

UCH-FC
Biotecnología
M 337
C. I.

LA SOBREPDUCCIÓN DE LOS GENES DE LA
MADURACIÓN DE LA MICROCINA E492 AUMENTA LA
ACTIVIDAD BACTERICIDA Y RETARDA LA FORMACIÓN DE
AGREGADOS DE TIPO AMILOIDE

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Facultad de Ciencias



por

MACARENA ANDREA MARÍN ARANCIBIA

2006

Director de tesis: Dra. ROSALBA LAGOS M.



“LA SOBREPDUCCIÓN DE LOS GENES DE LA MADURACIÓN DE LA MICROCINA E492 AUMENTA LA ACTIVIDAD BACTERICIDA Y RETARDA LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE TIPO AMILOIDE”

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

MACARENA ANDREA MARÍN ARANCIBIA.

Dra. Rosalba Lagos Mónaco
Directora de Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Octavio Monasterio Opazo
Co-Director de Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación de Seminario de Título

Dra. Margarita Carú Marambio
Presidente Comisión

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Corrector

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, Octubre 2006

*Dedico esta tesis a mi familia,
especialmente a mis padres y hermanos.*



Agradecimientos

Mi paso por la universidad ha dejado una huella profunda en mi persona. Por lo que quiero agradecer no sólo a quienes me ayudaron a llevar a cabo esta tesis, sino que a los que han ayudado a mi formación durante estos años.

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutora, la Dra. Lagos, quien a no obstante mi timidez demostró confianza en mí, lo que facilitó enormemente mi integración. A pesar de sus múltiples compromisos su puerta siempre estuvo abierta para cualquier problema o idea, que yo quisiera discutir. También quisiera agradecer al Dr. Monasterio, por sus comentarios constructivos y su interés por el trabajo científico. A todos mis compañeros de laboratorio, por estar siempre dispuestos a ayudar y por hacer del laboratorio un ambiente acogedor. Especialmente quiero agradecerle a mi amigo Mario Tello, por ayudarme a ver lo que es realmente importante y estar siempre tratando de hacerme ver un poco más allá de lo evidente, además por las innumerables horas de conversación, que hicieron mucho más ameno mi paso por el laboratorio.

En segundo lugar quiero agradecer a mis amigos. Tanto a los que conocí en esta etapa de mi vida, como a los que ya pertenecían a ella. Gracias Marcela por ser mi mejor amiga y esforzarte tanto por mantener nuestra amistad, a pesar de la falta de tiempo. A la Carla y al Andrés por todo el tiempo que compartimos, definitivamente sin ustedes dos, el estudio y mi paso por la universidad no hubiera sido los mismo, en gran medida ustedes son los responsables de lo feliz que fui aprendiendo todos estos años. A mis amigos de "en la pitilla" (incluida la barra) y a un charista, no creo que sepan cuanto han significado para mí estos últimos años. Ustedes me han marcado mucho, como ningún otro amigo lo había hecho antes.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, las personas más importantes en mi vida. Gracias por su apoyo y cariño. Le agradezco a mis padrinos y abuelos, especialmente a mi abuela Inés. Una de las personas que más admiro por su rectitud, inteligencia y la pasión con la que hace las



cosas. Papás los quiero y admiro más de lo que alguna vez podré decirles. Nunca podré agradecerles lo suficiente, la amistad y formación que me han dado. Creo que nunca se los he dicho, pero creo haber sido una persona feliz al menos estos años que he vivido. Para el final dejo a las dos personas más importantes en mi vida, mis dos hermanitos, Julio y Oscar. Las únicas personas en el mundo con las cuales puedo ser realmente yo.



Autobiografía



Como todo ser vivo nací, crecí y moriré en algún momento futuro. Mi vida no ha estado marcada por grandes sucesos y esto sumado a mi mala memoria dificulta la composición de una autobiografía.

A ver, que creo que es digno saber de mí. Primero que nací en San Felipe, tres veces gloriosa ciudad y cuna del ilustre club deportivo Unión San Felipe. Estudié en el Colegio Alemán de dicha ciudad, establecimiento ubicado en las inmediaciones de un cerro y con una privilegiada vista de la cuenca del río Aconcagua.

Incitada por mi padre, desde una temprana edad me inicié en el deporte, mi gran amor hasta el día de hoy. Soy una cabeza de músculo empedernida, he practicado cuanto deporte he podido. También por influencia paterna, me enamoré de la Universidad de Chile, primero del club deportivo, y luego de la casa de estudios. Al momento de decidir mi futuro académico, no tenía idea de que quería estudiar sólo sabía que mi *alma mater* sería la casa de Bello.

Por razones que aun yo misma desconozco terminé optando por la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, un nombre algo rimbombante para una carrera nueva, de 5 años de duración y en una facultad pequeña. Me dispuse a estudiar una carrera totalmente desconocida entre mi círculo de cercanos, y para la angustia de mi pobre progenitor, que desesperado me prometía su completo apoyo si no me gustaba la carrera y quería cambiarme al final del primer año.

No alcancé a notar como pasaron estos 5 años de mi vida, pero me encuentro hoy, un día domingo en la noche, tratando de escribir una autobiografía para mi tesis, mientras chateo y tomo té. Ah y por supuesto trato de buscar una foto, donde no me vea tan desfavorecida, para adjuntar a mi tesis.

Luchando contra el sueño encontré una idea de Miyamoto Musashi para finalizar mi autobiografía. Para quienes no lo conozcan, Musashi fue el guerrero más famoso del Japón feudal.

“Se dice que un guerrero sigue el doble *Camino de las Letras y de la Espada*, y que ha de practicar ambos Caminos. Incluso si un hombre no tiene una habilidad natural, puede ser un guerrero mediante la práctica perseverante de ambas divisiones del Camino.”



INDICE DE MATERIAS



INDICE DE MATERIAS	viii
INDICE DE TABLAS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiii
ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Bacteriocinas	1
1.2. Microcina E492	2
1.2.1 Origen y propiedades de la microcina E492	2
1.2.2 Determinantes genéticos del sistema productor de microcina	2
1.2.3 Mecanismo de acción de la microcina E492	5
1.2.4 Formación de agregados de tipo amiloide	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1. Materiales	9
2.1.1. Reactivos	9
2.1.2. Cepas bacterianas	10
2.1.3. Plasmidios y vectores	10
2.2. Métodos	10
2.2.1. Medios de cultivo	10
2.2.2. Técnicas Moleculares	13
2.2.3. Purificación de microcina E492	13
2.2.3.1. Purificación de microcina para ensayo de agregación	13
2.2.3.2. Purificación de microcina en fase estacionaria	14
2.2.4. Cuantificación de la microcina	14
2.2.5. Western Blot	14

2.2.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS)	14
2.2.5.2. WesternBlot	15
2.2.5.3. Electroquimioluminiscencia (ECL)	15
2.2.6. Detección y cuantificación de la actividad bactericida de la microcina E492	15
2.2.6.1. Detección de la actividad bactericida	15
2.2.6.2. Cuantificación de actividad bactericida mediante el método de la dilución crítica	16
2.2.6.3. Tratamiento de sobrenadantes para la determinación de la actividad bactericida	16
2.2.7. Curvas de crecimiento y actividad bactericida de cepas productoras	16
2.2.8. Determinación de la actividad formadora de canales iónicos <i>in vitro</i>	17
2.2.9 Ensayo de la actividad sobre esferoplastos	17
2.2.9.1 Preparación de esferoplastos	17
2.2.9.2 Ensayo de sensibilidad a microcina	18
2.2.10 Ensayo de agregación <i>in vitro</i>	18
2.2.10.1 Preparación de las muestras de microcina	18
2.2.10.2 Detección de la formación de agregados de tipo amiloide	18
2.2.10.2.1 Espectro de absorción de Rojo Congo (RC)	18
2.2.10.2.2 Espectro de emisión de fluorescencia de tioflavina T (ThT)	19
2.2.10.3 Cuantificación de la formación de agregados de microcina	19
2.2.10.3.1 Ensayo de unión a Rojo Congo (RC)	19
2.2.11 Ensayo de agregación <i>in vivo</i>	20
2.2.11.1 Detección de la formación de agregados de tipo amiloide	20
2.2.11.1.1 Digestión con Proteinasa K (PK)	20
2.2.12 Microscopía	20
2.2.12.1 Microscopía de fluorescencia	20



2.2.12.2 Microscopía electrónica de transmisión	20
3. RESULTADOS	21
3.1. Relación entre la dosis génica de los genes <i>mceC</i> , <i>mceI</i> y <i>mceJ</i> y actividad bactericida de la microcina E492	21
3.1.1 Mutantes en los genes responsables de la maduración la microcina, producen microcina inactiva	21
3.1.2 La cepa <i>E. coli</i> VCS(DE3)pJEM15 presenta una mayor actividad bactericida que la cepa <i>E. coli</i> VCS(DE3)pJAM434	23
3.1.3 El aumento en la dosis génica de los genes <i>mceC</i> , <i>mceI</i> y <i>mceJ</i> conduce a un aumento en la actividad bactericida	23
3.2. Relación entre la dosis génica de los genes <i>mceI</i> y <i>mceJ</i> y la pérdida de actividad bactericida en fase estacionaria de crecimiento	25
3.2.1 La microcina E492 pierde su actividad bactericida en fase estacionaria de crecimiento	25
3.2.2 El aumento en la dosis génica de los genes <i>mceI</i> y <i>mceJ</i> produce un incremento en la actividad bactericida de la microcina E492 y un retardo en la pérdida de actividad en fase estacionaria tardía	27
3.2.3 El aumento de la dosis génica del gen <i>mceC</i> retrasa la pérdida de actividad en fase estacionaria	29
3.2.4 Las diferencias en la actividad bactericida de la microcina E492 producida por las diferentes cepas no se deben a diferencias en la cantidad de proteína	29
3.3. Relación entre la dosis génica de los genes <i>mceAB</i> y la actividad bactericida	32
3.4. Relación entre la agregación <i>in vitro</i> de microcina E492 purificada a partir de cepas con distintas dosis génicas de los genes de maduración	34
3.4.1 Los agregados de microcina E492 son de tipo amiloide	34
3.4.2 Los agregados no poseen actividad bactericida sobre esferoplastos	36
3.4.3 Los agregados no forman canales iónicos en bicapas lipídicas	39



3.4.4 Los agregados de microcina están formados por microfibrillas	39
3.4.5 La forma activa de la microcina E492 tiene menor capacidad de agregación	46
3.5. Formación de agregados de microcina <i>in vivo</i>	48
3.5.1 La microcina E492 forma agregados <i>in vivo</i>	48
4. DISCUSIÓN	52
5. CONCLUSIONES	59
6. REFERENCIAS	60



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis	11
Tabla 2.	Plasmidios y vectores utilizados en este trabajo	12
Tabla 3.	Diámetros de las fibras formadas por diferentes preparaciones de microcina E492 agregada	45
Tabla 4.	Actividad bactericida de sobrenadantes de cultivos de cepas productoras de microcina E492	50



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de los determinantes genéticos del sistema productor de microcina E492	4
Figura 2.	Modelo de la producción y acción de microcina E492 activa	7
Figura 3.	Ensayo de la actividad bactericida de diferentes cepas de <i>E. coli</i> que portan el sistema de microcina E492	22
Figura 4.	Disposición de los determinantes genéticos del sistema de microcina E492 en pJEM15 y pJAM434	24
Figura 5.	Curvas de crecimiento y de actividad bactericida de cepas productoras de microcina	26
Figura 6.	Curvas de actividad bactericida de cepas que coexpresan los genes <i>mceI</i> y <i>mceJ</i>	28
Figura 7.	Curvas de actividad bactericida de cepas que coexpresan el gen <i>mceC</i>	30
Figura 8.	Preparaciones de microcina E492 a partir de cultivos en fase logarítmica y estacionaria tardía de crecimiento	31
Figura 9.	Curvas de actividad bactericida de cepas que coexpresan los genes <i>mceA</i> y <i>mceB</i>	33
Figura 10.	Espectro de absorción de rojo congo unido a microcina E492	35
Figura 11.	Espectro de emisión de fluorescencia de ThT unida a microcina E492	37
Figura 12.	Ensayo de sobrevivencia de esferoplastos de <i>E. coli</i> BL21 utilizando microcina E492 agregada	38

Figura 13.	Registro de corriente de bicapas tratadas con muestras de microcina E492	40
Figura 14.	Microscopía de fluorescencia de agregados de microcina E492 incubados con rojo congo	41
Figura 15.	Microscopía de fluorescencia de agregados de microcina E492 incubados con tioflavina T	42
Figura 16.	Micrografía electrónica de diferentes preparaciones de microcina E492 en buffer de agregación	44
Figura 17.	Cuantificación de la agregación de microcina purificada a partir de diferentes cepas productoras mediante ensayo de unión a rojo congo	47
Figura 18.	Formación de agregados amiloide <i>in vivo</i> .	49
Figura 19.	Análisis de la secuencia aminoacídica de la microcina y determinación de posibles secuencias amiloidogénicas	56
Figura 20.	Modelo de la formación de fibras amiloide según la fase del crecimiento	58

ABREVIATURAS

A	absorbancia
aa	aminoácidos
Amp	ampicilina
APS	persulfato de amonio
bp	pares de bases
Cit	citrato
Cm	cloranfenicol
Da	Dalton
Glc	glucosa
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranosido
Kan	kanamicina
Kb	kilobases
LB	caldo Luria
MccE492	microcina E492
MES	ácido 2-N(morfolino)etanosulfónico
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pI	punto isoelectrico
PC	fosfatidilcolina
PIPES	piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etano sulfónico)
POPE	palmitoil oleoilfosfatidiletanolamina
RC	Rojo Congo
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamino
TFA	ácido trifluoroacético
ThT	Tioflavina T
Tricina	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	ultra violeta
UFC	unidad formadora de colonias
β -MeOH	beta mercaptoetanol
λ	longitud de onda

Resumen

La microcina E492 es un péptido antibiótico de 7,9 kDa producido por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 que mediante la formación de canales iónicos produce la despolarización de la membrana citoplasmática de las bacterias sensibles a esta bacteriocina.

Esta microcina presenta la particularidad de ser producida en forma activa sólo durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano, a diferencia de otras microcinas descritas, que son producidas principalmente durante la fase estacionaria. El decaimiento de la actividad bactericida en fase estacionaria de crecimiento se correlaciona con la aparición de agregados de tipo amiloide y con la disminución en la tasa de transcripción de los genes *mceJI*, cuyos productos génicos están involucrados en el proceso de maduración de la microcina.

En esta tesis se abordó el estudio de la relación entre la expresión de los genes *mceJI*, la producción de microcina E492 activa y la formación de agregados amiloides. Se demostró que un aumento en la dosis génica de los genes de la maduración conduce a un aumento en la actividad bactericida y a un retardo en la pérdida de actividad en fase estacionaria de crecimiento. En cambio, el aumento en la dosis génica de los genes *mceAB* (gen estructural y de la inmunidad) produce una disminución en la actividad bactericida de la microcina y un aumento en la agregación.

Se estableció que la agregación *in vitro* de la microcina depende inversamente de la capacidad de producir microcina activa de la cepa productora. Los agregados formados se caracterizaron bioquímica, electrofisiológica y microscópicamente, determinándose que estos agregados no presentan actividad bactericida sobre esferoplastos, no forman canales iónicos en bicapas lipídicas y forman filamentos de tipo amiloide.

Los resultados de esta tesis sugieren que no sólo la secuencia aminoacídica de la microcina afecta su capacidad de agregarse, sino que también su estado de maduración. En conclusión, la capacidad de la bacteria de producir dos formas de microcina permite modular la agregación de esta proteína y de esta manera controlar su actividad bactericida.

Abstract

Microcin E492 is an antibiotic peptide of 7.9 kDa produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492 that induces, by forming ion channels, depolarization of the cytoplasmic membrane on sensitive cells.

This microcin presents the particularity of being produced in an active form only during the exponential phase of bacterial growth, unlike others that are produced mainly during the stationary phase. The decay of the bactericidal activity in stationary phase of growth is correlated with a diminution in the rate of transcription of the genes *mceJl*, whose genic products are involved in the maturation process of the microcin, and also in the appearance of amyloid-like aggregates.

The relationship between the expression of the genes *mceJl*, the production of active microcin E492 and the amyloid aggregates formation was studied in this thesis. It was demonstrated that an increase in the genetic dose of the maturation genes leads to an increase on the bactericidal activity and a delay in the loss of activity in the stationary phase. On the other hand the increase in the genetic dose of *mceAB* genes (microcin and the immunity genes) produces a diminution in the bactericidal activity of microcin and an increase in the aggregation.

It was established *in vitro* that the aggregation of the microcin inversely depends on the capacity to produce active microcin of the producing strain. The aggregates were characterized biochemically, electrophysiologically and microscopically. It was determined that these aggregates do not present bactericidal activity on spheroplasts, do not form ion channels in lipidic bilayers and form amyloid-like fibrils. The results of this thesis suggest that not only the amino acid sequence of microcin affects the capacity of aggregation, but also the maturation

state. In conclusion, the capacity of the bacteria to produce two forms of microcin allows aggregation modulation and in this way to control the bactericidal activity.

