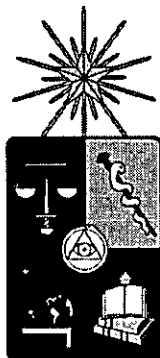


UCH-FC  
Biotecnología  
E7643  
C Δ

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



DETERMINACIÓN DE LA TOPOLOGÍA DE MCEB, UNA PROTEÍNA INTEGRAL DE  
MEMBRANA QUE CONFIERE INMUNIDAD A LA MICROCINA E492

Seminario de Título

Entregado a la Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al Título de  
Ingeniera en Biotecnología Molecular



Por

Beatriz María González Muñoz

Enero, 2010  
Santiago-Chile

Director de Seminario de Título: Dra. Rosalba Lagos Mónaco



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

### “DETERMINACIÓN DE LA TOPOLOGÍA DE MCEB, UNA PROTEÍNA INTEGRAL DE MEMBRANA QUE CONFIERE INMUNIDAD A LA MICROCINA E492”

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

**BEATRIZ MARIA GONZÁLEZ MUÑOZ**

*Dra. Rosalba Lagos Mónaco*  
**Directora Seminario de Título**

Handwritten signature in blue ink over a horizontal line.

**Comisión de Evaluación**

Dr. Nicolás Guiliani  
**Presidente Comisión**

Handwritten signature in blue ink over a horizontal line.



Dr. Ricardo Cabrera Paucar  
**Evaluador**

Handwritten signature in blue ink over a horizontal line.

Santiago de Chile, enero de 2010

## AUTOBIOGRAFÍA



Nací durante la lluviosa tarde-noche del primero de julio del año 1985, y me transformé de esta forma en la primogénita del matrimonio compuesto por Mónica Muñoz y Alejandro González. Debido a un pequeño defecto de fábrica que hasta el día de hoy nadie puede explicar, a los 6 meses mi madre consideró necesario que yo entrara a la Teletón. Buena decisión de su parte, ya que ahí no sólo aprendí a relacionarme con otros niños y a valerme por mí misma, sino que me inculcaron mi filosofía de vida: "Si a la primera no te resulta, sigue tratando hasta que lo logres". Nacieron luego mis hermanos, y se activó con esto mi chip de "hermana mayor con loqueos de madre". Desde los 6 meses que paso mis veranos en la séptima región, en Curicó a la costa, en el fundo familiar. Acá todos los veranos me desestreso, paso de mi color blanco pantruca a uno un poquito más tostado y leo en cantidades industriales.

Por sugerencia de la Teletón, mis papás me metieron al sistema escolar a los 3 años, y yo de verdad creo que ahí comencé a vivir el ñoñeo máximo. O sea, tenía tres años y yo iba al jardín con uniforme y corbata... Pasaron los años, llegó marzo y yo ingresé al Colegio Filipense, en donde estuve desde Kinder hasta Cuarto Medio. Lejos, la mejor "experiencia colegio" que pude haber tenido. Me encantó el pasar 13 años con puras niñas, en colegio de monjas y con profesores que no sólo nos enseñaban, sino que también se preocupaban por nosotras. Acá mi ñoñeo ya estaba en niveles altos, lo cual queda totalmente demostrado con estos datos: terminé todos los cursos como la mejor alumna, y salí como la mejor de la promoción (e incluso un año salí escogida como mejor compañera, pero este es un hecho que hasta el día de hoy no se puede explicar).

En el verano del 2002, mientras aún era una chiquilla escolar inocente, me metí a la Escuela de Verano de la Chile para tomar el curso de Biotecnología, ya que esta era una carrera que acababa de descubrir y quería entender... Best.Decision.Ever... No sólo se me olvidó el no ir a la Gira de estudios con el resto de mi curso, sino que también descubrí mi vocación, juro que tuve como un llamado hacia la ciencia y decidí que a esto yo me quería dedicar, que con esto yo iba a llegar al Nobel.

En el 2004 comenzó mi vida universitaria y no sólo tuve suerte en lo que se refiere a mi entrada a la carrera, sino que también por la gente con la que pude relacionarme. Encontré un grupo realmente bueno de amigos, con quienes además podía estudiar y que estaban igual de motivados que yo con esta carrera. Es difícil, no lo voy a negar, pero al mismo tiempo estoy segura de haber tomado una muy buena decisión.

En estos momentos y como toda mi vida, vivo con mis papás, mis hermanos y la mascota familiar, una erizo de tierra que nos tiene como verdaderos esclavos. En marzo comenzaré con mi proyecto de Magister y seguiré juntando plata para viajar por el mundo en un futuro no muy lejano... o para ir a conciertos.



*Dedico esta tesis a mis papás, Mónica y Alejandro  
Y a mis hermanos, Javier y Lorena.*

*Best,  
You've got to be the best  
You've got to change the world  
And you use this chance to be heard  
Your time is now.  
(Muse, "Butterflies and Hurricanes")*



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir agradeciéndolo a mi profe tutora, la Doctora Rosalba Lagos. Le agradezco el haber corrido el riesgo de aceptarme en su laboratorio y de darme cabida en su línea de investigación. Estoy tremendamente agradecida por todo el ánimo y el apoyo que me dio en momentos en los cuales yo seriamente pensaba cambiarme a pedagogía en religión, por toda la guía entregada no sólo en lo referente al trabajo de laboratorio, sino que también a problemas de la vida "civil". Por siempre valoraré el haber sido entrenada bajo su tutela, ya que aprendí sobre rigurosidad, orden y responsabilidad.

También quisiera agradecer las opiniones entregadas por el Dr. Octavio Monasterio en las reuniones de los días lunes sobre mi trabajo, me ayudaron a ver las cosas no sólo desde un punto de vista netamente microbiológico.

Obviamente, no puedo dejar de agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Biología Estructural y Molecular (BEM o CEM para los amigos) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. No sólo por toda la ayuda entregada, sino que también por hacer entretenida mi vida y por hacerme despertar con ganas de ir a trabajar. Cuando yo entré al lab como una humilde Isaura fui educada por Mario Leiva y por Jorge Flores, y por esto estaré agradecida hasta el fin de los días. Les agradezco la paciencia, las ganas de enseñar, el haberme contestado cada una de mis "dudas de la vida" y por hasta el día de hoy darse un tiempo para discutir resultados, para enseñarme algo y sobre todo para dar jugo. También debo agradecer la guía entregada por Gabriela Mercado y Sergio Gutiérrez, ancestros de la microcina que me entregaron conocimiento milenario. Obviamente, Roselyn tiene una mención especial en estos agradecimientos. Sin ella no tendría ni un solo reactivo, no me reíría tanto, no podría conversar y mi vida en el lab no sería ni la mitad de entretenida de lo que es. Gracias Roselyn por entender mis ataques de orden y por apoyarlos. Gracias también a Maca por estar ahí cada vez que la necesité, al igual que a Don Pedro. Agradezco también a los microcinos y tubulinos que tuvieron paciencia para enseñarme y sobre todo por aguantarme todo este tiempo.

Un agradecimiento aparte se merece Daniela Muñoz, mi primera amiga biotec y hasta el día de hoy mi compañera diaria. Hemos pasado por cursos terribles, por juntaciones que nunca realmente ocurrieron y otras que no tenemos ningún problema en confesar, por laboratorios de docencia y por periodos de violencia intrafamiliar. Gracias por estar ahí en cada momento de estos 6 años y sobre todo por haberme aguantado. Obviamente debo también agradecer al resto de mis amigos biotecs, sin los cuales no podría haber llegado a este momento: Sonia, Mati, Gaby, Vale, Pame, Nacho y José.

Por último, pero no por eso de forma menos importante, le agradezco a mi familia. A mis padres de forma especial por haber aceptado que yo quería estudiar esto que hasta el día de hoy nadie puede explicar, por aguantar mis dramas con los ramos, con el laboratorio y con lo que el estrés me causa cuando no tengo vacaciones. Gracias por nunca haberme presionado a estudiar algo más convencional, y sobre todo por haberme ayudado a llegar hasta este momento, por haberme guiado por este camino que empezó cuando tenía 3 años y entré al jardín infantil. Gracias por haberme dejado estar en un curso de verano que me ayudó a confirmar mi vocación, por su apoyo incondicional durante toda mi etapa escolar y sobre todo por seguir auspiciándome en mi vida estudiantil futura. Quiero hacer mención especial a mis hermanos, que me escucharon durante estos 6 años quejarme, llorar, estresarme y sobre todo hablarles de mi vida en la ciencia aún cuando no les interesaba. Es bueno saber que me escuchan, y que por eso son capaces de diferenciar *D.melanogaster* hembras de machos, y conocen a los cnidarios. Le quiero agradecer también a mis abuelos, a mi tío Osvaldo y a mis

primas por estar siempre pendientes de mi vida universitaria, por participar en cadenas de oración en ciertos momentos importantes y por tener el tacto suficiente para no preguntar cuando yo estaba con la nube negra sobre la cabeza. Por último, me gustaría agradecerle a mi nana, Rosa Donoso, el apoyo que siempre me ha prestado y por preocuparse de mí durante todos estos años.

No puedo dejar de agradecerle a Dios el haber podido llegar hasta este momento en mi vida.





## INDICE DE CONTENIDOS

AUTOBIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Bacteriocinas.....	1
1.2. La microcina E492.....	2
1.2.1. Propiedades de la microcina E492 .....	2
1.2.2. Determinantes genéticos del sistema productor de la microcina E492 .....	3
1.2.3. Mecanismo de acción de la microcina E492.....	6
1.2.4. Proteína de inmunidad a la microcina E492. ....	9
1.3. Estudio de la topología de proteínas de membrana.....	12
HIPÓTESIS .....	17

OBJETIVOS .....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos Específicos .....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.1. Materiales .....	19
2.1.1. Reactivos .....	19
2.1.2. Cepas bacterianas .....	20
2.1.3. Plásmidos y vectores.....	20
2.1.4. Partidores.....	22
2.2. Métodos.....	22
2.2.1. Medios de cultivo.....	22
2.2.2. Técnicas moleculares.....	24
2.2.3. Purificación de microcina E492 .....	24
2.2.4. Cuantificación de microcina E492.....	25
2.2.5. Construcción de fusiones traduccionales entre la proteína de inmunidad a la microcina (MceB) y la proteína $\beta$ -galactosidasa (LacZ) .....	25
2.2.6. Caracterización de las fusiones traduccionales mediante PCR .....	26
2.2.7. Ensayos de actividad bactericida sobre las fusiones traduccionales obtenidas .....	26
2.2.7.1. Ensayo de formación de halo de inhibición de crecimiento.....	26





2.2.7.2. Ensayo de sensibilidad a la microcina E492 en cultivos líquidos .....	26
2.2.8. Secuenciación de las fusiones traduccionales.....	27
2.2.9. Medición de la actividad de $\beta$ -galactosidasa.....	27
RESULTADOS .....	28
3.1. Construcción de las fusiones traduccionales MceB::LacZ.....	28
3.2. Caracterización fenotípica de las fusiones MceB::LacZ, MceB $\Delta$ 55-95::LacZ y MceB $\Delta$ 21-95::LacZ.....	32
3.3. Comprobación de las fusiones MceB::LacZ, MceB $\Delta$ 55-75::LacZ y MceB $\Delta$ 21- 95::LacZ .....	33
3.4. Sensibilidad de las fusiones MceB::LacZ y MceB $\Delta$ 21-95::LacZ a la microcina E492 .....	36
DISCUSIÓN .....	42
CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo .....	21
<b>Tabla 2.</b> Plásmidos y vectores utilizados en este trabajo.....	21
<b>Tabla 3.</b> Partidores utilizados en este trabajo en las reacciones de PCR y secuenciación.....	23
<b>Tabla 4.</b> Sensibilidad a la microcina E492 de las células que portan las distintas fusiones traduccionales de la proteína de inmunidad.....	40
<b>Tabla 5.</b> Ensayo de sobrevivencia a la microcina E492 sobre las cepas que expresan las distintas fusiones con la proteína MceB.....	40





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los determinantes genéticos del sistema productor de la microcina E492. ....	4
Figura 2. Mecanismo de acción de la microcina E492. ....	7
Figura 3. Secuencia aminoacídica de la proteína MceB y predicción de su topología en la membrana citoplasmática. ....	10
Figura 4. Productos de PCR obtenidos para las distintas fusiones MceB-LacZ. ....	29
Figura 5. Patrones de digestión de las diferentes fusiones MceB-LacZ. ....	30
Figura 6. Diseño de los plasmidios de este trabajo. ....	31
Figura 7. Caracterización fenotípica de las distintas fusiones MceB-LacZ. ....	34
Figura 8. Extracción de ADN plasmidial de clones al azar que contienen las distintas construcciones, visualizadas en 1% agarosa. ....	35
Figura 9. Reacciones de PCR para comprobar las fusiones MceB::LacZ y MceB $\Delta$ 21-95::LacZ. ....	37
Figura 10. Alineamiento de la secuencia del plásmido pBA-LacZ (A) con las secuencias de las fusiones MceB::LacZ (B) y MceB $\Delta$ 21-95::LacZ (C). ....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	ATP Binding Cassette
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>Da</b>	Dalton
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad Optica medida a 600 nm
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>GFP</b>	Proteína Fluorescente Verde (siglas en inglés)
<b>kb</b>	Kilobases
<b>Mcc</b>	Microcina
<b>nm</b>	Nanometros
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (siglas en inglés)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>TEMED</b>	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactopiranósido

## RESUMEN

La microcina E492 es una bacteriocina que actúa sobre cepas de la familia *Enterobacteriaceae* a través de la formación de canales iónicos en la membrana de la célula, lo que lleva a su despolarización. La proteína MceB es una proteína integral de membrana que confiere inmunidad a esta microcina. No se ha determinado experimentalmente su topología en la membrana citoplasmática pero perfiles de hidropatía indican que tendría tres regiones transmembrana, con el extremo N-terminal en el periplasma y su C-terminal en el citoplasma. Tampoco se conoce su mecanismo de acción, pero se cree que cada una de las hélices transmembrana tienen distinta importancia en la función protectora.

