



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**“LA ESPECIFICIDAD, EXPORTACIÓN Y  
PROCESAMIENTO DE LA MICROCINA E492 Y  
COLICINA V DEPENDEN DEL DOMINIO ABC DE  
SUS TRANSPORTADORES”**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de  
los requisitos para optar al grado de Doctor en Bioquímica

MARIO CÉSAR GERARDO TELLO REYES

Director de Tesis: Dra Rosalba Lagos M.

**SANTIAGO, CHILE**

**JULIO 2006**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO

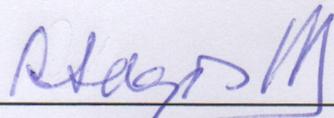
Se informa a la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**MARIO CÉSAR GERARDO TELLO REYES**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica en el examen de defensa de Tesis rendido el día 31 de Agosto de 2006.

**Director de Tesis.**

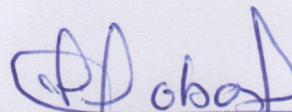
Dra. Rosalba Lagos



---

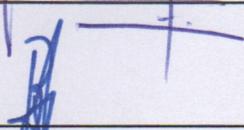
**Comisión de Evaluación de Tesis.**

Dr. Sergio Lobos



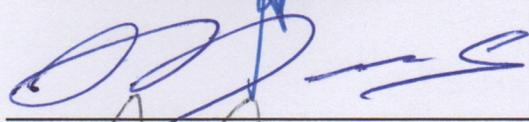
---

Dr. Bernardo González



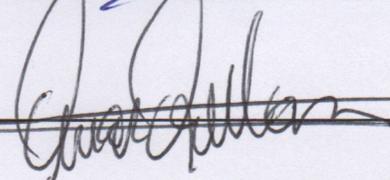
---

Dr. Guido Mora



---

Dr. Omar Orellana



---

*Dedicado a mi Familia*

## Agradecimientos.

Al ingresar al programa de Doctorado en Bioquímica, Sergio Lavandero nos dijo que por algún motivo los compañeros de Doctorado no se olvidan. En ese momento no entendí muy bien a que se refería y pensé que era un “romanticismo” científico que hacía referencia a mis compañeros del Doctorado en Bioquímica. Sin embargo, ahora que tengo que reflexionar sobre lo que ha sucedido en estos años, me he dado cuenta que el desarrollo del Doctorado no es solo la adquisición o generación de conocimiento. Mas bien estos puntos son solo una consecuencia de un proceso mas profundo en el cual se funden aspectos profesionales y personales. En realidad creo que el aporte mas importante del Doctorado se encuentra en los aspectos personales, los cuales se adquieren y maduran directamente del contacto con otras personas. En ese sentido creo que los reales compañeros de Doctorado han sido las personas con las cuales he compartido mi experiencia científica como alumno de Postgrado y como ser alumno no es un trabajo con horario, sino una condición de 24 horas, me gustaría agradecer a todas las personas con la cuales he compartido mi estatus de “alumno”

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, padres y hermana, por que ellos son mis raíces lo que me explica en muchos aspectos, son parte de lo que he sido, soy y seré. Gracias por aceptarme tal como soy y apoyarme en la distancia.

En segundo lugar me gustaría agradecer a mi familia “adoptiva”, mis compañeros de departamento Heidi Pérez, Susan Smalley, Reinaldo Barrera, gracias por compartir su experiencia de vida. Gracias por su paciencia, tolerancia, por su inagotable capacidad para escuchar mis discursos y por soportar mis exabruptos, se que no ha sido fácil para ellos aguantarme.

También quiero agradecer a mis amigos y compañeros de laboratorio Gino Corsini, Erwin Strasburger, Esteban Nova, José Jaime Arbildua, Jae Shin, Claudia Estévez, Roselyn Orellana, Gabriela Mercado, Verónica García y Macarena Marín, gracias por compartir sus experiencias de vida conmigo. Todos Uds. han aportado en diversas formas a mi desarrollo personal, pues son personas admirables de las tengo mucho que aprender. Gracias por su paciencia y apoyo.

Gracias a Cesar Díaz, Felipe Montecinos, Andrea Garcés, Maria Jesús Mascayano y Rodrigo Gallardo, por los buenos momentos que hemos compartido y por esas largas conversaciones en el laboratorio en horarios en que otros descansan o se divierten.

Gracias a la Dra. Rosalba Lagos, por su Fé en mi persona y por enseñarme a ver siempre las cosas desde un punto de vista positivo.

Gracias al Dr. Octavio Monasterio por su crítica aguda y constructiva. También gracias por su loable espíritu de compartir su experiencia de vida con sus alumnos.

Todos Uds. son mis compañeros de Doctorado y al igual que el Dr. lavandero, ahora creo que son una parte indeleble de mi persona.

# INDICE DE MATERIAS

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| <b>INDICE DE MATERIAS</b> | v   |
| <b>INDICE DE TABLAS</b>   | ix  |
| <b>INDICE DE FIGURAS</b>  | x   |
| <b>ABREVIATURAS</b>       | xii |
| <b>RESUMEN</b>            | xiv |
| <b>ABSTRACT</b>           | xvi |

## 1. INTRODUCCIÓN.

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1.1.1   | Bacteriocinas.   | 1  |
| 1.1.1.1 | Colicinas.   | 2  |
| 1.1.1.2 | Microcinas.  | 3  |
| 1.1.2   | Organización genética de las microcinas.               | 3  |
| 1.1.2.1 | Microcinas codificadas en el cromosoma.                | 3  |
| 1.1.2.2 | Microcinas codificadas en plasmidios.                  | 6  |
| 1.1.3   | Mecanismos de acción de las microcinas.                | 7  |
| 1.1.4   | Exportación de las microcinas.                         | 8  |
| 1.2     | Transportadores ABC (ATP-Binding Cassette).            | 9  |
| 1.2.1   | Exportación de proteínas y transportadores ABC.        | 10 |
| 1.2.2   | Estructura y especificidad de los transportadores ABC. | 13 |
| 1.3     | Microcina E492.  | 15 |
| 1.3.1   | Actividad antibiótica.                                 | 16 |
| 1.3.2   | Elementos genéticos.                                   | 17 |
| 1.3.3   | Mecanismo de exportación de la microcina E492.         | 21 |
| 1.3.4   | El gen <i>mceF</i> .                                   | 22 |
| 1.4     | Objetivo general.                                      | 24 |

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.1   | Materiales.  | 25 |
| 2.1.1 | Reactivos.   | 25 |
| 2.1.2 | Cepas bacterianas.   | 26 |
| 2.1.3 | Plasmidios y vectores.   | 26 |
| 2.1.4 | Partidores.  | 27 |
| 2.2   | Métodos.   | 27 |
| 2.2.1 | Medios de cultivo.   | 27 |
| 2.2.2 | Purificación de la microcina E492 extracelular.  | 34 |
| 2.2.3 | Extractos celulares totales.   | 34 |
| 2.2.4 | Extracto de microcina extracelular.  | 35 |
| 2.2.5 | Detección y cuantificación de la actividad de la microcina E492.   | 35 |
| 2.2.6 | Ensayo de sensibilidad a la microcina en placa.  | 35 |
| 2.2.7 | Purificación de microcina E492 mediante HPLC.  | 35 |
| 2.2.8 | Electroforesis de la microcina E492 en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).   | 36 |
| 2.2.9 | Marcación y preparación de la microcina E492 con fluorescamina para su detección en electroforesis en geles de poliacrilamida. | 36 |
| 2.3   | Hibridación Western.   | 37 |
| 2.3.1 | Electrotransferencia.  | 37 |
| 2.3.2 | Desarrollo inmunológico.   | 37 |
| 2.4   | Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.  | 38 |
| 2.4.1 | DNA plasmidial bacteriano (miniprep).  | 38 |
| 2.4.2 | RNA bacteriano.  | 38 |
| 2.4.3 | Electroforesis de ácidos nucleicos.  | 39 |
| 2.4.4 | Ligación de fragmentos de DNA.   | 39 |
| 2.4.5 | Preparación de células electrocompetentes.   | 40 |
| 2.4.6 | Transformación por electroporación.  | 40 |
| 2.5   | Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.  | 40 |
| 2.5.1 | PCR de DNA plasmidial.   | 40 |
| 2.5.2 | PCR de colonia.  | 41 |
| 2.5.3 | Transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR).   | 41 |
| 2.5.4 | Purificación de productos PCR.   | 42 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.5.5  | Generación de construcciones virtuales.                                   | 42 |
| 2.6.1  | Generación del vector pET15A y pET15AF.                                   | 42 |
| 2.6.2  | Eliminación mediante el método de Datsenko y Wanner.                      | 43 |
| 2.6.3  | Eliminación de los genes <i>mceF</i> y <i>mceK</i> .                      | 43 |
| 2.6.4  | Generación de las construcciones pMceF, pMceK y pMceKF.                   | 44 |
| 2.6.5  | Perdida de Inmunidad en fase estacionaria (PIFE).                         | 44 |
| 2.6.6  | Generación de la construcción pORFL.                                      | 44 |
| 2.6.7  | Clonamiento de los sistemas de transporte de colicina V y microcina E492. | 45 |
| 2.6.8  | Generación de sistemas de transporte híbridos.                            | 45 |
| 2.6.9  | Generación de transportadores quiméricos.                                 | 46 |
| 2.6.10 | Modificación del carboxilo terminal de MceG.                              | 46 |
| 2.6.11 | Mutagénesis puntual.  | 49 |
| 2.7    | Modelamiento por comparación.   | 49 |

### 3. RESULTADOS.

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.1   | Clonamiento y expresión del gen <i>mceF</i> .   | 52 |
| 3.1.2 | Clonamiento del gen <i>mceF</i> .   | 52 |
| 3.1.3 | Complementación de mutantes en el gen <i>mceF</i> .   | 52 |
| 3.2   | Análisis de la secuencia de los plasmidios pC1, JRS1 y pJAM229.   | 53 |
| 3.3   | Eliminación de los genes <i>mceF</i> y <i>mceK</i> .  | 60 |
| 3.3.1 | Ensayos de actividad microcina E492 de las construcciones p $\Delta$ FK.  | 62 |
| 3.3.2 | Participación de <i>mceK</i> y <i>mceF</i> en el sistema productor de microcina E492.                           | 62 |
| 3.3.3 | El gen <i>mceF</i> es prescindible en los sistemas de exportación de microcina E492 y colicina V.               | 66 |
| 3.4   | El transportador CvaB no complementa a mutantes en <i>mceG</i> .  | 66 |
| 3.4.1 | Localización del dominio del transportador CvaB que confiere la especificidad para el transporte de colicina V. | 68 |
| 3.4.2 | La construcción pAB $\gamma$ no exporta microcina E492.   | 70 |
| 3.5   | Modelamiento del transportador de microcina E492.   | 73 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| 3.5.1     | Búsqueda de homólogos estructurales del transportador de microcina E492.                                     | 74  |
| 3.5.3     | Modelamiento de la región transmembrana y dominio ABC de MceG en estado abierto y cerrado.                   | 76  |
| 3.5.4     | Estudio de las interfase entre los dominios ABC y transmembrana de los transportadores ABC.                  | 76  |
| 3.5.5     | Modelo del dominio peptidasa de MceG.  | 79  |
| 3.5.6     | Evaluación de los modelos del transportador de microcina.  | 79  |
| 3.6       | Las diferencias en el dominio ABC de los exportadores MceG y CvaB se concentran en una región del modelo 3D. | 83  |
| 3.7       | Estudio de la región C-terminal de MceG y su relación con el procesamiento de la microcina E492.             | 83  |
| 3.8.1     | Interacción del dominio peptidasa con el resto del transportador.  | 85  |
| 3.8.2     | Potencial sitio activo del dominio peptidasa de MceG.  | 92  |
| 3.9       | Ensamblaje de los tres dominios del transportador MceG.  | 95  |
| <br>      |  |     |
| <b>4.</b> | <b>DISCUSIÓN.</b>  |     |
| 4.1       | Especificidad de transporte.   | 101 |
| 4.2       | Modelamiento del transportador MceG.   | 105 |
| 4.2.1     | Modelamiento en estado cerrado.  | 108 |
| 4.2.2     | Modelos de los transportadores y especificidad de transporte.  | 110 |
| 4.2.3     | Generación de un modelo completo del transportador ABC.  | 111 |
| 4.3       | Modelo de la exportación de microcina E492.  | 114 |
| <br>      |  |     |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSIONES.</b>   | 117 |
| <br>      |  |     |
| <b>7.</b> | <b>ANEXO I.</b>  | 118 |
| <br>      |  |     |
| <b>8.</b> | <b>REFERENCIAS.</b>  | 127 |

## INDICE DE TABLAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Tabla I   | Cepas utilizadas en esta Tesis.   | 28 |
| Tabla II  | Plasmidios y vectores utilizados en esta Tesis.   | 29 |
| Tabla III | Secuencias de los partidores empleados en esta Tesis.                                   | 32 |
| Tabla IV  | Participación de <i>mceF</i> en la PIFE y en la producción de microcina activa.         | 65 |
| Tabla V   | Resumen del resultado de la búsqueda de homólogos estructurales del transportador MceG. | 75 |
| Tabla VI  | Distancia entre los dominios ABC y transmembrana.                                       | 80 |

## INDICE DE FIGURAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | Comparación de los sistemas productores de microcinas cromosomales.  | 4  |
| Figura 2  | Diagrama del sistema de secreción de tipo I.   | 12 |
| Figura 3  | Dímero de dominios ABC.  | 14 |
| Figura 4  | Esquema de la organización genética y transcripcional del sistema productor de microcina E492.   | 18 |
| Figura 5  | Formación de sistemas de transporte híbrido.   | 47 |
| Figura 6  | Estrategia para generar transportadores quiméricos.  | 48 |
| Figura 7  | Esquema del método utilizado para modelar el transportador de microcina E492 (MceG) y los transportadores de colicina V, microcina H47, microcina L. | 50 |
| Figura 8  | Análisis de las regiones promotoras del gen <i>mceF</i> en pJAM434 y el gen <i>mceJ</i> en pJAM229.  | 54 |
| Figura 9  | Análisis de secuencia nucleotídica de la mutante pJRS1.  | 55 |
| Figura 10 | Análisis del ORF MceK.   | 56 |
| Figura 11 | Búsqueda de nuevos ORFs en el sistema de microcina E492.   | 58 |
| Figura 12 | Comparación de los sistemas productores de microcina H47 y E492.   | 59 |
| Figura 13 | El gen <i>mceF</i> es prescindible para la producción de microcina E492 activa.  | 62 |
| Figura 14 | La modificación del C-terminal del transportador MceG impide la exportación de microcina E492.   | 63 |
| Figura 15 | Ensayos de complementación cruzada de los sistemas de transporte de la microcina E492 y de la colicina V.  | 67 |
| Figura 16 | Sistemas de transporte híbridos entre el exportador ABC y la proteína accesoria de los transportadores de microcina E492 y colicina V.               | 69 |
| Figura 17 | Complementación de mutantes en los transportadores de colicina V y microcina E492 con transportadores quimeras.                                      | 71 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 18 | Exportación de microcina E492 por los transportadores híbridos p $\alpha$ BC y pAB $\gamma$ .                     | 72  |
| Figura 19 | Modelamiento del transportador MceG en estado abierto.  | 77  |
| Figura 20 | Comparación de las estructuras de los transportadores de vitamina B12 y de lípido A.                              | 78  |
| Figura 21 | Modelo del transportador de microcina E492 en estado cerrado.   | 81  |
| Figura 22 | Modelo del dominio peptidasa del transportador de microcina E492.   | 82  |
| Figura 23 | Comparación de los dominios ABC del transportador de microcina E492 y colicina V.                                 | 84  |
| Figura 24 | Modelo de la región C-terminal de MceG.   | 86  |
| Figura 25 | El extremo C-terminal de MceG es importante para la exportación de microcina E492.                                | 87  |
| Figura 26 | Estado de procesamiento del péptido líder de la microcina intracelular.   | 89  |
| Figura 27 | Participación de los residuos TISI del transportador MceG en el procesamiento y exportación de la microcina E492. | 90  |
| Figura 28 | Reemplazo del C-terminal de MceG por una secuencia de consenso.   | 91  |
| Figura 29 | Sitio activo del dominio peptidasa del transportador de microcina E492.   | 94  |
| Figura 30 | La mutación D121N en el dominio peptidasa de MceG.  | 96  |
| Figura 31 | Análisis de los potenciales electrostáticos de superficie.  | 98  |
| Figura 32 | Interacción del dominio peptidasa con el dominio ABC.   | 99  |
| Figura 33 | Modelo completo del transportador de microcina E492 en estado cerrado.  | 100 |
| Figura 34 | Representación de MceG.   | 115 |
| Figura 35 | Modelo de reconocimiento y exportación del sistema de secreción de tipo I.  | 116 |
| Figura 36 | Evaluación de los modelos de MceG en estado abierto.  | 123 |
| Figura 37 | Evaluación de los modelos de MceG en estado cerrado.  | 124 |
| Figura 38 | Evaluación del modelo del dominio peptidasa de MceG.  | 125 |

## ABREVIATURAS

|      |  |
|------|--|
| 3D   | Tridimensional                             |
| A    | Absorbancia                                |
| ABC  | <b>ATP-Binding Cassette</b>                |
| Amp  | Ampicilina                                 |
| BCIP | 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato          |
| pb   | Pares de bases                             |
| Cm   | Cloranfenicol                              |
| DEPC | Dietilpirocarbonato                        |
| DMSO | Dimetilsulfóxido                           |
| dNTP | Desoxirribonucleótidos trifosfato          |
| DO   | Densidad óptica                            |
| Da   | Daltons                                    |
| kDa  | Kilodaltons                                |
| FMDV | Virus de la fiebre aftosa                  |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución   |
| ICD  | Dominio intercitoplasmático                |
| IFE  | Inmunidad en fase estacionaria             |
| IPTG | Isopropil-tio- $\beta$ D-galactopiranosido |
| Kan  | Kanamicina                                 |
| kpb  | Kilo pares de bases                        |
| LB   | Caldo Luria                                |
| MCS  | Sitio de múltiple clonamiento              |
| MHC  | Complejo mayor de histocompatibilidad      |
| min  | Minutos                                    |
| NBT  | Nitro blue tetrazolium                     |
| nm   | Nanómetros                                 |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida    |
| PIFE | Perdida de inmunidad en fase estacionaria  |
| PCR  | Reacción en cadena de la polimerasa        |

|         |                                    |
|---------|------------------------------------|
| rpm     | Revoluciones por minuto            |
| SDS     | Dodecilsulfato de sodio            |
| s       | Segundos                           |
| TCA     | Ácido tricloroacético              |
| TEMED   | N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino  |
| TFA     | Ácido trifluoroacético             |
| Tricina | N-tris-(hidroximetil)-metilglicina |
| Tris    | Tris-(hidroximetil)-aminometano    |

## RESUMEN

La microcina E492 es un antibiótico peptídico de 7,9 kDa producido por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 que mediante la formación de canales iónicos produce la despolarización de la membrana citoplasmática de bacterias gram negativo como *E. coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Mediante estudios de clonamiento y expresión en *E. coli* se estableció que los determinantes genéticos implicados en la producción de microcina activa están contenidos en un segmento de 13 Kpb ubicado en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae* RYC492.

La microcina E492 es exportada por un sistema de transporte de tipo I constituido por un transportador ABC (MceG), una proteína accesoria (MceH) y una proteína de membrana externa (TolC). El sistema de exportación de microcina E492 y el sistema de exportación de colicina V comparten alrededor de un 90% de similitud entre ellos. Estudios preliminares indicaron que el sistema de exportación de colicina V no reemplaza la función del sistema de exportación de microcina E492, y que la especificidad del transporte estaba relacionada con la presencia del gen *mceF*.

El objetivo central de esta tesis consistió en estudiar los mecanismos de especificidad del sistema I de exportación para lo cual se usará como modelo los exportadores que permiten la secreción de colicina V y microcina E492.

Mediante estudios de mutagénesis se determinó que MceF es prescindible en la exportación de microcina E492, y que más bien este producto génico participaría en la regulación de esta bacteriocina. Así, se determinó que MceF regula negativamente la expresión de la inmunidad de la microcina E492 y, posiblemente a través de este mecanismo, la expresión de la microcina E492.

Para estudiar los determinantes de la especificidad de la exportación se clonaron los sistemas de exportación de microcina E492 (*mceHG*) y colicina V (*cvaAB*). Se determinó que el sistema de exportación de colicina no complementa la exportación de microcina E492. Mediante la construcción de sistemas de exportación híbridos entre las proteínas ABC y accesoria de los sistemas de microcina E492 y colicina V se estableció que el transportador de colicina V (CvaB) no permite la exportación de microcina E492. La

construcción de transportadores quimeras entre los dominios del transportador de colicina V y microcina E492 permitió establecer que el dominio ABC del sistema de exportación de colicina V determina la exportación específica de su bacteriocina.