1. Introducción

1.1 Bacteriocinas

En el medio ambiente las bacterias no se encuentran aisladas sino que forman parte de complejas comunidades microscópicas. Estas comunidades son dinámicas y dependen de las interacciones entre sus componentes. Los nutrientes y los nichos generalmente son escasos, generando una presión selectiva. Algunas bacterias producen antibióticos para eliminar a potenciales competidores. Cuando estos antibióticos son de naturaleza proteica, reciben el nombre de bacteriocinas (Riley y Wertz, 2002).

Las bacteriocinas son producidas tanto por bacterias gram positivas como por gram negativas y son secretadas al medio extracelular, lugar donde ejercen su acción. Estos antibióticos presentan un reducido rango de acción, pues sólo afectan a microorganismos de la misma especie o especies relacionadas (Riley y Wertz, 2002). Los mecanismos bactericidas de las bacteriocinas son muy variados. Algunas poseen actividades enzimáticas del tipo endodesoxiribonucleasa o endoribonucleasa, otras 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 (Braun y col., 2002).

Las bacteriocinas se clasifican principalmente en dos grandes grupos: las producidas por bacterias gram positivas y las producidas por bacterias gram negativas. Las bacteriocinas producidas por enterobacterias gram negativas se clasifican en colicinas y microcinas. Las colicinas presentan tamaños que varían entre los 25-70 kDa y están codificadas en plásmidos. En su mayoría son producidas por cepas de *E. coli*, y su expresión es regulada por el sistema SOS (Lazdunski, 1988; Pugsley, 1984). Las microcinas por otra parte, poseen una masa molecular inferior a 10 kDa, y su actividad es regulada por sus propios sistemas de

maduración y exportación, en forma independiente del sistema SOS. El sistema de exportación permite la viabilidad de las células productoras (Baquero y Moreno, 1984; Kolter y Moreno, 1992; Braun y col, 2002), pues a diferencia de las colicinas no se liberan por lisis celular. Las microcinas son resistentes a algunas proteasas, condiciones de pH extremas, altas temperaturas y son solubles en metanol (de Lorenzo, 1984; Baquero y Moreno, 1984).

En esta tesis se utilizó como modelo de estudio a la microcina E492.

1.2 La microcina E492

1.2.1 Origen y propiedades de la microcina E492

La microcina E492 es activa contra cepas pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Erwinia* (de Lorenzo, 1984). Originalmente fue aislada a partir de cultivos de *K. pneumoniae* cepa RYC492 (de Lorenzo, 1984) y presenta la particularidad de ser producida en forma activa sólo durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano (de Lorenzo y col., 1984; Orellana y Lagos 1996), a diferencia de otras microcinas descritas que son producidas principalmente durante la fase estacionaria.

La microcina E492 es un péptido hidrofóbico que presenta un pI de 3,8 y posee una masa molecular de 7886 Da. (Lagos y col., 1999) y al igual que otras microcinas es resistente al tratamiento con tripsina, a condiciones de pH ácido y a temperaturas sobre los 90 °C

1.2.2 Determinantes genéticos del sistema productor de microcina

Los determinantes genéticos implicados en la síntesis, maduración, procesamiento, exportación e inmunidad de la microcina E492 están contenidos en un segmento de 13 kb del cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492 (Wilkens y col., 1997). Estos determinantes fueron clonados y expresados en *E. coli*, permitiendo la

obtención de una microcina de idénticas propiedades bioquímicas y electrofisiológicas a la producida por *K. pneumoniae* RYC492 (Wilkens y col., 1997).

El análisis de la secuencia de DNA permitió definir un mínimo de 10 marcos abiertos de lectura, esquematizados en la figura 1. Mediante mutagénesis al azar con el transposón Tn5 se identificaron los genes necesarios para la producción de microcina activa (Lagos y col. 2001), que participarían en procesos de maduración, procesamiento y exportación de la microcina E492.

Estos genes se ordenan en 6 unidades transcripcionales. La primera unidad transcripcional corresponde a los genes *mceA* y *mceB*. El gen *mceA* corresponde al gen estructural de la microcina E492. Este gen codifica para una pre-proteína que es procesada al momento de su exportación en su extremo amino terminal produciendo una proteína madura de 84 aminoácidos (Lagos y col., 2001). El gen *mceB* codifica para una proteína de 95 aminoácidos que confiere inmunidad ante la microcina E492 (Lagos y col., 1999).

Los genes *mceC*, *mceI* y *mceJ* están involucrados en el proceso de maduración de la microcina E492 (Lagos y col., 2001). El gen *mceC* codifica para una proteína de 370 aminoácidos, homóloga a una glicosiltransferasa, el gen *mceI* para una proteína de 163 aminoácidos con homología a una aciltransferasa, en tanto que el gen *mceJ* codifica para una proteína de 524 aminoácidos sin homólogo conocido (Lagos y col., 2001). Estudios de la regulación transcripcional de estos genes revelaron que la unidad *mceJI* se transcribe en fase exponencial de crecimiento, en tanto el gen *mceC* se transcribe tanto en fase exponencial como en fase estacionaria (Corsini y col., 2002).

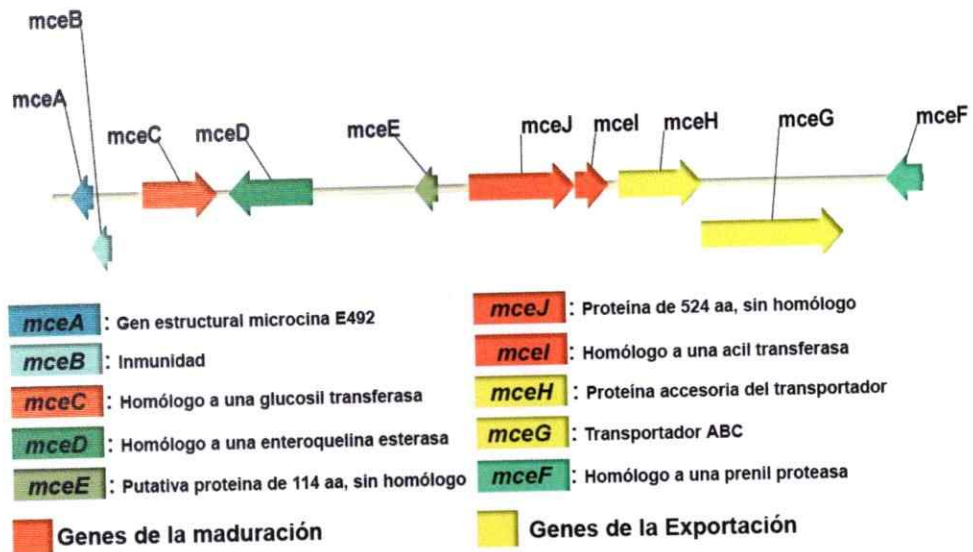


Figura 1. Esquema de los determinantes genéticos del sistema productivo de microcina E492. Se representa con flechas la orientación de los 10 marcos abiertos de lectura dentro del fragmento de 12559 pb, que contiene al sistema productivo de microcina E492 con la conformación que presenta en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae*. También se indican sus funciones u homologías. En rojo se encuentran aquellos implicados en el proceso de maduración y en amarillo aquellos implicados en la exportación. El gen estructural de la microcina y su inmunidad están en tonos azules. Los genes en verde aún no tienen una función definitiva asignada. aa: aminoácidos.

El gen *mceD* codifica para una proteína de 414 aminoácidos, homóloga a una enteroquelina esterasa. Mutantes en el gen *mceD* producen microcina activa, desconociéndose la función de este gen en la producción de microcina activa. El gen *mceE* codifica para una proteína de 114 aminoácidos y no tiene homólogo identificable.

Los genes *mceH* y *mceG* están involucrados en la exportación de microcina E492 y constituyen una unidad transcripcional. El gen *mceH* codifica para una proteína de 413 aa, correspondiente a la proteína accesoria del sistema de exportación. El gen *mceG* codifica para una proteína de 698 aminoácidos, que tiene una alta identidad con los transportadores ABC del sistema de exportación de tipo I (Lagos y cols., 2001).

El gen *mceF* es el último gen del sistema productor de microcina y codifica para una proteína emparentada con una familia de enzimas prenil proteasas de eucariontes.

1.2.3 Mecanismo de acción de la microcina E492

La microcina E492 ingresa al periplasma de la bacteria a través de los receptores de sideróforos catecólicos FepA, Fiu y Cir (Strahsburger y cols., 2005). La proteína TonB es necesaria para la acción de la microcina E492 en la membrana interna (Pugsley y cols., 1986), pues esferoplastos producidos a partir de cepas TonB⁻ son resistentes a la microcina E492 (Baeza, 2003). El reconocimiento de la microcina por parte de los receptores sería en parte mediado por una molécula tipo salmoquelina unida covalentemente a la serina 84 del extremo C-terminal de la microcina (Thomas y cols., 2004). Esta modificación sólo afecta a una pequeña fracción, aproximadamente el 15% de la microcina sintetizada, por lo cual el reconocimiento de la microcina no modificada posiblemente es a través de otra interacción.

Una vez en el interior de la célula blanco, el mecanismo de acción de esta microcina consiste en la despolarización de la membrana interna (de Lorenzo y Pugsley, 1985), producto de la formación de canales, hecho que se infiere por su capacidad de formar canales iónicos en bicapas lipídicas (Fig. 2) (Lagos y col., 1993).

La producción de microcina activa implica un complejo sistema de control, que involucra la regulación de la expresión de las proteínas de maduración, una modificación post-traducciona, antagonismo con enteroquelina (Orellana y Lagos, 1996) e inactivación por agregación (Bieler y col., 2005).

1.2.4 Formación de agregados de tipo amiloide

Los agregados amiloides corresponden a estructuras filamentosas de proteínas que están asociadas a una amplia gama de enfermedades. Están compuestos por láminas β , independiente de la estructura secundaria del precursor. Las láminas β son estabilizadas por la anfipaticidad dada por un patrón binario de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en la secuencia de la proteína. Una proteína bajo condiciones amiloidogénicas inicialmente permanece soluble (fase "lag"), pero lentamente comienza a ser ensamblada en un proceso cooperativo. El retraso inicial puede ser acortado adicionando proteína previamente agregada (Miranker, 2005).

Como ya se mencionó, las fibras amiloides están asociadas a variadas enfermedades, entre ellas el Alzheimer y la diabetes tipo II. Sin embargo, en el último tiempo, se ha encontrado que estas fibras cumplen funciones fisiológicas. Por ejemplo, depósitos de agregados amiloides de la proteína curli de *E. coli* sirven de sustrato en la formación de biopelículas (Miranker, 2005; Chapman et col., 2002).

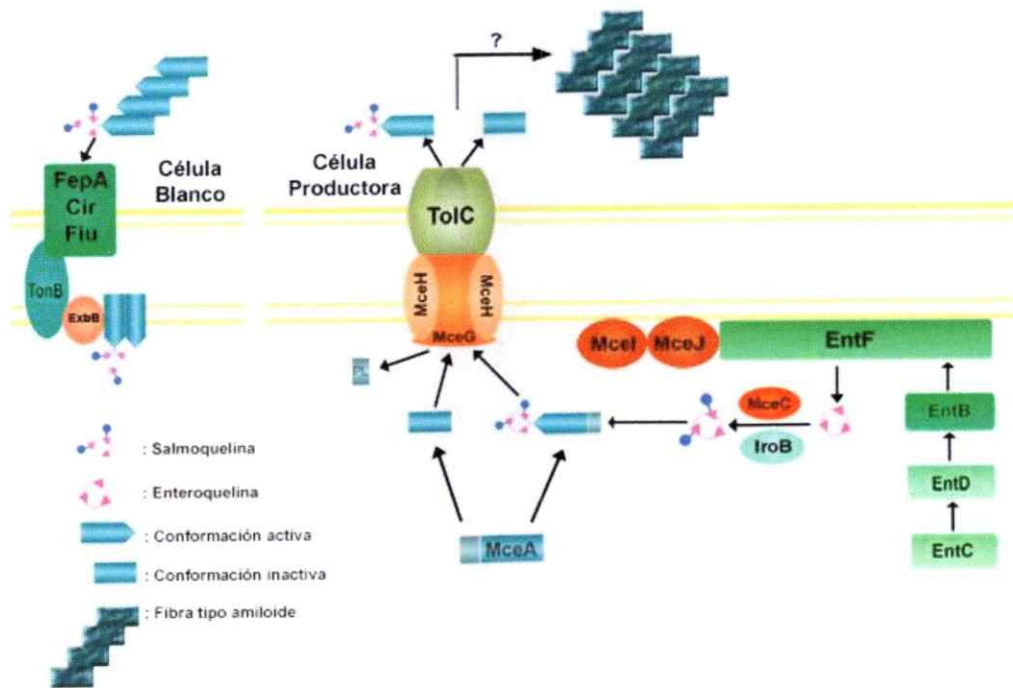


Figura 2. Modelo de la producción y acción de microcina E492 activa. La microcina E492 se sintetiza como una preproteína, que puede sufrir o no un proceso de maduración. Éste consiste en la unión de una molécula tipo salmoquelina al extremo C-terminal. En este proceso participarían las proteínas MceC, MceI, MceJ y posiblemente EntF. Luego, tanto la forma modificada como la no modificada son exportadas al medio extracelular, después del corte proteolítico que remueve el péptido líder. En la célula blanco interactúa con los receptores FepA, Cir y Fiu, ingresando a la membrana interna en un proceso dependiente de TonB, donde forma canales.

La microcina E492 forma agregados de tipo amiloide *in vitro* e *in vivo* (Bieler y col., 2005). La formación de estos agregados se correlaciona con la pérdida de actividad en fase estacionaria y con la disminución de la expresión de los genes *mceJI*. Con estos antecedentes se planteó que la formación de fibras amiloides *in vivo* por parte de la microcina elimina su actividad bactericida (Bieler y col., 2005).

En esta tesis se abordará el estudio de la relación entre la expresión de los genes *mceJI*, la producción de microcina E492 activa y la formación de agregados amiloides. Como hipótesis se planteó que la agregación de la microcina depende de la proporción de microcina no modificada secretada por la cepa productora. Para determinar esto, nos planteamos como objetivos:

- Cambiar la proporción de microcina modificada post-traduccionalmente versus la no modificada producida por cepas productoras de microcina. Ya sea coexpresando los genes *mceJIC*, de modo de aumentar la proporción de microcina modificada o coexpresando los genes *mceAB*, de manera de aumentar la proporción de microcina no modificada.
- Caracterizar bioquímica, microscópica y electrofisiológicamente los agregados de microcina E492.
- Determinar la capacidad de agregación *in vitro* de la microcina E492.
- Determinar la formación *in vivo* de agregados de la microcina E492.

Materiales y Métodos

2.1. Materiales.

2.1.1 Reactivos

La 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, tiamina, ácido-trifluoroacético (TFA), MES, lisozima, proteinasa K, ácido p-cumárico, rojo congo y tioflavina T se compraron en Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O., USA.

El POPE y la fosfatidilcolina (PC) se compraron en Avanti Lipids, 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.

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

El azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, acetonitrilo, cloruro de calcio, sacarosa 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 pb, se compraron en Winkler, Santiago, Chile.

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

Los reactivos de grado técnico: ácido acético, etanol, metanol, 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 tetraciclina en el Laboratorio Benguerel Ltda., Chile.

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

La ampicilina y el piperacilina se compraron en US Biological, Swampscott, MA, USA.

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

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

2.1.2 Cepas Bacterianas

En la tabla 1 se describen las cepas bacterianas utilizados en este trabajo.

2.1.3 Plasmidios y vectores

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

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.

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 tonA53</i> Δ (<i>thyA57</i>)]	Stratagene
VCS257(DE3)	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 tonA53</i> Δ (<i>thyA57</i>)] con DE3, un profago λ que porta el gen de la polimerasa del T7.	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 gal [dcm] [lon] hsdSB</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) con DE3, un profago λ que porta el gen de la polimerasa del T7.	Novagen

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
pJAM434	Derivado de pJAM229, posee un fragmento interno <i>Xho</i> 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>Sal</i> I. Es un sobreproductor de <i>mccE492</i> activa. Amp ^r	Wilkens y cols., 1997
np133	pJAM434 <i>mceC</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Colección Laboratorio
np205	pJAM434 <i>mceI</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Colección Laboratorio
np221	pJAM434 <i>mceJ</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Colección Laboratorio
npB4	pJEM15 <i>mceC</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Colección Laboratorio
npE7	pJEM15 <i>mceI</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Colección Laboratorio
npF2	pJEM15 <i>mceJ</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Colección Laboratorio
pT7-IJ	Derivado de pACYC184, contiene en su sitio <i>EcoRV</i> los genes <i>mceIJ</i> bajo el promotor de T7. Cm ^r	Colección Laboratorio
pT7-C	Derivado de pACYC184, contiene en su sitio <i>EcoRV</i> el gen <i>mceC</i> bajo el promotor de T7. Cm ^r	Colección Laboratorio
pT7-AB	Derivado de pACYC184, contiene en su sitio <i>EcoRV</i> los genes <i>mceAB</i> bajo el promotor de T7. Cm ^r	Colección Laboratorio

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

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

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* BL21 (sensible a la microcina E492) crecido hasta fase estacionaria.

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

2.2.2 Técnicas moleculares.

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, PCR, etc., se realizaron utilizando métodos estandarizados (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1992).