Para determinar experimentalmente la topología de esta proteína, se realizaron fusiones entre cada una de las hélices transmembrana y la proteína LacZ, la cual sería activa sólo cuando la porción de  $\beta$ -galactosidasa se localiza en el citoplasma. Se estudió además la contribución de cada hélice en la actividad protectora. Los resultados obtenidos permiten afirmar que el extremo carboxilo terminal de esta proteína se encuentra hacia el citoplasma de la célula, de igual forma que el primer "loop" hidrofílico. Este resultado concuerda con los modelos obtenidos a partir de perfiles de hidropatía. En lo que se refiere a la protección entregada por las distintas hélices frente a la microcina E492, se observó que la fusión de la proteína completa con  $\beta$ -galactosidasa es resistente, en tanto que la fusión de la primera hélice con  $\beta$ -galactosidasa es muy sensible a su acción, por lo que se concluye que la primera hélice transmembrana no es suficiente para entregar protección frente a esta bacteriocina.

## ABSTRACT

Microcin E492 is a bacteriocin that acts against strains of the *Enterobacteriaceae* family through the formation of ion channels in the inner membrane of the cells, producing its depolarization. MceB is an integral membrane protein that confers immunity to this microcin. The topology of this protein in the cytoplasmic membrane has not been experimentally determined, but hydrophaty profiles predict that this protein has three transmembrana regions with the amino terminal to the periplasma and the carboxy terminal to the cytoplasm. The MceB mechanism of action is also unknown, but it has been proposed that each transmembrane helixes has a different importance in the protective function.

To experimentally determine the topology of this protein, fusions between MceB transmembrane helixes and LacZ were performed. These constructions would be active if the  $\beta$ -galactosidase portion is located to the cytoplasm. The contribution of each helix in the protective activity was also studied. The carboxy terminal and the first hydrophilic loop of MceB were found to be located to the cytoplasm of the cell. These results agree with the models obtained by hydrophaty profiles. The protection given by each helix against microcin E492 was also tested. The fusion between the complete MceB protein and  $\beta$ -galactosidase protects against mceE492, but the fusion between the first helix and  $\beta$ -galactosidase is very sensitive to its action, indicating that the first transmembrane helix is not enough to give protection against this bacteriocin.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1. Bacteriocinas

En el medio ambiente los microorganismos deben competir por los nutrientes y por un nicho ecológico. Para eliminar a sus competidores y de esta forma aumentar sus probabilidades de supervivencia, algunos microorganismos producen una amplia gama de sustancias químicas, entre las que se encuentran los antibióticos clásicos, productos metabólicos, agentes líticos, exotoxinas y bacteriocinas (Riley y Chavan, 2007).

Las bacteriocinas son proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas que son secretadas al medio extracelular, en donde cumplen con su acción antibacteriana al interactuar con la célula blanco. Estos antibióticos sólo afectan a microorganismos de la misma especie o de especies relacionadas (Reeves, 1965; Riley y Wertz, 2002). Las bacteriocinas actúan a través de diversos mecanismos, como son la inhibición de la transcripción (Bellomio y cols., 2007), la degradación de ADN (Toba y cols., 1988) o formando poros en la membrana citoplasmática (Lagos y cols., 1993; Braun y cols., 2002; Cascales y cols., 2007).

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas se clasifican de acuerdo a su masa molecular, y es posible distinguir dos grupos: las colicinas, que poseen una masa mayor a 10 kDa, y las microcinas, cuya masa es inferior a 10 kDa (Baquero y Moreno, 1984). Las colicinas presentan las siguientes características: son producidas por cepas de *Escherichia coli*, los genes necesarios para su producción están localizados en plásmidos y su expresión se encuentra regulada por el sistema

SOS (Riley y Wertz, 2002). Las microcinas, por su parte, son antibióticos de bajo peso molecular producidas por miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Baquero y Moreno, 1984) que son resistentes a condiciones extremas de pH o temperatura y a algunas proteasas, son solubles en metanol, y no son inducibles por el sistema SOS (Kolter y Moreno, 1992). Las microcinas son excretadas al medio extracelular, a diferencia de las colicinas que se liberan mediante lisis de la célula productora (Braun y cols., 2002). Los genes implicados en la expresión de las microcinas se organizan en operones, que están constituidos al menos por tres tipos de genes: el gen estructural de la microcina, el gen de la inmunidad a la microcina y el gen o los genes responsables de la salida de la microcina al medio extracelular (Kolter y Moreno, 1992). Las microcinas se sintetizan como precursores y la mayoría son modificadas post traduccionalmente, por lo que además existen los llamados genes de la maduración (Kolter y Moreno, 1992).

## **1.2. La microcina E492**

### **1.2.1. Propiedades de la microcina E492**

La microcina E492 (mccE492) es una bacteriocina producida y excretada de forma natural por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 que actúa sobre cepas de la familia *Enterobacteriaceae* (de Lorenzo, 1984). Su mecanismo de acción es a través de la despolarización de la membrana citoplasmática de la célula blanco (de Lorenzo y Pugsley, 1985), debido a que la mccE492 es capaz de formar canales iónicos selectivos para cationes en bicapas lipídicas (Lagos y cols., 1993).

La mccE492 se produce en forma activa solamente en la fase exponencial de crecimiento bacteriano (Orellana y Lagos, 1996; Corsini y cols., 2002), a diferencia de

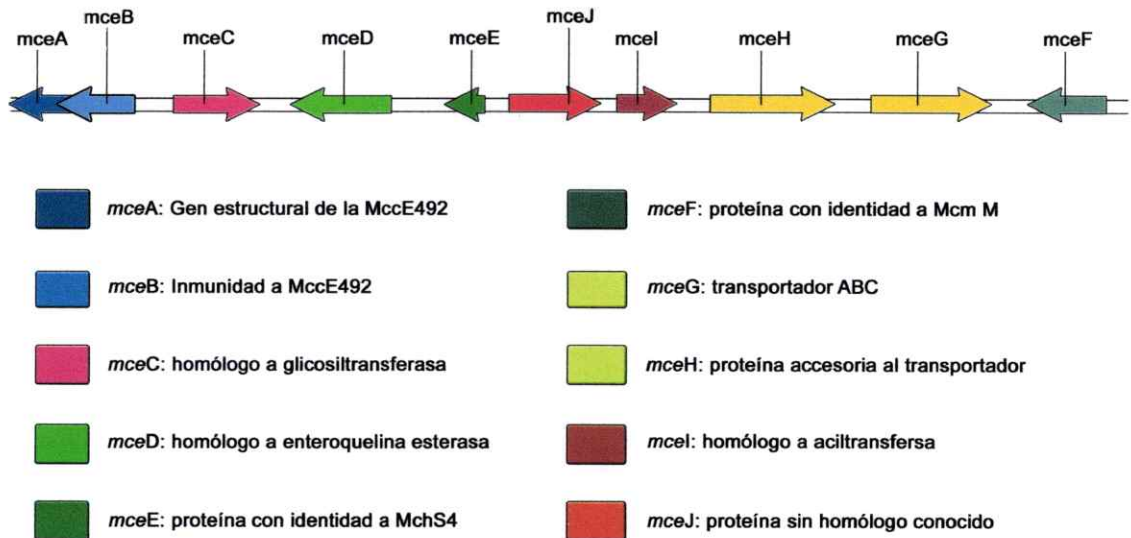


otras microcinas que son producidas durante la fase estacionaria principalmente (Kolter y Moreno, 1992). La forma no modificada de la *mccE492* posee una masa molecular de 7886 Da, un *pI* de 3.8 (Lagos y cols., 1999), es resistente al tratamiento con tripsina, al pH ácido y a temperaturas sobre los 90°C (de Lorenzo, 1984). Otras características destacables de la *mccE492* son la capacidad de inducir la apoptosis en líneas celulares humanas (Hetz y cols., 2002) y la de formar de fibras tipo amiloide tanto *in vivo* como *in vitro* (Bieler y cols., 2006; Marín 2006).

### **1.2.2. Determinantes genéticos del sistema productor de la microcina E492**

Los determinantes genéticos necesarios para la producción, el procesamiento, la exportación y la inmunidad de la *mccE492* se encuentran en un segmento de 13 kilobases (kb) del cromosoma de *K. pneumoniae*. Este segmento fue clonado y expresado en *E. coli*, obteniéndose microcina con propiedades idénticas a la producida por *K. pneumoniae* RYC492 (Wilkins y cols., 1997). Al analizar este segmento a través de un mapa de restricción, mutagénesis al azar usando el transposón Tn5, análisis bioinformático y secuenciación, fue posible identificar al menos 14 marcos de lectura abiertos denominados *mceA,B,C,D,E,J,I,H,G,F* y *orfK,L,S2,S3,X* (Lagos y cols., 2009). Los genes *mce* se ordenan en seis unidades transcripcionales (Figura 1) (Lagos y cols., 2001).

La primera unidad corresponde a los genes *mceA* y *mceB*. El gen *mceA* corresponde al gen estructural de la *mccE492*, y codifica para una pre-proteína que es procesada al momento de su exportación en el amino terminal, produciéndose una proteína de 84 aminoácidos (Lagos y cols., 2001). Existen dos aminoácidos que potencialmente podrían funcionar como inicio de la traducción: las metioninas en posición 1 y 5. Experimentos realizados en este laboratorio indican que cuando



**Figura 1. Esquema de los determinantes genéticos del sistema productivo de la microcina E492.**

Las flechas representan la orientación de los distintos marcos abiertos de lectura que se encuentran en el fragmento de 13 kb que contiene al sistema productivo de la microcina E492. Se indican además sus funciones o las homologías que presentan. En amarillo se muestran los genes involucrados en la exportación, mientras que en rojo y rosado se muestran los relacionados con la maduración de esta microcina. En azul está el gen estructural y el gen de la inmunidad. En verde están los genes cuya función definitiva aún no ha sido asignada. Para simplificar la figura no se incluyó los ORFs mencionados en el texto.

se reemplaza la metionina 5 por otro aminoácido no se observa producción de microcina, lo que sugiere fuertemente que esta metionina corresponde al inicio de la traducción (Leiva, 2008). El gen *mceB*, por su parte, codifica para una proteína integral de membrana (MceB) de 95 aminoácidos que confiere inmunidad ante la *mccE492* (Lagos y cols., 1999).

Los genes *mceC*, *mceI* y *mceJ* están involucrados en la maduración de la *mccE492* (Lagos y cols., 2001). El gen *mceC* codifica para una proteína de 370 aminoácidos que es homóloga a una glicosiltransferasa, el gen *mceI* para una proteína de 163 aminoácidos que tiene homología con una aciltransferasa, y el gen *mceJ* codifica para una proteína de 524 aminoácidos que no tiene homólogo conocido (Lagos y cols., 2001). La proteína MceC transfiere una molécula de glucosa a la enteroquelina para dar origen a la molécula de salmoquelina, y las proteínas MceIJ unen covalentemente la salmoquelina al último aminoácido de la *mccE492*, la serina 84 (revisado en Lagos y cols., 2009). La unidad *mceIJ* se transcribe en la fase exponencial de crecimiento bacteriano, mientras que el gen *mceC* lo hace durante la fase exponencial y la fase estacionaria (Corsini y cols., 2002).

El gen *mceD* codifica para una proteína de 414 aminoácidos que es homóloga a una enteroquelina esterasa (Lagos y cols., 2001), mientras que el gen *mceE* codifica para una proteína de 114 aminoácidos sin función asignada, pero que presenta identidad con MchS4, una proteína del sistema de Mcch47 que promueve la producción de enteroquelina (Lagos y cols., 2009).

Los genes *mceG* y *mceH* constituyen una unidad transcripcional y se encuentran involucrados en la exportación de la *mccE492*. El gen *mceG* codifica para una proteína de 698 aminoácidos que tiene alta identidad con los transportadores ABC

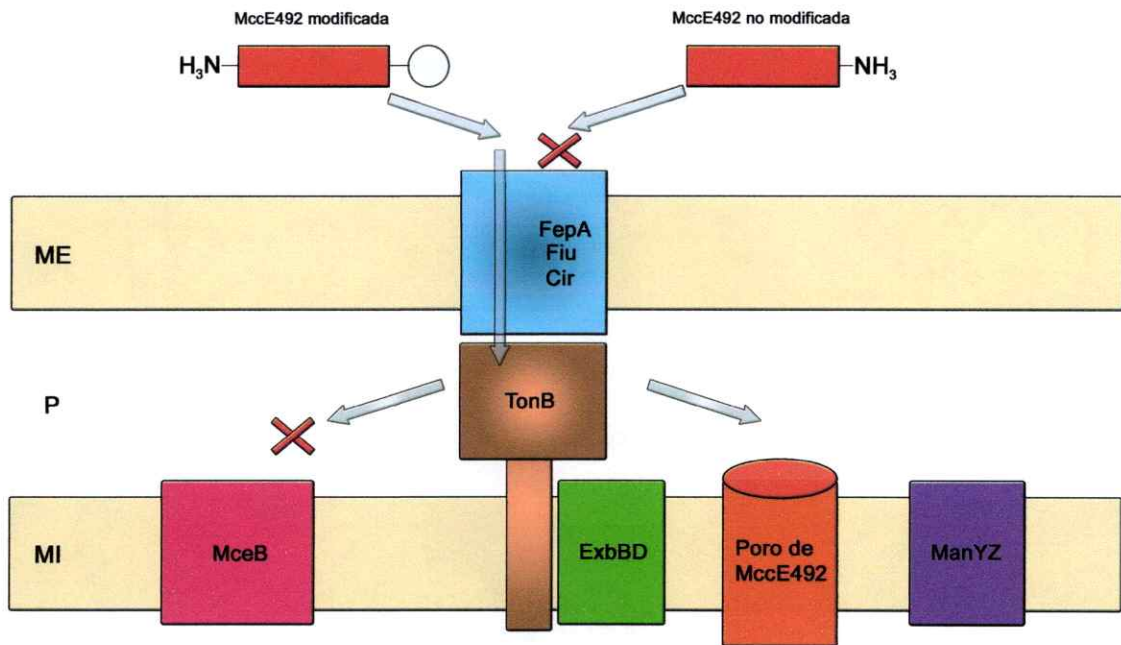
del sistema exportador de tipo I. El gen *mceH* codifica para una proteína de 413 aminoácidos que correspondería a la proteína accesoria del sistema de exportación (Lagos y cols., 2001).