Para entender los mecanismos moleculares de los determinantes de especificidad se generaron modelos 3D del transportador de microcina E492. Este modelo ayudó a predecir la importancia del residuo D121 en el procesamiento del péptido líder de la microcina E492, lo cual se comprobó experimentalmente. El modelo de MceG también permitió establecer que las diferencias entre los dominios ABC de los transportadores de microcina E492 y colicina V se localizan en una región específica. El modelo 3D también permitió entender la importancia de los cuatro últimos aminoácidos del transportador en el proceso de exportación, lo cual fue verificado experimentalmente. Esta región interactúa directamente con el nucleótido, elemento indispensable para energizar el sistema.

Finalmente, se estudió mediante western blot de extractos celulares totales y extractos extracelulares de mutantes en los dominios peptidasa y ABC, el acoplamiento que existe entre el procesamiento de la bacteriocina y su exportación. Estos estudios indicaron que el procesamiento ocurre concomitante con la exportación y que el dominio ABC es necesario para activar a la peptidasa.

## ABSTRACT

Microcin E492 is peptide antibiotic of 7,9 kDa produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492 that through the formation of ion channels produces depolarization of cytoplasmatic membrane of gram-negative strains such as *E. coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. Through the cloning and expression in *E. coli* has been established that the genetic determinants involved in microcin E492 production are encoded in a 13 Kpb DNA segment from the chromosome of *K. pneumoniae* RYC492.

Microcin E492 is secreted by a type I exporter system. This system is formed by an ABC transporter (MceG), an accessory protein (MceH), and the outer membrane protein TolC. The microcin E492 exporter system has more than 90% of similarity with the colicin V system. Preliminary studies showed that colicin V system is unable to replace the function of microcin E492 exporter, and this specificity was related to the *mceF* gene.

The main goal of this thesis was to study the mechanisms of specificity in type I protein export system using as models colicin V and microcin E492 exporter systems.

The use of mutants in MceF allowed to establish that MceF was not necessary to export microcin E492, and that this protein would participate in the regulation of microcin E492 expression. Thus, it was established that microcin E492 immunity is negatively regulated by MceF, and probably through this mechanism the expression of microcin E492 could be controlled.

To study the elements that are involved in the specificity of export, the microcin E492 (*mceHG*) and colicin V (*cvaAB*) exporter systems were cloned. The colicin V exporter system was unable to complement the export of microcin E492. Through the construction of a hybrid between the accessory and exporter proteins of microcin E492 and colicin V exporter systems it was established that CvaB was unable to export microcin E492. The construction of chimeric proteins between the domains of microcin E492 and colicin V exporters showed that the ABC domain of colicin V exporter confers the specificity in the exportation of this bacteriocin.

To understand the molecular mechanism of the specificity, 3D models of microcin E492 exporter were generated. These models helped to determine the importance of D121

residue in the processing of microcin E492 leader peptide. The 3D model of MceG allowed locate the region where the differences between the ABC domain of colicin V and microcin E492 exporters reside. The 3D model also permitted to assess the importance of MceG C-terminal region in the processing and export of microcin E492. This region also interacts directly with the nucleotide, a key step to energize the system.

Finally, the coupling between microcin E492 processing and export was analyzed through western blot using intracellular and extracellular extracts of mutants in the ABC or peptidase domains. These studies showed that ABC domain is necessary to activate the peptidase.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1.1 Bacteriocinas.

Los microorganismos *in vivo* no se encuentran como células aisladas bajo condiciones óptimas de temperatura y amplia disponibilidad de nutrientes. Por el contrario, los microorganismos experimentan condiciones de crecimiento deficientes en nutrientes, con temperaturas cambiantes, y una ardua competencia con otros microorganismos por utilizar los pocos nutrientes que tienen a su disposición. Para aumentar sus posibilidades de crecimiento, algunos microorganismos producen compuestos antibióticos destinados a eliminar la competencia. Estos compuestos antibióticos son de diversa naturaleza química, denominándose bacteriocinas a aquellos compuestos antibióticos de naturaleza proteica (Riley y Wertz, 2002).

Las bacteriocinas son una amplia familia de proteínas secretadas al espacio extracelular. Estas proteínas son producidas tanto por bacterias (gram negativo y positivo) como por archaeas. Se estima que alrededor del 99% de las especies bacterianas conocidas produce al menos un tipo de bacteriocina (Klaenhammer, 1993). Las bacteriocinas tienen un reducido espectro de acción antibiótica, que afecta principalmente a cepas de bacterias relacionadas con la cepa productora. Cada bacteriocina ejerce su actividad antibiótica afectando específicamente algunos de los procesos o estructuras esenciales para la sobrevivencia de una bacteria. Estos procesos incluyen estabilidad del material genético, transcripción, traducción e integridad de la membrana citoplasmática. Para la producción de cualquier bacteriocina se requiere de al menos tres genes: a) un gen que codifica para la bacteriocina, b) un gen que codifica para una proteína que confiere protección (inmunidad) a la célula productora frente a la actividad tóxica de la bacteriocina secretada, c) uno ó dos genes que median la liberación de la bacteriocina al espacio extracelular. Estos elementos genéticos pueden estar codificados en el cromosoma bacteriano o en plasmidios (Riley y Wertz, 2002; Braun y cols., 2002; Héchard y Sahl, 2002).

### 1.1.1.1 Colicinas

Uno de los grupos de bacteriocinas mejor estudiado corresponde a las colicinas. Originalmente el término colicina se aplicó a cualquier bacteriocina producida por *E. coli*, sin embargo, dado que la mayor parte de las colicinas tiene un tamaño superior a 10 KDa, se optó por utilizar este término para todas las bacteriocinas de *E. coli* con un masa superior a 10 KDa, y se acuñó el término microcina para las bacteriocinas de *E. coli* con una masa inferior a 10 KDa (**Baquero y Moreno, 1984**).

Las colicinas son un grupo de toxinas con diversos mecanismos de acción y tamaños, que: 1) dependen de la presencia de receptores para su importación a través de la membrana externa de la célula blanco, 2) están codificadas en plasmidios, 3) son producidas bajo condiciones de estrés mediante el regulón S.O.S y 4) sus determinantes genéticos están compuestos por un gen que codifica para la toxina, una proteína de inmunidad y una proteína que libera a la colicina mediante lisis de la célula productora. Entre los distintos mecanismos de toxicidad de las colicinas se encuentran la formación de poros en la membrana interna (colicinas A, E1, N, K, U, 28b, B, Ia, Ib, 5 y 10), actividad DNasa (colicinas E2, E7-9), actividad RNasa (colicinas E3-6, DF13, D) y alteración de la síntesis del péptido glicano (colicina M y pesticina) (**Riley y Wertz, 2002; Haruhiko y Ogawa, 2002; Kolade y cols., 2002; Braun y cols., 2002**).

Las colicinas pueden ser clasificadas en los grupos A y B de acuerdo al sistema de importación que ocupan en la membrana externa de la célula blanco. El grupo A de colicinas utiliza el sistema Tol para su importación y está constituido por las colicinas A, E (1-9), N, K, U, 28b y DF13. El grupo B de colicinas utiliza el sistema Ton de importación y está conformado por las colicinas B, D, Ia, Ib, Js, M, 5, 10 y pesticina (**Braun y cols., 2002; Lazzaroni y cols, 2002; Bouveret y cols, 2002**).

Las características generales de las colicinas pueden ser aplicadas con ciertas excepciones a otras bacteriocinas producidas por bacterias gram negativo. Por ejemplo, *P. aeruginosa* produce piocinas, que son bacteriocinas similares a las colicinas, las cuales están codificadas en el cromosoma (**Michel-Briand y Baysse, 2002**). *S. marcescens* produce colicina 28b que puede estar codificada en el cromosoma o en plasmidios, y *Klebsiella* produce una serie de bacteriocinas estrechamente relacionadas con las colicinas denominadas klebocinas, las cuales también pueden estar codificadas en el cromosoma o en plasmidios (**Ferrer y cols., 1996; Chavan y cols., 2005**).

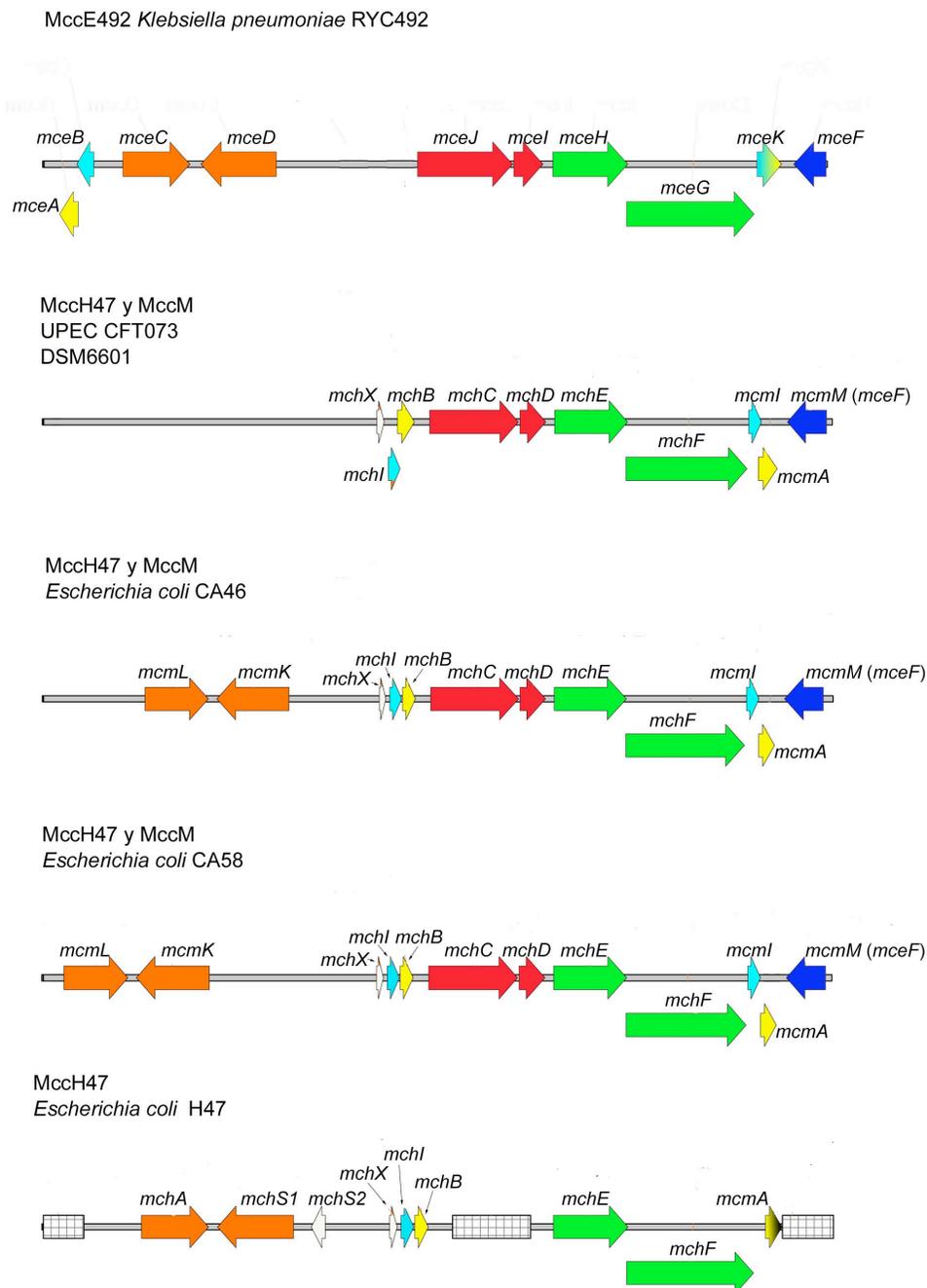
### 1.1.1.2 Microcinas.

Las microcinas son un grupo de péptidos antibióticos descritos por primera vez en 1976 en aislados fecales de *E. coli* (**Asensio y Perez-Diaz, 1976**). Como las colicinas, las microcinas son un grupo muy diverso tanto en secuencia aminoacídica como en mecanismo de acción, que ejerce su actividad antibiótica sobre un grupo de bacterias estrechamente relacionado con la bacteria productora (**Pons y cols, 2002**). Casi todas las microcinas descritas se han aislado a partir de cepas de *E. coli*, con excepción de la microcina E492 producida por *K. pneumoniae* RYC492 (**de Lorenzo, 1984; Wilkens y cols., 1997**) y la microcina SF608 que es producida por la cianobacteria *Microcystis* sp (**Banquer y Carmely, 1999**). En general, las microcinas producidas por las enterobacterias comparten características bioquímicas y genéticas con las bacteriocinas de clase II producidas por bacterias gram positivo. Ambos grupos de bacteriocinas son proteínas de baja masa molecular (<10 KDa), solubles en metanol, resistentes a condiciones extremas de temperatura y pH, resistentes al tratamiento con algunas proteasas, y a diferencia de las colicinas, no se inducen por el sistema SOS (**Kolter y Moreno, 1992**). Mediante análisis genético, bioquímico y de inmunidad se han identificado las microcinas B17 (**San Millan y cols., 1985**), C7 (**Novoa y cols., 1986**), D93 (**Martínez y Pérez-Díaz, 1986**), E492 (**de Lorenzo, 1984**), H47 (**Laviña y cols., 1990**), J25 (**Solbiati y cols., 1996**), L (**Pons y cols., 2004**), 24 (**U47048**), M (**Patzer y cols., 2003**) y colicina V (**Gilson y cols., 1990**).

### 1.1.2 Organización genética de las microcinas.

#### 1.1.2.1 Microcinas codificadas en el cromosoma.

La producción de cada una de las microcinas identificadas requiere de un sistema genético distinto. La mayor parte de estos sistemas están codificados en plasmidios, con excepción de los sistemas de las microcinas E492, H47 y M que se encuentran en el cromosoma bacteriano. Hasta el momento se ha descrito la organización genética de las microcinas H47, M en las cepas de *E. coli* CA46, CA58, DSM6601, UP CFT073 y H47, y la organización genética de la microcina E492 en *K. pneumoniae* RYC492 (**Lagos y cols, 2001**). Estas microcinas tienen una organización genética similar (**Ver figura 1**).



**Figura 1. Comparación de los sistemas productores de microcinas cromosomales.** En la figura se representan los genes relacionados con el transporte (verde), el gen estructural de la bacteriocina (amarillo), el gen de la proteína de inmunidad (celeste), los genes relacionados con el metabolismo de enteroquelina (naranja), los genes sin función conocida (blanco), las regiones no secuenciadas (rectángulos cuadrículados), genes fusionados (gradiente dos colores) y los genes truncos (gradiente con negro).

En primer lugar, sus elementos genéticos están agrupados en un segmento de aproximadamente 13 Kpb. El gen de inmunidad está río arriba y solapado con el gen estructural de la toxina, formando una sola unidad transcripcional. Estos sistemas presentan un “cluster” de genes que codifican para las proteínas de exportación de la toxina y para dos proteínas de función desconocida, pero necesarias para la actividad bactericida. En el sistema productor de microcina E492 este “cluster” de genes está formado por dos unidades transcripcionales (*mceHG* y *mceJI*). La unidad transcripcional que comanda la expresión de los genes de exportación (*mceHG*) tiene una expresión constitutiva, en cambio la unidad que comanda la expresión de los genes necesarios para la actividad (*mceJI*) es regulada negativamente en fase estacionaria (**Corsini y cols., 2002**). Además de los elementos nombrados con anterioridad los sistemas productores de estas microcinas necesitan un tercer segmento que codifica para dos proteínas ubicadas en unidades de transcripción distintas y convergentes. Las proteínas codificadas en esta región están relacionadas con el metabolismo de enteroquelina pues presentan altos porcentajes de identidad con enzimas encargadas de la glucosilación de la enteroquelina (**Fischbach y cols., 2005**) y con enzimas encargadas de la hidrólisis de la enteroquelina (**Lin y cols., 2005; Zhu y cols., 2005**). Este último segmento y el resto de los genes necesarios para la producción de microcinas puede estar juntos como en el caso de las cepas de *E. coli* CA46, CA58, H47 y *K. pneumoniae* RYC492, o separados como en el caso de las cepas de *E. coli* DSM6601 y UPEC 536. En el caso de las cepas de *E. coli* DSM6601 y UPEC CFT073 las funciones de los genes encargados de la glucosilación e hidrólisis de enteroquelina pueden ser suplidas por genes homólogos ubicados fuera del sistema productor (**Patzer y cols., 2003**). La comparación de las secuencias de los elementos genéticos de las microcinas codificadas en el cromosoma indica que estos elementos han estado en continuo intercambio. El análisis de los ORFs del sistema productor de microcina H47 obtenido a partir de un aislado fecal de *E. coli* indica la presencia de un gen para microcina M trunco (**Gaggero y cols., 1993**). Por otra parte, también es posible encontrar cepas como *E. coli* DSM6601, *E. coli* UPEC CFT073, *E. coli* CA46 y CA48, que expresan dos microcinas las cuales se encuentran codificadas en el mismo segmento genético y comparten el mismo sistema de exportación (**Patzer y cols., 2003**). Mediante secuenciación de genomas se ha determinado que los sistemas productores de microcina H47 y M de la cepa no patogénica de *E. coli* DSM6601 se encuentran en la isla genómica I. Esta isla genómica se encuentra insertada en el gen tRNA *serX* y comprende una región de aproximadamente 70 Kpb dentro de la cual se

encuentran genes que participan en el metabolismo de hierro y en la formación de biopelículas (**Patzer y cols., 2003; Grozdanov y cols., 2004**). La comparación de su secuencia nucleotídica indica que se encuentra conservada en un 99% en la cepa de *E. coli* UPEC CFT073 (**Welch y cols., 2002**). Las mismas funciones presentes en la isla genómica se encuentran presentes en la isla de patogenicidad III de la cepa de *E. coli* UPEC 536, sin embargo, en este caso los genes que participan en la síntesis de la microcina H47 están ausentes y el exportador está interrumpido por una secuencia de inserción (**Dobrindt y cols., 2001**). Respecto al sistema genético de la microcina E492 es probable que se encuentre en un isla de patogenicidad de *K. pneumoniae* RYC492, pues presenta un contenido G+C inferior al del genoma de *K. pneumoniae* MGH 78578.

### 1.1.2.2 Microcinas codificadas en plasmidios.

Los elementos genéticos de las microcinas codificadas en plasmidios se encuentran en regiones bastantes compactas agrupando hasta siete genes en fragmentos de DNA inferiores a 7 KDa (**Kolter y Moreno, 1992**). Las microcinas L, D93, C51, C7, 24 y colicina V están codificadas en unidades de replicación extra cromosomales. Hasta el momento, el sistema genético de la colicina V es el mejor caracterizado. La colicina V es en realidad una microcina, pero por razones históricas conserva el nombre de colicina. Este sistema consta de dos operones ubicados en una región de aproximadamente 5 Kpb. El primer operón codifica para el sistema de transporte de la colicina V y el segundo codifica para la toxina y su proteína de inmunidad (**Boyer y Tai, 1998**). La transcripción de ambos operones está regulada por la concentración de  $Fe^{3+}$ , aumentando su expresión en carencia de hierro (**Kolter y Moreno, 1992**).

El sistema productor de colicina V está ampliamente distribuido en aislados de *E. coli* y se encuentra asociado a factores de virulencia como: a) la proteasa de hemoglobina; b) el sistema productor de aerobactina (**Waters y Crosa, 1991**); y c) los genes involucrados en la síntesis y captación del sideróforo salmoquelina (**Johnson y cols., 2006**). Estos factores de virulencia también se encuentran presentes en islas de patogenicidad de *E. coli* junto con segmentos del sistema productor de colina V, indicando que los plasmidios productores de colicina V (pColV-K30 y pAPEC O2-ColV) pueden servir como vectores de transferencia de factores de virulencia.

Los sistemas genéticos de la microcina L y 24 presentan la misma organización que el sistema de colicina V. El sistema genético de la microcina L se encuentra

codificado en el plasmidio pL102 y esta conformado por dos genes que codifican para un sistema de transporte de tipo I, el gen estructural de la microcina L, el gen de inmunidad para la microcina L y un gen de inmunidad para la colicina V. (**Pons y cols., 2004**). El sistema genético de la microcina 24 esta conformado por dos genes que codifican para el sistema de transporte, el gen estructural de la microcina 24, el gen de inmunidad para la microcina 24 y un gen que codifica para un posible factor transcripcional (**U47048**).