2.2.3 Purificación de microcina E492.

2.2.3.1 Purificación de microcina para ensayo de agregación.

Se crecieron cultivos en medio mínimo M9 suplementado con glucosa y citrato de sodio al 0,2% a 37 °C con agitación hasta una A_{600} de 1,5. 1l de sobrenadante de cultivo fue pasado a través de una columna de fase reversa Sep-Pak C18 (Waters). La columna fue lavada con 3 ml de metanol 65% y 3 ml de

acetonitrilo 25%. La microcina fue eluida con 3 ml de acetonitrilo 50%.

2.2.3.2 Purificación de microcina en fase estacionaria.

Se crecieron cultivos de las cepas con agitación y a 37 °C durante 17h (fase estacionaria temprana) y 48h (fase estacionaria tardía) en medio mínimo M9 suplementado. 500 ml de sobrenadante de cultivo fue pasado por una columna de fase reversa Sep Pack C8 (Waters). La columna fue lavada 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 Cuantificación de la microcina.

La microcina obtenida a partir de las purificaciones fue cuantificada mediante el kit Micro BCA protein assay (Pierce), según las recomendaciones del fabricante.

2.2.5 Western Blot.

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

Los geles fueron preparados con tres fases: separadora, espaciadora y concentradora. El gel separador consistió en 16,5% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1% y glicerol al 10%. El gel espaciador consistió en 10% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1%. El gel concentrador contenía 3% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5; SDS 0,1%. A cada una de estas soluciones se les agregó 0,033% de APS y 2,2 mM de TEMED. Para estos geles la solución de corrida para el cátodo fue 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. El acetonitrilo de las muestras fue evaporado mediante un concentrador CentriVap(Labconco), y luego se agregó 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 en termoblock a 95 °C durante 3 min y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE.

2.2.5.2 WesternBlot.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h a 100 V y -20 °C empleando amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20%) previamente enfriado. La membrana fue bloqueada con leche al 5% en TS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, Tween 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente, luego incubada con anticuerpo primario policlonal de conejo contra el fragmento C-terminal de la microcina E492 [SGSGYNSATSSSGSGS] (dilución 1:1.000) durante 2h, lavadas con buffer TS-Tween, incubadas con un anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:20.000) durante 2h, y revelada por electroquimioluminiscencia.

2.2.5.3 Electroquimioluminiscencia (ECL).

La membrana fue revelada en 10 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8,5, con 50 µl de luminol 250 mM (preparado en DMSO) y 22 µl de ácido p-cumárico 90 mM (preparado en DMSO). La reacción de quimioluminiscencia se inició agregando 3 µl de peróxido de hidrógeno. La membrana se expuso entre 5 s y 2 min, dependiendo de intensidad de la señal obtenida.

2.2.6 Detección y cuantificación de la actividad bactericida de la microcina E492.

2.2.6.1 Detección de la actividad bactericida.

La detección de la actividad bactericida se realizó picando colonias o depositando sobre una placa de césped una alícuota de 3 µl 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 por la aparición de halos de inhibición de crecimiento sobre el césped de la cepa sensible *E. coli* BL21.

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

Para la cuantificación de la actividad bactericida de la microcina se realizaron diluciones seriadas de las muestras en agua nanopura estéril, pudiendo ser estas diluciones en base 2 o en base 3. Se tomaron alícuotas de 3 µl 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 se determinó el título de la muestra en unidades arbitrarias (U.A.), definidas como el inverso de la dilución del último tubo cuya alícuota es capaz de producir un halo de inhibición de crecimiento sobre una placa de césped sensible de la cepa *E. coli* BL21.

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

También se determinó y cuantificó la actividad bactericida de la microcina a partir de los sobrenadantes de cultivos de cepas productoras. Para evitar que células viables interfirieran en la determinación, éstas fueron eliminadas de los sobrenadantes mediante un tratamiento con cloroformo. Se centrifugó los cultivos durante 10 min a 7.000 rpm y a 800 µl del sobrenadante se les agregó 30 µl de cloroformo, se agitó con vortex por 10 s y se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 10 min. Se utilizó la fase superior para la detección de la actividad bactericida.

2.2.7 Curvas de crecimiento y actividad bactericida de cepas productoras.

Las curvas de crecimiento y las de actividad bactericida de las cepas productoras de microcina fueron construidas a partir de cultivos crecidos a 37 °C y

220 rpm en 200 ml de medio mínimo M9 suplementado con glucosa y citrato de sodio al 0,2%. En los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 2 ml de cultivo para medir la A_{600} en un espectrofotómetro LKB Ultrospec 4050 (Biochrom), y para determinar la actividad bactericida del sobrenadante tratado.

2.2.8 Determinación de la actividad formadora de canales iónicos *in vitro*.

Las bicapas se formaron usando una mezcla 4:1 de palmitoil oleoilfosfatidiletanolamina (POPE) y fosfatidilcolina (PC) con una concentración final de 20 mg/ml en decano (Lagos *et al.*, 1993). La membrana separó dos compartimentos acuosos de 0,1 M KCl, 0,01 M ácido 2-N(morfolino)etanosulfónico (MES)-KOH, pH 6,7. Uno de los compartimentos (lado *cis*) fue conectado a una fuente de poder que permitió la aplicación de potenciales desde 0 a \pm 200 mV. El flujo de corriente a través de la membrana, como resultado del potencial aplicado, fue medido por un transductor de corriente-voltaje conectado al otro compartimiento (lado *trans*). La corriente se registró en un osciloscopio y se grabó para análisis posteriores. La microcina se adicionó directamente sobre la membrana en el compartimiento *cis*.

2.2.9 Ensayo de la actividad sobre esferoplastos.

2.2.9.1 Preparación de esferoplastos.

Los esferoplastos se prepararon de acuerdo al método descrito por Weiss (1976). La cepa sensible *E. coli* BL21(DE3) se creció en 100 ml de medio mínimo M9 suplementado con glicerol al 0.5% p/v hasta una A_{600} de 0,4. Las células se colectaron por centrifugación a 7.000 rpm durante 5 min, se lavaron 2 veces con 20 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y se resuspendieron en 20 ml de Tris-HCl 100mM sacarosa 20% p/v, pH 8,0. Se adicionó lentamente 2 ml de una solución de EDTA 0,1 M, pH 8,0, y se incubó durante 15 min. Se agregó, manteniendo una agitación

constante, 1 ml de una solución de lisozima (2 mg/ml), y se incubó la mezcla nuevamente durante 15 min. La cantidad de esferoplastos se determinó por la disminución del título celular después de diluciones en agua nanopura.

2.2.9.2 Ensayo de sensibilidad a microcina.

Se incubaron alícuotas de 100 μ l de esferoplastos con 100 μ l de muestra de microcina agregada o soluble durante 20 min a 37 °C. Se sembraron diluciones seriadas sobre placas agar-LB y el título celular fue determinado mediante el conteo de las UFC. El porcentaje de supervivencia de los esferoplastos se estimó respecto del control sin tratamiento con microcina.

2.2.10 Ensayo de agregación *in vitro*.

2.2.10.1 Preparación de las muestras de microcina.

Se concentraron muestras de microcina mediante concentrador CentriVap (Labconco), se llevó el pH de éstas a 8,0 adicionando NaOH y fueron incubadas a 37 °C durante 15 min. Posteriormente, para asegurar la eliminación de los agregados preexistentes, las muestras fueron centrifugadas a 16.000 g durante 30 min a 4 °C. Se determinó la concentración de proteína de las muestras tratadas con el kit Micro BCA protein assay (Pierce). Posteriormente, las muestras se diluyeron hasta alcanzar una concentración final de 400 μ g/ml en buffer de agregación (10mM PIPES-NaOH, pH 6,5; 0,5 M NaCl) y se incubaron con agitación a 37 °C durante 15 h.

2.2.10.2 Detección de la formación de agregados de tipo amiloide.

2.2.10.2.1 Espectro de absorción de Rojo Congo (RC).

Para el análisis espectral, la microcina agregada fue obtenida incubando la proteína (400 μ g/ml) en buffer de agregación a 37° C a 220 rpm durante 15 h. Las

muestras fueron incubadas con 22 μ M RC durante 15 min a 37° C y luego la absorbancia fue medida entre 400 y 700 nm con un espectrofotómetro de arreglo de diodos 8452A (HP). El espectro de RC unido fue obtenido restando el espectro de microcina del espectro de microcina en presencia de RC. El espectro de RC libre fue obtenido restando el espectro del buffer utilizado del espectro de RC en este mismo buffer.

2.2.10.2 Espectro de emisión de fluorescencia de Tioflavina T (ThT).

El análisis espectral de la microcina agregada se llevo a cabo midiendo la fluorescencia en un espectrofluorímetro LS50 (Perkin Elmer). Las muestras fueron sonicadas (5 ciclos de un pulso de 30 s seguido por una pausa de 1 min) en un sonicador 3000 (misonix) y posteriormente diluidas a la mitad en glicina 100 mM pH 9,5. Se agregó tioflavina T (ThT) hasta una concentración final de 5 μ M y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se fijó la longitud de onda de excitación a 430 nm y se registraron las longitudes de onda de emisión desde los 440nm hasta los 700 nm. El ancho de banda utilizado fue de 4 tanto para la emisión como para la excitación.

2.2.10.3 Cuantificación de la formación de agregados de microcina.

2.2.10.3.1 Ensayo de unión a Rojo Congo (RC).

La formación de amiloide mediante el ensayo de unión a RC fue cuantificada mediante la disminución de RC libre. Las muestras de microcina fueron incubadas con RC 22 μ M durante 15 min a 37 °C y centrifugadas a 16.000 g durante 15 min a 4 °C. La absorbancia de los sobrenadantes fue registrada a 490 nm. La fracción de RC libre fue determinada a partir de la comparación con la absorbancia de la muestra sin proteína.

2.2.11 Ensayo de agregación *in vivo*.

2.2.11.1 Detección de la formación de agregados de tipo amiloide.

2.2.11.1.1 Digestión con Proteinasa K (PK).

La formación de agregados de microcina *in vivo* fue detectada mediante digestión con PK. 100 µl de sobrenadantes de cultivos crecidos en medio LB-PIPES, (LB en amortiguador con PIPES-NaOH 100 mM, pH 6,5) fueron incubados durante 15 min a 37° C con PK (3 µM). Luego, la PK fue inactivada incubando las muestras con buffer de carga y calentándolas durante 10 min a 95° C. La resistencia o sensibilidad a PK fue detectada mediante Western Blot.

2.2.12 Microscopía.

2.2.12.1 Microscopía de fluorescencia.

Muestras de microcina agregada fueron teñidas de manera independiente con RC 22 µM durante 15 min a 37 °C y con ThT 5 µM durante 10 min a temperatura ambiente. Luego fueron aplicadas sobre un cubreobjeto y se secaron. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia LSM 410 (Zeiss).

2.2.12.2 Microscopía electrónica de transmisión.

Las muestras de microcina se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% durante 2 min sobre grillas de 300 mesh revestidas de carbón, y se examinaron en un microscopio electrónico JEOL JEM-100SX.

3. Resultados:

3.1. Relación entre la dosis génica de los genes *mceC*, *mceI* y *mceJ* y actividad bactericida de la microcina E492.

3.1.1 Mutantes en los genes responsables de la maduración la microcina, producen microcina inactiva.

Algunas mutantes en los genes de la maduración (*mceC*, *mceI*, *mceJ*) en el plasmidio pJAM434 habían sido caracterizados previamente en el laboratorio (Lagos y col., 2001; Corsini y col., 2002). Sin embargo, debido a que las cepas que portan el plasmidio pJEM15 crecen más rápidamente y producen una mayor cantidad de microcina, se buscaron mutantes en estos genes en una colección de mutantes por transposición del sistema productor de microcina JEM15, las cuales fueron seleccionadas por su incapacidad de formar un halo de inhibición de crecimiento sobre un césped de células sensibles (Fig. 3). Mediante análisis de restricción, complementación y PCR se determinó el sitio de inserción del transposón Tn5. La cepa *E. coli* VCS257(DE3)npB4 presenta la inserción en la posición 179 del gen *mceC*. La cepa *E. coli* VCS257(DE3)npF2 tiene interrumpido el gen *mceI* en la posición 365. Finalmente, la cepa *E. coli* VCS257(DE3)npE7 presenta la inserción en la posición 1452 del gen *mceJ*. El fenotipo encontrado fue el mismo observado con anterioridad para los mutantes en los genes de la maduración en el sistema JAM434 (Fig. 3). Concordantemente, la microcina purificada a partir de estos mutantes no presenta actividad bactericida.

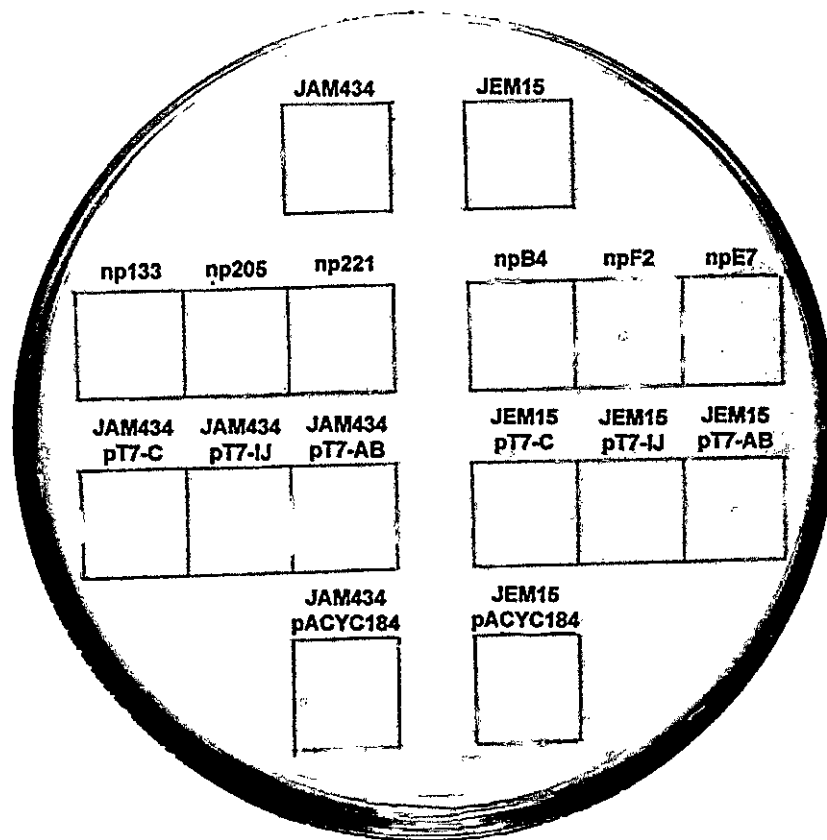


Figura 3. Ensayo de la actividad bactericida de diferentes cepas de *E. coli* que portan el sistema de microcina E492 . Colonias de las cepas que portan los plasmidios que se indican en los recuadros fueron picadas sobre un césped de la cepa sensible *E. coli* BL21. Las colonias picadas son representativas del total de colonias analizadas. A la izquierda de la figura se muestran las colonias con fondo genético VCS257(DE3)pJAM434, y a la derecha las colonias con fondo genético VCS257(DE3)pJEM15. Las cepas VCS257(DE3)np133, VCS257(DE3)np205 y VCS257(DE3)np221 corresponden a los mutantes del plasmidio pJAM434 en los genes *mceC*, *mceI* y *mceJ*, respectivamente. Las cepas VCS257(DE3)npB4, VCS257(DE3)npF2 y VCS257(DE3)npE7, son los equivalentes de estos mutantes en el plasmidio pJEM15. El plasmidio pACYC184 corresponde al plasmidio parental de las construcciones pT7-C, pT7-IJ y pT7-AB, construcciones que portan los genes *mceC*, *mceI* y *mceAB* bajo el control del promotor $\phi 10$ del fago T7.

3.1.2 La cepa *E. coli* VCS(DE3)pJEM15 presenta una mayor actividad bactericida que la cepa *E. coli* VCS(DE3)pJAM434.

La principal diferencia entre las construcciones pJEM15 y pJAM434 es el cambio en la orientación de un fragmento XhoI de 6,8 kpb, que porta los genes *mceJIHGF*. Este cambio causa que el promotor del gen *mceF* de pJAM434 comande la transcripción de los genes *mceJIGH* en la construcción pJEM15 (Fig. 4). En el laboratorio se ha determinado que la tasa de transcripción de los genes *mceIJ* es mayor en el caso de cepas que portan pJEM15 en comparación a cepas que portan pJAM434, por lo tanto los genes *mceIJ* en pJEM15 se encontrarían bajo el control de un promotor más fuerte. El cambio en la disposición de estos genes, y consecuentemente en la tasa de transcripción, produce un cambio en la actividad bactericida. La cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15 presenta un halo de inhibición de crecimiento mayor que la cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJAM434 (Fig. 3). La actividad ensayada a partir de purificaciones de microcina de estas cepas y directamente de sobrenadantes tratados también es mayor para la cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15.

3.1.3 El aumento en la dosis génica de los genes *mceC*, *mceI* y *mceJ* conduce a un aumento en la actividad bactericida.