El gen *mceF* es el último gen del sistema productor de la microcina y codifica para una proteína que posee un 75% de identidad con la proteína McmM de los sistemas de las microcinas H47 y M (Lagos y cols., 2009). No se ha determinado aún experimentalmente una función para esta familia de proteínas debido a que no existe un fenotipo claro asociado a la falta de esta proteína. Sin embargo, se ha encontrado similitud de esta proteína con la familia de las prenil proteasas (Lagos y cols., 2009).

### **1.2.3. Mecanismo de acción de la microcina E492.**

Para ejercer su acción, la microcina debe cruzar la membrana externa de las células sensibles y traslocarse al espacio periplasmático a través de los receptores de sideróforos tipo catecol FepA, Fiu y Cir (Strahsburger y cols., 2005). Estos receptores reconocen a la *mccE492* modificada, proceso que se lleva a cabo gracias a los productos de los genes de la maduración *mceCIJ* (Figura 2) (Thomas y cols., 2004; revisado en Lagos y cols., 2009).

Una vez dentro del periplasma de la célula sensible, la *mccE492* necesita de la proteína TonB para ejercer su acción bactericida en la membrana interna (Pugsley y cols., 1986; Lagos y cols., 2001). TonB es una proteína de 239 aminoácidos cuya función es transducir la energía de la membrana interna a la membrana externa de la célula, que participa en el transporte activo de diversos sideróforos, metales y otros nutrientes (Postle y Kadner, 2003). Esta transducción de energía involucraría el acoplamiento de TonB al gradiente de protones en la membrana interna de la célula, y el posterior cambio conformacional que se produciría en la proteína TonB y que haría



**Figura 2. Mecanismo de acción de la microcina E492.**

La microcina modificada post-traduccionalmente puede entrar a la célula blanco a través de los receptores de sideróforos FepA, Fiu y Cir, mientras que la microcina no modificada no puede hacerlo debido a que no es reconocida por estos receptores. La microcina se trasloca al periplasma con ayuda del complejo TonB/ExbBD, y luego se inserta en la membrana interna, formando el poro que produce la despolarización de la membrana interna. El complejo proteico ManYZ es esencial para la actividad bactericida de la mceE492, ya que se cree que actúa como una chaperona para las bacteriocinas en la membrana interna de la célula blanco. La presencia de la proteína de la inmunidad (MceB) impide que la microcina lleve a cabo su actividad bactericida a través de un mecanismo que aún no se encuentra dilucidado. ME: Membrana Externa; P: Periplasma; MI: Membrana Interna.

posible la interacción de esta proteína con los receptores presentes en la membrana externa (Postle y Held, 2002).

Esta proteína tiene tres dominios: el dominio amino terminal (aminoácidos 1-65), que ancla la proteína a la membrana interna de la célula; un dominio rico en residuos de prolina (aminoácidos 66-102), que se encuentra en el periplasma; y el dominio carboxilo terminal (103-239), que interactuaría con los receptores presentes en la membrana externa (Larsen y cols., 2003; Postle y Kadner, 2003).

Para la transducción de la energía, TonB necesita de las proteínas ExbB y ExbD, que se localizan en la membrana interna de las células (Larsen y cols., 1999). Este complejo entregaría energía a los transportadores presentes en la membrana externa, para que de esta forma puedan movilizar los sustratos hasta el periplasma (Postle y Kadner, 2003). No está claro el mecanismo por el cual ocurre la transferencia de energía, ni tampoco las interacciones de las proteínas o su estequiometría en el complejo. Lo cierto es que ExbB y ExbD son necesarias para que ocurra el transporte y que contribuyen a la estabilidad de TonB (Ahmer y cols., 1995).

Otra proteína esencial para la acción bactericida de la *mccE492* es ManYZ, que corresponde a un complejo proteico que forma parte del sistema de la manosa permeasa. Mutantes en ManYZ son resistentes a la acción bactericida de la *mccE492* (Bieler y cols., 2006). Se cree que este transportador estaría actuando como una especie de chaperona para las bacteriocinas en la membrana citoplasmática (Lagos y cols., 2009).

Cuando la *mccE492* se inserta en la membrana citoplasmática de la célula sensible, forma canales iónicos que llevan a la despolarización de la célula, a la pérdida del potencial de membrana y a una reducción drástica de los niveles de ATP

(de Lorenzo y Pugsley, 1985; Lagos y cols., 1993; Baeza, 2003; Destomieux-Garzón y cols., 2003).

#### **1.2.4. Proteína de inmunidad a la microcina E492.**

La inmunidad a la *mccE492* es conferida por la proteína *MceB*, que se expresa de forma coordinada con el gen estructural de la microcina. Esta proteína tiene 95 residuos aminoacídicos y una masa teórica de 11,5 kDa (Lagos y cols., 1999).

Existen dos mecanismos de acción reportados para proteínas de inmunidad de sistemas de colicinas formadoras de poro: una interacción directa con la colicina, lo que inactiva la función formadora de poro de la colicina, y/o interacción con el aparato de traslocación de la colicina, bloqueando su importación o inserción (Geli y Lazdunski, 1992; Cramer y cols., 1995). El mecanismo de acción más probable de *MceB* implicaría una interacción con el complejo TonB-ExbBD, para de esta forma impedir la inserción correcta de la *mccE492* en la membrana interna. Esto explicaría mejor por qué bajos niveles de expresión de *MceB* confieren protección a la *mccE492*, ya que la probabilidad de encuentro y asociación con el aparato de traslocación sería mayor (Baeza, 2003).

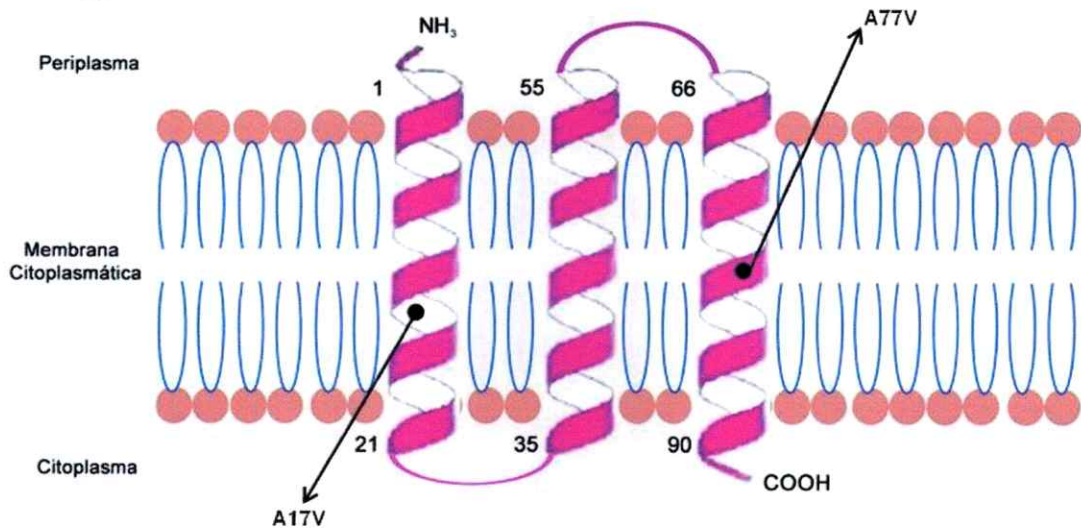
De acuerdo a perfiles de hidropatía la proteína de inmunidad correspondería a una proteína integral de membrana con tres regiones transmembrana, que comprenden los aminoácidos 1 a 21, 35 a 55 y 66 a 90 (Baeza, 2003). Programas de predicción de topología de proteínas de membrana sugieren que su extremo amino terminal se encontraría ubicado hacia el periplasma, mientras que su extremo carboxilo terminal estaría en el citoplasma de la célula (Figura 3) (Baeza, 2003).

Experimentos previos realizados en este laboratorio de mutagénesis al azar con hidroxilamina del gen *mceB* permitieron aislar dos mutantes con fenotipo sensible a la

**A**

MTLLSFGFSPVFFSVMAFCI**SRSKFYPQRTRNKVIVLILLTFFICFLYPLT**  
KV**YLVGSYGIFDKFY**LFCFISTLIAIAINVVILTINGAKKNERN

**B**



**Figura 3. Secuencia aminoacídica de la proteína MceB y predicción de su topología en la membrana citoplasmática.**

**A)** Secuencia aminoacídica de la proteína MceB. En rojo se muestra la región correspondiente al loop citoplasmático, en azul el loop periplasmático y en negrita las hélices transmembrana. **B)** Este modelo fue creado a partir de los datos que se encuentran en Baeza, 2003. Las mutantes puntuales que producen un fenotipo sensible a la microcina se encuentran indicadas. Se usaron también los programas TmPred (Hoffman y Stoffel, 1993), TopPred (Claros y von Heijne, 1994) y SOSUI (Hirokawa y col, 1998).



microcina: una mutante con un cambio puntual de un residuo de alanina por valina en la posición 17 (MceB A17V), y otra en la posición 77 (MceB A77V). La mutación en ambos casos es conservada, pues tanto alanina como valina son aminoácidos hidrofóbicos, pero difieren en el tamaño de la cadena lateral. De acuerdo a los perfiles de hidrofobicidad, los cambios estarían ubicados en las regiones transmembrana de la proteína. La predicción topológica de estas mutantes indican que no se producirían cambios en la estructura de la proteína, por lo que las mutaciones estarían afectando la interacción con otras proteínas en la membrana, la cual sería necesaria para que MceB cumpla su función. Aún cuando las mutaciones son conservadas, al realizar ensayos para determinar la sensibilidad a la mceE492, MceB A17V presentó mayor sensibilidad a la mceE492 que la mutante MceB A77V. Este resultado indica que la mutación en la hélice amino terminal de la proteína de inmunidad presenta un efecto mayor (100 veces) sobre la acción protectora que la mutante puntual en la hélice carboxilo terminal (Baeza, 2003).

Para determinar si esta pérdida de actividad protectora en las mutantes de MceB se debía a la interacción con TonB, se buscaron mutantes en TonB capaces de compensar el fenotipo sensible a la mceE492 de MceB A17V y MceB A77V. Se obtuvieron tres mutantes compensatorias en TonB. Dos mutantes presentaban codones de término que llevarían a la producción de una proteína TonB trunca, correspondientes a los primeros 42 aminoácidos (TonB  $\Delta$ 43-239), y 108 aminoácidos (TonB  $\Delta$ 108-239), y por lo tanto presentarían las regiones citoplasmática, transmembrana y una pequeña fracción rica en residuos de prolina. La tercera mutante presentó un cambio puntual de una serina por una leucina en la posición 16 (TonB S16L), que estaría en la región transmembrana de la proteína TonB. Estos resultados

apoyan la hipótesis de una interacción entre las proteínas MceB y TonB en el mecanismo de acción de la inmunidad ante la mceE492, y también sugiere que sólo la región amino terminal de TonB estaría implicada en esta interacción (Baeza, 2003).

Si el mecanismo de acción de la proteína de inmunidad a la mceE492 involucra una interacción con TonB, esto podría ocurrir de dos formas. La primera implica que la interacción de estas dos proteínas inhibiría la interacción de TonB con la mE492, por lo que ésta no podría insertarse en la membrana citoplasmática. Alternativamente, la unión de MceB con TonB podría ayudar a que la proteína de inmunidad se ubique de forma tal que pueda interactuar con la mceE492, y de esta forma impedir su acción bactericida. Es posible que también exista una mezcla de ambos mecanismos. Esta mezcla podría explicar las diferentes sensibilidades de las mutantes MceB A17V y MceB A77V, ya que implicaría que estas mutaciones podrían afectar distintas interacciones de MceB: por un lado la interacción con TonB y por otro la interacción con la mceE492. De ser así, MceB interactuaría con la mceE492 una vez que ésta ya se ha insertado en la membrana interna (Baeza, 2003). Este mecanismo fue descrito para la inmunidad a la colicina E1 (Cramer y Song, 1991; Lindeberg y Cramer, 2001) y para la colicina A (Espeset y cols., 1996).

### **1.3. Estudio de la topología de proteínas de membrana.**

Existen pocos métodos para generar cristales tridimensionales de proteínas de membrana y estos son complejos, por lo que se han producido considerablemente menos estructuras cristalográficas de proteínas de membrana que de proteínas citoplasmáticas. Por lo tanto, se emplean métodos alternativos bioquímicos y de predicción para obtener información acerca de la estructura de proteínas de membrana

(Van Geest y Lolkema, 2000). Aún cuando las proteínas de membrana tienen distintos tamaños y formas, todas se rigen por principios comunes debido al ambiente lipídico en el que se encuentran sumergidas. Un aspecto muy importante en el estudio de las proteínas de membrana es su topología, es decir, el número de segmentos transmembrana que tiene y su orientación en la membrana (Daley y cols., 2005). Las restricciones fisicoquímicas impuestas por el ambiente lipídico entregan un método simple para predecir la topología, porque las predicciones se basan en dos observaciones principales: las  $\alpha$  hélices transmembrana son muy hidrofóbicas, y la distribución de cargas de los "loops" hidrofílicos que conectan los segmentos transmembrana siguen la regla de "positivos adentro", que afirma que los "loops" no traslocados tienen mayor cantidad de residuos cargados positivamente en relación a los "loops" traslocados (von Heijne, 1992). La primera observación se usa para identificar los segmentos transmembrana en una secuencia aminoacídica a través del análisis de la hidrofobicidad de los residuos, y la segunda se usa para predecir la orientación total de la proteína en la membrana (Van Geest y Lolkema, 2000).