Las microcinas C7, B17 y J25 son péptidos que para ejercer su actividad necesitan estar modificadas post-traduccionalmente. En este grupo los genes necesarios para su modificación están orientados en el mismo sentido y se encuentran entre el gen estructural de la toxina y la proteína de inmunidad. El sistema productor de la microcina B17 está codificado en el plasmidio pMccB17 en una región de aproximadamente 5,5 Kpb donde se ubican siete genes en la misma orientación. Esta región codifica para tres genes relacionados con la modificación de la toxina (*mcbBCD*) (**Li y cols., 1996; Milne y cols., 1998; Milne y cols., 1999**) y tres genes relacionados con la inmunidad y exportación (*mcbEFG*) (**Garrido y cols., 1998**). La microcina C7 es un péptido de 7 aminoácidos que está modificado en su extremo amino por un residuo de formil metionina y su extremo carboxilo se encuentra unido a una molécula de adenosina monofosfato aminopropanol (**Destoumieux-Garzón y cols., 2002**). Para la producción de microcina C7 se requieren siete genes, codificados en una región de aproximadamente 6,5 Kpb. Los genes *mccBD* están encargados de la modificación del C-terminal, y al igual que la microcina B17 los genes que participan en la inmunidad *mccCEF* también son los encargados de exportación (**Gonzalez-Pastor y cols., 1995**). Para la producción de microcina J25 se necesitan cuatro genes (*mcjABCD*). Estos elementos genéticos están codificados en una región de aproximadamente 5 Kpb del plasmidio de pTUC100 (60 Kpb.). El gen *mcjA* codifica para el gen estructural, los genes *mcjBC* posiblemente están involucrados en la modificación del producto de *mcjA* (procesamiento del péptido líder y ciclación) y el gen *mcjD* participaría en la exportación e inmunidad (**Solbiati y cols., 1999**).

### **1.1.3 Mecanismos de acción de las microcinas.**

Las microcinas ejercen su actividad antibiótica afectando algunos de los procesos vitales de la célula. (ej. generación de energía, integridad de la membrana citoplasmática, replicación del DNA, transcripción y traducción). Por ejemplo, las microcinas E492 y colicina V alteran el potencial de membrana mediante la formación de poros en la

membrana interna (**Yang y Konisky., 1984; Lagos y cols., 1993; de Lorenzo y Pugsley, 1985**). Las microcinas B17 y D93 alteran la replicación del DNA, la primera inhibiendo a la DNA girasa y la segunda inhibiendo la síntesis de DNA (**Heddle y cols., 2001; Martínez y Pérez-Díaz, 1986**). Las microcinas J25 y C7 impiden la expresión génica inhibiendo la transcripción y la traducción, respectivamente (**Guijarro y cols., 1995; Delgado y cols., 2001**). La microcina H47 parece ejercer su actividad afectando la producción de ATP, inhibiendo a la ATP sintetasa (**Trujillo y cols., 2001**). Por otra parte, las microcinas 24, L, y M no han sido objeto de estudios tan acuciosos, razón por la cual se desconoce su mecanismo de acción.

Para ejercer su actividad sobre el blanco, las microcinas deben ser translocadas a través de la membrana externa mediante una interacción con un receptor. Las microcinas utilizan como receptores moléculas encargadas del transporte de nutrientes fundamentales para la bacteria. Por ejemplo microcinas J25, H47, M, E492 y colicina V ocupan receptores de sideróforos. Las microcinas E492, H47 y M pueden ocupar los tres receptores de sideróforos catecólicos, Fiu, Fep y Cir, (**Patzer y cols., 2003**) en cambio la colicina V sólo ocupa el receptor Cir (**Davies y Reeves, 1975**). La microcina J25 ocupa el receptor de ferricromo FhuA (**Salomón y Farias, 1993**), en tanto que la microcina B17 ocupa a las proteínas de transporte inespecíficas OmpR y OmpF (**Detoumieux-Garzón y cols., 2002**). Por otra parte, se desconoce los receptores de las microcinas 24, C7, D93 y L. Las microcinas que necesitan a los receptores de sideróforos catecólicos probablemente ocupan el mecanismo de importación del sideróforo para acceder el espacio periplasmático. Mutantes en el complejo TonB-ExbB-ExbD, necesario para la importación de catecoles, son resistentes a la acción de las microcinas (**Braun y cols., 2002**). Sin embargo, la microcina E492 parece utilizar un mecanismo de translocación diferente, pues a pesar de utilizar los receptores catecólicos no requiere del “gating” inducido por TonB (**Baeza, 2003**).

#### **1.1.4 Exportación de las microcinas.**

La mayor parte de las microcinas descritas hasta el momento (L, M, 24, H47, E492 y colicina V), son exportadas al espacio extracelular por un sistema de transporte ABC (**Braun y cols., 2002; Pons y cols., 2002; Lagos y cols., 2001**). Los sistemas de secreción de las microcinas B17, C7 y J25 son diferentes de los otros tipos de secreción presentes en bacterias gram negativo, interesantemente estos sistemas de secreción

también son los encargados de conferir inmunidad a la célula productora contra su propia microcina (**Destoumieux-Garzon y cols., 2002**). Respecto a la microcina D93, aun no se han descrito los elementos genéticos necesarios para su exportación, y se desconoce el mecanismo por el cual la microcina D93 se exporta al espacio extracelular.

## **1.2 Transportadores ABC (ATP-Binding Cassette).**

Los transportadores ABC son fundamentales para el adecuado funcionamiento celular. El sistema de transporte ABC es un sistema de transporte activo, que acopla la hidrólisis de ATP con la importación o exportación de una molécula. Este sistema está ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose presente en procariotes, eucariotes y arqueas. En humanos por ejemplo, alteraciones de los transportadores ABC están asociadas a alrededor de 12 enfermedades, y en las células tumorales son la principal fuente de resistencia a anticancerígenos (**Dean 2005; Leslie y cols., 2005**). En bacterias, los transportadores ABC representan alrededor del 5% de los ORF (**Linton y Higgins, 1998**), participan en la exportación de factores de virulencia (**Holland y cols., 1990; Wandersman y cols., 1990; Letoffe y cols., 1991**), translocación de lípidos de membrana (**Doerrler y cols., 2004**) e importación de nutrientes (**Linton y Higgins, 1998**).

El término **alócritro** ha sido acuñado para identificar a las moléculas translocadas por los sistemas de transporte ABC (**Blight y Holland, 1990**). Los alócritros corresponden a moléculas de diversa naturaleza, como péptidos, proteínas, iones, xenobióticos, antibióticos y nutrientes. Los transportadores ABC son proteínas que se ubican en la membrana plasmática y se caracterizan por tener cuatro dominios los cuales pueden estar codificados en la misma cadena polipeptídica o en cadenas diferentes. Dos de los dominios se ubican en la membrana celular y se denominan dominios transmembrana. Los dominios transmembrana corresponden a proteínas intrínsecas de membrana que atraviesan cada uno alrededor de seis veces la membrana plasmática. Ambos dominios transmembrana forman un canal por donde el alócritro es translocado a través de la membrana plasmática (**Saurin y cols., 1999; Dean y cols., 2001; Davidson y Chen, 2004**). Los otros dos dominios se ubican en el citoplasma y son los encargados de energizar el transporte. Estos dominios se denominan ABC por su capacidad de unir e hidrolizar ATP (**ATP-Binding Cassette**). Los dominios ABC son ATPasas que para hidrolizar ATP necesitan dimerizar, pues el sitio activo se forma por la interacción de ambas subunidades (**Smith y cols., 2002**). La actividad ATPasa está directamente

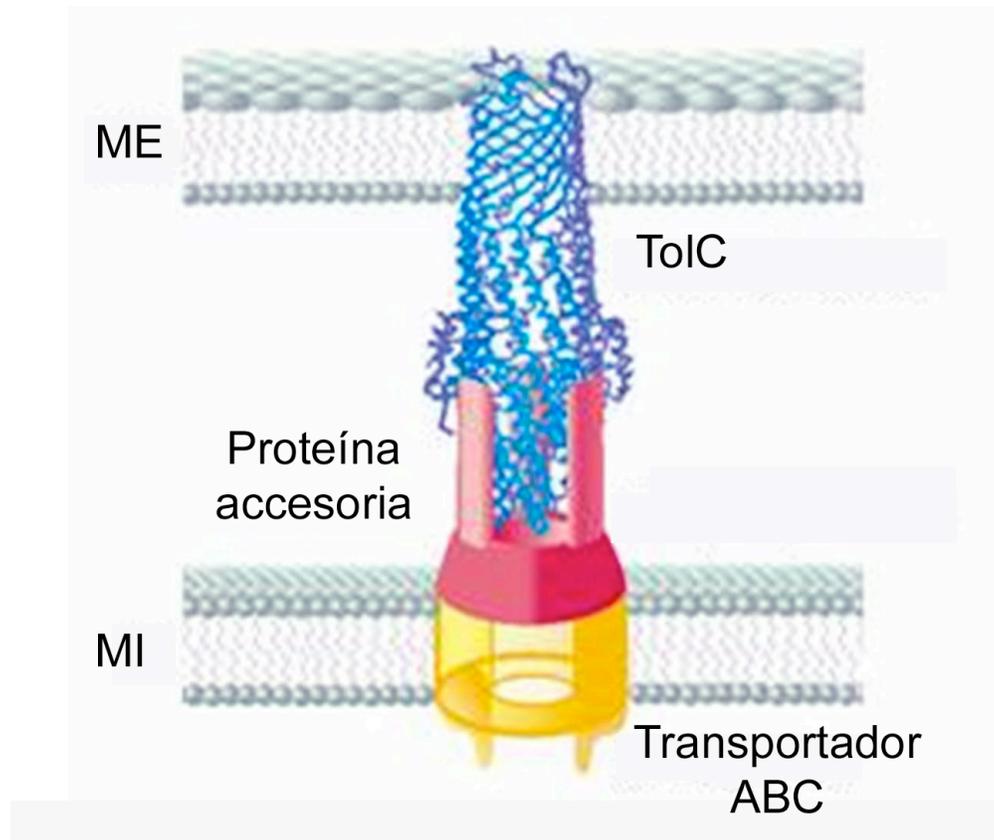
relacionada con el transporte del alócritro, pues en experimentos donde se ha eliminado por mutagénesis puntual la actividad ATPásica del transportador también se ha perdido la función de transporte (**Bishop y cols., 1989**). Esta relación entre actividad ATPásica y transporte parece ser recíproca pues también se ha observado que la presencia del alócritro estimula la actividad ATPásica del transportador (**Urbatsch y cols., 1994**).

### 1.2.1 Exportación de proteínas y transportadores ABC.

Los transportadores ABC median la exportación de proteínas tanto en bacterias como en eucariotes. Por ejemplo, en humanos la presentación de antígenos mediante el MHC está asociada a los transportadores ABC TAP I y II que participan en la translocación de péptido desde el interior del lisosoma hasta la superficie del MHC (**Abele y Tampe, 2004**). En bacterias gram positivo los transportadores ABC participan en la exportación de bacteriocinas (**Franke y cols., 1999**), factores de “quorum sensing” (**de Saizieu y cols., 2000**), factores de competencia (**Havarstein y cols., 1995**) y en la inmunidad ante algunos péptidos antibióticos (**Gajic y cols., 2003**). Estos transportadores actúan como homodímeros  $[MD-ABC]_2$  en los cuales cada monómero tiene un dominio transmembrana y un dominio ABC. En bacterias gram negativo, los dominios transmembrana y ABC de los transportadores implicados en la expulsión de péptidos antibióticos (mecanismos de inmunidad) están codificados en genes distintos formando un transportador con estructura  $[MD]_2[ABC]_2$  (**Garrido y cols., 1988; Gonzalez-Pastor y cols., 1995**). En este tipo de transportadores los dominios de transmembrana pueden formar heterodímeros.

Una característica común entre las bacteriocinas, los factores de “quorum sensing” y de competencia es que son sintetizados como pre-proteínas. Estas pre-proteínas tienen en el extremo amino un péptido líder de aproximadamente 20 aminoácidos, el cual es procesado concomitante con la exportación. Este péptido líder es procesado adyacente a un motivo de doble glicina el cual está conservado en todos los péptidos líder de las proteínas exportadas por este tipo de transportador (**Michiels y cols., 2001**). El procesamiento es realizado por el propio transportador, el cual posee en el extremo amino un tercer dominio de aproximadamente 160 aminoácidos que corresponde a una peptidasa (**Havarstein y cols., 1995; Wu y Tai., 2004; Biemans-Oldehinkel y cols., 2005; Ishii y cols., 2006**).

Las bacterias gram positivo tienen una sola membrana, por lo cual la exportación de proteínas no necesita de estructuras accesorias para que las proteínas lleguen al espacio extracelular. Por el contrario, las bacterias gram negativo poseen membrana externa y membrana citoplasmática, por lo tanto la exportación de proteínas necesita de estructuras y mecanismos accesorios para que las proteínas sean secretadas. En bacterias gram negativo existen cinco sistemas de secreción de proteínas (Sistema tipo I, II, III, IV, auto-transporte). El sistema de secreción de tipo I también es conocido como sistema ABC dedicado pues permite la exportación específica de proteínas. Mediante este sistema de secreción se exporta al espacio extracelular proteasas, fosfatasa, glucanasas, nucleasas, lipasas y toxinas como hemolisinas y microcinas. (**Delepelaire, 2004**). El sistema de tipo I realiza la exportación de proteínas desde el citoplasma al espacio extracelular sin pasar por un intermediario periplasmático. Para esto el sistema de transporte ABC necesita de una proteína accesoria de orientación periplasmática anclada a la membrana interna y una proteína de membrana externa perteneciente a la familia de TolC (**Figura 2**). Mediante experimentos de entrecruzamiento de proteínas se ha establecido que el transportador ABC, la proteína accesoria y la proteína de membrana externa interactúan al momento de exportar formando un complejo de exportación con una estequiometría 2:3:3 (**Thanabalu y cols., 1998**). Respecto del mecanismo de los transportadores ABC para el reconocimiento y exportación de proteínas, se han descrito dos mecanismos; uno en el cual la señal de exportación se encuentra en el extremo carboxilo y otro donde la señal de exportación se encuentra en el extremo amino de la proteína. La proteína HylA (hemolisina) de *E. coli*, Has (hemóforo) de *S. marcescens*, algunas metaloproteasas de *E. chrysanthemi* y *P. aeruginosa* son exportadas mediante una secuencia señal ubicada en el extremo carboxilo. Esta secuencia es una región rica en glicina, poco conservada que permanece junto con la proteína después de la exportación. Experimentos realizados intercambiando esta señal de exportación han permitido establecer que esta región determina la especificidad de la proteína por su exportador (**Holland y cols., 2005**). El segundo mecanismo es utilizado principalmente por los sistemas de exportación de microcinas y es similar al mecanismo descrito en los sistemas de exportación de bacteriocinas en bacterias gram positivo. En ambos sistemas, la señal de exportación o péptido líder presenta un motivo de dobles glicina que sirve como sitio de procesamiento para una peptidasa ubicada en el extremo amino del transportador ABC (**Michiels y cols., 2001; van Belkun y cols., 1997**).



**Figura 2. Diagrama del sistema de secreción de tipo I.** El sistema de exportación de tipo I está conformado por un dímero del transportador ABC (proteína amarilla), un trímero de proteína accesoria (proteína rosada) y un trímero de la proteína de membrana externa perteneciente a la familia de TolC (proteína en azul). MI, membrana interna; ME, membrana externa.

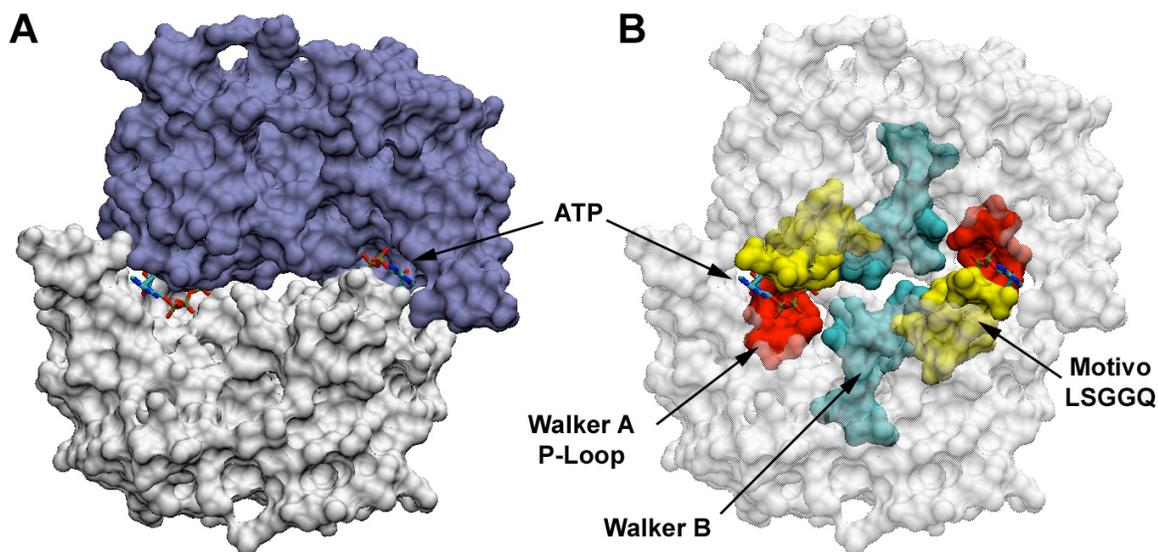
En este último mecanismo, el péptido líder es el encargado de dirigir la proteína al exportador, pero no está clara su función en la especificidad de transporte.

### **1.2.2 Estructura y especificidad de los transportadores ABC.**

Dada su implicancia en la multiresistencia a antibióticos en bacterias y a la resistencia a compuestos antitumorales en células neoplásicas, existe una activa investigación en el área de los transportadores ABC. La comparación de la secuencia primaria de los transportadores ABC indica que estos actúan como proteínas modulares compuestas por dominios ABC y dominios transmembrana. Cada dominio ABC posee dos motivos característicos denominados Walker A y Walker B (**Walker y cols, 1982**) que son comunes a las proteínas que unen nucleótidos. Además de estos dos motivos, los dominios ABC contienen una secuencia característica (LSSGN) que los distingue de otros dominios de unión a nucleótidos (**Jones y George, 2004**). Con el fin de dilucidar el mecanismo de exportación se han realizados importantes esfuerzos para obtener la estructura cristalográfica de dominios ABC de distintos transportadores. La comparación de la estructura 3D de los dominios ABC cristalizados ha indicado que en general los dominios ABC poseen el mismo patrón de plegamiento y estructura 3D (**Watanabe y cols., 2005**) (**Figura 3**).

Los dominios transmembrana de los transportadores ABC son menos conservados, aún cuando transporten moléculas de características semejantes. Estudios mediante alineamiento múltiple han permitido distinguir dos tipos de dominios transmembrana que se relacionan con la función del transportador. Aquellos transportadores que participan en la importación de alócritos presentan dominios transmembrana compactos, con regiones citoplasmáticas cortas que conectan las hélices transmembrana.

Las regiones citoplasmáticas participan en la interacción con el dominio ABC, el cual se encuentra localizado en una cadena polipeptídica diferente. La estructura modelo de los importadores ABC corresponde al transportador de cobalamina (**Locher y cols., 2002**).



**Figura 3. Dímero de dominio ABC.** En la figura se muestra un homodímero de dominios ABC Mj0796 (Estructura 1L2T). En el panel A los monómeros se representan de color azul y en blanco. En la interfase de los dominios ABC se ubican dos moléculas de ATP por dímero. En el panel B se destacan los motivos Walker A/P-Loop (rojo), Walker B (cian) y el motivo característico de los dominios ABC “Signatura Motif” (amarillo). Como se observa el sitio activo se conforma en la interfase de ambos dominios por la interacción de los motivos Walker A y Walker B de un monómero con el motivo LSSGQ (“Signatura Motif”) del otro monómero.

Los dominios transmembrana de los exportadores ABC son unidades menos compactas que tienen grandes regiones citoplasmáticas que forman un subdominio denominado ICD (dominio intercitoplasmático). Los subdominios ICD están formados por las regiones citoplasmáticas que unen las hélices transmembrana (**Chang y Roth, 2001**). En algunos exportadores ABC, como el transportador de lípido A, el factor de multiresistencia de *Lactococcus* (LmrA) y los exportadores del sistema de exportación de tipo I, el dominio transmembrana y el dominio ABC se localizan en la misma cadena polipeptídica (**Delepelaire, 2004; Ecker y cols., 2004**). A nivel estructural este tipo de transportadores se encuentra menos caracterizado que los importadores ABC. Las primeras estructuras obtenidas a partir de cristalografía de rayos-X fueron resueltas a partir de cristales del transportador de lípido A de *E. coli* y *V. cholerae* (**Chang y Roth, 2001; Chang, 2003**). Estas estructuras son de baja resolución (3,5- 4,2 Å) y no se aprecia en detalle la interacción entre el dominio ABC y la región transmembrana. Sólo recientemente se ha logrado obtener una estructura del transportador de lípido A donde la interacción entre la región transmembrana y ABC se encuentra resuelta en detalle (**Reyes y Chang, 2005**).