Los genes involucrados en el proceso de maduración fueron clonados bajo el promotor $\phi 10$ del fago T7 en el plasmidio pACYC184 (número de copias intermedio). Las cepas *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15 y *E. coli* VCS257(DE3)pJAM434 fueron transformadas con los plasmidios pT7-C y pT7-IJ, portadores de los genes *mceC* y *mceIJ* respectivamente. Los transformantes presentan un aumento en el diámetro del halo de inhibición de crecimiento respecto a las cepas parentales y a los controles transformados sólo con el plasmidio pACYC184 (Fig. 3).

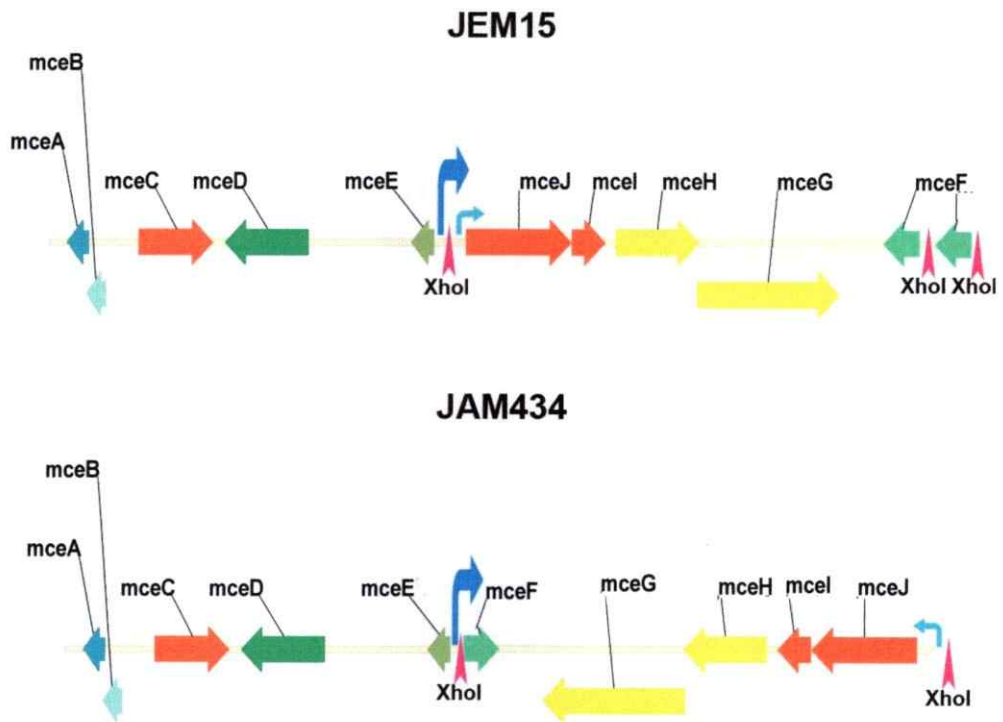


Figura 4. Disposición de los determinantes genéticos del sistema de microcina E492 en pJEM15 y pJAM434. En la figura se esquematizan las diferencias entre pJEM15 y pJAM434: la inversión del fragmento de 6,8kpb que porta a los genes *mceJIHGF* y la duplicación del gen *mceF* en pJEM15. Se representa con flechas en tonos azules a los promotores que controlan la transcripción de los genes *mceIJ* y *mceF*. En azul oscuro se muestra al promotor más fuerte y en celeste al promotor más débil.

Purificaciones de microcina y sobrenadantes obtenidos a partir de estas cepas transformantes también presentan una mayor actividad bactericida.

3.2. Relación entre la dosis génica de los genes *mceI* y *mceJ* y la pérdida de actividad bactericida en fase estacionaria de crecimiento.

La actividad bactericida de la microcina E492 está determinada por un complejo conjunto de factores, que abarcan la expresión de las proteínas involucradas en el proceso de maduración, el antagonismo con la enteroquelina y la agregación de la microcina. Estos factores provocan cambios en los patrones de actividad de la microcina a lo largo de las curvas de crecimiento de las cepas productoras.

3.2.1 La microcina E492 pierde su actividad bactericida en fase estacionaria de crecimiento.

Para estudiar este fenómeno se realizaron curvas de crecimiento y de actividad a partir de las cepas *E. coli* VCS257(DE3)pJAM434 y *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15. La actividad fue determinada a partir de sobrenadantes obtenidos de cultivos de dichas cepas. Con anterioridad se había observado que la actividad de la microcina aumenta en la primera parte de la fase exponencial de crecimiento hasta alcanzar un máximo (de Lorenzo, 1984; Orellana y Lagos, 1996). Luego, en fase estacionaria se produce un descenso en la actividad, llegando a desaparecer ésta en fase estacionaria tardía. Ambas cepas presentaron el mismo comportamiento, sin embargo, la cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15 presenta mayor actividad a lo largo de la curva de crecimiento (Fig.5).

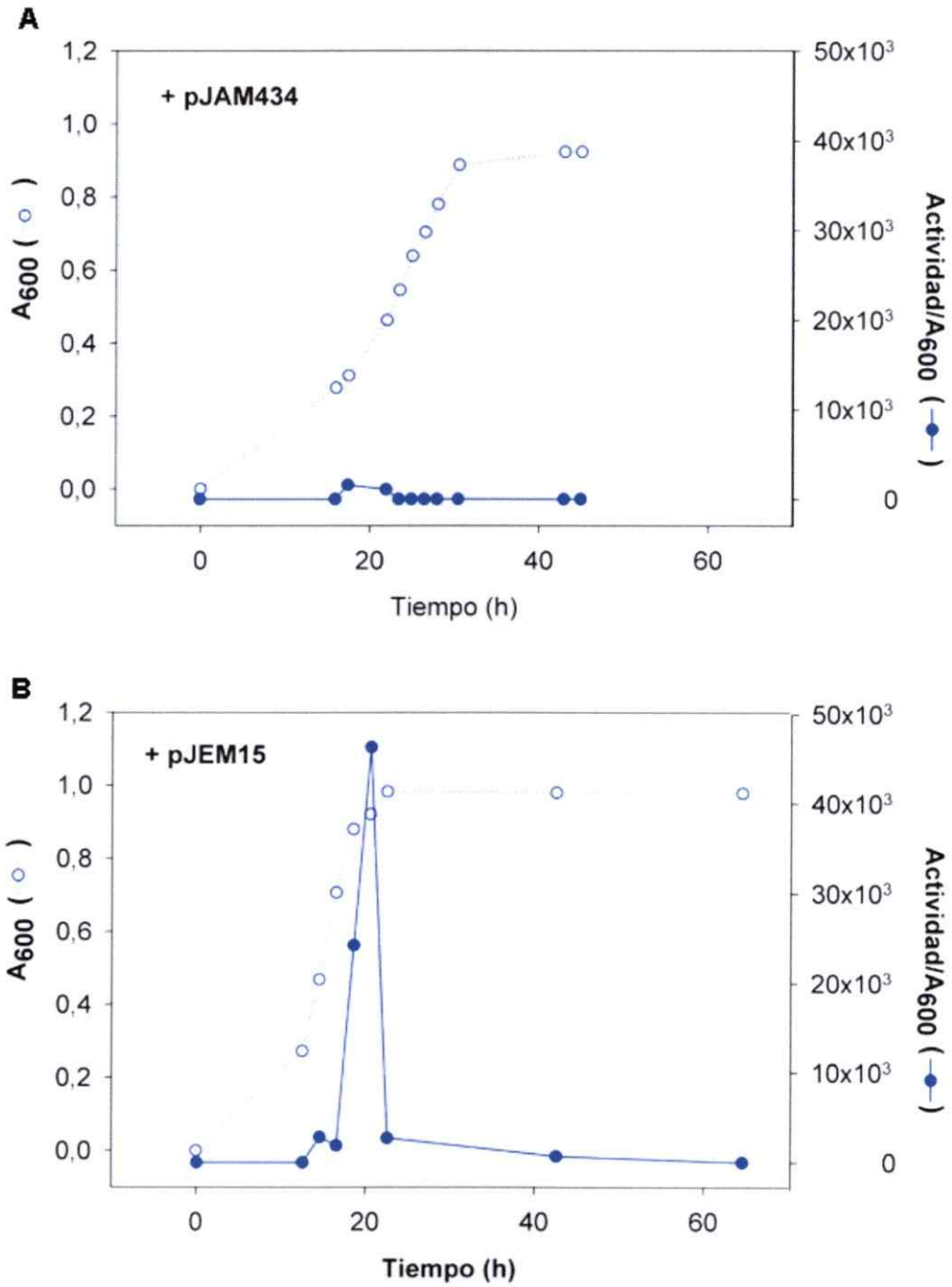


Figura 5. Curvas de crecimiento y de actividad bactericida de cepas productoras de microcina. Las curvas de actividad fueron normalizadas por la A₆₀₀ de la cepa *E. coli* VCS257(DE3) A) pJAM434 B) pJEM15. La actividad se midió en unidades arbitrarias (U.A.)/ml.

3.2.2 El aumento en la dosis génica de los genes *mceI* y *mceJ* produce un incremento en la actividad bactericida de la microcina E492 y un retardo en la pérdida de actividad en fase estacionaria tardía.

Mediante RT-PCR se determinó que la tasa de transcripción de los genes *mceI* y *mceJ* en el sistema JAM434 disminuye en fase estacionaria de crecimiento (Corsini, G. y col., 2002). Con el objetivo de aumentar la dosis génica de los genes *mceI* y *mceJ* y mantenerla constante durante toda la curva de crecimiento, se transformó la cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJAM434 con el plasmidio pT7-IJ. La actividad bactericida aumenta desde el inicio en la fase exponencial hasta llegar a un máximo antes de comenzar la fase estacionaria. La actividad bactericida es mayor en todos los puntos de la curva y se produce un retraso en la pérdida de actividad con respecto a la cepa parental (Fig. 6A).

En el caso de la cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-IJ hay un aumento de la actividad desde el inicio de la fase exponencial hasta llegar a un máximo en el final de esta fase. Posteriormente, hay un descenso en la actividad. Sin embargo en esta cepa la curva de actividad no es simétrica. La pérdida de actividad en fase estacionaria es considerablemente más lenta, y después de 65 horas de incubación aun no se pierde completamente. También se produce un aumento significativo de la actividad en todos los puntos de la curva de crecimiento, en comparación con su cepa parental *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15 (Fig. 6B).

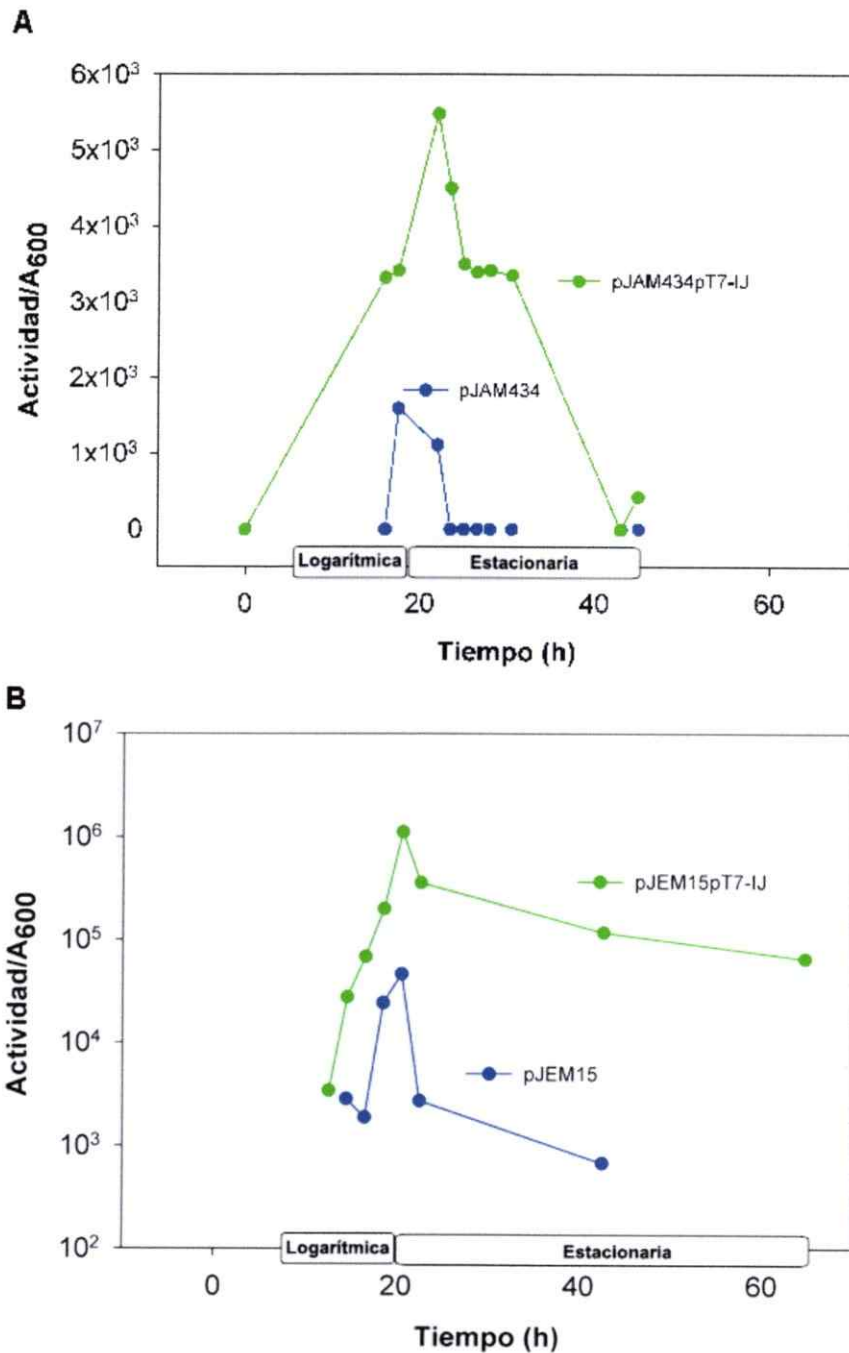


Figura 6. Curvas de actividad bactericida de cepas que coexpresan los genes *mceIJ*. Las curvas de actividad fueron normalizadas por la A_{600} de la cepa *E. coli* VCS257(DE3) que coexpresa los genes *mceIJ* y el plasmidio A) pJAM434 B) pJEM15. En azul se señala la cepa parental y en verde a la cepa que coexpresa los genes *mceIJ*. La actividad se midió en unidades arbitrarias (U.A.)/ml. La barra ubicada bajo el eje del tiempo representa la duración de las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento.

3.2.3 El aumento de la dosis génica del gen *mceC* retrasa la pérdida de actividad en fase estacionaria.

Las curvas de actividad de las cepas *E. coli* VCS257(DE3)pJAM434pT7-C y *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-C presentan un patrón similar. La curva de actividad es asimétrica con un máximo de actividad en el último tramo de la fase exponencial. Este máximo tiene un valor superior al de la cepa parental en ambos casos. Sin embargo, la cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-C presenta un máximo mayor (Fig. 7). La pérdida de actividad en fase estacionaria de esta cepa es más lenta y al igual que en el caso de la cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-IJ no hay una pérdida total aún después de 65 horas de incubación.

Las cepas *E. coli* VCS257(DE3)pJAM434pT7-C y *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-C, presentan diferencias en la velocidad de crecimiento, siendo la cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-C la que crece más rápido. Esta es una propiedad de los derivados pJEM15, pues todas las cepas que portan dicho plasmidio tienen una velocidad de crecimiento mayor en comparación a las pJAM434.

3.2.4 Las diferencias en la actividad bactericida de la microcina E492 producida por las diferentes cepas no se deben a diferencias en la cantidad de proteína.