Para verificar modelos predichos de la topología de proteínas de membrana, es necesario comprobar la existencia de los segmentos transmembrana y la localización de los "loops" hidrofílicos en los distintos compartimentos celulares. La naturaleza de la membrana lipídica, la estructura de las proteínas y la capacidad de modificarlas genéticamente ha permitido el desarrollo de técnicas bioquímicas y moleculares que se usan para establecer la topología de las proteínas de membrana.

Una técnica muy usada consiste en identificar regiones de la proteína que se encuentran en zonas opuestas de la membrana citoplasmática, y dentro de estas zonas, blancos específicos como sitios de N – glicosilación, residuos cisteína o sitios

proteolíticos. Debido a la impermeabilidad de la membrana a moléculas hidrofílicas, la accesibilidad de distintos reactivos a estos blancos específicos entrega una idea de su ubicación en distintos lados de la membrana. Otra técnica consiste en usar fusiones traduccionales, en las cuales una molécula reportera se fusiona a una de las regiones hidrofílicas de la proteína de membrana. Los reporteros que se utilizan son moléculas cuyas propiedades dependen de su ubicación subcelular. El gen que codifica para la molécula reportera se fusiona en distintas zonas del gen que codifica para la proteína de membrana, y las propiedades de la proteína de fusión resultante muestra hacia qué lado de la membrana citoplasmática se localiza el reportero (Van Geest y Lolkema, 2000).

Existen tres reporteros que se usan comúnmente para hacer fusiones en proteínas de células procariontes: la fosfatasa alcalina, la  $\beta$ -lactamasa y la  $\beta$ -galactosidasa. La fosfatasa alcalina (PhoA) es codificada por el gen *phoA*, y sólo puede plegarse en su conformación enzimáticamente activa cuando se encuentra en el periplasma (Rapp y cols., 2004). En el periplasma de la célula, la parte madura de PhoA se oxida, lo que permite que las cisteínas formen puentes disulfuro, gatillando el plegamiento correcto de la proteína. Este proceso se completa con la formación del dímero, generando el complejo proteico activo (Lehane y cols., 2005; Van Geest y Lolkema, 2000).

La  $\beta$ -lactamasa es una proteína codificada por el gen *bla* (Van Geest y Lolkema, 2000) que cataliza la hidrólisis de anillos  $\beta$ -lactámicos, que es una clase de antibióticos que tiene como blanco las enzimas encargadas de la biosíntesis de la pared celular que se encuentran en el periplasma. Por lo tanto, la  $\beta$ -lactamasa debe exportarse al periplasma para proteger a la bacteria del antibiótico. Esto significa que

cuando se encuentra fusionada a otra proteína, la resistencia a  $\beta$ -lactámicos se usa como indicador de exportación al periplasma (McCann y cols., 2007).

La  $\beta$ -galactosidasa (LacZ) es una enzima tetramérica que se usa generalmente de forma complementaria a la fosfatasa alcalina. Esta proteína presenta actividad enzimática cuando se localiza en el citoplasma de las células. Se ha descrito que cuando se encuentra bajo el control de una señal de exportación queda atrapada en la membrana, y no se pliega correctamente. Por lo tanto, fusiones de esta proteína a regiones periplasmáticas de proteínas de membrana son inactivas, mientras que fusiones a dominios citoplasmáticos son activos (Van Geest y Lolkema, 2000). Para determinar la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, se utilizan sustratos cromogénicos como X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactopiranosido) o ensayos espectroscópicos.

Experimentos previos de mutagénesis por transposición con un transposón derivado de Tn5 que contiene el gen *phoA* sin su promotor (Tn<sub>phoA</sub>) realizados en este laboratorio indican que mutantes por inserción en los cuales la inserción de PhoA ocurrió en la región de la proteína de inmunidad que se encontraría en el periplasma tienen actividad fosfatasa alcalina tanto en ensayos sobre placas como en medio líquido (Baeza, 2003). Esto concuerda con el modelo predicho de la topología de la proteína MceB en la membrana citoplasmática. Sin embargo, las secuencias de DNA obtenidas a partir de estas fusiones muestran que la inserción del gen de la fosfatasa alcalina no ocurrió en el marco de lectura apropiado, lo que significa que al traducirse quedaría fuera de fase. Por lo tanto, la existencia de la actividad fosfatasa alcalina no pudo ser atribuida a la fusión, sino más bien a un artefacto experimental.

En esta memoria de título se estudió la topología que presenta la proteína de la inmunidad MceB en la membrana citoplasmática de las células, a través de fusiones de

esta proteína con  $\beta$ -galactosidasa. Las fusiones no se realizaron por transposición al azar, sino mediante PCR se hizo la construcción dirigida en las distintas regiones hidrofílicas de la proteína de inmunidad. Es decir, se construyeron mutantes en donde MceB se encontraba fusionada a  $\beta$ -galactosidasa en el término de la primera, la segunda, y la tercera hélice transmembrana predichas. De esta forma, se identificó la orientación del extremo carboxilo terminal de la proteína de inmunidad y del primer "loop" hidrofílico, y con esto la topología de la proteína completa en la membrana interna. Además, se probó la efectividad de estas fusiones como proteínas de inmunidad de la *mccE492*.

## HIPÓTESIS

A partir de estos antecedentes bibliográficos, se puede postular que *la proteína MceB es una proteína integral de membrana que posee tres regiones transmembrana, con su extremo amino terminal ubicado hacia el periplasma y su extremo carboxilo terminal en el citoplasma de la célula. Además, esta proteína cumple su labor protectora a través de sus hélices transmembrana, que interactuarían con TonB y/o la mceE492 y tendrían un distinto nivel de importancia en estas interacciones. Esto se puede afirmar a que una mutación puntual conservada de un residuo en la hélice amino terminal de la proteína presenta un mayor efecto sobre la acción protectora que la mutante puntual en la hélice carboxilo terminal.*

Si las afirmaciones antes mencionadas son correctas, se espera que la fusión de MceB con LacZ tanto en el primer "loop" de MceB como en el extremo C-terminal presenten actividad  $\beta$ -galactosidasa. Adicionalmente se espera que estas fusiones tengan diferentes grados de protección a la mceE492.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar experimentalmente la topología de MceB, la proteína de inmunidad a la mceE492 en la membrana citoplasmática de las células productoras y estudiar la importancia de cada una de sus hélices en su función protectora.

### Objetivos Específicos

1. Creación de una proteína MceB fusionada con  $\beta$ -galactosidasa en su extremo carboxilo terminal.
2. Creación de una proteína MceB con una delección de los últimos 40 aminoácidos fusionada con  $\beta$ -galactosidasa.
3. Creación de una proteína MceB con una delección de los últimos 74 aminoácidos, fusionada con  $\beta$ -galactosidasa.
4. Caracterización de las fusiones obtenidas, a través de ensayos de sensibilidad a la mceE492 y secuenciación.
5. Caracterización de las fusiones obtenidas, a través de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en placa.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Reactivos

Las enzimas de restricción *NofI* y *FseI*, los marcadores de peso molecular para fragmentos de ADN de escala 100 pb y 1kb, y la enzima DNA Ligasa T4 fueron compradas en New England Biolabs (Ipswich, MA, Estados Unidos).

La enzima polimerasa de ADN *Taq* y los partidores diseñados en este trabajo fueron comprados en Invitrogen (Carlsbad, California, Estados Unidos).

La enzima polimerasa de ADN *Pfu* fue comprada en Stratagene (California, Estados Unidos).

Los desoxirribonucleótidos trifosfato fueron comprados en Omega Bio-Tek (Estados Unidos).

Las membranas de nitrocelulosa VSWP025000 utilizadas para remover las sales de los ácidos nucleicos antes de electroporar se compraron en Millipore (Estados Unidos).

La agarosa fue comprada en Fermelo Biotec (Santiago, Chile).

El cloramfenicol fue comprado en Andrómaco (Santiago, Chile).

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

El cloruro de sodio, hidróxido de sodio, azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, etanol, metanol, isopropanol, acetonitrilo y peróxido de hidrógeno fueron comprados en Merck (Darmstadt, Alemania).

La tiamina, ácido p-cumárico, TEMED, glucosa y tricina fueron comprados en Sigma Chemical Co (St.Louis, Missouri, Estados Unidos).

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

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

La bisacrilamida se compró en Bioworld (Atlanta, Estados Unidos).

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

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

La Silica Gel 100-C18 fue comprada en Waters Corporation (Estados Unidos).

El kit para la cuantificación de proteínas Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit fue comprado en Pierce Chemical Company (Rockford, IL, Estados Unidos).

El tris y la glicina se compraron en U.S. Biological (Swampscott, MA, Estados Unidos).

### **2.1.2. Cepas bacterianas**

En la tabla 1 se describen las distintas cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

### **2.1.3. Plásmidos y vectores**

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

**Tabla 1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.**

Cepa	Genotipo	Fuente
BW25113	<i>rrnB</i> DE <i>lacZ</i> 4787 <i>HsdR</i> 514 DE( <i>araBAD</i> )567 DE( <i>rhaBAD</i> )568 <i>rph</i> -1	Colección Keio
BL21	F <sup>-</sup> <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>)</i>	Novagen
DH5α	<i>supE</i> 44 Δ <i>lacU</i> 169 (Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>hsdR</i> 17 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>thi</i> -1 <i>relA</i> 1	Hanahan, 1983.

**Tabla 2. Plásmidos y vectores utilizados en este trabajo.**

Plásmidos	Características relevantes	Fuente o referencia
pACYC184	Plásmido de propósito general Cm <sup>R</sup> y Tet <sup>R</sup>	Chang y Cohen, 1978.
pJEM15	Derivado de pJAM229, portador de los determinantes genéticos de la microcina E492. Sobreproductor de <i>mccE</i> 492 activa. Duplicación de un fragmento <i>Sal</i> I de 2,5 kb (gen <i>mceF</i> ). Amp <sup>R</sup>	Wilkens y col., 1997.
pBA-LacZ	Derivado de pACYC184, portador de un segmento de 1 kb <i>Fse</i> I- <i>Not</i> I del sistema de la <i>mccE</i> 492 (genes <i>mceBA</i> y promotor natural), y un fragmento de 3 kb <i>Not</i> I- <i>Asc</i> I del gen <i>lacZ</i> . Cm <sup>R</sup>	Colección laboratorio, Gutiérrez y Tello, 2009

#### 2.1.4. Partidores

En la tabla 3 se describen los partidores utilizados en este trabajo.

### 2.2. Métodos

#### 2.2.1. Medios de cultivo

**Caldo Luria (LB):** Bactotriptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, NaOH 3,5 mM.

**Medio Mínimo M9:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1 g/L.

**Medio M9 suplementado:** El medio M9 se suplementó con CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1 g/ml, casaminoácidos 1 mg/ml y glucosa 0,2% p/v.

**Placas de agar:** Se prepararon las placas con medio LB y 1,5% p/v de agar agar.

**Agar Blando:** Se preparó con medio mínimo M9 y 0,7% 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 100 µL de un cultivo bacteriano crecido hasta fase estacionaria. Las cepas bacterianas que portan plásmidos recombinantes y/o transposones con resistencia a antibióticos se crecieron en medio líquido o en placas suplementadas con los antibióticos correspondientes, que se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 50 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL, estreptomina 10 µg/mL y el ácido nalidíxico a 10 µg /mL. Éstos fueron preparados según lo descrito por Sambroock y cols. (1989).

**Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo en las reacciones de PCR y secuenciación.**

Partidor	Secuencia (5' -> 3')
MceBcomp-Fus	CGGATTAATGG <u>CGGCCGCT</u> ACCATTCTCTCATTCTTAGCTCC
MceBper-Fus	CTTAGCGTTTG <u>CGGCCGCT</u> ACCATACACTTTTGTTAATGGAT
MceBcit-Fus	GACTACAGTAGCG <u>CGGCCGCT</u> ACCAATGATACAGAACGCCATGA
Mcc_Fus_F	ACAGGAGAAATCTAGAG <b>CGGCCGCGGCC</b> CAATAAAGAGAATACGC
RL1	CGGATAAAACATATGACATTACTTTTCATTTGG
RL2	AAAGCAAGAATTCAGTCCTTTTGACTAATTCT
LacZ Pelican R	CGGTACTTCAGGCGCGCCACCTTATTTTTGACACCAGACCA
Bma30	AGTAAATTCTATCCGTAGAGAACGCGAAAC
Bma20	TGCCCAATTAAGGTAGTTGACG

Subrayados se encuentran los sitios de restricción para *NotI*, y en negrita el sitio *FseI*.