### 1.3 Microcina E492.

En experimentos realizados por de Lorenzo a comienzos de los años ochenta, se observó que la actividad bactericida de la microcina E492 era producida principalmente en fase exponencial de cultivo y que está actividad declinaba a medida que el cultivo entraba a fase estacionaria. En esta fase, la actividad de la microcina E492 disminuye en parte por el aumento en la producción de enteroquelina la cual actúa como antagonista de la microcina E492 (**de Lorenzo, 1984; Orellana y Lagos, 1996**).

Mediante cromatografía de fase reversa fue posible concentrar la actividad de la microcina E492 a partir de sobrenadantes de cultivos de *K. pneumoniae* RYC492, sugiriendo que el responsable de tal actividad era un compuesto de naturaleza hidrofóbica. Este compuesto era soluble en metanol y su actividad antibiótica se mantenía estable durante meses en estas condiciones (**de Lorenzo, 1984**). Los primeros intentos por demostrar la naturaleza del compuesto antibiótico fueron contradictorios, pues éste era sensible a algunas proteasas pero no era visible mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie o plata. No fue hasta que se administró un pulso de aminoácidos radioactivos a la cepa productora de microcina E492 que se estableció que el compuesto

responsable de la actividad antibiótica era una proteína de aproximadamente 8 KDa (**de Lorenzo y Pugsley, 1985**).

### 1.3.1 Actividad antibiótica.

La microcina E492 ejerce su actividad antibiótica sobre cepas pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Erwinia* (**de Lorenzo, 1984**). Esta bacteriocina actúa sobre la célula blanco produciendo despolarización de la membrana interna (**de Lorenzo y Pugsley, 1985; Lagos y cols., 2001; Destoumieux-Garzón, 2003**). Esta despolarización sería causada por la formación de canales en la membrana, a juzgar por su capacidad de formar canales iónicos en bicapas lipídicas (**Lagos y cols., 1993; Wilkens y cols., 1997; Lagos y cols., 2001**).

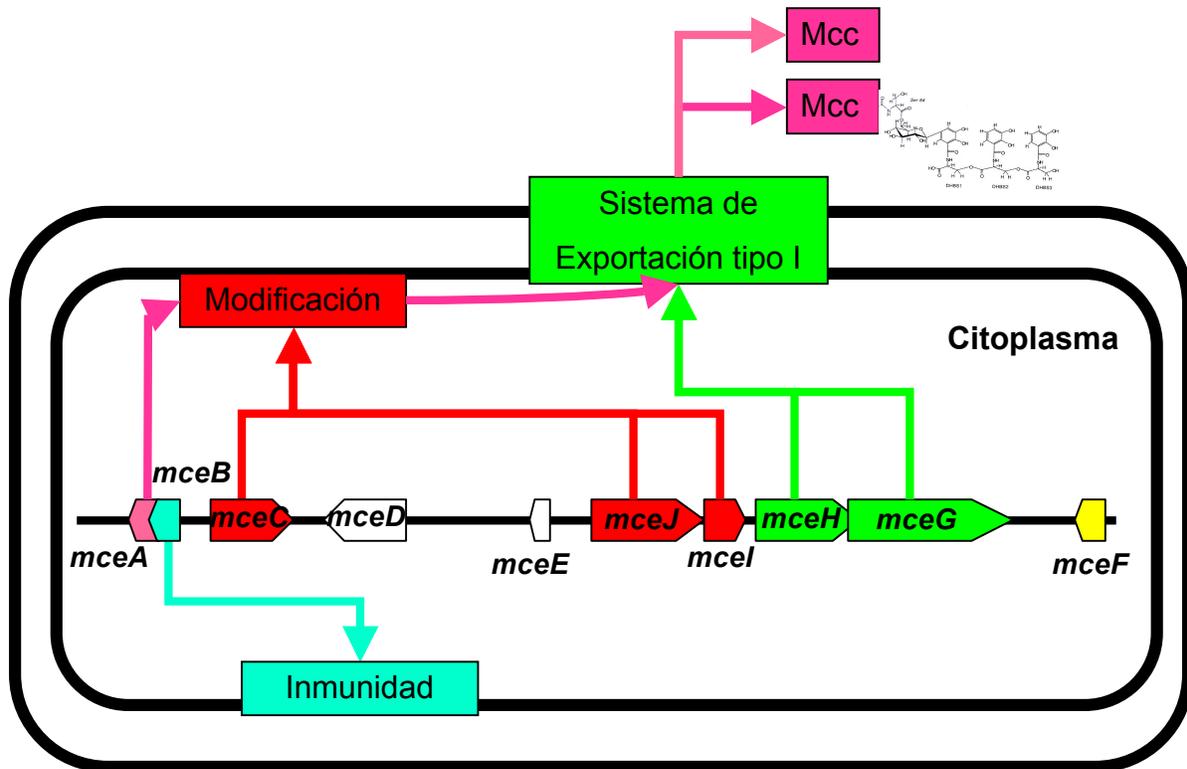
La microcina E492 ingresa al periplasma de la bacteria a través de los receptores de sideróforos catecólicos FepA, Fiu y Cir (**Strahsburger y cols., 2005**). Por otra parte las proteínas TonB y ExbB, que se ubican en la membrana citoplasmática (**Pugsley y cols., 1986**) y que participan en todos los sistemas de captación de hierro conocidos en *E. coli* (**Silver y Walderhaug, 1992**) son necesarias para la acción de la microcina E492 en la membrana interna, pues esferoplastos producidos a partir de cepas TonB<sup>-</sup> son resistentes a la microcina E492 (**Baeza, 2003**).

La microcina E492 no sólo presenta actividad bactericida. Experimentos utilizando algunas líneas celulares humanas, determinaron que la microcina E492 produce liberación de Ca<sup>2+</sup> al citosol causando la muerte celular por apoptosis (**Hetz y cols., 2002**). Las características detalladas de los poros formados por la microcina E492 se desconocen, sin embargo de los experimentos realizados sobre bicapas lipídicas se ha podido establecer que los canales formados son selectivos para cationes (**Lagos y cols., 1993**). Dado el pequeño tamaño de la microcina E492, se estima que los canales formados por la microcina estarían constituidos por asociaciones de ésta. En solución acuosa la microcina E492 forma dímeros y trímeros (**Destoumieux-Garzón, 2003**), los cuales podrían a su vez interactuar para la formación del canal. La asociación de la microcina E492 no sólo serviría para formar canales sino que también podría ser una forma de regular su actividad. Experimentos realizados con microcina de fase estacionaria han determinado que en cultivos donde se han alcanzado altos valores de densidad óptica, la microcina forma agregados tipo fibras amiloides, resistentes a proteasas y que no presentan actividad bactericida (**Bieler y cols., 2005**).

### 1.3.2 Elementos genéticos.

Los primeros intentos por determinar donde se encontraban los elementos genéticos responsables de la producción de microcina E492 apuntaron a buscar en los plasmidios que la cepa *K. pneumoniae* RYC492 portaba naturalmente. Los resultados de estos experimentos indicaron que ninguno de los dos plasmidios presente en esta cepa contenía la información necesaria para la producción de microcina E492 (**de Lorenzo y Pugsley, 1985**). No fue hasta que se realizaron genotecas en cosmidios del genoma de *K. pneumoniae* RYC492 que se logró establecer que estos elementos estaban codificados en el cromosoma de esta cepa (**Wilkins y cols., 1997**). Los cosmidios contenían segmentos clonados de DNA de aproximadamente 40 Kpb. El cosmidio que contenía los elementos genéticos para la producción de microcina E492 fue denominado pJ, y a partir de él se realizaron sucesivos intentos por acotar la región productora. A partir del plasmidio pJ se obtuvieron las construcciones pJAM434, pJAM229 y pJEM15. Las construcciones pJAM434 y pJAM229 difieren en la inversión de un fragmento XhoI de aproximadamente 6,8 Kpb. De la construcción pJAM229 derivan las construcciones pJEM15 y pJRS1. La construcción pJEM15 tiene duplicado un fragmento Sall que se encuentra ausente en la construcción pJRS1. La microcina recombinante producida por cepas de *E. coli* que contenían los plasmidios, pJAM229, pJEM15 o pJAM434 tiene las mismas características electrofisiológicas y el mismo perfil de producción que la microcina silvestre aislada a partir de *Klebsiella* (**Wilkins y cols., 1997; Lagos y cols., 2001**). Esto sugirió que todos los elementos genéticos necesarios para la producción de microcina E492 están codificados en la región clonada en *E. coli*.

Mediante una combinación de análisis de restricción, secuenciación de DNA y mutagénesis por transposición con Tn5 se estableció que los elementos necesarios para la producción de microcina E492 están contenidos en una región de 13 Kpb. Esta región contiene 10 genes organizados en 7 unidades transcripcionales. Estos genes participan en los procesos de síntesis, maduración, exportación e inmunidad (**Lagos y cols., 2001**) (**Figura 4**). La primera unidad transcripcional corresponde a los genes *mceB* y *mceA*. El gen *mceB* codifica para una proteína de 95 aminoácidos, que se localiza en la membrana interna de la bacteria. La sola expresión de este gen es suficiente para conferir inmunidad ante la microcina E492 (**Lagos y cols., 1999**).



**Figura 4. Esquema de la organización genética del sistema productivo de microcina E492.** El sistema productivo de microcina E492 puede ser dividido en cuatro grupos de genes: a) El gen estructural de la microcina E492 *mceA* (en rosado), b) el gen de inmunidad *mceB* encargado de proteger a la bacteria de la actividad tóxica de la microcina E492 (en celeste), c) los genes de modificación *mceC*, *mceJ* e *mceI*, encargados de modificar postraduccionalmente el extremo carboxilo de la microcina E492 con una molécula de salmoquelina (en rojo) (Thomas y cols., 2004) y los genes de exportación *mceH* y *mceG*, encargados de formar el sistema de secreción de tipo I que realizan la exportación de la microcina al espacio extracelular (en verde).

El gen *mceA* codifica para el gen estructural de la microcina E492. Este gen codifica para una pre-proteína de 103 o 99 aminoácidos dependiendo del inicio de la traducción. La pre-proteína es procesada al momento de su exportación en su extremo amino terminal en un sitio de doble glicina produciendo una proteína madura de 84 aminoácidos. La identidad del gen con la proteína fue confirmada mediante microsecuenciación de la microcina exportada. La proteína madura corresponde a un péptido de 7886 Da el cual es producido principalmente sin modificaciones post-traduccionales (**Lagos y cols., 2001; Pons y cols., 2002**). Los genes *mceB* y *mceA* se encuentran yuxtapuestos situación que podría ser importante en la regulación fina de la estequiometría entre la microcina intracelular y la proteína de inmunidad.

El gen *mceC* forma una sola unidad transcripcional. Experimentos mediante RT-PCR han determinado que este gen no presenta una regulación transcripcional importante por la fase de crecimiento, sin embargo mediante fusiones de proteína con la enzima  $\beta$ -galactosidasa se ha determinado que la expresión de la proteína alcanza un máximo al inicio de la fase estacionaria (**Corsini, 2004**). El producto génico del *mceC* es la proteína MceC de 370 aminoácidos que es homóloga a IroB, una glicosil-transferasa que participa en la síntesis de salmoquelina (**Fichbach y cols., 2005**), y en la síntesis de los antibióticos urdamicina A en *Streptomyces fradiae* (**Faust y cols., 2000**) y daunorubicina en *Streptomyces peucetius* (**Otten y cols., 1995**). La proteína MceC está relacionada con el proceso de “maduración” de la microcina E492, pues mutantes en este gen producen microcina inactiva. La función del gen *mceC* puede ser sustituida por el gen *iroB*, lo cual sugiere que existe una relación entre la actividad de la microcina E492 y la producción de salmoquelina (**G. Mercado y R. Lagos**, resultados no publicados).

El gen *mceD* codifica para una proteína de 414 aminoácidos, homóloga (54% de identidad y 67% de similitud) a una enteroquelina esterasa (*iroD*) de *S. typhi*. El producto del gen *mceD* también parece estar relacionado con el metabolismo de salmoquelina y enteroquelina (**Baumler y cols., 1998**), pues homólogos de MceD linealizan la molécula de salmoquelina (**Zhu y cols., 2005; Lin y cols., 2005**). Mutantes en el gen *mceD* producen microcina activa, por lo cual se desconoce si la función de este gen es dispensable para la producción de microcina activa o si en la mutante esta función es complementada por otro gen de *E. coli*.

El gen *mceE* codifica para una proteína de 114 aminoácidos y no tiene homólogo identificable. Esta proteína puede tener algún papel regulador, ya que una región de su secuencia presenta un grado de similitud con proteínas reguladoras que se unen al DNA.

El gen *mceJ* codifica para una proteína de 524 residuos que no posee homólogo conocido. Mutantes en este gen producen microcina, pero ésta carece de actividad, por lo cual se piensa que está asociado con el proceso de maduración de la microcina. Mediante la búsqueda de homólogos estructurales utilizando los patrones de estructura secundaria se logró establecer una similitud con una aminoacil tRNA sintetasa y con proteínas que unen nucleótidos. De esta forma, MceJ podría estar relacionada con la activación del carboxilo terminal de la microcina con una molécula de AMP.

El gen *mceI* codifica para una proteína de 163 aminoácidos. El análisis de la secuencia de MceI indica que posee homología con aciltransferasas del sistema de productor citolisina de *A. pleuropneumoniae* (Kuhnert y cols., 2005) y el sistema de leucotoxina de *P. hemolítica* (Davies y cols., 2001). Mutantes en este gen también producen microcina inactiva (Lagos y cols., 2001). Basado en las características del enlace que une a la molécula de salmoquelina con el carboxilo terminal de la microcina, y la dependencia del sistema productor de microcina del gen *entF*, se cree que MceI participa en la formación del enlace éster que une a la microcina con la salmoquelina. MceI transferiría, a la microcina, desde EntF a la molécula de salmoquelina (G. Mercado y R. Lagos, resultados no publicados).

A través de RT-PCR se ha encontrado una relación entre la actividad de la microcina E492 y los genes *mceJI* (Corsini y cols., 2002). En fase estacionaria se observa que la transcripción de los genes *mceJI* disminuye en forma concomitante con la pérdida de la actividad de la microcina. Estos resultados están de acuerdo con experimentos que indican que la sobreexpresión de los genes *mceJI* aumenta la producción de microcina E492 activa y retarda la pérdida de actividad observada en fase estacionaria (M. Marín y R. Lagos, resultados no publicados).

El gen *mceH* codifica para una proteína de 413 aminoácidos con una masa aproximada de 47 KDa. La proteína para la cual codifica este gen presenta una región hidrofóbica ubicada en el amino terminal entre los aminoácidos 11 y 34. Mutantes por transposición en este gen son incapaces de exportar la microcina E492 (Lagos y cols., 2001). El análisis bioinformático de la secuencia primaria de MceH estableció que esta

proteína pertenece a la familia de proteínas accesorias del sistema de exportación de tipo I de bacterias gram negativo. La proteína MceH presenta un alto porcentaje de similitud con las proteínas accesorias del sistema de exportación de las microcinas L (95%), H47 (95%), M (94%), 24 (86%), colicina V (94%), y con la proteína HlyD del sistema de exportación de hemolisina B (42%). La evidencia experimental indica que una región de estas proteínas se encuentra unida a la membrana interna, pero el resto de la proteína se orienta hacia el periplasma (**Skvirsky y cols., 1995**).

El gen *mceG* codifica para una proteína de 698 aminoácidos. Esta proteína tiene identidad con los transportadores ABC del sistema de exportación de tipo I. Como se esperaba, mutantes por transposición en este gen tienen un fenotipo no productor de microcina E492. El análisis de la secuencia de la proteína deducida arrojó la existencia de un dominio peptidasa ubicado en el extremo amino, un dominio transmembrana y un dominio ABC. Al igual que la proteína MceH, este transportador presenta un alto porcentaje de similitud con los transportadores ABC de los sistemas de exportación de las microcinas H47 (95%), M (95%), L (93%), 24 (89%), colicina V (92%) y hemolisina (93%).

Los genes *mceHG* se encuentran solapados y forman una sola unidad transcripcional. A diferencia de los genes *mceJI* los genes del sistema de transporte no se regulan negativamente en fase estacionaria y tienen su propio sitio de inicio de transcripción (**Lagos y cols., 2001; Corsini y cols., 2002**).

El gen *mceF* es el último gen del sistema productor de microcina y se transcribe constitutivamente en forma opuesta a los genes *mceJIHG*. El gen *mceF* se encuentra conservado en los sistemas productores de las microcinas cromosomales de *E. coli* y codifica para una proteína de transmembrana de 171 aminoácidos (**Patzer y cols., 2003**). La búsqueda de dominios conservados dentro de su secuencia de proteína indica que este gen codifica para una proteína emparentada con enzimas prenil proteasas de eucariotes, las cuales hasta el momento no tienen homólogos funcionales en bacterias.

### **1.3.3 Mecanismo de exportación de la microcina E492.**

Estudios previos en el mecanismo de exportación de la microcina E492 indicaron que la exportación de esta bacteriocina depende de los genes *mceG* y *mceH* ambos presentes en el sistema productor de microcina. Estos estudios también indicaron que se requiere de la participación de la proteína de membrana externa de *E. coli*, TolC (**Castillo,**

**2003**). Esta evidencia apunta a que la microcina E492 es exportada por un sistema de exportación de tipo I, similar al que exporta hemolisina o colicina V. Sin embargo, el sistema de exportación de microcina E492 parece ser más complejo que el resto de los antes determinados, pues la mutante pJRS1 que carece del gen *mceF* es incapaz de exportar microcina E492 (**Wilkens y cols., 1997**). La dependencia de *mceF* sería de tipo mecánica, pues experimentos utilizando cepas que expresan microcina E492 complementadas con el sistema productor de colicina V pero mutadas en su respectivo transportador, mostraron que el transportador de microcina E492 exportaría microcina E492 y colicina V sólo en la presencia de MceF. Posteriores estudios combinando los sistemas productores de colicina V y microcina E492 indicaron que cuando se expresa el sistema productor de colicina V con mutantes en los transportadores de microcina sólo es posible observar la actividad de la colicina V, lo cual indicaría que en este caso ambos sistemas no son intercambiables. Otra característica interesante del sistema productor de microcina E492 es que mutantes que tienen duplicados segmentos génicos donde se encuentra el gen *mceF* sobreproducen microcina E492. Todos estos antecedentes hicieron pensar que existe una relación entre MceF y la exportación de microcina E492, y que esta proteína guardaría relación con la especificidad en la exportación.

#### **1.3.4 El gen *mceF*.**

El gen *mceF* es una unidad monocistrónica que es activa transcripcionalmente tanto en fase logarítmica como estacionaria y codifica para una proteína de 179 aminoácidos, con seis posibles regiones transmembrana, y que presenta una masa hipotética de 21,1 KDa. (**Lagos y cols., 2001**). El análisis de su secuencia nucleotídica mediante BLAST ocupando la base de datos de GenBank no mostró identidad significativa con otros genes, sin embargo al utilizar la secuencia de la proteína deducida (MceF) y contrastarla con la base de datos de GenBank se encontró alta identidad con el ORF 5 (CAA64203.1) presente en el islote de patogenicidad III de la cepa uropatogénica de *E. coli* 536. Al analizar en detalle la estructura de este islote de patogenicidad se pudo comprobar que el ORF 5 se encuentra vecino a un precursor de colicina V (ORF4) y a un ORF que codifica para un transportador ABC con identidad al transportador de colicina V (ORF3) (**Dobrindt y cols., 2001**). De esto es posible especular que en este caso el ORF5 también se encuentra relacionado en el proceso de exportación de microcina.