Con el objetivo de determinar si las diferencias de actividad se debían a una diferencia en la capacidad de producir microcina activa de la cepa productora o a una diferencia en la cantidad de proteína, se realizaron purificaciones de microcina en fase exponencial y en fase estacionaria tardía de crecimiento de las cepas que se indican en la figura 8. La coexpresión, ya sea de los genes *mceIJ* o del gen *mceC*, con el sistema productor de microcina pJAM434 conduce a un aumento en

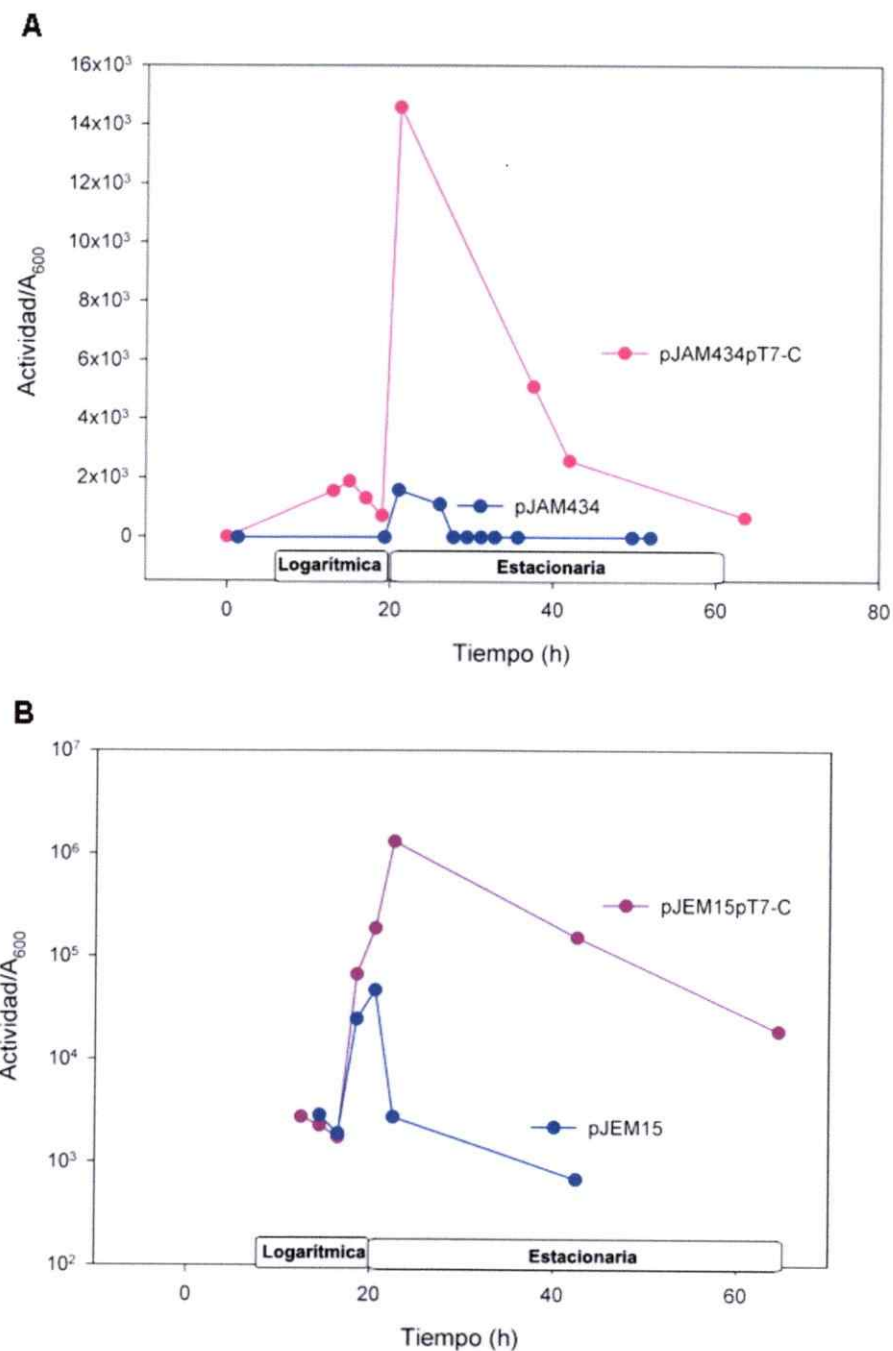
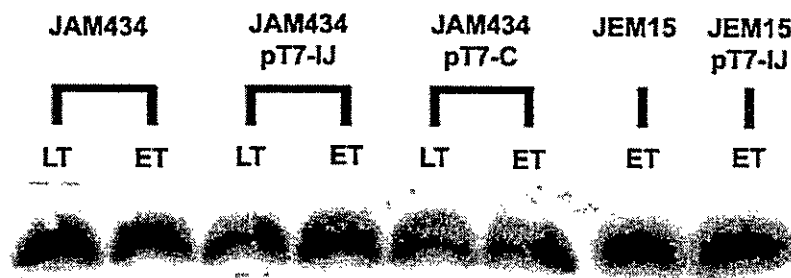


Figura 7. Curvas de actividad bactericida de cepas que coexpresan el gen *mceC*. Las curvas de actividad fueron normalizadas por la A_{600} de la cepa *E.coli* VCS257(DE3) que coexpresa el gen *mceC* y el plasmidio A) pJAM434 B) pJEM15. En azul se señala la cepa parental y en morado a la cepa que coexpresa el gen *mceC*. La actividad se midió en unidades arbitrarias (U.A.)/ml. La barra ubicada bajo el eje del tiempo representa la duración de las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento.



Actividad (U.A./ml)	$1,1 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^2$	$4,2 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^4$	$5,3 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^4$
---------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------

Figura 8. Preparaciones de microcicina E492 a partir de cultivos en fase logarítmica y estacionaria tardía de crecimiento. Se purificó microcicina a partir de sobrenadantes de cultivos crecidos a 37°C y 220 rpm en Medio M9 suplementado con glucosa y citrato de sodio al 0,2%, durante 17 h (LT: logarítmica tardía) y 40 h (ET: estacionaria tardía). En la parte superior de la figura se muestra el western blot de las purificaciones y en la parte inferior se indican las actividades presentadas por dichas muestras. Estos resultados son representativos de varios experimentos que presentan la misma tendencia, aunque con diferencias en los valores absolutos de actividad.

la actividad bactericida en las preparaciones purificadas. Sin embargo, sólo la coexpresión de los genes *mceIJ*, permite la mantención de la actividad en fase estacionaria tardía. Este comportamiento difiere de la actividad observada directamente en sobrenadantes tratados de cultivos de estas cepas (Fig. 6A). Este resultado indica que el proceso de purificación afecta de manera diferente a la microcina obtenida a partir de estas cepas.

Mediante western blot (Fig. 8) se determinó que las importantes diferencias en la actividad bactericida de las purificaciones no se deben a diferencias en la concentración de proteína, pues no existen diferencias notorias en la concentración de microcina. Este resultado apoya la idea que la actividad bactericida de la microcina E492 está relacionada con una modificación post-traduccional, dependiente de los genes de la maduración.

3.3. Relación entre la dosis génica de los genes *mceAB* y la actividad bactericida.

Para determinar si la capacidad del sistema de producir microcina activa estaba limitada por la producción de la proteína microcina, se aumentó la dosis génica de los genes *mceA* y *mceB*, transformando las cepas *E. coli* VCS257(DE3)pJAM434 y *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15 con el plasmidio pT7-AB, que porta dichos genes bajo el control del promotor $\phi 10$ del fago T7. Ambas cepas presentan curvas de crecimiento muy similares y alcanzan una A_{600} máxima de ~1,1.

La cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJAM434pT7-AB no presenta actividad cuantificable a lo largo de la curva de crecimiento (Fig. 9A), en tanto que la cepa *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-AB presenta una marcada disminución respecto a la cepa parental (Fig. 9B). Hay que recordar que las cepas con pJEM15 poseen

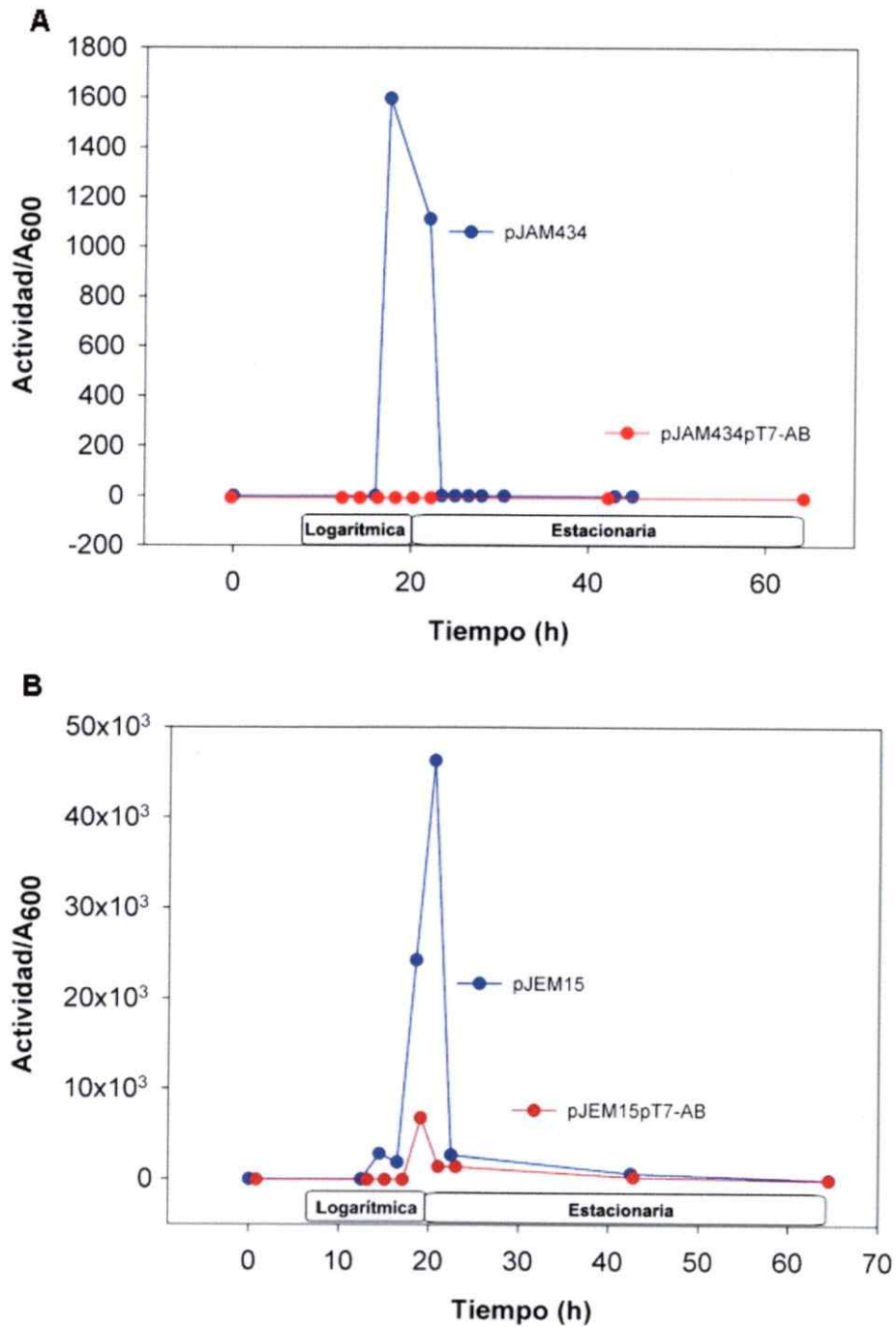


Figura 9. Curvas de actividad bactericida de cepas que coexpresan los genes *mceAB*. Las curvas de actividad fueron normalizadas por la A_{600} de la cepa *E. coli* VCS257(DE3) que coexpresan los genes *mceAB* y el plasmidio A) pJAM434 B) pJEM15. En azul se señala la cepa parental y en rojo a la cepa que coexpresan los genes *mceAB*. La actividad se midió en unidades arbitrarias (U.A.)/ml. La barra ubicada bajo el eje del tiempo representa la duración de las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento.

intrínsecamente una mayor capacidad de producir microcina activa, debido a la mayor expresión de los genes *mceIJ*, lo cual probablemente permitió la detección de la actividad. Es importante mencionar sin embargo, que el control de pJEM15 transformado con el plasmidio vector pACYC184 (parental de pT7-AB) presentó una disminución en la actividad, con niveles comparables a pJEM15pT7-AB. No se ha encontrado una explicación a este fenómeno, sin embargo puede ser algo inherente al plasmidio.

3.4. Relación entre la agregación *in vitro* de microcina E492 purificada a partir de cepas con distintas dosis génicas de los genes de maduración.

3.4.1 Los agregados de microcina E492 son de tipo amiloide.

Los agregados de tipo amiloide se caracterizan por unir RC y ThT, además de formar microfibrillas, sedimentar, ser resistentes a proteasas y poseer un alto porcentaje de estructura beta. En este trabajo, para determinar si la microcina E492 forma agregados de tipo amiloide se utilizaron los ensayos de unión a RC y a ThT.

Como ha sido descrito para otros tipos de amiloides, la microcina agregada induce un cambio espectral en la absorbancia del RC. El RC libre presenta un máximo de absorbancia a los 490 nm. La máxima diferencia entre el RC libre y el RC unido se observa a ~ 540 nm. En la figura 10 se muestra el espectro de unión a RC de microcina purificada a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 después de 0 y 15 h de agitación a 37 °C.

Por otro lado, el máximo de emisión de fluorescencia de la ThT libre en el buffer de agregación es de ~500 nm. Sin embargo, cuando la ThT se encuentra unida a un agregado de tipo amiloide, este máximo se desplaza a 482 nm, concomitantemente con un aumento de la intensidad de fluorescencia.

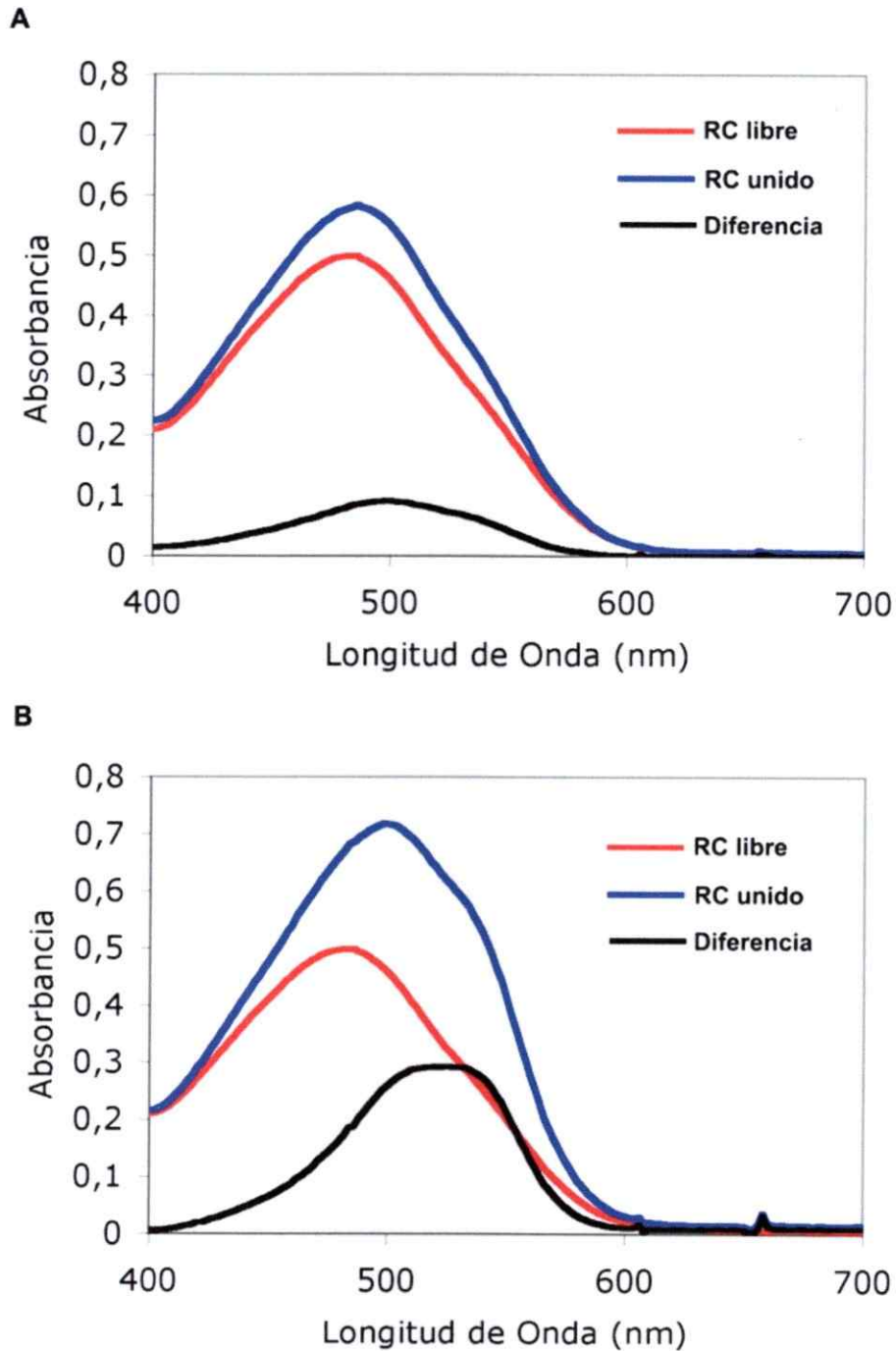


Figura 10. Espectro de absorción de rojo congo unido a microcina E492. La microcina purificada a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 fue incubada durante: A) 0 h y B) 15 h en buffer de agregación (10mM PIPES-NaOH, pH 6,5; 0,5 M NaCl) y posteriormente incubada con rojo congo. En rojo se representa el espectro de absorción de rojo congo libre, en azul el espectro de absorción de rojo congo unido a microcina y en negro la diferencia entre dichos espectros.

Las muestras de microcina obtenidas a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 e incubadas durante 0 y 15 h en buffer de agregación fueron ensayadas con ThT. En la figura 11 se muestra el espectro de emisión de fluorescencia obtenido.

3.4.2 Los agregados no poseen actividad bactericida sobre esferoplastos.

La primera etapa en el mecanismo de acción de la microcina E492 es el reconocimiento de los receptores en la membrana externa y la posterior translocación a través de ésta. Para determinar si la membrana externa es la barrera que impide la acción de las formas agregadas de la microcina, se realizaron ensayos de actividad utilizando esferoplastos. En éstos se encuentra permeabilizada la membrana externa, lo que haría a la microcina independiente de esta barrera.