### **2.2.2. Técnicas moleculares**

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

### **2.2.3. Purificación de microcina E492**

La mceE492 utilizada en este trabajo fue cedida por Daniela Muñoz, y el protocolo de purificación que siguió fue el que se utiliza en este laboratorio para altas cantidades de mceE492. Se activaron 50 g de Silica Gel 100-C18 con 300 mL de acetonitrilo 100% y se mantuvo con agitación a 4°C durante toda una noche. La resina se dejó decantar por 30 minutos y se retiró el acetonitrilo, agregando en su lugar 300 mL de agua nanopura. Se centrifugaron a 8000 g durante 30 minutos 4 litros de cultivo de la cepa productora crecida en medio M9 suplementado con citrato y glucosa a 37°C y en agitación de 220 rpm, y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de polietersulfona a la temperatura de 4°C. Posteriormente, se agregó la resina activada y se agitó por 20 minutos a 4°C. El contenido se filtró en un embudo Büchner que tenía un papel filtro y que se encontraba acoplado a un matraz kitasato, utilizando presión negativa. La resina fue lavada con 100 mL de metanol y luego con 100 mL de acetonitrilo 25%. La mceE492 fue eluída con lavados sucesivos de acetonitrilo 30%, 40%, 50%, 60%, 70% y 100%.

#### **2.2.4. Cuantificación de microcina E492**

La concentración de la mceE492 utilizada en este trabajo se determinó utilizando el kit Micro BCA Protein Assay Reagent (Pierce) siguiendo las indicaciones del fabricante y usando como estándar el BSA del mismo kit.

#### **2.2.5. Construcción de fusiones traduccionales entre la proteína de inmunidad a la microcina (MceB) y la proteína $\beta$ -galactosidasa (LacZ)**

La proteína MceB fusionada con  $\beta$ -galactosidasa en su extremo carboxilo terminal se obtuvo realizando un PCR con el plásmido pBA-LacZ como templado y los partidores MceBcomp-Fus y Mcc\_Fus F; la proteína trunca MceB  $\Delta$ 55-95 utilizando los partidores MceBper-Fus y Mcc\_FusF; y la proteína trunca MceB  $\Delta$ 21-95 se obtuvo utilizando los partidores MceBcit-Fus y Mcc\_Fus F (Tabla 3). Las condiciones de estas reacciones de PCR fueron: 15 minutos de denaturación a 95°C, seguidos por 25 ciclos de 60 segundos de denaturación a 95°C, 60 segundos de apareamiento a 38°C y 4 minutos de elongación a 70°C, seguidos por una elongación final de 70°C por 10 minutos. Los productos de PCR presentan sitios de restricción para *FseI* y *NotI*, y fueron digeridos con estas enzimas usando protocolos indicados por los fabricantes. El plásmido pBA-LacZ, que presenta estos sitios de restricción, fue digerido con estas enzimas para luego ser ligado con los productos de PCR. Estos productos de ligación se utilizaron para la electrotransformación en *E.coli* BW25113 (*lacZ*), y la selección de las células que expresaban esta construcción se realizó en placas de medio LB suplementadas con cloramfenicol y el reactivo cromogénico X-Gal.

## **2.2.6. Caracterización de las fusiones traduccionales mediante PCR**

Se aisló ADN plasmidial de clones seleccionados para ambas construcciones y se realizaron reacciones de PCR en las que se usaron las parejas de partidores RL1-RL2 y RL1-LacZ Pelican R (Tabla 3). Los productos de la reacción RL1- LacZ Pelican R fueron resueltos en geles 1% de agarosa, en tanto que para los productos obtenidos con RL1-RL2 se utilizó 2,5% de agarosa.

## **2.2.7. Ensayos de actividad bactericida sobre las fusiones traduccionales obtenidas**

### **2.2.7.1. Ensayo de formación de halo de inhibición de crecimiento**

Para determinar si las cepas obtenidas presentan sensibilidad a la mceE492, se hicieron céspedes de bacterias sobre placas de agar LB con 3 mL de agar blando, inoculando con alícuotas de 100  $\mu$ L de cultivos celulares de *E.coli* líquidos en fase exponencial crecidos en LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Sobre estos céspedes se ensayó la actividad bactericida de 3  $\mu$ L de una dilución seriada en base 2 de mceE494 con una concentración inicial de 100  $\mu$ g/mL. Después de incubar a 37°C por 20 horas, la actividad bactericida fue visualizada como un halo de inhibición de crecimiento

### **2.2.7.2. Ensayo de sensibilidad a la microcina E492 en cultivos líquidos**

Para realizar este ensayo de sobrevida, se centrifugó 1 mL de cultivo líquido de las cepas de interés ( $DO_{600} = 0,3 - 0,4$ ) a 13.000g durante 3 minutos. El precipitado obtenido fue lavado 2 veces con 1 mL de medio LB líquido fresco, y posteriormente fue resuspendido en 1 mL de medio líquido LB. Alícuotas de 100  $\mu$ L de esta homogeneización fueron mezcladas con 100  $\mu$ L de mceE492 purificada con una



concentración final de 100 µg/mL, y fueron incubadas por 20 minutos a 37°C. Se sembraron en placas de agar LB alícuotas de 3 µL de estas mezclas diluidas en base 10 hasta 6 veces, y se incubaron por 20 horas a 37°C. La sobrevivencia de las células se determinó mediante el conteo de células viables.

#### **2.2.8. Secuenciación de las fusiones traduccionales**

Una vez que se identificaron clones representativos de cada construcción, el ADN fue secuenciado utilizando los partidores Bma30 y Bma20 para la proteína MceB::LacZ y para MceBA $\Delta$ 21-95::LacZ, respectivamente.

#### **2.2.9. Medición de la actividad de $\beta$ -galactosidasa**

Las colonias transformantes se sembraron en placas de agar LB suplementadas con cloramfenicol y el sustrato cromogénico X-Gal, para de esta forma poder observar diferencias entre las fusiones que expresan a la  $\beta$ -galactosidasa de forma activa (colonias de color azul) y las colonias que no expresan esta actividad (colonias de color blanco).

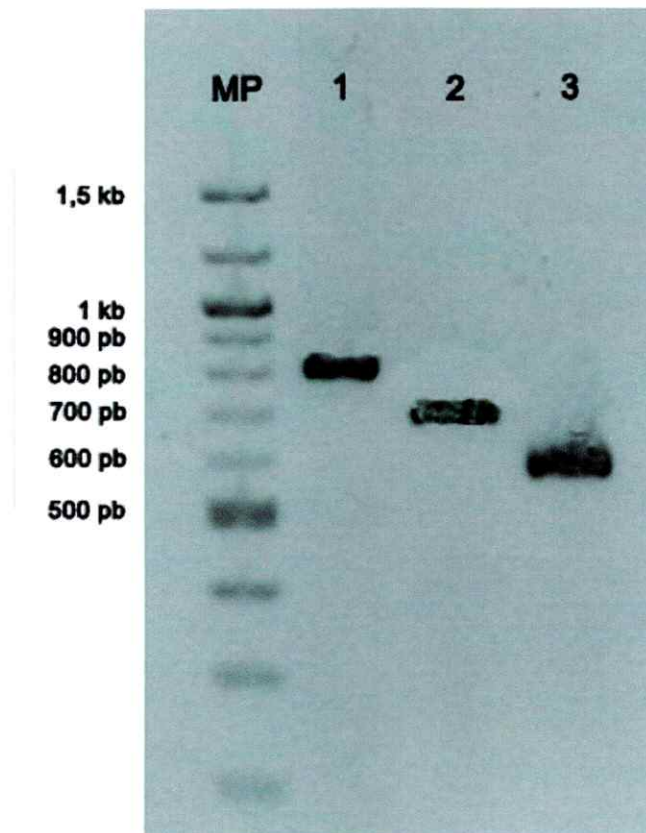
## RESULTADOS

### 3.1. Construcción de las fusiones traduccionales MceB::LacZ

Para la construcción por PCR de las fusiones se utilizó el plásmido pBA-LacZ como templado y los partidores MceBcomp-Fus y Mcc\_Fus F para la proteína MceB completa, MceBper-Fus y Mcc\_Fus F para la proteína trunca MceB  $\Delta$ 55-95, y MceBcit-Fus y Mcc\_Fus F para la proteína trunca MceB  $\Delta$ 21-95. Luego de la optimización de la reacción, se obtuvieron productos de PCR del tamaño esperado (780 pb, 670pb y 560 pb, respectivamente, figura 4).

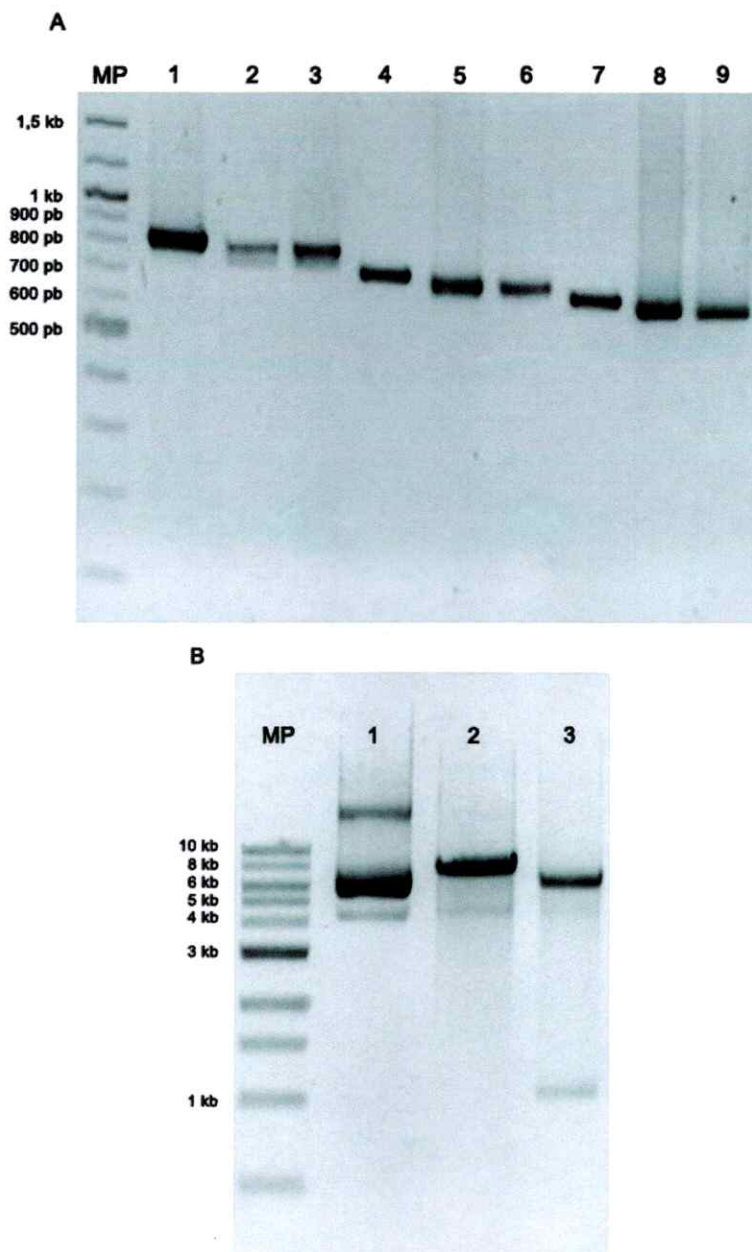
Estos productos de PCR fueron digeridos de forma sucesiva con las enzimas de restricción *NotI* y *FseI*, y los productos de digestión fueron observados en un gel 2,5% de agarosa (figura 5A). El plásmido pBA-LacZ también fue digerido con estas mismas enzimas, para de esta manera eliminar el fragmento de 1kb entre los sitios *FseI* y *NotI*, que contiene la región promotora natural de los genes *mceBA* y a los genes *mceB* y *mceA* (figura 5B).

Se realizó una reacción de ligación entre el plásmido pBA-LacZ digerido con *FseI* y *NotI* y las distintas versiones de la proteína MceB, a fin de obtener la  $\beta$ -galactosidasa fusionada a la proteína MceB completa, a MceB  $\Delta$ 55-95 y a MceB  $\Delta$ 21-95 (Figura 6). El diseño de las fusiones, tanto con la proteína MceB completa como las proteínas MceB truncas, se realizó utilizando la información obtenida con los programas de predicción de hélices transmembrana. Así, LacZ quedaría fusionado al último aminoácido del extremo carboxilo terminal de la proteína de inmunidad, lo que dejaría a la  $\beta$ -galactosidasa en el citoplasma de la célula; en tanto que con la fusión