La búsqueda de dominios conservados en la secuencia de MceF estableció que esta proteína presenta el dominio conservado Abi (pfam02517) entre los aminoácidos 81 al 165. Esta familia de proteínas ha sido construida con el alineamiento de 47 proteínas, de las cuales 33 son de origen bacteriano. Algunos miembros de esta familia son CAAX prenil proteasa del tipo II. Las CAAX prenil proteasas del tipo II son las enzimas encargadas de realizar un corte proteolítico en el enlace peptídico del carboxilo terminal del residuo de cisteína de la secuencia CAAX una vez que éste ha sido modificado por prenilación (**Pei y Grishin, 2001**). Es interesante destacar que un miembro de la familia CAAX prenil proteasa de tipo II es un ORF hipotético (CAA64203.1) que codifica para una proteína de 63 aminoácidos la cual se encuentra dentro del segmento genómico que codifica para los péptidos tipo bacteriocina PlnP, PlnI, PlnT, PlnP y PlnU de *L. plantarum* C11. Estos péptidos también son exportados por un sistema de exportación ABC, que se encuentra codificado dentro de este mismo segmento genómico (**Diep y cols., 1996**). La actividad tipo prenil proteasa también ha sido descrita asociada a otros sistemas de transporte ABC. El precursor del factor A de levadura, que es exportado por un sistema tipo ABC, una vez que es prenilado por la proteína Ste6, es procesado proteolíticamente en su extremo carboxilo terminal y consecutivamente en su extremo aminoterminal para liberar su péptido líder. Ambos procesos son realizados por la misma enzima Ste24a que es una proteína intrínseca de membrana ubicada en el retículo endoplasmático con actividad prenil proteasa, pero del tipo I (**Tam y cols., 2001**). Basados en estos antecedentes, MceF podría catalizar la proteólisis de una proteína desconocida necesaria para la exportación de microcina E492, o podría jugar un papel estructural, en el cual MceF es necesaria para la conformación del transportador de microcina E492, o bien para el reconocimiento de MceF por el transportador. No se descarta que esta proteína pueda actuar como proteína de andamiaje que reclute a otras proteínas como MceI, MceJ y MceC que participan en la maduración de la microcina E492.

## 1.4 Objetivo general.

Los sistemas de exportación de microcina E492 y colicina V son un buen modelo para comprender los mecanismos de especificidad del sistema de secreción del tipo I, pues presentan un alto porcentaje de identidad (>90%), no son recíprocamente intercambiables para exportar sus correspondientes bacteriocinas, la producción de bacteriocina es fácilmente analizable, y los resultados pueden ser extrapolados a otros sistemas de exportación ABC.

Basados en estos antecedentes el objetivo general de esta tesis fue:

**“Determinar cuáles son los factores que confieren especificidad en la exportación de microcina E492 y colicina V”**

Para lograr este objetivo se estudió el posible papel de MceF en la exportación de microcina E492, se compararon las estructuras de los transportadores de colicina V y microcina E492, se construyeron exportadores quimeras entre ambos transportadores, se definieron las regiones claves en la exportación mediante experimentos de mutagénesis, se estudió la relación entre procesamiento del péptido líder y exportación, y finalmente se estudió la estructura del transportador MceG.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MATERIALES.

#### 2.1.1 Reactivos.

El cloruro de magnesio hexahidratado, dimetilformamida, glicina, Tween 20, tricina, glicerol, EDTA, fenol, acrilamida, bis-acrilamida, estándar de peso molecular  $\lambda$ HindIII, 1 kb DNA ladder, fosfato ácido de sodio,  $\beta$ -mercaptoetanol, citrato de sodio, TEMED, 100 bp DNA ladder se adquirieron en Winkler, Santiago Chile.

Los reactivos azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, TCA, acetonitrilo, peróxido de hidrogeno, glucosa, cloruro de calcio, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, cloruro de calcio, cloruro de potasio se obtuvieron en Merck, Darmstadt, Alemania.

La ribonucleasa A, fluorescamina, SDS, azul brillante de Coomassie, estándar de bajo peso molecular para péptidos, anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina y el persulfato de amonio se compraron en Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

El sulfato de magnesio, luminol y el ácido p-coumárico se adquirieron en Fluka Chemie AG, Messerschmittstr, Suiza.

Las cubetas de electroporación, membranas de nitrocelulosa para western blot y el estándar kaleidoscopio de bajo peso molecular para péptidos se obtuvieron en BioRad Laboratorios, Inc., Hercules, CA, USA.

Los desoxinucleótidos y los sistemas E.Z.N.A. TM PCR Purification System, E.Z.N.A TM Plasmid Miniprep Kit I se obtuvieron de Omega Bio-Tek Inc., Doraville, GA, USA. El agar y los casaminoácidos se adquirieron de DIFCO Laboratorios, Detroit, MI, USA.

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

Las enzimas de restricción se adquirieron en Fermentas Inc., Hanover, MD, USA.

La DNA polimerasa *Taq* DNA polimerasa se adquirió de Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA. La Pfu DNA polimerasa y el sistema de mutagénesis sitio dirigida QuickChange® XL Site-Directed Mutagénesis Kit se obtuvieron de Stratagene, La Jolla, CA, USA.

La DNA ligasa se obtuvo de New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA.

El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa se compró de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA. La película autoradiográfica X-OMAT BT Film, se obtuvo en Kodak, Windsor, Colorado, USA.

La DNAsa I se adquirió en Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania.

La transcriptasa reversa M-MLV se compró en Promega Corporation, Madison, WI, USA. Las membranas de nitrocelulosa VSWP02500 para microdiálisis de ácidos nucleicos se obtuvieron de Millipore, USA.

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

La triptona y el extracto de levadura se obtuvieron de MOBIO Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA.

El BCIP y NBT se adquirieron de Aplichem Damstadt, Alemania.

Los cartuchos Sep-Pak C18 se adquirieron de Waters, USA.

El cloranfenicol se adquirió de Flamingo Pharmaceuticals y tetraciclina en el Laboratorio Benguerel, Ltda, Chile. Gentamicina en Hebeie R.P.Ch. La kanamicina se obtuvo de Gibco BRL, Grand Island, NY, USA.

### **2.1.2 Cepas bacterianas.**

Las cepas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis se resumen en la Tabla I.

### **2.1.3 Plasmidios y vectores.**

En la Tabla II se detallan los plasmidios y vectores utilizados en esta Tesis.

**Tabla I.** Cepas utilizadas en esta Tesis.

| <b>Cepa</b>                 | <b>Genotipo</b>   | <b>Fuente</b> |
|-----------------------------|---|---------------|
| <i>E. coli</i> VCS257       | DP50, <i>sup</i> F[ <i>sup</i> E44, <i>sup</i> F58, <i>hsd</i> 53(rB mB), <i>dap</i> D8, <i>lac</i> Y1, <i>gln</i> V44, $\Delta$ ( <i>gal-uvr</i> B)47, <i>tyr</i> T58, <i>gyr</i> A29, <i>Ton</i> A53 $\Delta$ ( <i>thy</i> A57)]  | Stratagene    |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)    | F- <i>omp</i> T, rB mB  | Novagen       |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue     | <i>rec</i> A, <i>end</i> A1, <i>gyr</i> A96, <i>thi</i> 1, <i>hsd</i> R-17, <i>sup</i> E44, <i>rel</i> A1, <i>lac</i> [F' <i>pro</i> AB, <i>lac</i> IQZ $\Delta$ M15, Tn10]   | Stratagene    |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ | F'/ <i>end</i> A1 <i>hsd</i> R17( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ) <i>gln</i> V44 <i>thi</i> -1 <i>rec</i> A1 <i>gyr</i> A(Nal <sup>r</sup> ) <i>rel</i> A1 $\Delta$ ( <i>lac</i> IZYA- <i>arg</i> F) U169 <i>deo</i> R ( $\phi$ 80 <i>dlac</i> $\Delta$ ( <i>lac</i> Z)M15) | Stratagene    |
| <i>E. coli</i> LMG 194      | F- $\Delta$ <i>lac</i> X74 <i>gal</i> E <i>thi</i> <i>rps</i> L $\Delta$ <i>pho</i> A ( <i>Pvu</i> II) $\Delta$ <i>ara</i> 714 <i>leu</i> ::Tn10  | Stratagene    |
| <i>S. typhimurium</i> LT2   |   | S. Maloy      |

**Tabla II.** Plasmidios y vectores utilizados en esta Tesis.

| Plasmidio | Característica  | Resistencia | Origen               |
|-----------|---|-------------|----------------------|
| np108     | pJAM434 <i>mceG</i> ::Tn5.  | Amp, Kan    | Lagos y cols., 2001. |
| npB12     | Derivado de pJEM15 que contiene una inserción Tn5 en el gen <i>mceG</i> .                           | Amp, Kan    | Este trabajo         |
| pΔFK      | Derivado de pJRS1 que tiene reparado el C-terminal de <i>mceG</i> .                                 | Amp, Kan    | Este trabajo         |
| p157      | Derivado de pT7-7 que lleva el gen <i>mceB</i> en un fragmento <i>NdeI-EcoRI</i> de 0,3 kb.         | Amp         | Lagos y cols., 1999  |
| pA17      | Derivado de pBAD33 que contiene los genes <i>mceHG</i> .  | Cm          | Este trabajo         |
| pA210     | Derivado de pBAD33 que contiene los genes <i>cvaAB</i> .  | Cm          | Este trabajo         |
| pABγ      | Derivado de pBAD33 que contiene el transportador de microcina con el dominio ABC de CvaB.           | Cm          | Este trabajo         |
| pACYC184  | Plasmidio con origen de replicación p15A de propósito general.                                      | Cm, Tet     | Chang y Cohen, 1978  |
| pBAD33    | Plasmidio con origen de replicación p15A que permite modular la expresión transcripcional de genes. | Cm          | Guzman y cols., 1995 |

|                |   |          |                       |
|----------------|---|----------|-----------------------|
| pBluescript SK | Plasmidio ColE1, de propósito general.  | Amp      | Stratagene            |
| pBSC47         | Derivado de pBluescript SK. Lleva un fragmento Cla I de 3Kb de pJAM434. Contiene los genes <i>mceABC</i> .                    | Amp      | Lagos y cols., 1999   |
| pHC79          | Cosmidio ColE1, de propósito general.   | Amp, Tet | Hohn y Collins, 1980  |
| pHK11-4        | Derivado de pBR322 con los genes <i>cvaABC</i> con <i>cvaB::Tn5</i> .   | Amp      | Gilson y cols., 1987. |
| pJAM229        | Plasmidio derivado de pJAM434. Posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido respecto a pJAM434. Produce microcina activa. | Amp      | Wilkins y cols., 1997 |
| pJAM434        | Derivado de pHC79 que contiene los genes necesarios para la producción de microcina activa.                                   | Amp      | Wilkins y cols., 1997 |
| pJEM15         | Derivado de pJAM229. Posee doble copia del gen <i>mceF</i> .  | Amp      | Wilkins y cols., 1997 |
| pJRS1          | Derivado de pJAM229. Contiene una deleción en el gen <i>mceF</i> y una mutación en <i>mceG</i> .                              | Amp      | Wilkins y cols., 1997 |
| pMceF          | Derivado de pBAD33 Lleva clonado en el sitio <i>SmaI</i> el gen <i>mceF</i> con su promotor.                                  | Cm       | Este trabajo          |
| pMceFK         | Derivado de pBAD33 que contiene clonado los el gen <i>mceF</i> y el ORF <i>MceK</i> .   | Cm       | Este trabajo          |
| pMceG          | Derivado de pBAD33 que contiene el gen <i>mceG</i> .  | Cm       | Este trabajo          |

|                        |   |    |              |
|------------------------|---|----|--------------|
| pMceG <sup>-4</sup>    | Derivado de pBAD33 que expresa una versión de MceG carente los últimos cuatro amonocidos.       | Cm | Este trabajo |
| pMceG <sup>conse</sup> | Derivado de pMceG que tiene alterado el C-terminal por una secuencia consenso (IIVL).           | Cm | Este trabajo |
| pMceK                  | Derivado de pBAD33 que contiene clonado el ORF MceK.  | Cm | Este trabajo |
| pMceG <sup>D121N</sup> | Derivado de pmceG que contiene una mutación puntual D121N.                                      | Cm | Este trabajo |
| pORFL                  | Derivado de pACYC184 que contiene clonado el ORFL bajo promotor T7.                             | Cm | Este trabajo |
| pRxA2                  | Derivado de pBAD33, que contiene los genes <i>mceHcvaB</i> .                                    | Cm | Este trabajo |
| pRxB9                  | Derivado de pBAD33, que contiene los genes <i>cvaAmceG</i> .                                    | Cm | Este trabajo |
| pT715A                 | Derivado de pACYC184 que contiene el MCS y el gen <i>lacI</i> del pET28.                        | Cm | Este trabajo |
| pT715AF                | Derivado de p15A que contiene el gen <i>mceF</i> clonado bajo promotor T7.                      | Cm | Este trabajo |
| pαBC                   | Derivado de pBAD33 que contiene el transportador de microcina con el dominio peptidasa de CvaB. | Cm | Este trabajo |

### 2.1.4 Partidores.

En la Tabla III se detallan los partidores utilizados en los experimentos de PCR de esta Tesis. Los cuales se mandaron a sintetizar a BiosChile S.A.

## 2.2 MÉTODOS.

### 2.2.1 Medios de cultivo.

**Caldo Luria.** Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, NaOH 3,5 mM final. Se usó para el crecimiento de todos los clones de *E. coli*.

**Medio SOB.** Bactotripton 20 g/l, extracto de levadura 5,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 2,5 mM. Se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 5N (~0,2 ml/l).

**Medio SOC.** Se añadió al medio SOB estéril 20 ml de una solución estéril de glucosa 1 M. Esta solución se preparó disolviendo 18 g de glucosa para un volumen total de 100 ml de solución y fue esterilizado por filtro de 0,22 µm.

**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. Se suplementó con CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v tiamina 1 µg/ml, casaminoácidos 1 mg/ml, como fuente de carbono glucosa 0,2% p/v.

**Medio Mínimo RM.** Medio mínimo sin glucosa y suplementado con casaminoácidos al 2%.

**Placas de agar LB.** Se prepararon las placas con el medio caldo Luria y con 1,5% ó 1,0% de agar.

**Placas de medio mínimo M9.** Se prepararon las placas con el medio mínimo M9 y con 1,5% ó 1,0% de agar.

**Placas de medio mínimo RM.** Se prepararon las placas con el medio mínimo RM y con 1,5% ó 1,0% de agar.

**Tabla III.** Secuencias de los partidores empleados en esta Tesis.

| <b>Partidor</b>         | <b>Secuencia</b>   |
|-------------------------|--|
| 0BCOOH                  | 5'-TAT TCC TCA TAA GCT TGT AAT TCC TCT ATG-3'                                      |
| conceR                  | 5'-TCC AAA CAA AAA GCT TTT ACA GGA CAA TAA TTC GGT<br>CGA CAG TCC TCA GCG T-3      |
| C-Tnal <sup>Conse</sup> | 5'-ACG CTG AGG ACT GTC GAC GAA TTA TTG TCC TGT AAA<br>AAT AGG GGT TCC GCG CAC A-3' |
| C-Tnal <sup>stop</sup>  | 5'-TAA AAA TAG GGG TTC CGC GCA-3   |
| F1                      | 5'-CTT CTT GCC CAT ATG TTA TTC ATC CTC GAA-3'                                      |
| F2                      | 5'-TCC AGA GCG AAG CTT ATT ATG GAC TAT TGA-3'                                      |
| G0COOH/AS               | 5'-CTT CAC TAA AAG CTT CTT ACA AGA TAA TAT C-3'                                    |
| GBCOOH/S                | 5'-CTG CAC AAT GAG CGC ATG GCA GAT AT-3'   |
| GBNH2/AS                | 5'-CTT TTA ATA CCG TAA ATG CTG TTA AT-3'   |
| GBNH2/S                 | 5'-GCG TAT TTA CCA GTG GAT GCT-3'  |
| GBNH2Xbal               | 5'-AAA AAA GGC GTC TAG ACC AGT GGA TGC T-3'  |
| GBTM/AS                 | 5'-TTC AGG TTT TTC TCT TCC TTT TCA TG-3'   |
| GBTM/S                  | 5'-CTT CGT TCA CTG ATT AAC AGT ATT TAC GG-3'                                       |
| HA/AS                   | 5'-CCT GTT GCA CTG TGT TTC ATG T-3'  |
| HA/S                    | 5'-TGT TTC GTC TAG ATG CTT TAG AAA ACA GA-3'                                       |
| Kan                     | 5'-CAT GAT TGA ACA AGA TGG ATT-3   |
| MceG <sup>ELGEG</sup>   | 5'-TGA GCT GGG TGA AGG GCT TT-3'   |

|            |   |
|------------|---|
| MceGKan    | 5'-ACG CTG AGG ACT GTC GAC CGA ACT ATT TCG ATT TAA<br>ACT TAA ATA GGG GTT CCG CGC ACA-3 |
| MceK(S1'') | 5'-TGG ACT GAT ATT TAT CTT GTA AGG-3'   |
| MceK(S2)   | 5'-ATA GTC CAT AAT ATG CTT CGC T-3'   |
| MceKRT     | 5'-ATG AGA AAA TTA TCT GAA AAC-3'   |
| ORFL1      | 5'-GTT AAC CTG CTC CAT ATG AGC AAA CTG TG-3'  |
| ORFL2      | 5'-CCA AAA ATG TTT AAC TTC CGC G-3'   |
| pACYCF     | 5'-ACA ATG CGC TCA TCG TCA T-3'   |
| pACYCR     | 5'-GGG TGC GCA TAG AAA TTG C-3'   |
| pBAD33F    | 5'-CGG CAG AAA AGT CCA CAT TGA-3'   |
| pBAD33R    | 5'-AAA ATC TTC TCT CAT CCG CCA-3  |
| PETF       | 5'-AGC GCT GCC CGA CCG GGT CCT ACG AGT-3  |
| PETR       | 5'-CCG GAT ATA GTC GCG ACT TCA GCA AAA A- 3'  |
| StopR      | 5'-AAG TTT AAA TAA GCT TTT ATC GGT CGA CAG TCC TCA<br>GCG T-3'                          |
| Tn1        | 5'-AGG TCA CAT GG AAG TCA GAT CCT GGA AAA-3'  |

**Césped de bacterias sensibles a microcina E492 o colicina V.** Sobre placas de agar LB, agar medio mínimo M9 o agar medio mínimo RM se esparcieron 3 a 5 ml del respectivo agar blando (0,7%) en el que se incluyó 300 µL de un cultivo de bacterias sensibles, previamente crecido toda la noche.

**Cultivo Bacteriano.** Las células bacterianas que portan plásmidos recombinantes se crecieron en placas o en medio líquido suplementado con antibióticos, cuya concentración final es la siguiente: ampicilina 100 µg/ml, cloranfenicol 50 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml, y kanamicina 50 µg/ml. Estos antibióticos fueron preparados como describe Sambrock y cols. (1989).

### **2.2.2 Purificación de la microcina E492 extracelular.**

Medio litro de medio de cultivo M9 se inoculó con 3-5 µl de un cultivo crecido toda la noche. Este cultivo se incubó a 37°C con una agitación de 180 rpm, durante 16 horas. Posteriormente las bacterias se colectaron mediante centrifugación a 10.000 rpm por 30 minutos en un rotor GSA. El sobrenadante, sometido a una presión negativa, se pasó a través de una columna de extracción en fase sólida Sep Pak C-18, activada previamente con 3 ml de metanol al 95% y 3 ml de agua destilada. En la matriz de la columna quedó retenida la microcina y algunos contaminantes. La columna se lavó con 3 ml de metanol al 60% para retirar los contaminantes que tienen una pigmentación de color amarillo, y posteriormente la microcina se eluyó con 3 ml de metanol al 95%.

### **2.2.3 Extractos celulares totales.**

Para obtener extractos celulares totales se centrifugaron 3 ml de cultivo bacteriano el cual fue lavado tres veces con amortiguador TEN (Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 1mM, NaCl 100 mM). Las células se resuspendieron en 1 ml de TEN y se calentaron a 95 °C durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante fue precipitado con TCA 10% final. Las proteínas fueron colectadas por centrifugación, el precipitado se resuspendió en 50 µl de amortiguador TEN y 50 µl de amortiguador de carga 4X (Glicerol 40%, Tris-HCl 50 mM [pH 7,6], SDS 10%, β-mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0,01% p/v). Posteriormente se calentó a 70 °C durante 10 minutos y nuevamente se centrifugó para eliminar los restos insolubles. La solución fue ajustada a pH con NaOH cuando fue necesario.

#### **2.2.4 Extracto de microcina extracelular.**

Los extractos de microcina extracelular fueron obtenidos de manera similar a la obtención de extractos celulares totales. Básicamente, se centrifugaron 3 ml de cultivo y el sobrenadante se precipitó con TCA al 10% final. Las proteínas fueron colectadas por centrifugación, el precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ l de amortiguador TEN y 50  $\mu$ l de amortiguador de carga 4X. Posteriormente se calentó a 70 °C durante 10 minutos y nuevamente se centrifugó para eliminar los restos insolubles. La solución, cuando fue necesario, fue ajustada a pH con NaOH.

#### **2.2.5 Detección y cuantificación de la actividad de la microcina E492.**

La actividad bactericida de la microcina purificada se detectó depositando alícuotas de diluciones seriadas de la muestra sobre una placa conteniendo un césped de la cepa indicadora *E. coli* BL21(DE3). Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. La actividad de la microcina se visualizó por la presencia de halos de inhibición de crecimiento de la cepa sensible y en algunos casos se midió el diámetro de los halos formados. La cuantificación de la actividad microcina de estas preparaciones se realizó determinando la máxima dilución de la muestra donde es posible observar un halo de inhibición de crecimiento bacteriano en el césped de la cepa sensible (Dilución Mínima Inhibitoria, **Mayr-Harting y cols., 1972**). Para diluir las muestras se utilizó metanol al 95%.