Se ensayó sobre esferoplastos la actividad bactericida de muestras de microcina agregada. Esta forma de microcina no tiene actividad sobre células no tratadas. En la Figura 12 se presenta el porcentaje de sobrevivencia de esferoplastos incubados durante 20 min tanto con muestras de microcina agregada como soluble. La microcina soluble produce la muerte del 97 ± 2 % de los esferoplastos, en tanto que la microcina agregada no produce un efecto bactericida sobre los esferoplastos.

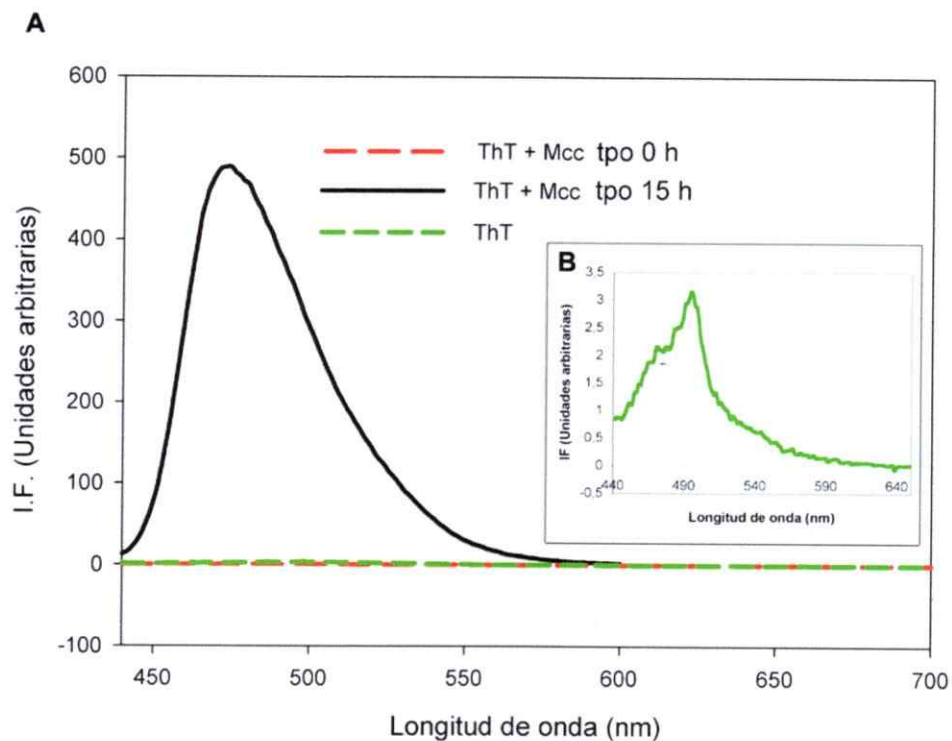


Figura 11. Espectro de emisión de fluorescencia de ThT unida a microcina E492. A) Espectro de fluorescencia de ThT (---), ThT incubada con microcina purificada a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 e incubada en buffer de agregación (10mM PIPES-NaOH, pH 6,5; 0,5 M NaCl) durante 0 h (---) y 15 h (—). B) Espectro de emisión de fluorescencia de ThT aumentado. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 430 nm y los ancho de banda de emisión y excitación fueron de 4 nm.

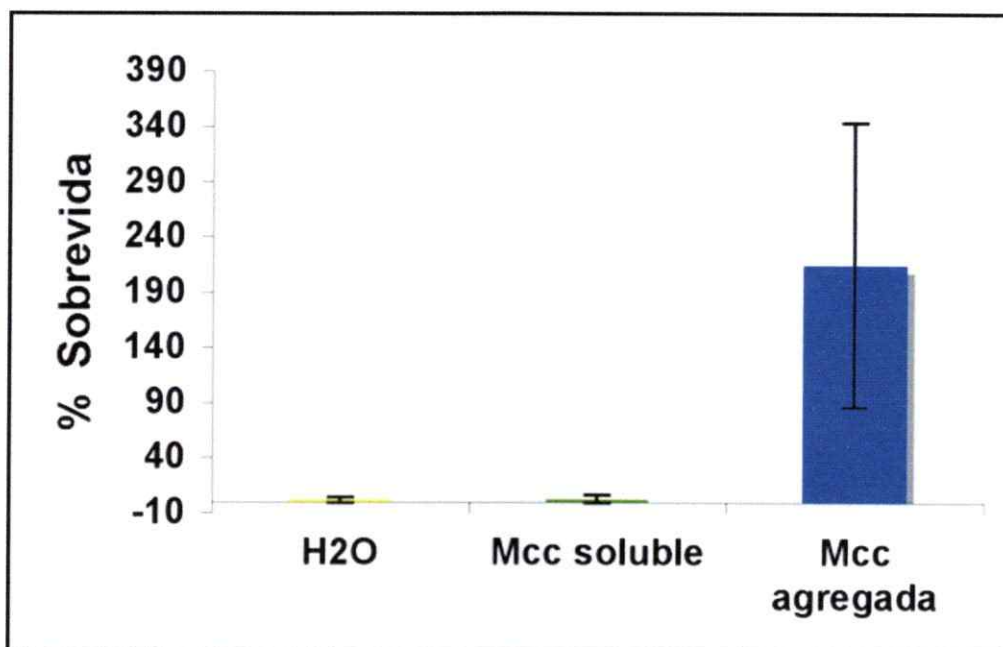


Figura12. Ensayo de sobrevida de esferoplastos de *E. coli* BL21(DE3) utilizando microcina E492 agregada. Los porcentajes son el promedio de cuatro experimentos independientes. La concentración final de la microcina utilizada fue de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y fue purificada a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15. La microcina agregada se obtuvo incubando microcina soluble en buffer de agregación durante 15 h. Los esferoplastos se prepararon como se describe en Materiales y Métodos.

3.4.3 Los agregados no forman canales iónicos en bicapas lipídicas.

El mecanismo a través del cual la microcina E492 ejerce su actividad bactericida sobre las células blanco sería mediante la formación de canales iónicos en la membrana interna de éstas. Para determinar si la falta de actividad de la microcina agregada se debe a una incapacidad para formar canales iónicos, se analizó esta propiedad en experimentos *in vitro* con bicapas fosfolipídicas artificiales. La microcina agregada producida por las cepas *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 (Fig. 13B) y *E. coli* BL21(DE3)npB4 (Fig. 13C) es incapaz de formar canales iónicos en estas bicapas.

Para investigar si el tamaño de los agregados es el que determina la imposibilidad de estos de insertarse en las bicapas, los agregados fueron sonicados y luego centrifugados. Se ensayó la capacidad de los sobrenadantes de formar canales iónicos. Estas muestras tratadas también fueron incapaces de formar canales iónicos (Fig. 13D,E). Se determinó la concentración de proteína en los sobrenadantes mediante el "kit" Micro BCA protein assay.

3.4.4 Los agregados de microcina están formados por microfibrillas.

Para tener una noción de los tamaños de los agregados de microcina y evaluar si esta variable pudiera impedir el ingreso de los agregados por los receptores se utilizó la propiedad de los amiloides de unir RC y ThT para observarlos por microscopía de fluorescencia. En la figura 14 se muestra microcina agregada y posteriormente incubada con RC, y en la figura 15 se muestran las mismas muestras de microcina, pero incubadas con ThT. En ambos casos se observan macroagregados de microcina purificada a partir de las cepas *E. coli* BL21(DE3)pJEM15, *E. coli* BL21(DE3)npB4 y *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-AB

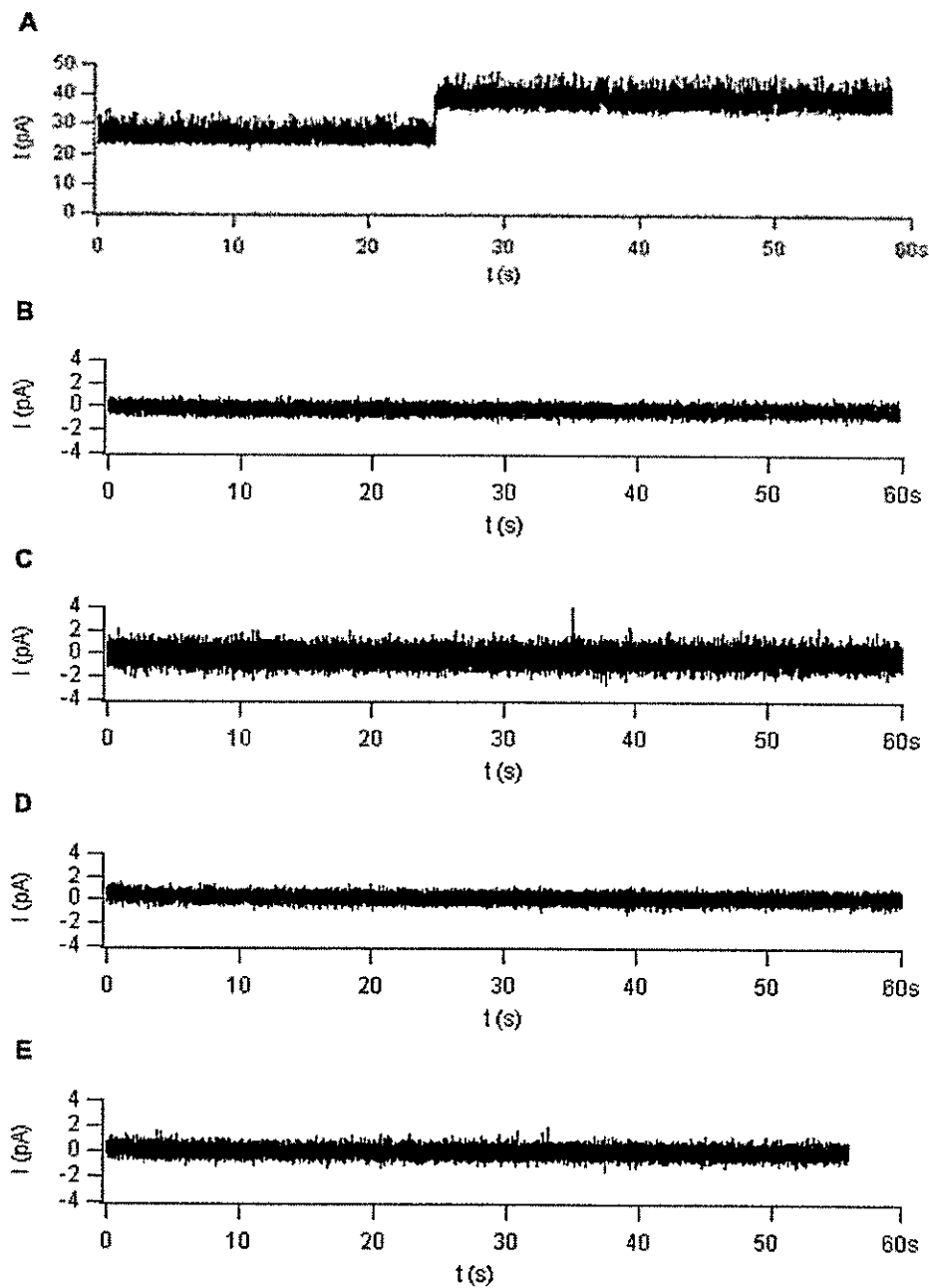


Figura 13. Registro de corriente de bicapas tratadas con muestras de microcina E492. Se realizaron los ensayos de formación de canales iónicos con microcina purificada a partir de las cepas *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 y *E. coli* BL21(DE3)npB4. En A) se muestra el registro de la microcina silvestre en estado soluble. En B) y C) se muestra el registro de la microcina silvestre y mutante, respectivamente después de haber sido incubada 15 h en buffer de agregación (10mM PIPES-NaOH, pH 6,5; 0,5 M NaCl). En D) y E) se muestra el registro del sobrenadante de microcina silvestre y mutante, respectivamente incubada en buffer de agregación y posteriormente sometida a sonicación y centrifugación.

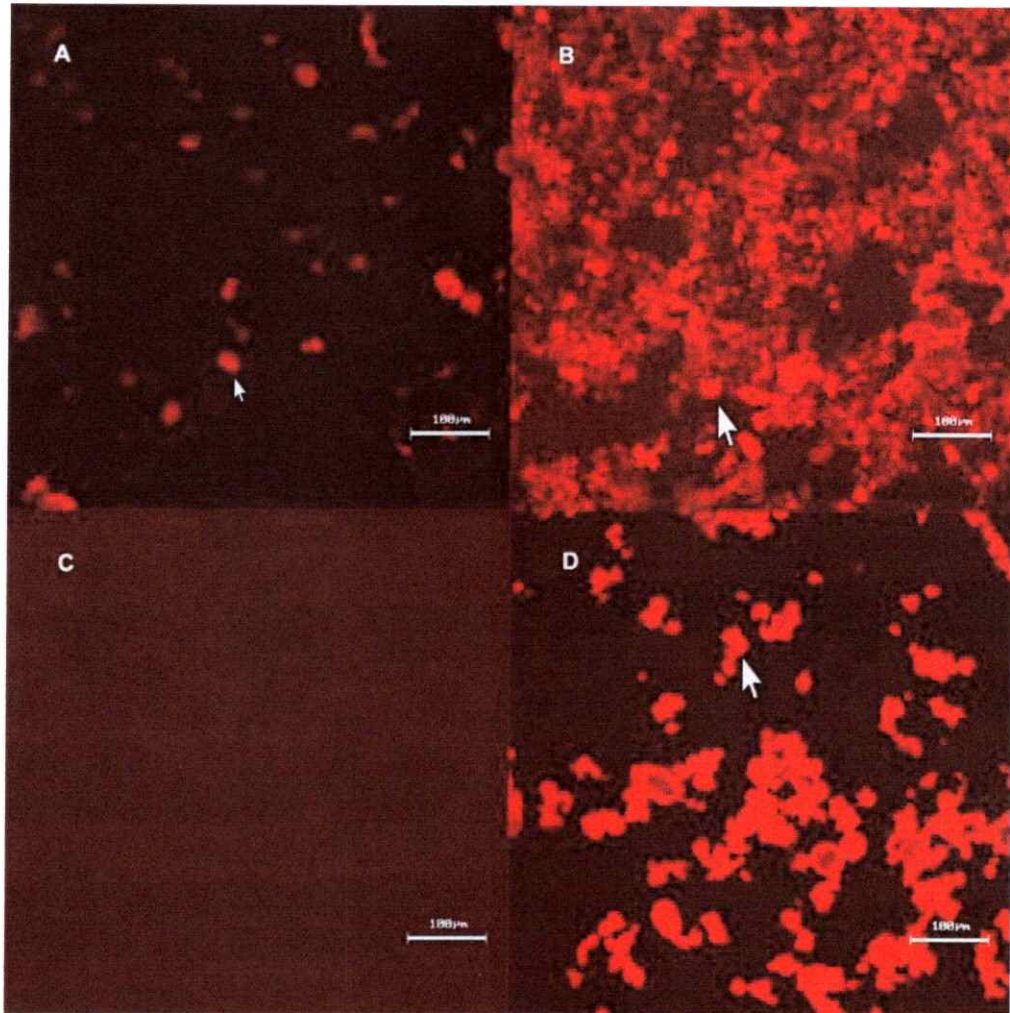


Figura 14. Microscopía de fluorescencia de agregados de microcina E492 incubados con rojo congo. Muestras de microcina obtenida a partir de las cepas *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 (A), *E. coli* BL21(DE3)npB4 (B), *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-IJ (C) y *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-AB (D), fueron incubadas en buffer de agregación durante 15 h y luego incubadas con rojo congo. Las flechas blancas señalan agregados de microcina. La barra indica 100 µm.