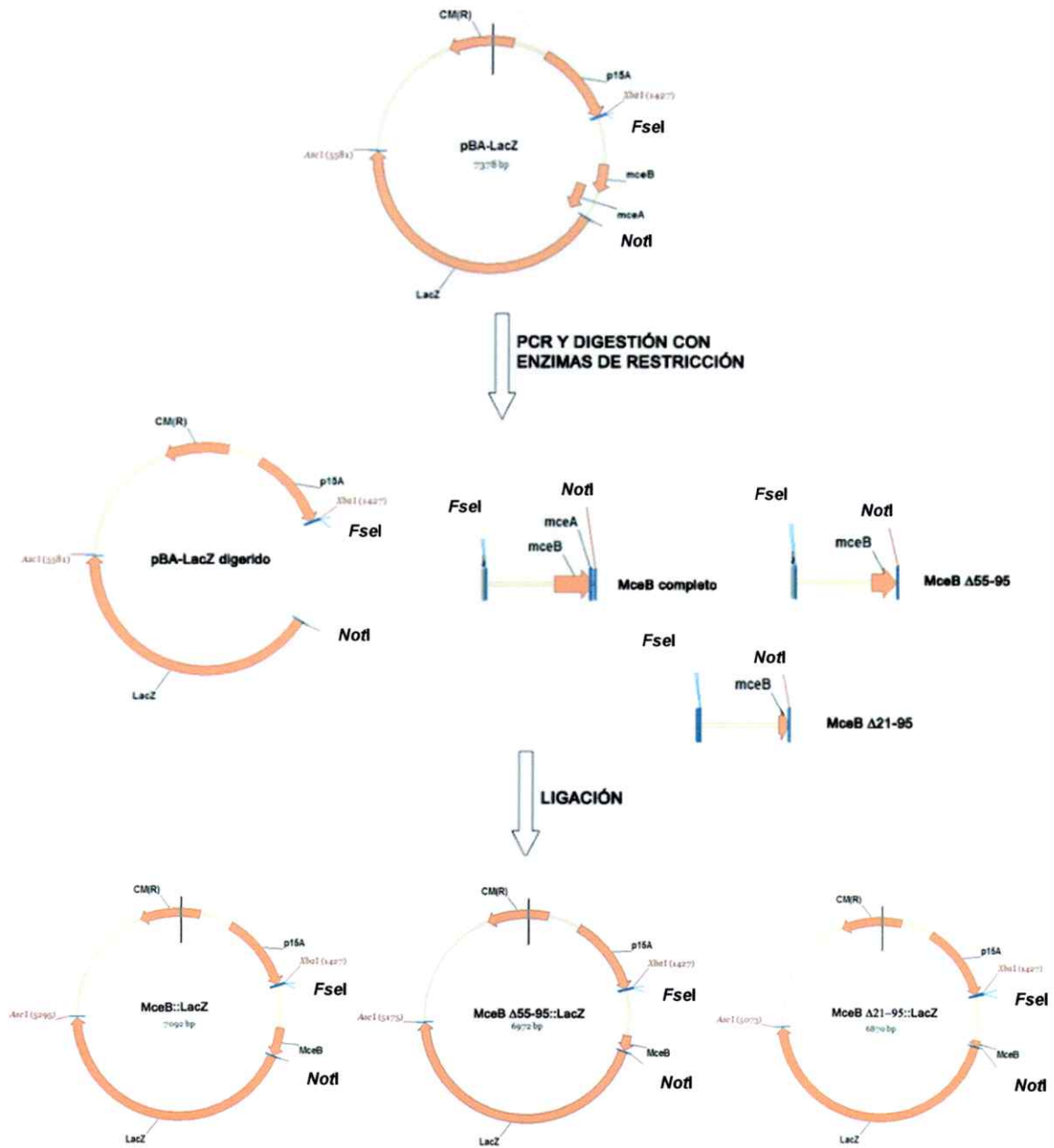
**Figura 4. Productos de PCR obtenidos para las distintas fusiones MceB-LacZ.**

Los distintos productos de PCR obtenidos fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.5%. Carril 1: Partidores MceBcomp-Fus y Mcc\_Fus F (tamaño esperado: 780 pb aproximadamente). Carril 2: Partidores MceBper-Fus y Mcc\_Fus F (tamaño esperado 670 pb aproximadamente). Carril 3: Partidores MceBcit-Fus y Mcc\_Fus F (tamaño del fragmento esperado: 560 pb aproximadamente). Carril MP: Marcador de peso molecular, escalera de 100 pb.



**Figura 5. Patrones de digestión de las diferentes fusiones MceB-LacZ.**

**A)** Patrón de digestión obtenido al tratar los productos de PCR con las enzimas *FseI* y *NotI* y posterior electroforesis en del de agarosa al 2.5%. Carril 1: MceB completo sin digerir. Carril 2: MceB completo digerido con *FseI*. Carril 3: MceB completo digerido con *FseI* y *NotI*. Carril 4: MceB  $\Delta 55-95$  sin digerir. Carril 5: MceB  $\Delta 55-95$  digerido con *FseI*. Carril 6: MceB  $\Delta 55-95$  digerido con *FseI* y *NotI*. Carril 7: MceB  $\Delta 21-95$  sin digerir. Carril 8: MceB  $\Delta 21-95$  digerido con *FseI*. Carril 9: PCR de MceB  $\Delta 21-95$  digerido con *FseI* y *NotI*. Carril MP: Marcador de peso molecular, escalera de 100 pb. **B)** Patrón de digestión obtenido al digerir el plásmido pBA-LacZ con las enzimas *FseI* y *NotI*, resuelto con un gel de agarosa al 1%. Carril 1: pBA-LacZ sin digerir. Carril 2: pBA-LacZ digerido con *NotI*. Carril 3: pBA-LacZ digerido con *NotI* y *FseI*. Carril MP: Marcador de peso molecular escalera de 1 kb.



**Figura 6. Diseño de los plasmidios de este trabajo.**

Las construcciones se diseñaron a partir de pBA-LacZ, y representan las distintas versiones de la proteína de inmunidad a la mceE492 fusionada al reportero β-galactosidasa.

MceB  $\Delta 55-95$  estaría fusionada al último aminoácido de la segunda hélice transmembrana de esta proteína, lo que significa que estaría en el periplasma de la célula; y en MceB  $\Delta 21-95$  LacZ estaría fusionada al último residuo aminoacídico de la primera hélice transmembrana de MceB, lo cual ubicaría a la  $\beta$ -galactosidasa en el citoplasma de la célula.

Los productos de ligación fueron concentrados antes de ser utilizados para transformar la cepa de *E.coli* BW25113. Esta cepa presenta un genotipo lacZ<sup>-</sup>, es decir, no produce la proteína  $\beta$ -galactosidasa. Las transformantes fueron incubadas en placas de agar LB suplementadas con cloramfenicol, para seleccionar a las que habían incorporado el plásmido. Se observó un número significativamente más alto de colonias transformadas con las construcciones MceB::LacZ y MceB  $\Delta 21-95$ ::LacZ respecto de MceB  $\Delta 55-75$ ::LacZ, a pesar de que la concentración de ADN usada en las transformaciones era la misma que para las otras construcciones. Todas las transformantes obtenidas se sembraron a continuación en placas de agar LB con cloramfenicol y el reactivo cromogénico X-Gal.

### **3.2. Caracterización fenotípica de las fusiones MceB::LacZ, MceB $\Delta 55-95$ ::LacZ y MceB $\Delta 21-95$ ::LacZ**

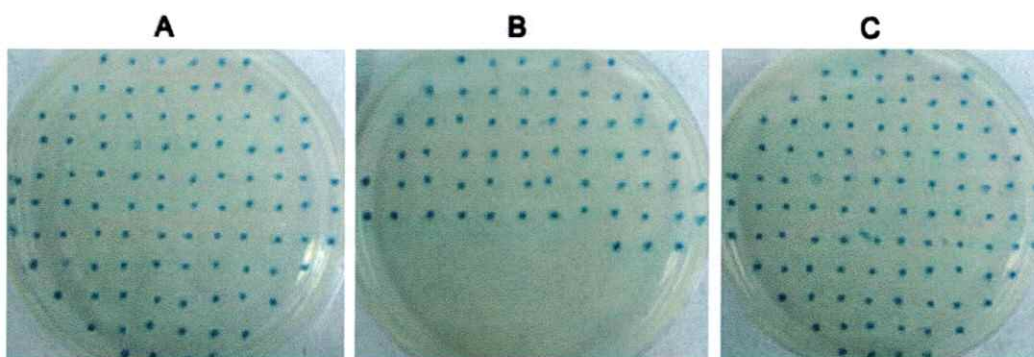
Los transformantes obtenidos fueron sembrados en placas LB suplementadas con cloramfenicol y X-Gal. El reactivo X-Gal es sustrato de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, y es degradado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, que es un producto insoluble de color azul. Por lo tanto, si las células expresan una enzima  $\beta$ -galactosidasa funcional, las colonias tendrán color azul al ser sembradas en estas placas.

Luego de 18 horas de incubación se observó que todas las colonias obtenidas a partir de las construcciones MceB::LacZ, MceB  $\Delta$ 55-95::LacZ y MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ presentaban coloración azul, es decir, la proteína  $\beta$ -galactosidasa era capaz de reaccionar con el X-Gal (Figura 7). Esto indicaría que en todas estas construcciones la  $\beta$ -galactosidasa está en el citoplasma de la célula, incluso para la construcción MceB  $\Delta$ 55-95::LacZ, en la cual el reportero fue fusionado al "loop" periplasmático de la proteína de inmunidad. Se procedió entonces a verificar la correcta construcción y expresión de estas fusiones mediante los pasos que se describen a continuación.

### **3.3. Comprobación de las fusiones MceB::LacZ, MceB $\Delta$ 55-75::LacZ y MceB $\Delta$ 21-95::LacZ**

Se escogieron 9 clones al azar de cada una de las construcciones y se les extrajo ADN plasmidial para comprobar el tamaño de los plásmidos presentes respecto al plasmidio pBA-LacZ parental. Al resolver estos plásmidos en un gel de electroforesis al 1% de agarosa se observó que putativos clones para MceB::LacZ y MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ presentaron bandas con una migración menor a la del parental, que es compatible con lo esperado (Figuras 8A y 8C, respectivamente), pero las migraciones encontradas para todos los clones examinados en la construcción MceB  $\Delta$ 55-75::LacZ fue igual a la del plasmidio pBA-LacZ parental (Figura 8B). Por esta razón, no se prosiguió con la caracterización de la construcción MceB  $\Delta$ 55-75::LacZ.

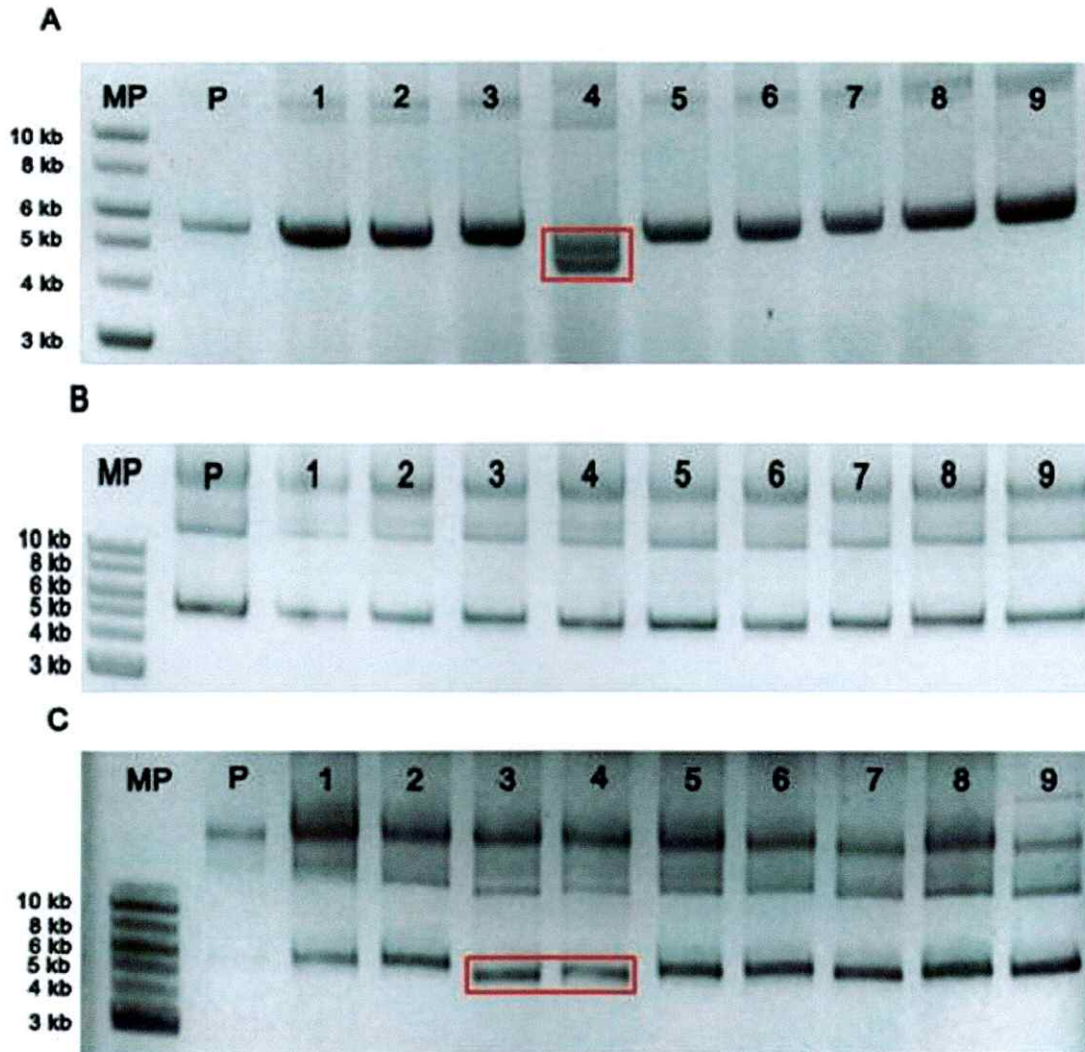
Los clones con las construcciones MceB::LacZ (clon 4) y MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ (clones 3 y 4) que presentaron plásmidos con una migración compatible a la esperada fueron analizados mediante digestión con la enzima *FseI*, para linealizarlos y de esta manera conocer su tamaño. Al compararlos con la banda correspondiente al plásmido



**Figura 7. Caracterización fenotípica de las distintas fusiones MceB-LacZ.**

Las colonias fueron sembradas en placas de agar LB suplementadas con cloramfenicol y X-Gal. Células transformadas con las fusiones transcripcionales MceB::LacZ (A), MceB  $\Delta$ 55-95::LacZ (B) y MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ (C).