#### **2.2.6 Ensayo de sensibilidad a la microcina en placa.**

Alícuotas de 150  $\mu$ l de cultivo de la cepa a analizar se mezclaron con 4 ml de agar blando (0,75% p/v) y se esparcieron sobre placas de agar LB. Se sembraron alícuotas de 5  $\mu$ l de diluciones seriadas de microcina E492 purificada sobre este césped. Las células sensibles a la acción de la microcina presentaron halos de inhibición de crecimiento en torno a la microcina sembrada. Las células inmunes a la acción de la microcina no presentaron formación de halos de inhibición de crecimiento.

#### **2.2.7 Purificación de microcina E492 mediante HPLC.**

La purificación de la microcina mediante HPLC se realizó a partir de la microcina prepurificada mediante cartuchos Sep-Pak C-18. Se tomó 1 ml de microcina prepurificada

mediante cartuchos Sep-Pak C-18 y se concentró a sequedad mediante Speed-Vac. El concentrado obtenido se resuspendió en 50  $\mu$ l de una solución de acetonitrilo 40%, TFA 0,1%. La microcina concentrada se cargó en un HPLC Beckman System Gold y se cromatografió isocráticamente en una columna Beckman ODS (5  $\mu$  X 4,6 mm X 25 cm) usando acetonitrilo al 40% TFA 0,1% con un flujo de 1 ml/minuto. La microcina fue detectada a 215 nm usando Beckman System Gold 166 Detector. Para identificar que pico del cromatograma correspondía a la microcina, se colectaron fracciones de 0,5 ml. La presencia de la microcina en las fracciones fue detectada realizando ensayos de actividad antibacteriana en césped sensible.

### **2.2.8 Electroforesis de la microcina E492 en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

Los geles se prepararon según el método descrito por **Schägger y von Jagow (1987)** que permite separar proteínas de un rango de masa molecular de 1-100 kDa. El gel separador se preparó con: 16,5% de acrilamida (3% de entrecruzamiento); Tris-HCl 1,0 M pH 8,5; SDS 0,1% y glicerol al 10%. El gel espaciador se preparó con: 10% de acrilamida (3% de entrecruzamiento); Tris-HCl 1,0 M pH 8,5; SDS 0,1%. El gel concentrador se preparó con: 3% de acrilamida (3% de entrecruzamiento); Tris-HCl 1,0 M pH 8,5; SDS 0,1%. A cada una de estas soluciones se agregó 0,033% de persulfato de amonio y 2,2 mM de TEMED. Los geles se sometieron a un campo eléctrico de 20 - 200 V, empleando un amortiguador catódico (Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1%) y un amortiguador anódico (Tris-HCl 0,2 M pH 8,9). La diferencia de potencial se aplicó con una fuente de poder EC-420 de EC Apparatus Corporation o Power Pac 300 de BioRad.

### **2.2.9 Marcación y preparación de la microcina E492 con fluorescamina para su detección en electroforesis en geles de poliacrilamida.**

Se empleó el método de marcación de péptidos con fluorescamina descrito por **Rangland y cols. (1974)**. Para ello se concentró por evaporación al vacío 300  $\mu$ l del eluido de la columna Sep Pak C-18 o 1 ml de microcina de extractos celulares hasta un volumen de 10  $\mu$ L. Al concentrado se agregó 4  $\mu$ l de solución borato (0,4 M pH 9,0), 8  $\mu$ l de fluorescamina (2 mg/ml en DMSO) y 7  $\mu$ l de amortiguador de carga 4X (glicerol 40%;

Tris-HCl 50 mM pH 7,6; SDS 10%;  $\beta$ - mercaptoetanol 20%; azul de bromofenol 0,04% (p/v). La mezcla se calentó a baño maría por 3 minutos y las proteínas se separaron mediante SDS PAGE. Como marcador de peso molecular se utilizó MW-SDS, que contiene mioglobina de 16.950 Da y fragmentos de mioglobina de 14.440, 8.160, 6.210, 3.460 y 2.210 Da. Estas proteínas se marcaron con fluorescamina de la misma manera que las muestras. Las bandas de proteínas se visualizaron en un transiluminador UV.

## **2.3 Hibridación Western.**

### **2.3.1 Electrotransferencia.**

Después de realizar un SDS-PAGE, se retiró el gel de los vidrios y se montó la transferencia colocando el gel sobre una esponja y 3 papeles filtro. Luego se colocó sobre el gel una membrana de nitrocelulosa, tres papeles filtro y otra esponja. Antes de montar la transferencia las hojas de papel filtro y las esponjas se humedecieron en amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%). La membrana de nitrocelulosa se humedeció en agua y posteriormente en amortiguador de transferencia. El sistema se montó en la cámara respectiva y la transferencia se realizó durante 2 h a 100 V a  $-20^{\circ}\text{C}$  empleando el amortiguador de transferencia enfriado previamente.

### **2.3.2 Desarrollo inmunológico.**

La membrana se bloqueó 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 se traspasó a una solución de leche 1% en TS-Tween que contiene el anticuerpo primario. La membrana se incubó con el anticuerpo primario antimicrocina durante 2 h con agitación a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con amortiguador TS y la membrana se incubó por 2 h en leche al 1% en TS-Tween con el anticuerpo secundario el cual está conjugado a la enzima fosfatasa alcalina o peroxidasa. Se empleó una dilución 1:1.000 del anticuerpo policlonal antimicrocina y una dilución 1:30.000 para el segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina y 1:20.000 para el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. El revelado se realizó colocando la membrana en 10 ml de amortiguador para fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM;  $\text{MgCl}_2$  5 mM), y se adicionó 33  $\mu\text{l}$  de BCIP (0,5 g del reactivo disuelto en 10 ml de dimetilformamida 100%) y 66  $\mu\text{l}$  de NBT (0,5 g del reactivo disuelto en 10 ml de dimetilformamida 70%). La membrana se incubó hasta la aparición del color en la banda y

la reacción se detuvo lavando la membrana con abundante agua destilada. Cuando se utilizó el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa, la membrana se reveló en 10 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8,5, a la cual se agregó 50  $\mu$ l de luminol 250 mM (preparados en DMSO) y 22  $\mu$ l de ácido p-cumárico 90 mM (preparados en DMSO). La reacción de quimioluminiscencia se inició agregando 3  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno. La membrana se expuso entre 5 segundos y 2 minutos, dependiendo de la señal obtenida.

## **2.4 Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.**

### **2.4.1 DNA plasmidial bacteriano (miniprep).**

El DNA plasmidial se extrajo según el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y cols. (1989). Se centrifugaron 5 ml de un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche en medio LB o medio mínimo. El precipitado bacteriano se resuspendió en 200  $\mu$ l de amortiguador de lisis (glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM). Se incubó 5 min a temperatura ambiente y se agregó 400  $\mu$ l de una solución fresca de SDS/NaOH (SDS 1% y NaOH 0,2 M), se mezcló invirtiendo los tubos 10 veces. A continuación se agregó 300  $\mu$ l de acetato de potasio 7,5 M pH 5,2 y se mezcló suavemente por inversión. Esta solución se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, y se centrifugó a 14.500 x g. El sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo previamente rotulado, y se agregó 250  $\mu$ l de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1) para eliminar proteínas contaminantes. La muestra se agitó en el vortex por 10 s y se centrifugó durante 5 min a 14.500 x g. Luego se extrajo la fase acuosa (superior) y se sometió a una extracción con 250  $\mu$ l de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1) para remover los restos de proteínas y fenol. A la fase superior que contiene el DNA se adicionó 0,6 volúmenes de isopropanol y se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 15 min para precipitar el DNA. El DNA precipitado por centrifugación se lavó con etanol al 70% y posteriormente se secó en una estufa ( $37^{\circ}\text{C}$ ) o en un Speed Vac. El precipitado de DNA se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua (destilada y deionizada) y se agregó 5  $\mu$ l de ribonucleasa A (10 mg/ml).

### **2.4.2 RNA bacteriano.**

El RNA bacteriano se aisló a partir de cultivos crecidos hasta  $\text{DO}_{600}=0,4$  ó  $\text{DO}_{600}=0,7$ . El cultivo se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y las bacterias se suspendieron en solución Z6 (clorhidrato de guanidina 8 M; Tris-HCl 50 mM pH 7,0; EDTA 20 mM) complementada con  $\beta$ -mercaptoetanol frío (al 10%). A la mezcla se agregó

fenol:cloroformo saturado en agua y después de agitar fuertemente en un vortex se dejó en hielo durante 20 min. Las proteínas y el DNA se separaron centrifugando la solución a 13.000 rpm durante 30 min en una microcentrífuga. La fase acuosa se trasladó a un tubo nuevo y se agregó 1/20 del volumen de ácido acético 1 M (en agua DEPC) y 0,7 volúmenes de etanol al 95% frío. Posteriormente se dejó a -20 °C durante 15 a 20 min. El RNA obtenido se sedimentó por centrifugación a 13.000 rpm a 4 °C y se lavó con etanol frío al 70% (con agua DEPC). Luego de secarlo al aire se disolvió en agua tratada con DEPC y se calentó a 65 °C durante 10 min. Inmediatamente después se enfrió en hielo.

### **2.4.3 Electroforesis de ácidos nucleicos.**

Los ácidos desoxirribonucleicos, como el DNA genómico, el DNA plasmidial, fragmentos de restricción, productos de PCR y productos de RT-PCR, se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Esta electroforesis se llevó a cabo en una cámara horizontal, usando el amortiguador TAE (Tris-HCl 40 mM pH 8,1; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 2 mM). La concentración de agarosa fluctuó entre 1,0 y 2,0% dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. Para la preparación de la muestra se empleó el amortiguador de carga (glicerol 50%, EDTA 50 mM, xilén cianol 1 mg/ml, azul de bromofenol 1,5 mg/ml) antes de su incorporación a los pocillos del gel. La electroforesis se realizó con una diferencia de potencial de 80-100 V. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (10 µg/ml) y se puso sobre un transiluminador UV para observar las bandas de DNA.

### **2.4.4 Ligación de fragmentos de DNA.**

Antes de ligar los fragmentos de DNA se determinó la concentración de DNA del vector y del inserto mediante espectrofotometría determinando la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm o mediante geles de agarosa comparando con estándares de concentración conocida. La relación de concentración entre el DNA del inserto y del vector fue de 3:1. La reacción de ligación se realizó mezclando el inserto, el vector, el amortiguador de la enzima y la T4 DNA ligasa, para luego incubarla durante toda la noche a 14 °C. En todos experimentos de ligación se realizó una reacción de control que no llevó inserto. Las sales presentes en el producto de la ligación se removieron por medio de una precipitación con etanol o empleando membranas Millipore VSWP02500 de 0,025 µm de poro, para su posterior electrotransformación.

### **2.4.5 Preparación de células electrocompetentes.**

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un cultivo de crecimiento exponencial, y para ello se inoculó 100 ml de medio LB con 1 ml de un cultivo crecido hasta fase estacionaria. Las células se colectaron a una OD550 de 0,75 ( $3-6 \times 10^8$  cel/ml) en tubos de centrifuga fríos y se centrifugó durante 10 min a 4.000 rpm. El precipitado bacteriano obtenido se resuspendió en 40 ml de glicerol frío 10% y se centrifugó durante 10 min a 4.000 rpm. Este procedimiento se repitió dos veces más. Después de los lavados, las células se resuspendieron en el glicerol 10% remanente que quedó en el tubo después de la última centrifugación. Se midió el volumen de la suspensión celular y se determinó la OD550 diluyendo una pequeña porción de ella en glicerol al 10%. El volumen final de las células competentes se ajustó con glicerol al 10% para llegar a una OD550 de 200-250. Las células se alicuotaron y se usaron directamente para la electroporación o se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.4.6 Transformación por electroporación.**

Se utilizó un equipo BioRad Gene Pulser acoplado a un controlador de pulso, para realizar la transformación de las células competentes. El aparato se configuró colocando el voltaje a 2.500 V, la resistencia de  $200 \mu\Omega$  y una capacitancia de  $25 \mu\text{F}$ . Las células, las cubetas y el portacubetas se colocaron en hielo antes de proceder a la transformación. Se mezclaron  $25 \mu\text{l}$  de células electrocompetentes con  $1-2 \mu\text{l}$  de DNA plasmidial en un tubo y se electroporó la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2 cm de separación entre los electrodos. Inmediatamente después se resuspendieron las células en 1 ml de medio SOC estéril y se las incubó a temperatura apropiada durante 1 h. Las células transformadas se sembraron en placas LB con los antibióticos apropiados y se incubaron durante 12 h a la temperatura apropiada.

## **2.5 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.**

### **2.5.1 PCR de DNA plasmidial.**

La reacción de amplificación se realizó mezclando DNA plasmidial (0,1-10 ng) con  $2,5$  ó  $5,0 \mu\text{l}$  de amortiguador de PCR (Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM),  $0,5-1,0 \mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM,  $1,0 \mu\text{l}$  de dNTPs 10 mM,  $1,0-2,0 \mu\text{l}$  de cada partidor a una concentración de  $25 \text{ pmol}/\mu\text{l}$  y 2,5 U de *Taq* DNA polimerasa para un volumen final de 25

ó 50 µl. Las condiciones estándares de la reacción fueron: para la desnaturación 30 a 33 ciclos de 45 s a 94 °C, para el apareamiento 30 s a 55 °C y para la elongación 90 s a 72 °C, seguidos por una elongación final a 72 °C durante 10 min. Los partidores empleados para la amplificación de los distintos segmentos están detallados en la Tabla III. Los productos de amplificación se purificaron utilizando el sistema E.Z.N.A Cycle Pure Kit, para realizar posteriormente las reacciones de ligación y clonamiento.

### **2.5.2 PCR de colonia.**

La amplificación de fragmentos de DNA utilizando directamente colonias bacterianas como fuente de DNA templado se realizó introduciendo una pequeña modificación al procedimiento descrito para hacer PCR a partir de DNA plasmidial. Se mezclaron los componentes de la reacción de PCR como se ha descrito anteriormente, excepto que no se agregó la polimerasa ni el DNA plasmidial. A continuación se resuspendió una colonia bacteriana fresca en la solución y se colocó en el termociclador a 99°C durante 10 min. Después de enfriada la mezcla, se agregó la enzima *Taq* DNA polimerasa y se prosiguió según el protocolo de amplificación de DNA plasmidial.

### **2.5.3 Transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR).**

El RNA total aislado en fase exponencial de crecimiento de la cepa *S. typhimurium* pJEM15 se trató con DNAsa I (libre de RNAsa) para retirar completamente todo el DNA que pudo haber sido co-purificado en el procedimiento de purificación de RNA total. Varias alícuotas de RNA se trataron con 10 U de DNAsa I en una solución de MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM durante 30 min a 25 °C. La reacción se detuvo por calentamiento a 65 °C durante 15 min. La mezcla resultante se incubó con él o los partidores antisentido durante 5 min a 75°C y luego se realizó la transcripción reversa empleando 200 U de transcriptasa reversa M-MLV de Promega y dNTPs (400 µM) durante 1 h a 42 °C. La reacción se calentó 10 min a 65 °C para desnaturar la enzima. La etapa de PCR se realizó empleando como templado una alícuota de 5 µl de la reacción de transcripción reversa, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTPs (200 µM), amortiguador de PCR 1X, 25 pmoles de cada partidor, 2,5 U de *Taq* DNA polimerasa utilizando el siguiente programa térmico: un ciclo inicial de 94 °C durante 6 min, 55 °C durante 2 min y 72 °C durante 30 min, seguido de 25 ciclos rápidos de 94 °C durante 45 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 90 s y una extensión final de 10 min a 72 °C.

### 2.5.4 Purificación de productos PCR.

Los productos PCR fueron purificados para ligación o para la generación de híbridos mediante el sistema E.Z.N.A. Cycle Pure Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR fueron resuspendidos en un volumen final de 50 µl de agua destilada y desionizada estéril.

### 2.5.5 Generación de construcciones virtuales.

Para analizar en detalle las construcciones que contienen el sistema productor de microcina y sus derivados se construyeron sus respectivos equivalentes virtuales (construcciones virtuales). Para esto se utilizó el programa Vector NTI, las secuencias del sistema productor de microcina E492 (**AF063590**), del vector pHC79, y la historia de las construcciones. En las construcciones virtuales se ubicaron los genes del sistema productor de microcina E492 y se analizó si algún ORF se encontraba modificado.

### 2.6.1 Generación del vector pET15A y pET15AF.

El vector pET15A se generó clonando en el sitio EcoRV del vector pACYC184 un producto PCR obtenido utilizando DNA plasmidial del vector pET28 y la pareja de partidores PETF y PETR. Este producto de PCR, obtenido utilizando Pfu, contiene el promotor T7, el sitio de múltiple clonamiento y el gen *lac<sup>f</sup>* del plasmidio pET27b. El sitio EcoRV del vector pACYC184 se encuentra en el gen que confiere resistencia a tetraciclina por lo tanto la presencia del inserto inactiva al gen y produce pérdida de la resistencia a tetraciclina. Los clones recombinantes fueron seleccionados en placas de LB con cloranfenicol y luego analizados por replica de placas en medio LB con tetraciclina, de modo de detectar aquellos que pierden la resistencia a tetraciclina. La presencia del inserto en los clones seleccionados (Cm<sup>R</sup> Tet<sup>S</sup>) se analizó mediante PCR utilizando los partidores PETF y PETR. El vector pET15AF, que contiene el gen *mceF* en el vector pET15A, se construyó amplificando el gen *mceF* con la enzima Pfu. En esta reacción se utilizó el partidor F1, que incorpora el sitio NdeI, y el partidor F2 que incorpora el sitio XhoI. Este producto de PCR se sometió a digestiones sucesivas primero con la enzima NdeI y luego con XhoI para posteriormente ser ligado al vector pET15A previamente digerido con NdeI y XhoI. La presencia del inserto en los clones seleccionados se verificó mediante PCR utilizando los partidores F1 y F2. Posteriormente la identidad e integridad del gen clonado se confirmó a través de análisis de restricción y secuenciación.

### 2.6.2 Eliminación mediante el método de Datsenko y Wanner.

El sistema desarrollado por Datsenko y Wanner permite la eliminación específica de un gen, para esto es necesario expresar el sistema de recombinación del fago lambda y simultáneamente transformar con un producto de PCR que codifica para una resistencia a antibióticos, y en sus extremos 3' y 5' debe ser idéntico a la región que flanquea el gen a eliminar. Se diseñaron los partidores RSFF y RSFR que en sus respectivos extremos 3' contienen la secuencia de los sitios P1 y P3 del plasmidio pKD13 y en sus extremos 5' una secuencia de 40 nucleótidos que flanquean al gen *mceF*. Estos partidores se utilizaron para amplificar la resistencia a kanamicina del plasmidio pKD13. El producto de PCR así obtenido se purificó desde geles de agarosa. Como blanco para producir la eliminación del gen *mceF* se escogió el plasmidio pJAM434. Bacterias de la cepa de *E. coli* VCS257 conteniendo el plasmidio pJAM434 fueron transformadas con el plasmidio pREDgenta que expresa el sistema de recombinación del fago lambda (genes gamma, beta y exo) y además es compatible con el plasmidio pJAM434. El sistema de recombinación del fago lambda se indujo durante 1 h con arabinosa 50 mM y posteriormente se transformó con el producto de PCR purificado. Las bacterias conteniendo la delección por reemplazo se seleccionaron por resistencia a kanamicina y ampicilina en placas de LB.

### 2.6.3 Eliminación de los genes *mceF* y *mceK*.

Para eliminar el gen *mceF*, el plasmidio pJAM229, se sometió a digestión con la enzima de restricción MunI, posteriormente se religaron los fragmentos en condiciones que favorecen la autoligación del vector, mediante esta estrategia se logró obtener la construcción pMunI. Esta construcción se analizó mediante PCR y análisis de restricción para comprobar la ausencia del gen *mceF*. La eliminación simultánea de los genes *mceF* y *mceK* también se logró mediante una estrategia de cortes con enzimas de restricción. Para esto se clonó en el sitio Sal I del plasmidio pJRS1 un producto de PCR que permitiera reparar el extremo carboxilo de MceG. Para facilitar la selección de los clones con el gen *mceG* reparado se incluyó en el producto PCR un marcador de resistencia a kanamicina. Utilizando el partidor MceGKan y el partidor RSFF se amplificó el casete de resistencia a kanamicina del vector pKD13. El extremo 5' del partidor MceGKan (60 pb) es idéntico a los últimos 40 nucleótidos del gen *mceG* (incluido el sitio Sall). Para poder amplificar la resistencia a kanamicina el extremo 3' de MceGKan es idéntico a la secuencia adyacente al sitio de término de la transcripción de vector pKD13. El producto de

PCR fue digerido con Sal I y ligado al sitio Sal I del plasmidio pJRS1. Los clones recombinantes fueron seleccionados en placas con kanamicina y ampicilina. Para comprobar que la restauración del fenotipo productor se debe a la reparación del extremo carboxilo terminal del transportador DNA plasmidial de la construcción p $\Delta$ FK2 se sometió a digestión con Sal I y luego se montó una reacción de ligación en condiciones que favorecen la re-circularización del plasmidio. Posteriormente con esta mezcla de ligación se transformó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionó por su resistencia a ampicilina. Luego de esto se picaron colonias en replica sobre placas con kanamicina y se ensayó la actividad bactericida sobre un césped sensible a la microcina E492.