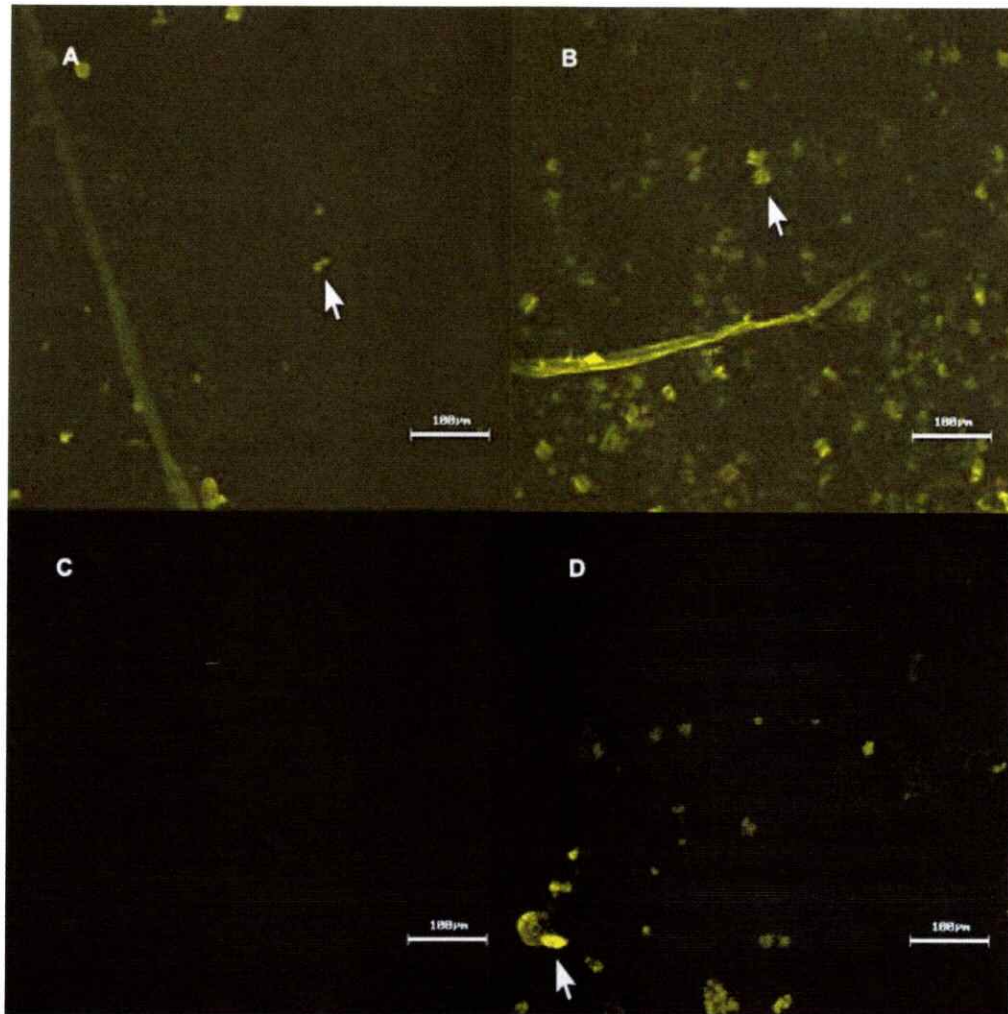


Figura 15. Microscopía de fluorescencia de agregados de microcina E492 incubados con tioflavina T. Muestras de microcina obtenida a partir de las cepas *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 (A), *E. coli* BL21(DE3)npB4 (B), *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-IJ (C) y *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-AB (D), fueron incubadas en buffer de agregación durante 15 h y luego incubadas con ThT. Las flechas blancas señalan agregados de microcina. La barra indica 100 μm .

visibles por microscopía óptica, los cuales son de tamaño variable, pero del orden de los micrómetros. Sólo en el caso de la microcina purificada a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-IJ no es posible observar macroagregados.

Posteriormente, se procedió a determinar la morfología de estos agregados mediante microscopía electrónica. En la figura 16 se observa que luego de 15h de incubación en buffer de agregación, las preparaciones de microcina forman estructuras filamentosas con diferentes características. En la Tabla 3 se resumen los diámetros de los filamentos de microcina producidos por las distintas cepas.

Los filamentos producidos por microcina de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 presentan ~ 95 nm de largo y ~ 10 nm de ancho, y no presentan una agrupación definida (Fig. 16 A). Los filamentos producidos por microcina de la cepa *E. coli* BL21(DE3)npB4 tampoco presentan una agrupación definida, sin embargo, son más largos y de ~ 7 nm de ancho (Fig. 16 B). Los filamentos observados en las muestras obtenidas a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-IJ tienen un ancho de ~ 7 nm, y al igual que las muestras de microcina anteriores, no presenta una agrupación definida (Fig. 16 C). Para encontrar fibras de esta microcina se debieron analizar muchos campos, al contrario de lo realizado para las otras preparaciones. Esto concuerda con las observaciones de microscopía de fluorescencia donde la microcina purificada a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-IJ no presenta agregados observables. La microcina producida por la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-AB forma filamentos que se agrupan en manojos compuestos por finos filamentos. Estos filamentos cuando se encuentran aislados tienen un ancho de ~ 9 nm (Fig. 16 D). Mediante un análisis de T-student se determinó que la diferencia entre el ancho de las fibras de microcina purificada a partir de las cepas *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 y *E. coli* BL21(DE3)npB4 es significativa con un *p-value* menor a 0,02, al igual que

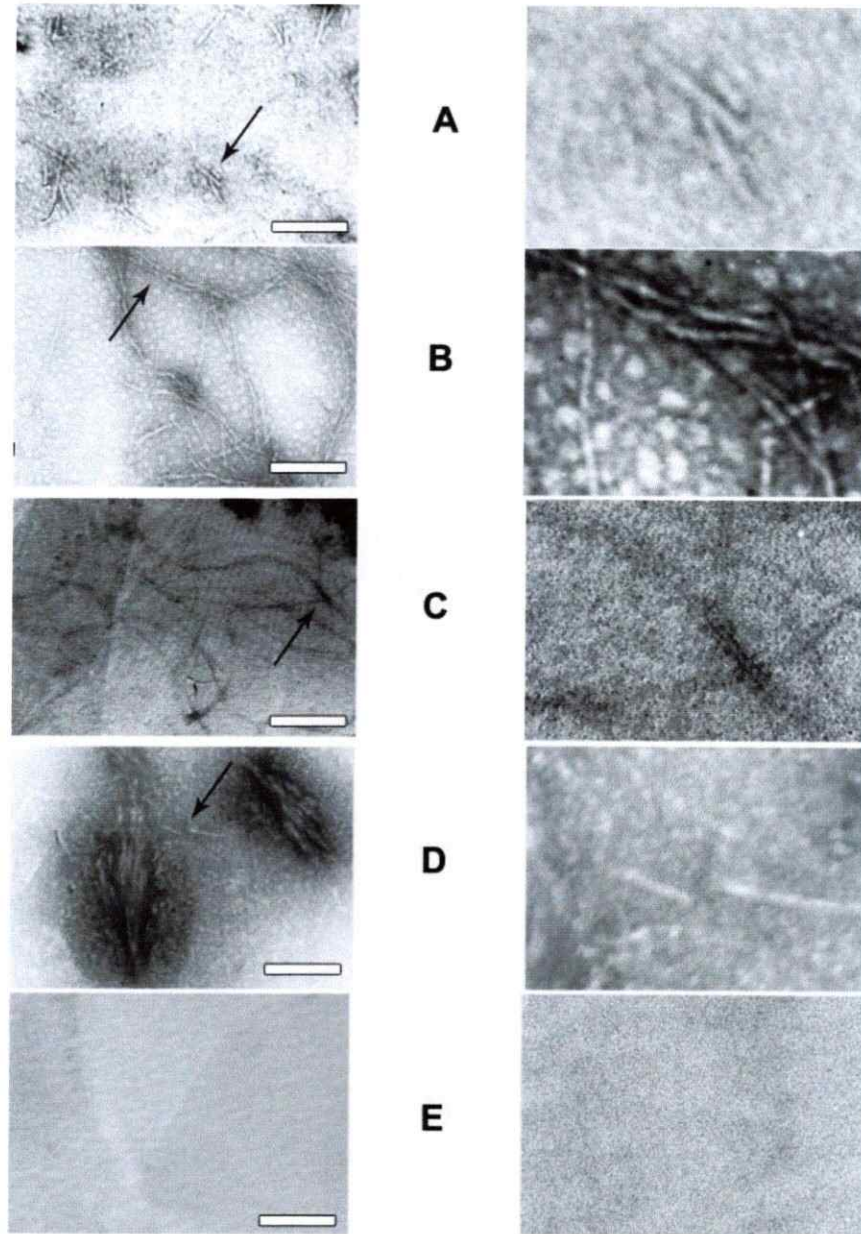


Figura 16. Micrografía electrónica de diferentes preparaciones de microcina E492 en buffer de agregación. Muestras de microcina purificada fueron incubadas en buffer de agregación durante 15 h, colocadas sobre grillas de 300 mesh y teñidas negativamente con acetato de uranilo al 2%. Estas muestras fueron obtenidas a partir de las cepas A) *E. coli* BL21(DE3)pJEM15, B) *E. coli* BL21(DE3)npB4, C) *E. coli* BL21(DE3)pT7-IJ y D) *E. coli* BL21(DE3)pT7-AB. En E) se muestra el control con microcina soluble (Tiempo 0 de incubación). A la izquierda se ubican las micrografías tomadas con un aumento de 20.000X, mientras que a la derecha se muestran ampliaciones 4X de la figura de la izquierda. Las flechas señalan fibras de microcina. La barra indica 200 nm.

Tabla 3. Diámetros de las fibras formadas por diferentes preparaciones de microcina E492 agregada.

Microcina	Diámetro (nm)
JEM15	10,1 ± 1,8
npB4	6,9 ± 1,6*
JEM15pT7-IJ	7,4 ± 0,9*
JEM15pT7-AB	8,7 ± 1,1

Los diámetros se midieron en la amplificación que se muestra a la izquierda de la figura 16 y representan el promedio de 7 mediciones.

* Fibras que presentan un ancho significativamente distinto del ancho de las fibras de microcina purificada a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 según el test T-student. *p-value* <0,02.

la diferencia entre las fibras de microcina purificada a partir de las cepas *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 y *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-IJ. La microcina que no ha sido incubada en buffer de agregación (0 h), permanece soluble y no forma filamentos (Fig. 16 E).

3.4.5 La forma activa de la microcina E492 tiene menor capacidad de agregación. Con la caracterización a nivel bioquímico, electrofisiológico y microscópico se evaluó cualitativamente la formación de agregados. Notándose que había diferencias en la capacidad de agregación de las microcinas purificadas a partir de las distintas cepas. Para cuantificar estas diferencias se realizaron ensayos de agregación *in vitro*. Se determinó cuantitativamente la agregación de la microcina purificada a partir de las cepas *E. coli* BL21(DE3)pJEM15, *E. coli* BL21(DE3)npB4, *E. coli* BL21(DE3)pT7-IJ y *E. coli* BL21(DE3)pT7-AB. Muestras de microcina purificada a partir de estas cepas se incubaron con agitación durante 15 h a 37 °C y transcurrido ese tiempo se determinó la capacidad de las muestras de unir RC y ThT. Adicionalmente, se midió su capacidad de sedimentar, la turbidez de la solución y la actividad bactericida. Mediante estos métodos se pudo determinar que existían diferentes grados de agregación de la microcina, lo que dependía de la capacidad de producir microcina activa por parte de la cepa productora. Se eligió el método de unión a RC para ejemplificar el comportamiento observado. En la figura 17 se presenta la fracción de RC libre presente en la muestra después de retirar el rojo congo unido a los agregados mediante centrifugación. En esta figura se observa que la capacidad de agregación de la microcina es inversamente proporcional a la producción de microcina activa. Las muestras de microcina que presentan más agregación son las provenientes de las cepas *E. coli* BL21(DE3)npB4 y *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-AB. Las muestras de microcina

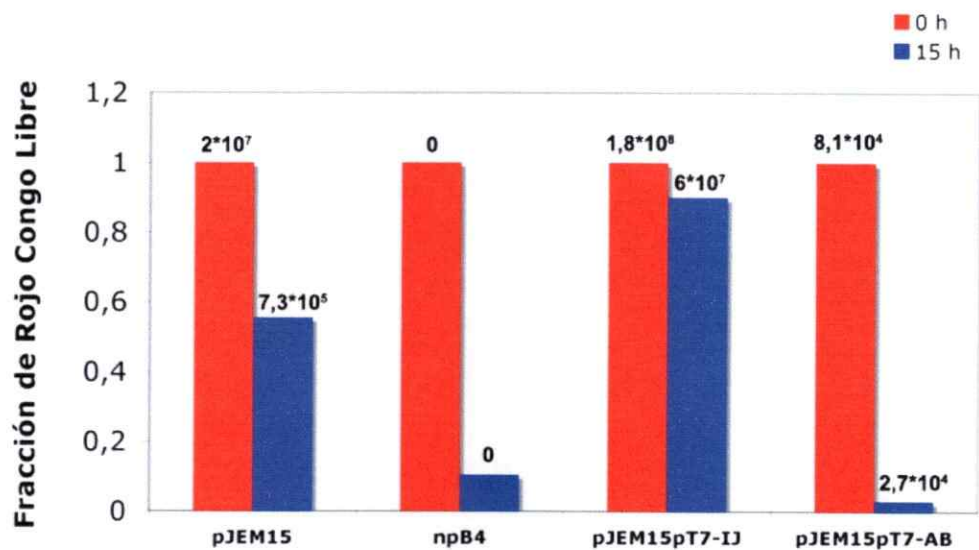


Figura 17. Cuantificación de la agregación de microcina purificada a partir de diferentes cepas productoras mediante ensayo de unión a rojo congo. La presencia de agregados de microcina purificada a partir de las cepas *E. coli* BL21(DE3)pJEM15, *E. coli* BL21(DE3)npB4, *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-IJ y *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-AB fue cuantificada después de 0 h (rojo) y 15 h (azul) de incubación en buffer de agregación. La fracción de rojo congo libre se obtuvo normalizando por la absorbancia del rojo congo en el buffer de agregación y por el valor a tiempo 0 de cada muestra. Los números sobre las barras representan la actividad bactericida de estas muestras medida en U.A./ml

provenientes de las cepas *E. coli* BL21(DE3)pJEM15 y *E. coli* BL21(DE3)pJEM15pT7-IJ, que son las más activas, presentan una menor capacidad de agregación.

3.5. Formación de agregados de microcina *in vivo*

En el punto anterior se demostró que la microcina es capaz de formar agregados de tipo amiloide *in vitro*. Adicionalmente se estableció que las cepas productoras que conservan por más tiempo la actividad bactericida producen una menor proporción de agregados. Para relacionar estos resultados con el comportamiento observado en las curvas de crecimiento y actividad se determinó la capacidad de producir agregados de microcina *in vivo*. Se utilizó el ensayo de resistencia a PK, pues este método es muy sensible y porque la detección se lleva a cabo mediante western blot. Este método inmunológico permite la detección específica de la microcina a partir de muestras no purificadas.

3.5.1 La microcina E492 forma agregados *in vivo*.

Mediante el ensayo de resistencia a PK se determinó la capacidad de las cepas *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pACYC184, *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-IJ, *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-AB y *E. coli* VCS257(DE3)npB4 de producir agregados de microcina a las 20 y 44 h de cultivo. En la figura 18 se observa que a las 44 h de incubación hay microcina resistente a PK de todas las cepas, lo que concuerda con la pérdida de actividad presentada por los sobrenadantes de todas las cepas productoras de microcina activa a las 44 h (Tabla 4).

La agregación es un proceso dependiente de la concentración de proteína. Por esto se debe normalizar la fracción de microcina resistente a PK respecto al total de microcina producida. Las diferencias en la cantidad de microcina, no permiten determinar si las diferencias en la agregación se deben a una diferencia en la

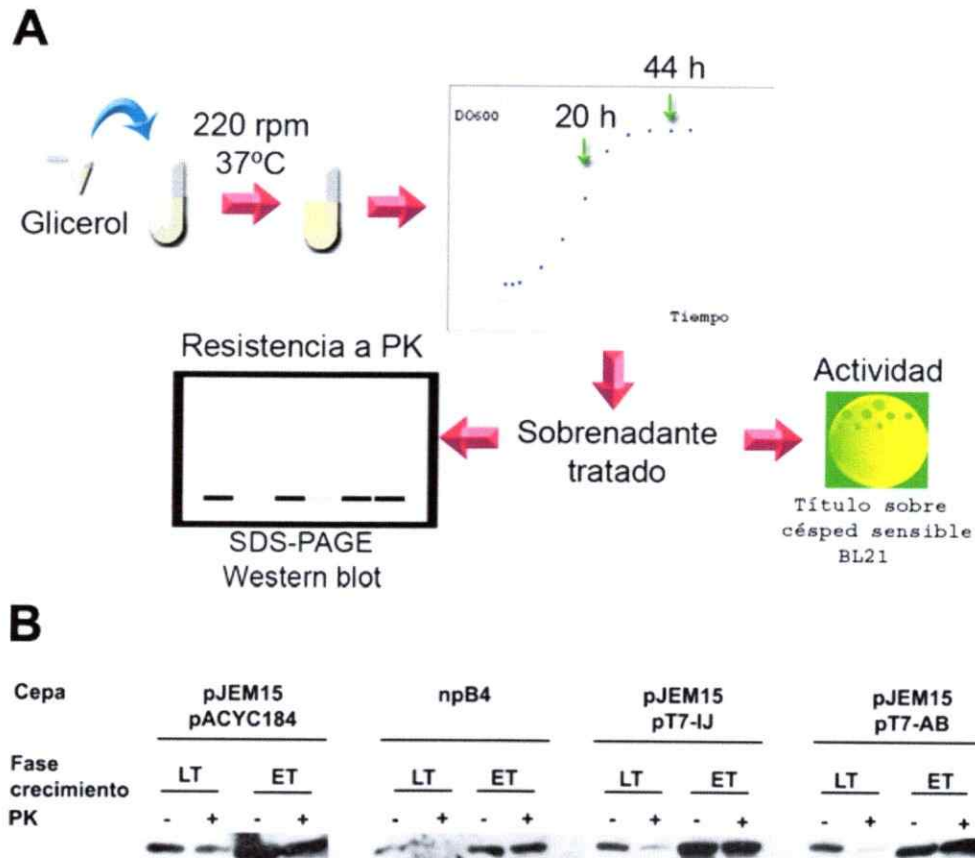


Figura 18. Formación de agregados amiloide *in vivo*. La agregación de la microcina *in vivo* fue determinada mediante resistencia a PK de sobrenadantes de cultivos y visualizada por western blot. A) Esquema del protocolo para determinar la presencia de agregados *in vivo*. B) Western blot de sobrenadantes tratados con PK de cultivos de las cepas *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pACYC184, *E. coli* VCS257(DE3)npB4, *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-IJ y *E. coli* VCS257(DE3)pJEM15pT7-AB. Dentro de las divisiones de cuatro carriles, los dos carriles a la izquierda corresponden a la fase logarítmica tardía (tiempo de incubación: 20 h), mientras que los dos a la derecha a la fase estacionaria tardía (tiempo de incubación: 44 h). Con el signo (+) se señala los carriles de los sobrenadantes tratados con PK.