**Figura 8. Extracción de ADN plasmidial de clones al azar que contienen las distintas construcciones, visualizadas en 1% agarosa.**

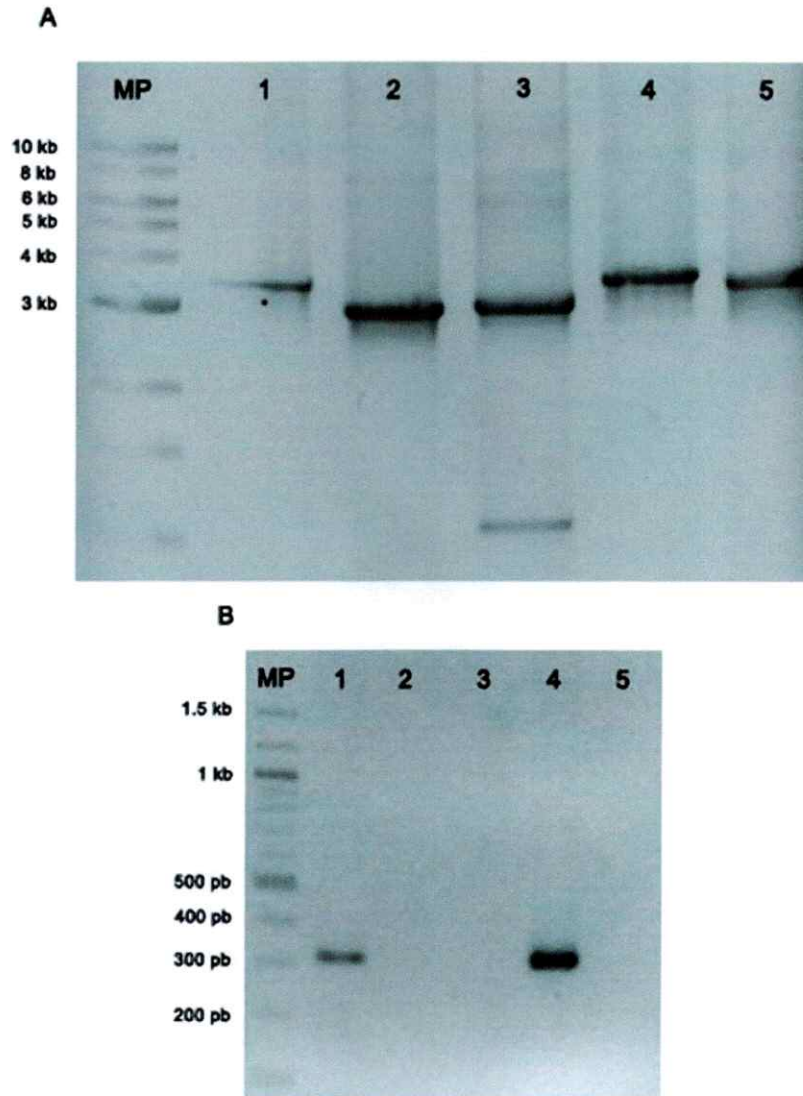
En cuadros de color rojo se encuentran los clones que presentan plásmidos con una migración compatible al esperado. **A)** Clones obtenidos a partir de transformación con la construcción MceB::LacZ. Carril 1-9: ADN plasmidial de clones escogidos al azar. **B)** Clones obtenidos a partir de transformación con la construcción MceB  $\Delta$ 55-95::LacZ. Carril 1-9: ADN plasmidial de clones escogidos al azar. **C)** Clones obtenidos a partir de transformación con la construcción MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ. Carril 1-9: ADN plasmidial de clones escogidos al azar. En todos los casos Carril MP: marcador de peso molecular, escalera de 1 kb, y Carril P: pBA-LacZ parental.

pBA-LacZ parental; se observa que presentan tamaños esperados para las distintas construcciones (7100 pb y 6870 pb, respectivamente). Por lo tanto, estos clones eran buenos candidatos para contener las construcciones esperadas. Estos plásmidos además se usaron como templado en reacciones de PCR que permitieron conocer el tamaño de las fusiones y la ausencia del gen estructural de la microcina (Figura 9A y 9B, respectivamente). Se descartó el clon 3 MceB::LacZ porque tanto en el análisis del tamaño como en la amplificación del gen *mceA* los resultados indicaron que se trataba del plásmido parental, y también se descartó el clon 4 MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ debido a la presencia de una banda que no se pudo identificar al analizar su tamaño (Figura 9A).

Se escogió un clon MceB::LacZ (clon 4) y un clon MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ (clon 3) como fuertes candidatos a presentar las fusiones transcripcionales deseadas. El ADN plasmidial de estos clones fue enviado a secuenciar, y se confirmó la presencia de las fusiones correctas después de analizar la secuencia mediante el programa Vector NTI Advance (Figura 10).

#### **3.4. Sensibilidad de las fusiones MceB::LacZ y MceB $\Delta$ 21-95::LacZ a la microcina E492**

Se prepararon céspedes bacterianos a partir de los clones que expresaban las fusiones transcripcionales MceB::LacZ y MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ, los cuales se inocularon con diluciones de mceE492 a una concentración inicial de 100  $\mu$ g/mL. Se estudió así si la fusión con  $\beta$ -galactosidasa afecta la acción protectora de MceB, y la contribución en la protección a la mceE492 de cada una de las hélices. Los resultados obtenidos se compararon con los de la cepa BW25113 silvestre y con esta cepa transformada con el plásmido pBA-LacZ parental.



**Figura 9. Reacciones de PCR para comprobar las fusiones MceB::LacZ y MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ.**

**A)** Se analizaron los productos de PCR utilizando los partidores RL1 y LacZ Pelican R y se determinó el tamaño en geles de agarosa al 1%. Carril MP: marcador de peso molecular, escalera de 1 kb. Carril 1: pBA-LacZ parental. Carril 2: Clon 3 MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ. Carril 3: Clon 4 MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ. Carril 4: Clon 3 MceB::LacZ. Carril 5: Clon 4 MceB::LacZ. **B)** Análisis de los productos de PCR usando los partidores RL1 y RL2, para comprobar la ausencia del gen estructural de la microcina mediante geles al 2.5% de agarosa. Carril MP: marcador de peso molecular, escalera de 100 pb. Carril 1: pBA-LacZ parental. Carril 2: Clon 3 MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ. Carril 3: Clon 4 MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ. Carril 4: Clon 3 MceB::LacZ. Carril 5: Clon 4 MceB::LacZ.

A) pBA-LacZ	ATGACATTACTTTCAATTTGGATTTTCCTGTTTTCTTTTCAGTCATGGCGTTCGTATCATTTACGCTAGTAAATTCATCCGGACAGAACCGGAAACAAAGTTATT
B) MceB::LacZ	ATGACATTACTTTCAATTTGGATTTTCCTGTTTTCTTTTCAGTCATGGCGTTCGTATCATTTACGCTAGTAAATTCATCCGGACAGAACCGGAAACAAAGTTATT
C) MceB Δ 21-95::LacZ	ATGACATTACTTTCAATTTGGATTTTCCTGTTTTCTTTTCAGTCATGGCGTTCGTATCATT-----
.....	
A) pBA-LacZ	GTTCTGATTTTACTAACTTTTTTATTTGTTTTTATATCCATTAAACAAAAGTGATCTGGTGGGAAAGTTACGGTATATTTGACAAAATCTACCTCTTTGCCTTTATTTTC
B) MceB::LacZ	GTTCTGATTTTACTAACTTTTTTATTTGTTTTTATATCCATTAAACAAAAGTGATCTGGTGGGAAAGTTACGGTATATTTGACAAAATCTACCTCTTTGCCTTTATTTTC
C) MceB Δ 21-95::LacZ	-----
.....	
A) pBA-LacZ	TAGGTTATTTGCAATAGCAATTAACGTAGTGATACTTACAATAAATGGAGCTAAGAATGAGAGAAAATTAGTCAAAGGACTTAAATCTTGCTTTTGGTGCAAGGAG
B) MceB::LacZ	TAGGTTATTTGCAATAGCAATTAACGTAGTGATACTTACAATAAATGGAGCTAAGAATGAGAGAAAATTAGTCAAAGGACTTAAATCTTGCTTTTGGTGCAAGGAG
C) MceB Δ 21-95::LacZ	-----
.....	
A) pBA-LacZ	AGACCGATCCAAATACTCAACTCTAAACGACCTTGGAAATAATATGGCATGGGGTCTGCTCTTGGCGCTCTGGCGGATTAGGATCAGCAGCTTTGGGGGCCG
B) MceB::LacZ	-----
C) MceB Δ 21-95::LacZ	-----
.....	
A) pBA-LacZ	CGGGAGGTGCATTACAAAATGTAGGGCAAGGATTAATTGACCATGGTCTGTAAATGTCCCATCCCTGTACTCATCGGGCCAGCTGGAATGGTAGCGGTAGTG
B) MceB::LacZ	-----
C) MceB Δ 21-95::LacZ	-----
.....	
A) pBA-LacZ	GTTATAACAGCGCAACATCCAGTCCGGTAGTGGTAGTGGTACGGCCGCGAACCCTGCTGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAAC
B) MceB::LacZ	GGTAGCGGGCCGCGAACCCTGCTGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAAC
C) MceB Δ 21-95::LacZ	GGTAGCGGGCCGCGAACCCTGCTGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAAC

**Figura 10. Alineamiento de la secuencia del plásmido pBA-LacZ (A) con las secuencias de las fusiones MceB::LacZ (B) y MceB Δ21-95::LacZ (C).**

En amarillo se muestra la secuencia del gen de la inmunidad MceB, en gris el gen estructural de la microcina y en azul una parte del gen de la β-galactosidasa. En cuadro amarillo se muestra el sitio de corte para la enzima NotI, y en un cuadro negro, los codones de 2 aminoácidos que funcionan como adaptador entre la proteína MceB y el reportero β-galactosidasa.

Después de 18 horas de incubación, se observó que la cepa BW25113 silvestre y la cepa con la construcción MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ presentan halos de inhibición de crecimiento hasta la dilución 128 veces (781 ng/mL), en tanto que las cepas con el plásmido parental y con la construcción MceB::LacZ no mostraron halos de inhibición para ninguna de las diluciones estudiadas (Tabla 4).

La cepa que sólo posee la primera hélice transmembrana de la proteína de inmunidad es tan sensible a la mceE492 como la cepa silvestre que no presenta esta proteína de inmunidad, lo cual sugiere que la primera hélice transmembrana de la proteína de inmunidad no es suficiente para entregar protección a la mceE492. Por otro lado, la cepa con la fusión MceB::LacZ presenta la misma sensibilidad a la mceE492 que la cepa que contiene al plásmido parental, lo cual indica que la fusión del reportero al extremo carboxilo terminal de la proteína de inmunidad no afecta su acción protectora.

La sensibilidad a la mceE492 se cuantificó también a través de ensayos de sobrevivencia. Para esto, una alícuota de cultivo líquido de cada cepa estudiada se incubó en presencia y ausencia de mceE492 (100  $\mu$ g/mL), y se evaluó el número de células viables en placas de agar LB para cada caso. El título obtenido para la condición control (ausencia de microcina) correspondió al 100% de sobrevivencia, y el porcentaje para el tratamiento con mceE492 se calculó a partir de esto (Tabla 5). La sobrevivencia de las células BW25113 tratadas con mceE492 es un poco inferior a la de las células BW25113 MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ. Este resultado es consistente con la observación obtenida a partir de los ensayos de dilución crítica, es decir, que la sola presencia de la primera hélice transmembrana de la proteína de inmunidad no entrega una protección significativa frente a la mceE492. Por otro lado, los porcentajes obtenidos para las

**Tabla 4. Sensibilidad a la microcina E492 de las células que portan las distintas fusiones traduccionales de la proteína de inmunidad.**

Cepa de <i>E.coli</i>	Actividad de la mceE492 (U.A.)*
BW25113 silvestre	128
BW25113 pBA-LacZ	0
BW25113 MceB::LacZ	0
BW25113 MceB $\Delta$ 21-95::LacZ	128

\* Estos números corresponden al recíproco de la potencia en base dos de la última dilución que presenta un halo de inhibición de crecimiento sobre los céspedes de las cepas estudiadas.

**Tabla 5. Ensayo de sobrevivencia a la microcina E492 sobre las cepas que expresan las distintas fusiones con la proteína MceB.**

Cepa de <i>E.coli</i>	Porcentaje de sobrevivencia*
BW25113 silvestre	1,48 $\pm$ 0,49
BW25113 pBA-LacZ	53,69 $\pm$ 2,95
BW25113 MceB::LacZ	99,09 $\pm$ 2,19
BW25113 MceB $\Delta$ 21-95::LacZ	6,24 $\pm$ 4,21

\*Estos resultados se obtuvieron a partir de tres experimentos realizados por triplicados. Se utilizó como 100% de sobrevivencia el número de colonias obtenido al incubar con agua. La microcina utilizada tenía una concentración de 100  $\mu$ g/mL.

cepas BW25113 pBA-LacZ y BW25113 MceB::LacZ son similares y están dentro del rango de error del método, lo cual concuerda con lo observado en los ensayos de dilución crítica. La diferencia observada podría deberse a que las células que presentan el plásmido pBA-LacZ tienen el gen estructural de la microcina, y por lo tanto son capaces de sintetizarla. Esta microcina sintetizada no puede ser exportada al medio extracelular porque estas células no cuentan con los exportadores, pero se ha reportado que esta microcina también tiene capacidad bactericida (Bieler y cols., 2006).

## DISCUSIÓN

Las bacterias han desarrollado distintas estrategias para poder competir por nutrientes y por un nicho ecológico. Una de las más importantes corresponde a la producción de bacteriocinas, que son antibióticos proteicos producidos que sólo pueden afectar a microorganismos de especies relacionadas, es decir, cepas que tienen requerimientos nutricionales similares dentro de un mismo nicho.

Todas las células que producen colicinas tienen plasmidios en los que se encuentra el gen estructural, junto con al menos dos genes más: el gen de la inmunidad y el gen de la lisis (Alonso y col., 2000). La proteína de inmunidad le permite a la célula resistir la acción de su propia bacteriocina, por lo que se expresa de forma coordinada con el gen estructural. En el caso de la *mccE492*, la inmunidad es conferida por la proteína *MceB* y su mecanismo de acción más probable es a través de una interacción con el complejo *TonB-ExbBD*, impidiendo de esta manera la inserción correcta de la *mccE492* en la membrana interna (Baeza, 2003).