#### **2.6.4 Generación de las construcciones pMceF, pMceK y pMceKF.**

Los genes *mceK* y *mceF* se clonaron en el vector pBAD33 tanto juntos como en forma independiente. Para esto, se diseñaron partidores que flanquearon cada gen y luego mediante PCR de alta fidelidad se amplificaron los genes *mceF*, *mceK* y la región *mceFK*. En todos los casos el gen *mceF* fue amplificado junto a su promotor. Todas estas construcciones se obtuvieron clonando en el sitio SmaI del vector pBAD33. Para obtener la construcción pMceF se utilizaron los partidores PEE y F2, para la construcción pMceK se utilizaron los partidores MceK(S2) y MceK(S1'') y para la construcción pMceKF se utilizó la pareja de partidores MceK(S2) y PEE. La orientación de los insertos fue determinada usando los partidores utilizados en el clonamiento y los partidores pBAD33R y pBAD33F que flanquean el sitio de múltiple clonamiento del vector pBAD33.

#### **2.6.5 Pérdida de inmunidad en fase estacionaria (PIFE).**

La PIFE se analizó mediante césped de bacterias provenientes de cultivos en fase estacionaria. Cada césped proviene del cultivo de una colonia. Por cada grupo analizado se tomaron 50 colonias y se cultivaron en LB durante 24 h. Posterior a la inclusión de las bacterias en agar blando se agregó una gota de microcina purificada activa y se incubó a 37 °C hasta observar la formación del césped.

#### **2.6.6 Generación de la construcción pORFL.**

Esta construcción se generó en dos etapas, la primera consistió en su amplificación con los partidores ORFL1 y ORFL2, luego este producto PCR fue digerido con la enzima NdeI y posteriormente ligado al sitio NdeI del plasmidio pT7. Esta mezcla de ligación se utilizó como templado para amplificar con los partidores T7 y ORFL2. El

producto PCR purificado se ligó al sitio EcoRV del vector pACYC184. De esta transformación se seleccionaron las colonias resistentes a cloranfenicol y sensibles a tetraciclina.

### **2.6.7 Clonamiento de los sistemas de transporte de colicina V y microcina E492.**

Los sistemas de transporte de microcina E492 (genes *mceHG*) y colicina V (*cvaAB*) se amplificaron usando PCR de alta fidelidad y los partidores HA/S, G0COOH/AS o 0BCOOH/AS. Estos productos de PCR se purificaron con el sistema E.Z.N.A Cycle Pure Kit, digirieron con las enzimas de restricción XbaI y HindIII y luego se clonaron en el vector pBAD33 entre los sitios XbaI y HindIII. La construcción que contiene los genes *mceHG* se denominó pA17 y la construcción que porta los genes *cvaB* se llamó pA210. Estas construcciones se utilizaron para complementar mutantes en el transportador de microcina E492 (np108) y mutantes en el transportador de colicina V (pHK11-4). La complementación fue evaluada mediante la formación de halos de inhibición de crecimiento sobre césped sensibles a microcina E492 y colicina V.

### **2.6.8 Generación de sistemas de transporte híbridos.**

Para la generación de sistemas de transporte híbridos los genes *mceH* y *cvaA* se amplificaron con los partidores HA/S y HA/AS a partir de DNA plasmidial de pJAM229 y pColV-K30. El gen *mceG* se amplificó usando los partidores de GBNH2/S y B0COOH/AS, en cambio el gen *cvaB* se amplificó utilizando los partidores GBNH2/S y 0BCOOH/AS. Posteriormente estos productos PCR fueron purificados mediante el sistema E.Z.N.A Cycle Pure Kit y resuspendidos en un volumen final de 50 µl. Para todas estas reacciones de amplificación se utilizó la enzima Pfu. Para generar los sistemas de transporte híbrido se empalmaron los productos de PCR *cvaA* con *mceG* y *mceH* con *cvaB*. Para empalmar y rellenar los productos PCR purificados se agregó 1 µl de cada uno a 50 µl de medio de reacción de la enzima Pfu. Los productos de PCR presentes en esta mezcla de reacción se desnaturaron a 95 °C durante 1 min, luego se hibridaron a 55 °C durante 30 s y posteriormente se rellenaron los extremos a 72 °C durante 1 min. Para asegurar que el relleno sea completo este procedimiento se repitió 10 veces. Para la generación del producto final se agregaron los partidores (12,5 µM cada uno) que permiten la amplificación del segmento completo. El producto PCR final fue purificado, digerido con las enzimas XbaI y HindIII y posteriormente ligado al vector pBAD33 previamente digerido

con las mismas enzimas (**Figura 5**). La identidad de los clones obtenidos fue comprobada mediante secuenciación.

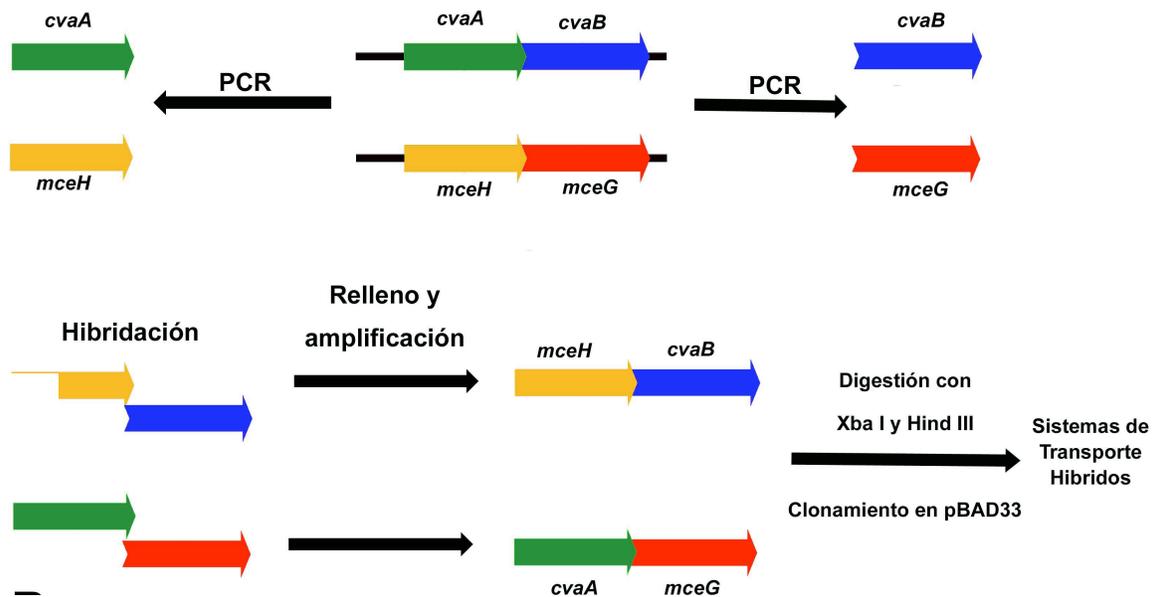
### 2.6.9 Generación de transportadores quiméricos.

Los transportadores quiméricos fueron generados mediante la misma estrategia que se utilizó para generar los sistemas de transporte híbrido. Esta vez se utilizaron los productos de PCR obtenidos usando la pareja de partidores GBNH2XbaI y GBTM/AS, y el partidor GBTM/S con G0COOH/AS (específico para *mceG*) o 0BCOOH/AS (específico para *cvaB*). Cuando se amplificaron los segmentos correspondientes al gen *mceG* se utilizó DNA plasmidial de pJAM229 y cuando se amplificaron los segmentos correspondientes a *cvaB* se utilizó DNA plasmidial de pCoIV-K30 (**Figura 6**).

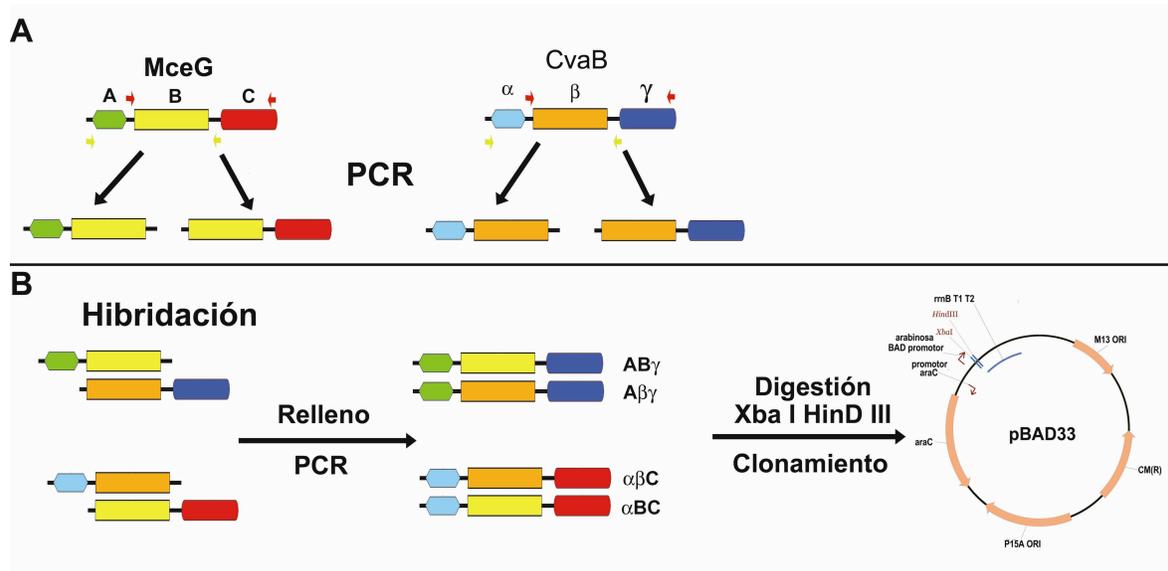
### 2.6.10 Modificación del carboxilo terminal de MceG.

Para eliminar los últimos cuatro aminoácidos del carboxilo terminal de MceG se introdujo un codón de término en el partidor C-TnaIStop. Este partidor junto con el partidor GBNH2/S se utilizaron para amplificar el gen. El producto PCR fue purificado y clonado en los sitios XbaI y HindIII del vector pBAD33.

Para cambiar el carboxilo terminal de *mceG* por una secuencia consenso, se diseñó el partidor C-TnaI-Conse el cual en su carboxilo incluye la secuencia consenso y el sitio Sal I. La secuencia de consenso se obtuvo mediante alineamiento múltiple de distintos dominios ABC presentes en la base de datos. El partidor C-TnaI<sup>Conse</sup> en su extremo 3' aparece con el sitio P5 del vector pKD13. Este partidor junto con el partidor P1 se utilizaron para amplificar la resistencia a kanamicina usando como templado DNA del plasmidio pKD13. Este fragmento de PCR se purificó, luego se digirió con Sal I y se ligó al vector pBluescrip KS. De las transformantes se seleccionó las colonias lac<sup>-</sup>, resistentes a kanamicina y ampicilina. El DNA plasmidial fue digerido con Sal I y el producto obtenido se ligó al sitio Sal I del plasmidio pMceG. Esta mezcla de ligación se transformó y se seleccionaron las colonias resistentes a cloranfenicol y kanamicina. La orientación del inserto fue confirmada mediante PCR. Esta nueva construcción, denominada MceG<sup>conse</sup>, fue utilizada para complementar mutantes en el transportador de microcina.



**Figura 5. Formación de sistemas de transporte híbrido.** La figura muestra el esquema para la obtención de sistemas de transporte híbrido entre los sistemas de transporte de microcina E492 y colicina V. Los genes que codifican para la proteína accesoria del sistema de microcina E492 (*mceH*) y colicina V (*cvaA*) fueron amplificados independientemente. Esta misma operación fue realizada con los genes que codifican para el gen del transportador de microcina E492 (*mceG*) y colicina V (*cvaB*). Los productos de PCR posteriormente se hibridaron entre si, amplificaron mediante PCR y se clonaron en el vector pBAD33.



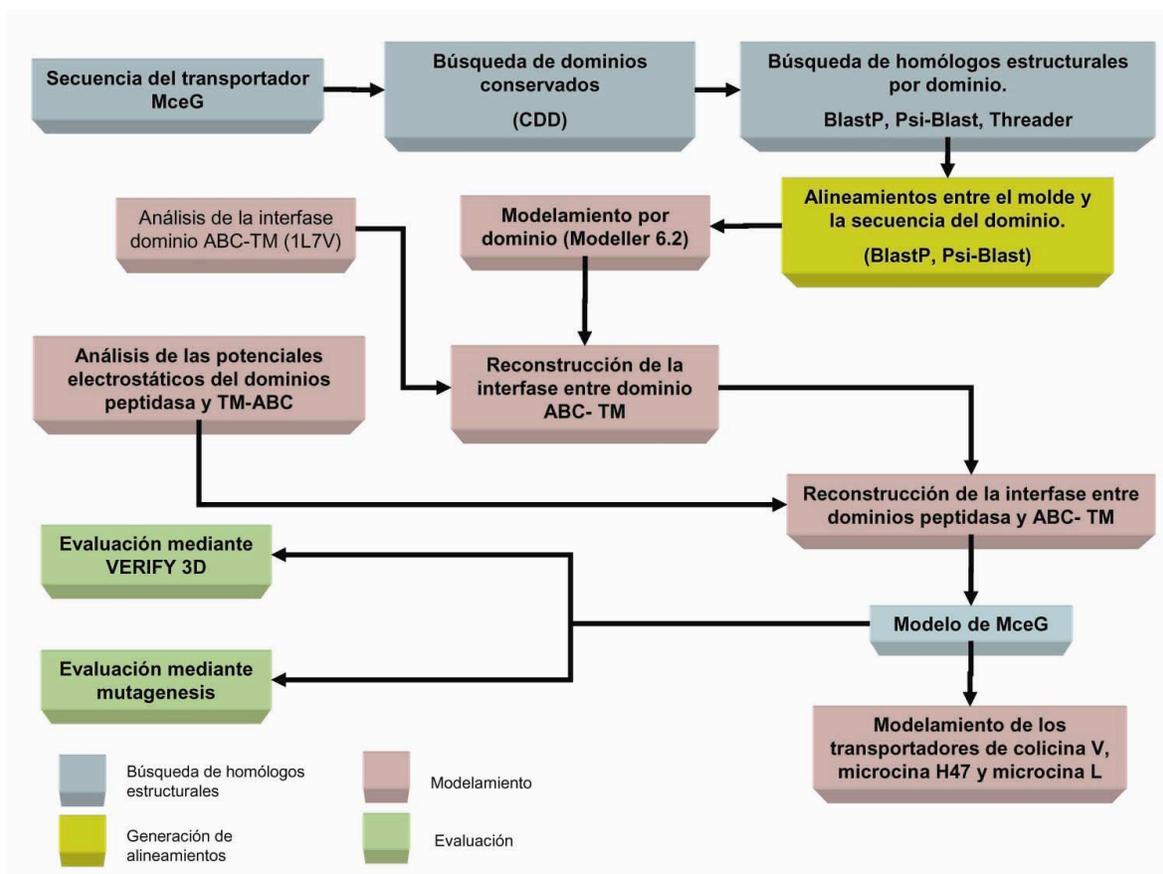
**Figura 6. Estrategia para generar transportadores quiméricos.** Para generar transportadores quiméricos se aprovechó la estructura modular de los transportadores de microcina E492 (MceG) y colicina V (CvaB). Los dominios peptidasa, transmembrana y ABC del transportador de microcina E492 (MceG) se representan con las letras A, B, C respectivamente. Los dominios peptidasa, transmembrana y ABC del transportador de colicina V (CvaB) se representan con las letras  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  respectivamente. Se amplificaron los dominios peptidasa-transmembrana y transmembrana-ABC de los transportadores de microcina E492 y colicina V (Panel A). Estos productos PCR se hibridaron entre sí y posteriormente el producto final se amplificó y clonó en el vector pBAD33 (Panel B).

### 2.6.11 Mutagénesis puntual.

La mutagénesis puntual se realizó bajo las condiciones que recomienda el sistema QuickChange® XL Site-Directed Mutagénesis Kit. Brevemente, en la reacción de mutagénesis puntual mediante PCR se utilizó 1  $\mu$ l DNA plasmidial del vector pMceG (templado) y los partidores D121NF y D121NR. El producto de PCR fue aislado del DNA plasmidial con la enzima de restricción DpnI la cual solo digiere al DNA metilado (DNA aislado a partir de un cultivo bacteriano) y no digiere al DNA producido *in vitro* (DNA proveniente de una reacción de PCR). El DNA remanente fue dializado y transformado sobre células competentes DH5 $\alpha$ . La identidad de la mutación se determinó mediante secuenciación.

## 2.7 Modelamiento por comparación.

El modelamiento de la estructura 3D de una proteína involucra cuatro pasos que se resumen en la **Figura 7**. La búsqueda de homólogos estructurales se realizó utilizando BLASP, Psi-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>) y “threading” (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm>). Para los alineamientos entre la secuencia del transportador y la secuencia aminoacídica del molde se realizaron alineamientos múltiples mediante el programa clustal X. El modelamiento por comparación se realizó utilizando el software MODELLER 6.2. En cada experimento de modelamiento se generó un total de 20 modelos de los cuales se escogió aquel que presentaba un menor valor de función objetiva. Para refinar el modelo se agregaron funciones de optimización como minimización de energía y dinámica molecular en nivel 5 y además se entregaron las distancias entre C $\alpha$ -C $\alpha$  como restricción. Para modelar el transportador en **estado abierto** se alineó la secuencia aminoacídica del transportador de lípido A en estado abierto (MsbAEc o MsbASt) con la secuencia aminoacídica del transportador MceG de la microcina E492.



**Figura 7. Esquema del método utilizado para modelar el transportador de microcina E492 (MceG) y los transportadores de colicina V, microcina H47 y microcina L.** En la figura se muestran los pasos necesarios para construir un modelo 3D del transportador de microcina. En términos generales el modelamiento de la estructura de una proteína involucra cuatro pasos: a) búsqueda de homólogos estructurales; b) alineamiento; c) modelamiento y d) evaluación. A cada paso se ha asignado un color distinto y las distintas etapas realizadas en cada paso se indican en los recuadros.

La estructura cristalográfica de ambos transportadores (MsbAEc o MsbASt) presenta dos “gaps” correspondientes a regiones no resueltas en la cristalografía. El primer “gap” es una región de 30 aminoácidos ubicado en el compartimiento citoplasmático, entre las hélices transmembrana 4 y 5. El segundo “gap” se ubica entre el dominio transmembrana y ABC y comprende una región de 78 aminoácidos en MsbAEc o de 30 aminoácidos en MsbASt. Para obtener un modelo sin “gaps” fue necesario obtener información adicional sobre la posible estructura de estas regiones.

Para completar el primer “gap” se realizó una predicción de estructura secundaria utilizando el programa PsiPred (**Jones y cols., 1997**). Esta aproximación permitió asignar a esta región una estructura de hélice-lazo-hélice. Para modelar el segundo “gap” se usaron dos estrategias levemente diferentes dependiendo del molde utilizado. En ambos casos se realizó una predicción de estructura secundaria. Sin embargo, cuando se utilizó como molde la estructura de MsbAEc, se agregó la información tridimensional del dominio ABC del complejo presentador de antígenos (Tap-1), y cuando se utilizó la estructura del transportador de lípido A de *Salmonella* la trayectoria inicial del lazo fue guiada manualmente.

Para modelar el **estado cerrado** se utilizó como molde la estructura del transportador del lípido A de *V. cholerae* y el dominio ABC en estado dimérico (1L2T). La estructura del transportador del lípido A de *V. cholerae* también presenta un “gap” de 30 aminoácidos que se ubica entre las hélice 4 y 5 en la región citoplasmática. Este “gap” fue modelado en base a la predicción de su estructura secundaria. Las distancias entre C $\alpha$ -C $\alpha$  necesarias para reconstruir la interfase dominio ABC- transmembrana se tomaron a partir de la estructura 3D del importador de vitamina B12 (1L7V) utilizando el programa Swiss-prot PDB Viewer. La representación final fue realizada con el programa MolMol o Swiss-prot pdb Viewer. Los potenciales electrostáticos de superficie fueron calculados y representados con el programa MolMol. La evaluación de los modelos fue realizada con el programa VERIFY3D presente en el paquete para modelamiento y manejo de proteínas DSModelling 1.1, Accelrys.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Clonamiento y expresión del gen *mceF*.