Tabla 4. Actividad bactericida de sobrenadantes de cultivos de cepas productoras de microcina E492

Cepa	Actividad bactericida (U.A.)	
	20h	44h
<i>E. coli</i> VCS257(DE3)pJEM15pACYC184	1,1*10 ⁴	1,4*10 ³
<i>E. coli</i> VCS257(DE3)npB4	0	0
<i>E. coli</i> VCS257(DE3)pJEM15pT7-IJ,	4,3*10 ⁴	2,3*10 ³
<i>E. coli</i> VCS257(DE3)pJEM15pT7-AB	5,3*10 ³	1,3*10 ³

Las cepas indicadas fueron crecidas en medio LB-PIPES durante 20h y 44h con agitación y a 37°C. Transcurrido el tiempo indicado se tomó una alícuota para medir la A₆₀₀, la actividad y la resistencia a PK de los sobrenadantes. La actividad se midió en unidades arbitrarias (U.A.)/ml.

capacidad de producir microcina activa por parte de la cepa o a una diferencia en la cantidad de proteína producida. En forma alternativa, los agregados producidos por las diferentes cepas podrían presentar diferente resistencia a PK. Además se debe considerar que la agregación de la microcina en fase estacionaria se determinó a las 44 h de incubación, lo que corresponde a la fase estacionaria tardía, etapa de la curva de crecimiento donde todos los cultivos presentan pérdida de la actividad bactericida.

4. Discusión

Las bacterias han desarrollado finos sistemas de control para la producción de antibióticos de manera de optimizar su producción. Así, son capaces de detectar sutiles cambios en el ambiente que las rodea y adaptar su comportamiento a ellos.

Existe una gran variedad de sistemas de control de la actividad de las bacteriocinas, incluyen control de la expresión génica a nivel transcripcional y traduccional, modificaciones post-traduccionales e inhibidores. Entre las bacteriocinas más estudiadas se encuentran la nisina y la subtilina, producidas por *Lactococcus lactis* y *Bacillus subtilis*, respectivamente. Ambas se encuentran modificadas post-traduccionalmente y su producción es controlada por un sistema de "quorum-sensing". Mediante un sistema de dos componentes, autorregulan su propia biosíntesis y es la propia bacteriocina la que actúa regulando la expresión del gen estructural (Kleerebezem, 2004). *Lactobacillus sakei* regula la expresión de sakacina mediante el acoplamiento traduccional de esta bacteriocina y su proteína de inmunidad (Mathiesen y col., 2005). La producción de esta bacteriocina es regulada transcripcionalmente por un sistema de transducción de señales de tres componentes: un factor de inducción, una histidina proteína kinasa y un regulador de la respuesta. El factor de inducción corresponde a un péptido tipo bacteriocina.

Por otro lado, la producción de colicinas es mediada por el regulón SOS, y por lo tanto se producen en condiciones de estrés (Papagianni, 2003). La expresión de bacteriocinas por parte algunas especies de *Clostridium* en tanto, es regulada por un subgrupo de factores sigma de RNA polimerasa (Dupoy B., Matamouros S., 2006).

La producción de microcina E492 puede ser utilizada como modelo de estudio para el control de la síntesis de un péptido bactericida, debido a que la síntesis de microcina E492 activa requiere de un gran número de genes y el control de la actividad se lleva a cabo a múltiples niveles. A nivel transcripcional, mediante

el control en la expresión de los genes *mceJI*, cuyos productos génicos participan del proceso de maduración de la microcina activa (Lagos y col. 1999). A nivel post-traducciona, mediante una glicosilación con una molécula de salmoquelina en su extremo C-terminal (Thomas y col. 2004). También existe un control de la actividad, mediado por el antagonismo con enteroquelina, sideróforo que compite por los receptores FepA, Fiu y Cir (Orellana y Lagos, 1996; Strahsburger y col., 2005). Recientemente, se ha planteado un nuevo nivel en el control de la actividad bactericida de esta microcina, mediante su agregación en forma de fibras amiloides (Bieler y col., 2005). Esta capacidad, además podría conferir ventajas a la célula productora, tales como favorecer el desarrollo de biopelículas, propiedad que ha sido observada en los agregados de la proteína bacteriana curli (Miranker, 2005).

Como se mencionó anteriormente, la producción de microcina activa depende de la actividad de los genes de la maduración *mceC*, *mceJ* y *mceI*. En un comienzo, la pérdida de la actividad bactericida de la microcina en fase estacionaria de crecimiento se atribuía principalmente a la disminución en la transcripción de los genes *mceJI* en esta fase. Si este supuesto es correcto, el aumento y la mantención de la dosis génica de estos genes en dicha fase de crecimiento, conduciría a la reversión de la pérdida de actividad. En este trabajo se demostró que un aumento en la dosis génica de los genes de la maduración conduce a un aumento en la actividad bactericida y retrasa la pérdida de actividad, sin embargo no revierte completamente el fenotipo. Cepas que coexpresan el sistema productor de microcina y los genes *mceJI* presentan niveles mayores de actividad bactericida y el decaimiento de dicha actividad se produce más tardíamente, en comparación con cepas que coexpresan el sistema productor y el gen *mceC*. De estos resultados se deduce que en el comienzo de la fase estacionaria de crecimiento, los productos génicos de los genes de la maduración, son limitantes en la síntesis de microcina activa.

Las diferencias observadas en la actividad no se deben sólo a diferencias en la cantidad de proteína microcina producida. Esto se demostró cuantificando la concentración de proteína de muestras que presentaban grandes diferencias en la actividad. No se encontró diferencias significativas en la cantidad de microcina producida. Las diferencias en la actividad de dichas muestras se atribuyeron a diferencias en la fracción de microcina modificada, puesto que a mayor dosis génica de los genes de maduración se obtuvo una fracción más alta de microcina activa.

Paralelamente, al aumentar la dosis génica de los genes *mceAB* manteniendo inalterada la capacidad del sistema de maduración, se alteró el balance de las proporciones de microcina madura y no madura. Las cepas con una mayor dosis génica de los genes *mceAB*, presentaron una menor actividad bactericida a lo largo de toda la curva de crecimiento. Esto sugiere fuertemente que la modificación post-traducciona l de la microcina no es el único factor que media la actividad, pues si sólo la fracción modificada de la microcina diera cuenta del total de la actividad, un aumento en la proporción de microcina sin modificar, no debería conducir a una disminución en la actividad, sino que debería mantener la misma.

La microcina es una proteína altamente hidrofóbica, propiedad que le permite insertarse en la membrana interna de la célula blanco y de esta manera ejercer su acción. Sin embargo, para que la microcina llegue a la célula blanco primero debe ser exportada al espacio extracelular, un ambiente acuoso y por lo tanto polar. En estas condiciones se ven favorecidas interacciones proteína-proteína, de carácter hidrofóbico, que conducen a la agregación. Como ya se ha mencionado, la microcina E492 posee la capacidad de formar agregados de tipo amiloide (Bieler y col., 2005). En este trabajo, se caracterizaron bioquímica, microscópica y electrofisiológicamente los agregados de microcina. Se determinó que no poseen actividad sobre esferoplastos y que son incapaces de formar

canales iónicos en bicapas lipídicas. Estos resultados explican la correlación observada con anterioridad entre la pérdida de actividad en fase estacionaria y la aparición de fibras amiloides en esta fase del crecimiento.

Los cambios que disminuyan la hidrofobicidad de la microcina desfavorecerían su agregación. Como fue descrito por Fischbach y col (2004), las glicosilaciones aumentan la hidrofiliidad de las moléculas a la cual se unen los azúcares. La modificación unida covalentemente a la ser 84 del extremo C-terminal de la microcina, corresponde a una molécula de enteroquelina diglucosilada, lo que lleva a pensar que la modificación post-traduccional de la microcina desfavorecería la agregación. En este trabajo se estableció que un aumento en la capacidad del sistema de producir microcina activa conduce a una disminución en la capacidad de agregación de la microcina *in vitro*. Este resultado apoya la hipótesis anterior.

Las proteínas curli, la proteína priónica de levadura y priónica humana presentan residuos aromáticos junto a residuos de glicina (usualmente múltiples) y de glutamina/asparragina. Se postula que interacciones de puentes de hidrógeno entre las cadenas amida, interacciones de tipo aromático y la flexibilidad proporcionada por los residuos de glicina, facilitan el proceso de reconocimiento molecular y autoensamblaje específico necesario para la eventual formación de fibras amiloides. Mutaciones puntuales en estas secuencias amiloidogénicas generan cambios en la morfología de los agregados, o incluso suprimen la capacidad de la proteína agregarse de la proteína. (Cherny y col., 2005). El análisis de la secuencia aminoacídica de la microcina indica la presencia de una secuencia similar a los repetidos aminoacídicos asociados a amiloidogénesis (Fig. 19). Esta característica podría explicar la capacidad de la microcina de formar fibras tanto *in vitro* como *in vivo*.

MELRMREISQKDLNLA**F**AGETDPNTQLLNDLGNNMAWGAALGAPGGLGS

AALGAAGGALQTVGQGLIDHGPVNVPIPV**LIGPSWNGSGSGYNSATSSSGSGS**

Figura 19. Análisis de la secuencia aminoacídica de la microcina y determinación de posibles secuencias amiloidogénicas. En rojo se señalan los aminoácidos que se plantean como probable secuencia amiloidogénica. En negrita se indica el sitio de procesamiento del péptido líder.

En este trabajo se postula que no sólo la secuencia aminoacídica de la microcina afecta su capacidad de agregarse, sino que también su estado de maduración. En la figura 20 se presenta un modelo de la formación de fibras amiloide que es dependiente de la fase de crecimiento en la cual se encuentre la cepa productora.

La inactivación de la microcina en fase estacionaria tardía se debe a un conjunto de factores que incluyen la agregación de la microcina y la disminución de la proporción de microcina no modificada. Este último factor depende no sólo de la disminución en la tasa de transcripción de los genes de la maduración sino que también de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de enteroquelina. En esta fase de crecimiento hay poco hierro en el medio, por lo que la maquinaria biosintética se enfoca en la producción del sideróforo, y se desfavorece la producción de microcina modificada, con el consiguiente aumento de la forma no modificada.

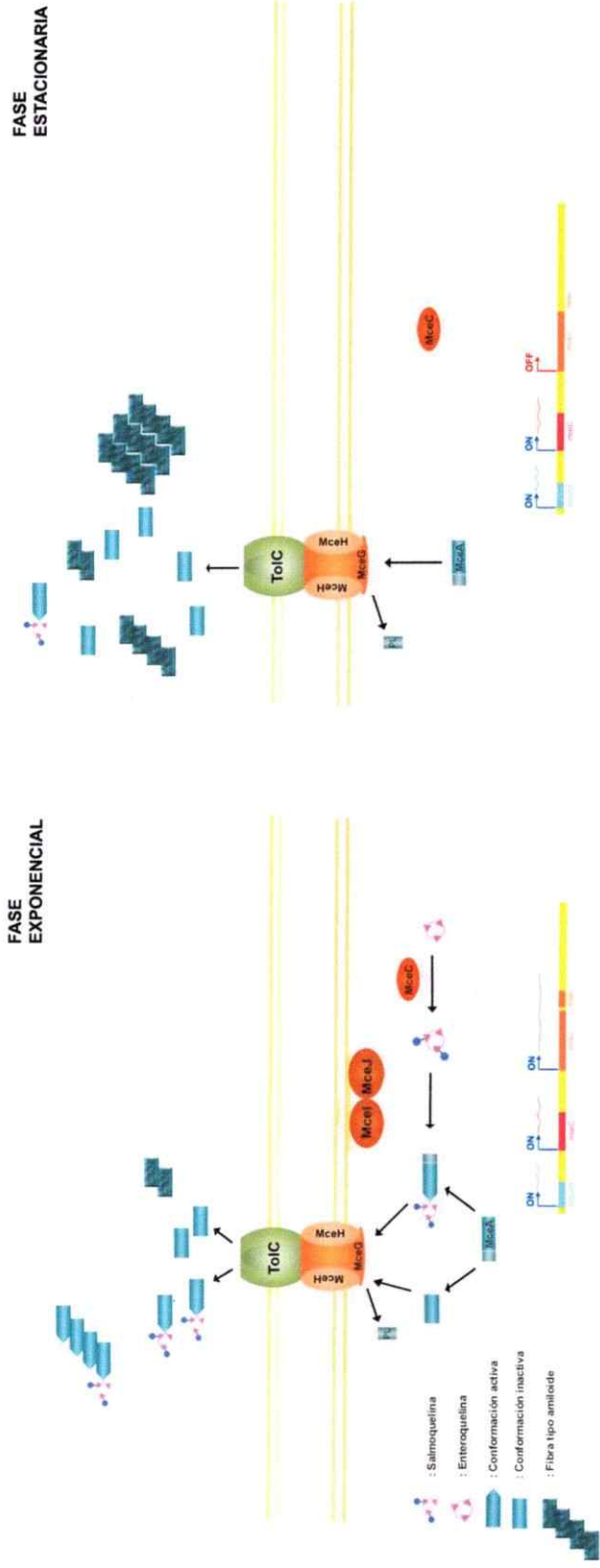


Figura 20. Modelo de la formación de fibras amiloide según la fase del crecimiento. La disminución en la expresión de los genes de la maduración conduciría a un aumento en la formación de fibras de tipo amiloide mediante un cambio en las propiedades fisicoquímicas de la microcistina, por un aumento en la cantidad de proteína en el espacio extracelular y por los cambios en la proporción de microcistina modificada versus la no modificada. Esta última forma de microcistina es la que aumenta principalmente en fase estacionaria.

5. Conclusiones

- La agregación de la microcina E492 dependería de la proporción de la forma modificada post-traduccionalmente versus la forma no modificada.
- La mayor actividad bactericida presentada por las cepas que coexpresan los genes de la maduración es consecuencia de un aumento en la actividad específica de la microcina.
- Purificaciones con alta actividad bactericida poseen menor capacidad de agregación.
- La carencia de actividad de los agregados tipo amiloide no sólo estaría dada por la incapacidad de interactuar con el receptor y atravesar la membrana, sino que también por su incapacidad de formar canales iónicos.

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.
- Baeza, M. (2003) Mecanismo de inmunidad, de traslocación y de conversión tipo prión de la mceE492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Baquero, F. y Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* 23:117-124.
- 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.
- Braun, V., Patzer, S.I. y Hantke, K. (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie.* 84:365-380.
- Chapman, M., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R. Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., Hultgren, S.J. (2002) Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295:851-5
- Chang, A. y Cohen, S. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from p15A cryptic mini plasmid. *J Bacteriol* 143:1141-1156.
- Cherny, I., Rockah, L., Levy-Nissenbaum, O., Gophna U., Ron, E. y Gazit, E. (2005) The formation of *Escherichia coli* curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. *J. Mol. Biol.* 352:245-252.
- Corsini, G., Baeza, M., Monasterio, O. y Lagos, R. (2002) The expresion of genes involved in microcin maturation regulates the produccion of active microcin E492. *Biochimie* 84:539-544.
- de Lorenzo, V. (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* 139:72-75.
- 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.
- 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.
- Dupuy B, Matamouros S. (2006) Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in *Clostridium* species by a new subgroup of RNA polymerase sigma-factors. *Res. Microbiol.* 157:201-5.

- 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.
- 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.
- Kleerebezem (2004) Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides.* 25:1405-1414.
- Lagos, R. Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X. y Monasterio, O. (1993) Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* 321:145-148.
- Lagos, R., Villanueva, J.E. y Monasterio O. (1999) Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.* 181:212-217.
- Lagos, R., Baeza, M., Corsini, C., Hetz, C., 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.
- Lazdunki, C.J. (1988) Pore forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. *Biochimie.* 70:1291-1296.
- Mathiesen G., Huehne K., Kroeckel L., Axelsson L. and Eijsink V. (2005) Characterization of a New Bacteriocin Operon in Sakacin P-Producing *Lactobacillus sakei*, Showing Strong Translational Coupling between the Bacteriocin and Immunity Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3565-3574
- Miranker A. (2005) Unzipping the mysteries of amyloid fiber formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:4335-4336.
- Miller, J. (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Press. New York. pp. 71-74.
- 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.
- Papagianni M. (2003) Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.* 21:465-499.

- 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., Moreno, F., y de Lorenzo, V. (1986) Microcin E492 insensitive mutants of *E. coli* K-12. *J. Gen. Microbiol.* 132:3253-3259.
- Riley, M.A. y Wertz, J.E. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:117-137.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Silver, S. y Walderhaug, M (1992). Gene regulation of plasmid and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 56:195-228.
- 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-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.* 279:28233-28242.
- Weiss R. (1976) Protoplast formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 128:668-670.
- 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.