Tanto los perfiles de hidropatía de la proteína de inmunidad como resultados experimentales indican que correspondería a una proteína integral de membrana con tres regiones transmembrana (Lagos y cols., 1999). Mediante programas de predicción de topología de proteínas de membrana se postuló que el extremo amino terminal de esta proteína se encontraría ubicado en el periplasma, mientras que el extremo carboxilo terminal estaría en el citoplasma de la célula (Baeza, 2003). Estas predicciones se comprueban utilizando fusiones de las proteínas de interés con genes reporteros como la fosfatasa alcalina, GFP o  $\beta$ -galactosidasa (Van Geest y Lolkema, 2000, von Heijne, 2002).



Al comparar los tamaños de la proteína MceB (95 aminoácidos) con la  $\beta$ -galactosidasa (1024 residuos aminoacídicos), se puede pensar que la proteína reportera podría interferir con la inserción natural de la proteína MceB en la membrana, y por lo tanto dar falsos positivos como resultado. Sin embargo, la topología de proteínas de inmunidad a otras colicinas se ha estudiado sin mayores dificultades a través del uso de estos reporteros (Geli y cols., 1988; Cramer y Song, 1991).

En este trabajo se quiso comprobar experimentalmente la predicción de la topología de la proteína MceB a través de la fusión del reportero  $\beta$ -galactosidasa con el extremo carboxilo terminal de la proteína de la inmunidad (residuo aminoacídico 95), y con el aminoácido 21 de la misma, que corresponde al primer residuo del "loop" citoplasmático de la proteína de inmunidad.

Se intentó sin éxito construir la fusión entre  $\beta$ -galactosidasa y el "loop" periplasmático de la proteína de inmunidad MceB. Una explicación para esto es debido a que la  $\beta$ -galactosidasa no sería capaz de ser translocada a través de la membrana citoplasmática, quedando atascada en la misma, lo cual genera una baja viabilidad celular. Se ha demostrado incluso que una pequeña región de esta proteína puede transferirse al espacio periplasmático, pero la mayor parte de la proteína queda sumergida en la membrana interna de la célula. Se postula que existen secuencias dentro de la proteína que impiden su translocación o a que la conformación que adapta la proteína interfiere con el paso a través de la membrana (Lee y cols., 1989). La explicación antes mencionada concuerda con el bajo número de transformantes obtenidos para este caso, comparada con los obtenidos en las otras dos construcciones. La inserción de esta gran proteína podría afectar la membrana de las

células, y por lo tanto llevar a un cambio en sus características, lo cual redundaría en la muerte de las células que presentaron esta fusión. Esto no ocurrió para las fusiones MceB::LacZ y MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ porque en estos casos la  $\beta$ -galactosidasa siempre se mantuvo en el citoplasma de las células.

Los resultados positivos obtenidos para las construcciones MceB::LacZ y MceB  $\Delta$ 21-95::LacZ permiten afirmar que la topología de la proteína MceB es tal como se había predicho: el carboxilo terminal de la proteína se encuentra hacia el citoplasma de la célula, al igual que el primer "loop" hidrofílico (Figura 3). Este estudio podría complementarse construyendo la fusión entre el segundo "loop" hidrofílico (que sería periplasmático) y la fosfatasa alcalina, pues en este caso deberá obtenerse una proteína activa. Daley y cols. (2005) afirman que el conocer la ubicación del carboxilo terminal de una proteína y usar esta información como una restricción al momento de utilizar los programas de predicción, permiten conocer con certeza su topología en la membrana interna de las células.

Como ya se mencionó, en este laboratorio se realizaron previamente experimentos en los cuales se mutaron los aminoácidos 17 y 77 de MceB, localizados en la primera y la última hélice transmembrana, respectivamente. Estos cambios son conservados y no dan cuenta de un cambio en la estructura de la proteína que ha perdido su actividad protectora. Se postula que estos cambios afectarían la interacción de MceB con otras proteínas de membrana necesarias para esta actividad protectora. Se observó también que la hélice amino terminal de MceB tiene un mayor efecto sobre la acción protectora que la hélice carboxilo terminal (Baeza, 2003).

Otro aspecto importante era dilucidar si se requería de toda la proteína de inmunidad para cumplir su función protectora o si esta proteína puede funcionar de manera modular. Para esto, se probó la sensibilidad a la *mccE492* de la construcción *MceB::LacZ* y de *MceB Δ21-95::LacZ*. En la primera construcción se tiene a la proteína completa, mientras que en la segunda sólo se cuenta con la primera hélice transmembrana, que de acuerdo a los antecedentes mencionados en la introducción sería de importancia en la acción protectora de *MceB*. Se observó que la presencia de sólo la primera hélice transmembrana no entrega protección significativa frente a la *mccE492*. Esto permite afirmar que si bien la primera hélice transmembrana es importante para la acción protectora de la proteína de inmunidad frente a la *mccE492*, no es suficiente por sí misma para otorgar esta protección.

La fusión *MceB::LacZ* entregó la misma protección frente a la *mccE492* que la dada por el plásmido parental *pBA-LacZ*, en el cual la proteína *MceB* no se encuentra fusionada a la  $\beta$ -galactosidasa. Esto quiere decir que la fusión de  $\beta$ -galactosidasa a la proteína de inmunidad no interfiere ni con su inserción en la membrana de la célula ni con la actividad protectora.

Los resultados de esta memoria indican que se requiere más de una hélice transmembrana para la inmunidad a la *mccE492*. Para discernir la contribución de las dos primeras hélices en esta protección será necesario construir una proteína que presente las dos primeras hélices de la *mccE492*, como lo es *MceB Δ55-95*, y complementar este estudio con una proteína en donde sólo esté la tercera hélice transmembrana. De esta manera se podrá dilucidar si existen módulos suficientes para

la acción protectora de MceB, o si esta proteína debe funcionar como un todo para cumplir su acción.

## CONCLUSIONES

- La proteína de inmunidad MceB, proteína integral con tres segmentos transmembrana, presenta su extremo amino terminal hacia el periplasma y con el carboxilo terminal en el citoplasma de la célula.
- La fusión de la proteína reportera  $\beta$ -galactosidasa al extremo carboxilo terminal de la proteína MceB no afecta su función protectora frente a la mceE492.
- La primera hélice transmembrana de la proteína MceB es importante para la inmunidad, pero por sí sola no es capaz de entregar protección frente a la mceE492.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmer, B. M. G. Thomas, R.A. Larsen y K. Postle. (1995). Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB y ExbD in TonB function and stability. *J. Bacteriol.* **177**: 4742-4747.
- Alonso, G., Vilches, G., Rodríguez, V. (2000) How bacteria protect themselves against channel-forming colicins. *Internatl. Microbiol.* **3**:81-88.
- 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 príon de la *mccE492*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Baquero, F. y Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 117-124.
- Bellomio, A., Vicent, P., Aruri, B., Farías, R., Morero, R. (2007). Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *J. Bacteriol.* **189**: 4180-4186.
- Bleler, S., Silva, F., Soto, C., Belin, D. (2006) Bactericidal Activity of both Secreted and Nonsecreted Microcin E492 Requires the Mannose Permease. *J. Bacteriol.* **188**: 7049-7061.
- Braun, V., Patzer, S.I. y Hantke, K. (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie.* **84**:365-380.
- Cascales, E., Buchanan, S., Duché D., Kleanthous, C., Lloubés, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., Cavard, D. (2007). Colicin Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 158-229.
- Chang, A.C.Y. y Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic mini plasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141-1156.
- Claros, M.G., and von Heijne, G. (1994) TopPred II: An Improved Software For Membrane Protein Structure Predictions. *CABIOS.* **10**: 685-686.
- Corsini, G., Baeza, M., Monasterio, O., Lagos, R. (2002) The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochimie.* **84**: 539-544.
- Cramer, W., Song, H. (1991) Membrane Topography of ColEI Gene Products:the Immunity Protein. *J.Bacteriol.* **173**: 2935-2043.

- Cramer W.A., Heymann L.B., Schendel S.L., Deiy B.N., Cohen F.S., Elkins P.A., Stauffacher C.V. (1995) Structure- function of the channel-forming colicins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**: 611-641.
- Daley, D., Rapp, M., Granseth, E., Melén, K., Drew, D., von Heijne, G. (2005) Global Topology Analysis on the *Escherichia coli* Inner Membrane Proteome. *Science*. **308**: 1321-1323.
- de Lorenzo, V. (1984) Isolation and characterization of microcin E 492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Microbiol.* **139**: 72 – 75.
- de Lorenzo, V., Pugsley, A.P. (1985) Microcin E492, a low molecular weight peptide antibiotic wich causes depolarization of *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob Agents Chemoter.* **27**:666-669.
- Destoumieux-Garzón D., X. Thomas, M. Santamaría, C. Goulard, M. Barthélémy, B. Boscher, Y. Bessin, G. Molle, A. Pons, L. Letellier, J. Perduzzi y S. Rebuffat (2003). Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**: 1031-1041.
- Espeset, D., Duche, D., Baty, D., Geli, V. (1996) The channel domain of colicin A is inhibited by its immunity protein through direct interaction in *Escherichia coli* inner membrane. *The EMBO Journal.* **15**: 2356-2364.
- Geli, V., Baty, D., Lazdunski, C. (1988). Use of a foreign epitope as a "tag" for the localization of minor proteins within a cell: The case of the immunity protein to colicin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**: 689-693
- Geli V., Lazdunski J. (1992) A  $\alpha$ - helical hydrophobic hairpin as a determinant in protein-protein interaction occurring in *E.coli* colicin A and B immunity system. *J. Bacteriol.* **174**: 6432-6437.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Hetz, C., M. Bono, L. Barros y R. Lagos (2002). Microcin E492, a channel forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**: 2696-2701.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* **14**: 378-379.
- Hofmann, K. y Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **374**: 166.

- Kolter, R. y Moreno, F. (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 141-163.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X., Monasterio, O. (1993) Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**: 145-148.
- Lagos, R., Villanueva, 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 G., Hetz C., Strahsburger E., Castillo J.A., Vergara C., Monasterio O. (2001) Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol Microbiol.* **42**: 229-243.
- Lagos, R., Tello, M., Mercado, G., García, V. y Monasterio, O. (2009) Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**: 74-85.
- Larsen, R., Thomas, M., Postle, K. (1999). Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* **31**: 1809-1824.
- Larsen, R., Letain, T., Postle, K. (2003). *In vivo* evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**: 211-218.
- Lee, C., Li, P., Inouye, H., Brickman, E., Beckwith, J. (1989) Genetic Studies on the Inability of 3-Galactosidase To Be Translocated across the *Escherichia coli* Cytoplasmic Membrane. *J. Bacteriol.* **171** (9): 4609-4616.
- Lehane, A., Korres, H., Verma N. (2005) Bacteriophage-encoded glucosyltransferase GtrII of *Shigella flexneri*: membrane topology and identification of critical residues. *Biochem. J.* **389**: 137-143.
- Leiva, M. (2008) Importancia de la Serina-84 y el motivo Glicina-83 Serina-84 de la microcina E492 en la modificación post-traduccional y en la actividad antibacteriana. Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Lindeberg, M., Cramer, W. (2001) Identification of Specific Residues in Colicin E1 Involved in Immunity Protein Recognition. *J.Bacteriol.* **183**: 2132-2136.
- Marín, M. (2006) La sobreproducción de los genes de la maduración de la MccE492 aumenta la actividad bactericida y retarda la formación de agregados de tipo amiloide. Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.



- McCann, J., McDonough, J., Pavelka, M., Braunstein, M. (2007)  $\beta$  – lactamase can function as a reporter of bacterial protein export during *Mycobacterium tuberculosis* infection to host cells. *Microbiology*. **153**(10): 3350–3359.
- 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.
- Postle, K. y Held, K.G. (2002). ExbB and ExbD Do Not Function Independently in TonB-Dependent Energy Transduction. *J. Bacteriol.* **184** (18): 5170-5173.
- Postle, K. y Kadner, R. J. (2003). Microrevisión. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**: 869-882.
- Pugsley A.P., Moreno F., de Lorenzo V. (1986) Microcin E492 insensitive mutant of *E.coli* K-12. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3253-3259.
- Rapp M., Drew D., Daley D.O., Nilsson J., Carvalho T., Melen K., De Grier J., Von Heijne G. (2004) Experimentally based topology models for *E.coli* inner membrane proteins. *Protein Science*. **13**: 937–945.
- Reeves, P. (1965) The Bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **29**: 24-45.
- Riley, M. y Wertz, J. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 117-137.
- Riley, M.A. y Chavan, M.A. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria. *Bacteriocins. Ecology and Evolution*. Springer-Verlag.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Strahsburger E., Baeza M., Monasterio O., Lagos R. (2005) Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3083-3086.
- Toba, M., Masaki, H., Ohta, T. (1988). Colicin E8, a DNase which indicates an evolutionary relationship between colicins E2 and E3. *J. Bacteriol.* **170**: 3237-3242.
- 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.
- Van Geest, M., Lolkema, J. (2000) Membrane Topology and Insertion of Membrane Proteins: Search for Topogenic Signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 13-33.

- von Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225**: 487–494.
- von Heijne, G., Drew, D., Sjöstrand, D., Nilsson, J., Urbig, T., Chin, C., de Gier, J. (2002) Rapid topology mapping of *Escherichia coli* inner-membrane proteins by prediction and PhoA\_GFP fusion analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 2690–2695.
- Wilkens, M., Villanueva, J.E., Cofre, J., Chnaiderman, J.S., Lagos, R. (1997) Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Genetics Determinants for Production of and Immunity to Microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4789-4794.