Para analizar la función del gen *mceF* en la exportación de microcina E492 y colicina V se decidió abordar una estrategia genética de modo de establecer inequívocamente que la ausencia de este gen causaba el fenotipo no productor de la cepa que portaba el plasmidio pJRS1. La estrategia utilizada consistió en la amplificación mediante PCR del gen *mceF* y posterior clonamiento en un vector de expresión T7 compatible con el resto del sistema productor de microcina E492 recombinante. A continuación se describen los experimentos de clonamiento y complementación para lograr este objetivo.

#### 3.1.2 Clonamiento del gen *mceF*.

Se realizaron múltiples intentos de clonamiento del gen *mceF* en el vector pET15A utilizando la cepa de *E. coli* VCS257(DE3) sin obtener transformantes. Probablemente el gen *mceF* codifica para una proteína que es tóxica cuando se expresa en exceso o fuera de su contexto genético. Tomando en cuenta que la cepa de *E. coli* VCS257(DE3) en ausencia del inductor IPTG expresa una cantidad basal de la RNA polimerasa de fago T7 se decidió cambiar esta cepa de clonamiento por la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  que no porta el profago que codifica para la RNA polimerasa del fago T7. Utilizando esta cepa se logró clonar el gen *mceF* generando la construcción pET15AF, cuya identidad fue comprobada mediante PCR, digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

#### 3.1.3 Complementación de mutantes en el gen *mceF*.

Para analizar la funcionalidad del gen *mceF*, bacterias de la cepa de *E. coli* VCS257 (DE3) que contienen al plasmidio pC1 o pJRS1 (ambos mutantes por delección en el gen *mceF*) se transformaron con el plasmidio pET15AF. Las colonias obtenidas se sometieron a ensayos de producción de microcina E492 en placa, en presencia y ausencia de IPTG. De modo inesperado, ninguna de las colonias analizadas que contenían ambos plasmidios presentó un fenotipo productor de microcina E492

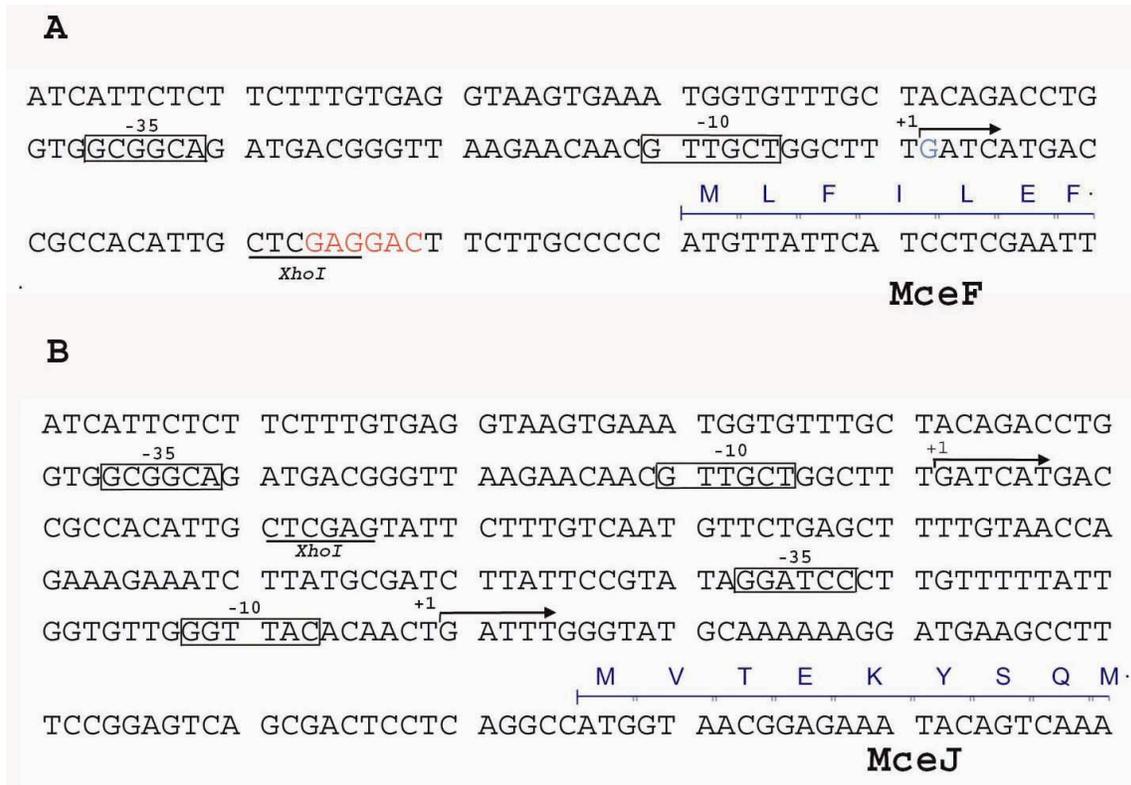
(complementación) lo cual llevó al análisis detallado de estas construcciones investigando si habían otras mutaciones.

### 3.2 Análisis de la secuencia de los plasmidios pC1, JRS1 y pJAM229.

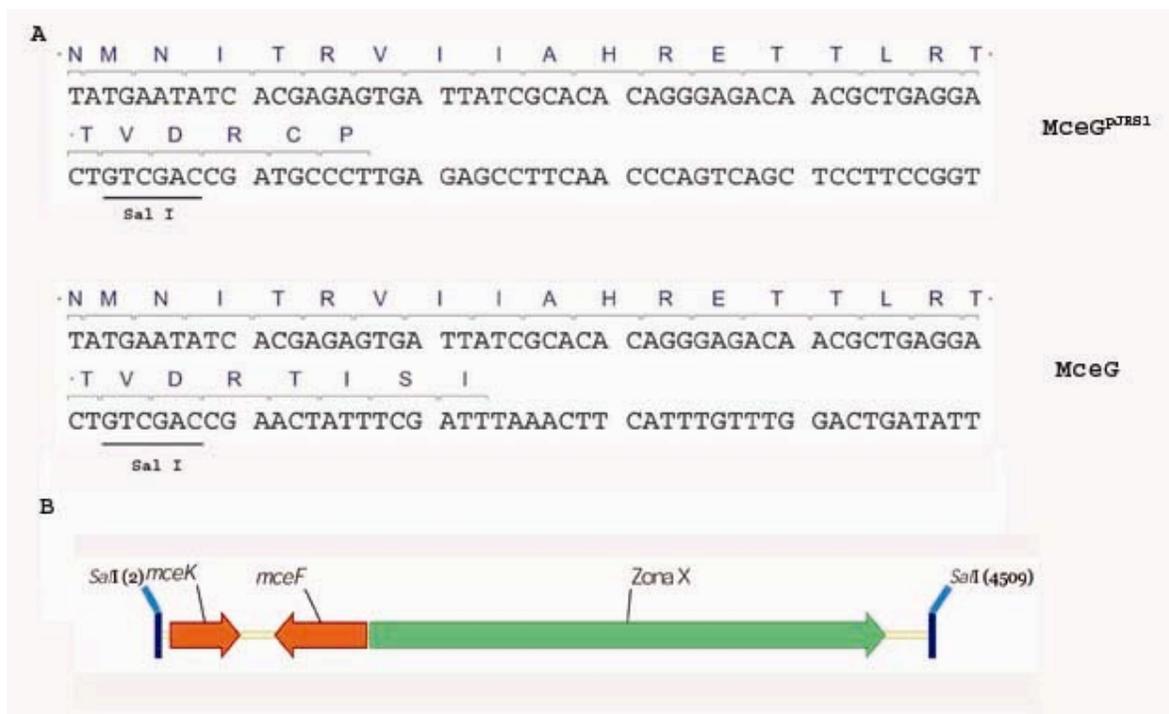
Para determinar si el fenotipo de las cepas que contienen los plasmidios pJRS1 y pC1 se debe a otra mutación producto del proceso de construcción se analizaron las construcciones virtuales de los plasmidios pJAM434, pJAM229, pC1 y pJRS1. Este análisis determinó que el cambio en la orientación de un fragmento XhoI de 6,8 Kpb causa que el promotor del gen *mceF* en pJAM434 comande la transcripción de los genes *mceJIGH* en la construcción pJAM229 (**Figura 8**).

Este análisis también indicó que el gen *mceG* se encuentra modificado en su extremo 3' en los plasmidios pJRS1 y pC1. Ambas construcciones fueron generadas utilizando el sitio Sal I ubicado río abajo del gen *mceF*. El análisis *in silico* de las construcciones generadas indicó que el sitio Sal I se encuentra en el extremo 3' del gen *mceG*, a 20 nucleótidos del codón de término. La unión entre los sitios Sall del gen *mceG* y el sitio Sal I del vector genera un cambio en el extremo carboxilo terminal del transportador de microcina. Esta mutación consiste en el cambio de la secuencia VDRITISI presente en el transportador normal, a la secuencia VDCP en el transportador ubicado en pJRS1 (**Figura 9**).

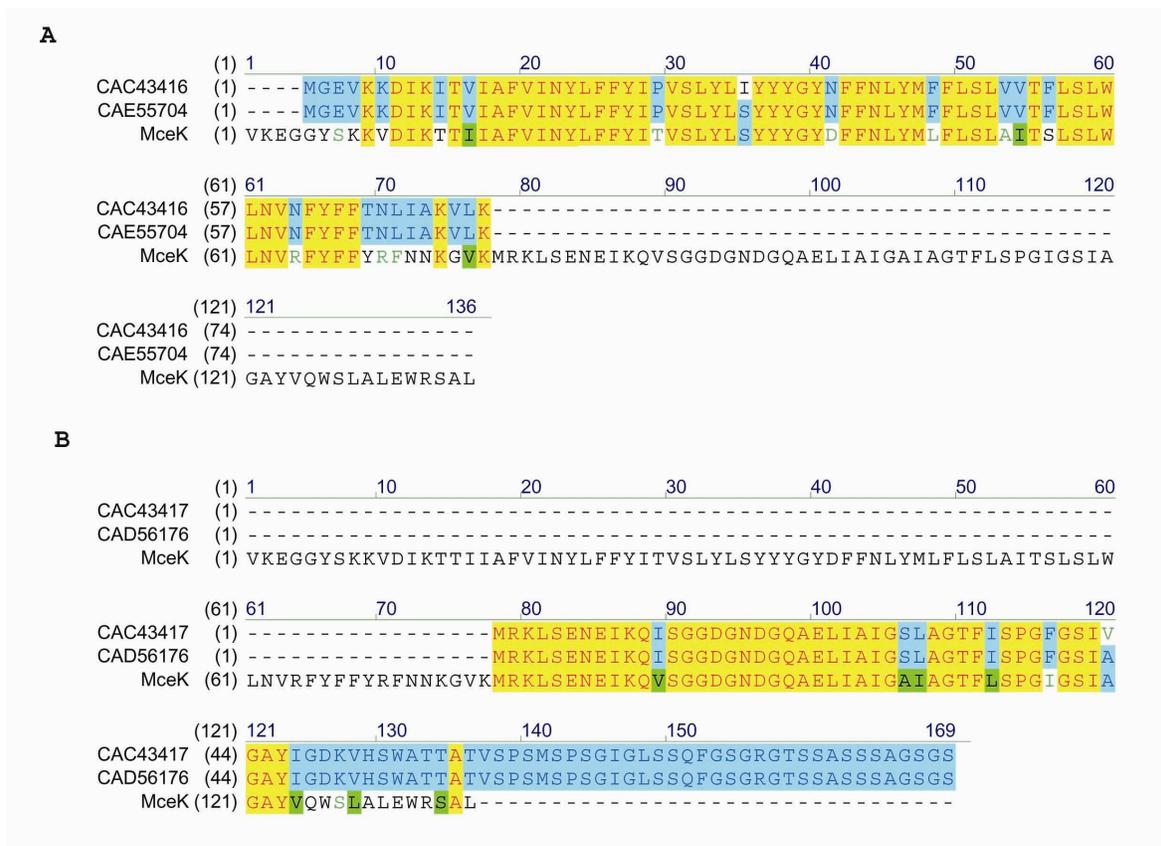
El análisis de la región eliminada en la construcción pJRS1 también mostró la existencia de un ORF ubicado entre los genes *mceG* y *mceF* que se orienta en el sentido de los genes *mceHG*. Este ORF fue denominado MceK y corresponde a una proteína de 136 aminoácidos que presenta identidad con la proteína de inmunidad de la microcina M presente en las cepas de *E. coli* UP 536 (CAC43416) y Nissle 1917 (CAE55704) y además en su extremo carboxilo presenta identidad con una versión trunca de la microcina M de las cepas de *E. coli* UP 536 (CAC43417) y Nissle 1917 (CAE55706) (**Figura 10**). Probablemente MceK no había sido identificado con anterioridad por que las caracterizaciones realizadas previamente se habían enfocado en aquellos ORF que comienzan con ATG y codifican para proteínas con más de 100 aminoácidos de longitud, sin embargo el codón de inicio de traducción de MceK es GTG y el segundo ORF anidado que comienza con ATG codifica para un posible péptido de 90 aminoácidos.



**Figura 8. Análisis de las regiones promotoras del gen *mceF* en pJAM434 y el gen *mceJ* en pJAM229.** En el panel A se muestra la región promotora del gen *mceF* en pJAM434. El sitio de unión al ribosoma se señala en letras rojas y el sitio *Xho I* se encuentra subrayado, también se señala el sitio de inicio de transcripción determinado mediante primer extensión (Corsini, 2004) y las regiones -10 y -35. En el panel B se muestra la región promotora del gen *mceJ* en pJAM229. El sitio *Xho I* esta subrayado y se señalan los sitios de origen de transcripción con sus respectivas cajas -10 y -35. El sitio +1 distante del gen *mceJ* corresponde al sitio +1 del gen *mceF* en pJAM434, por otra parte el sitio +1 proximal corresponde al origen de transcripción de *mceJ* en pJAM434.



**Figura 9. Análisis de secuencia nucleotídica de la mutante pJRS1.** El panel A muestra la ubicación del sitio Sal I dentro del gen *mceG* y el cambio en los últimos cuatro aminoácidos que produce la eliminación de este fragmento y la religación con el vector. En el panel B muestra un esquema de la región eliminada en pJRS1. Esta región contiene al gen *mceF*, al ORF *mceK* y a una región de secuencia desconocida.

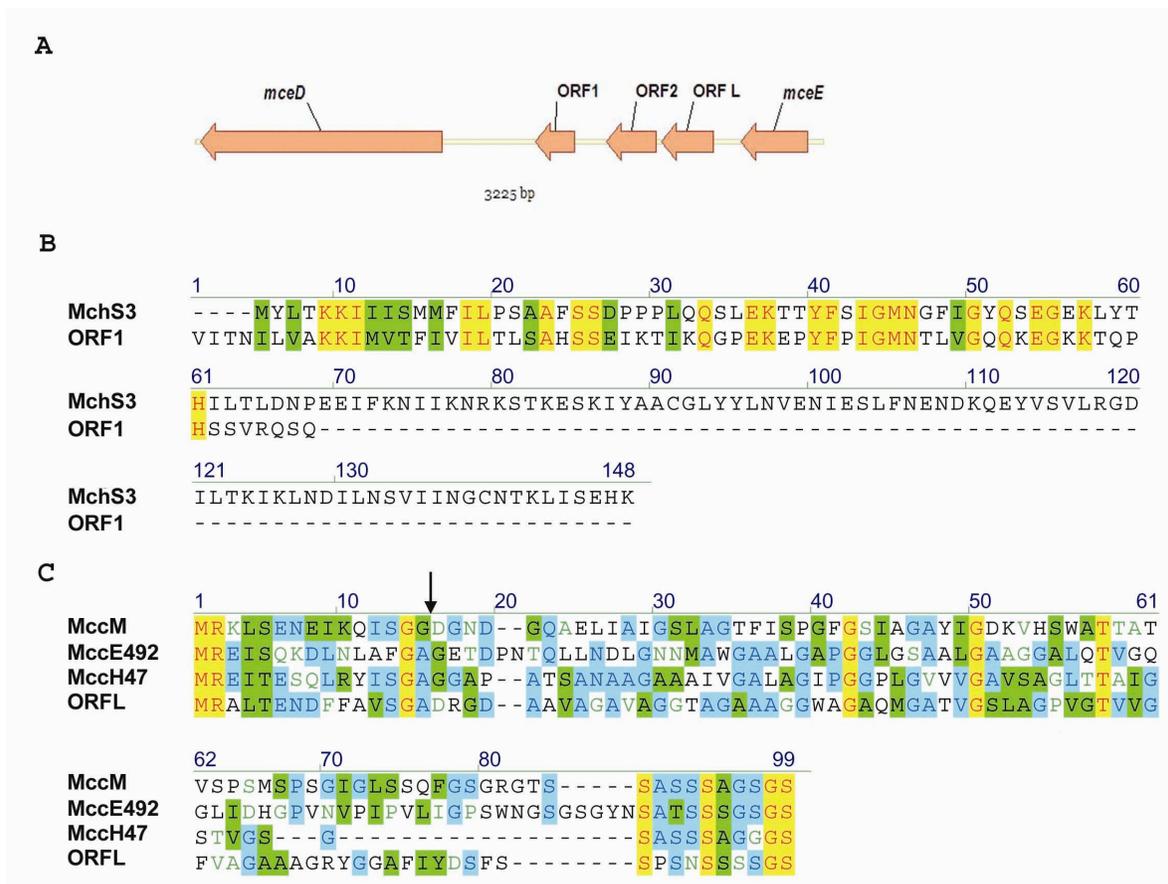


**Figura 10. Análisis del ORF MceK.** El Panel A muestra un alineamiento entre el producto del ORF MceK con las proteínas de inmunidad para la microcina M en UPEC cepa 536 (CAC43416) y en *E. coli* Nissle 1917 (CAC43417). El Panel B muestra un alineamiento entre los producto del ORF MceK con la microcina M de las cepas UPEC536 (CAE55704) y Nissle 1917 (CAD56176).

Para analizar en el sistema productor de microcina la presencia de otros genes que codifican para péptidos, se buscaron ORFs que codifican para proteínas inferiores a 100 aminoácidos. Esta aproximación permitió encontrar tres marcos de lectura entre los genes *mceD* y *mceE*. Estos ORFs fueron denominados ORF1, ORF2 y ORFL, y codifican para péptidos entre 50 y 90 aminoácidos. El ORF1 codificaría para una proteína de 68 aminoácidos que presenta un 40% de identidad y un 60 % de similitud con la proteína MchS3 del sistema productor de microcina H47. El ORF2 codificaría para una proteína de 85 aminoácidos que presenta un 28% de identidad y un 51% de similitud con una proteína hipotética de *Caenorhabditis briggsae*.

El análisis mediante BLASTP del ORFL no arrojó homólogos en la base de datos, sin embargo la inspección visual de la secuencia mostró que en su extremo amino se encuentra un péptido líder del tipo de las microcinas y bacteriocinas de gram positivo. En su extremo carboxilo existe una secuencia rica en serina similar a la que se encuentra en las microcina E492, microcina M y microcina H47. Esta información sugiere que el ORFL codifica para un péptido tipo bacteriocina (**Figura 11**).

La presencia de ORFL, MceK y ORF1, este último homólogo al gen *mchS3*, indicó que el sistema de microcina E492 se encuentra emparentado con los sistemas productores de microcina H47 y M. Para buscar vestigios del sistema productor de microcina H47 se buscaron ORFs río arriba del gen *mceJ*. Se encontró un nuevo ORF orientado en el mismo sentido que el gen *mceJ* y que codifica para una proteína homóloga a la proteína codificada en el gen *mchX* del sistema productor de microcina H47. Por otra parte, el gen *mceE* presenta identidad con el carboxilo terminal del gen *mchS4*, que también parte del sistema productor de microcina H47. Estos resultados muestran que al parecer el sistema productor de microcina E492 ha perdido los genes necesarios para la producción de microcina H47 y M, conservando algunos vestigios de estos (**Figura 12**).



**Figura 11. Búsqueda de nuevos ORF.** El panel A muestra la disposición de tres nuevos ORF ubicados entre los genes *mceD* y *mceE*. Estos ORFs codifican para posible proteína con un tamaño entre 50 y 90 aminoácidos. El Panel B muestra el alineamiento de la secuencia de la proteína deducida del ORF1 del sistema de microcina con el producto del gen *mchS3* del sistema productor de microcina H47. El panel C muestra un alineamiento entre la secuencia de proteína deducida del ORFL con las secuencias de las microcina M, E492 y H47. La flecha señala el sitio de procesamiento del péptido líder de las microcinas.



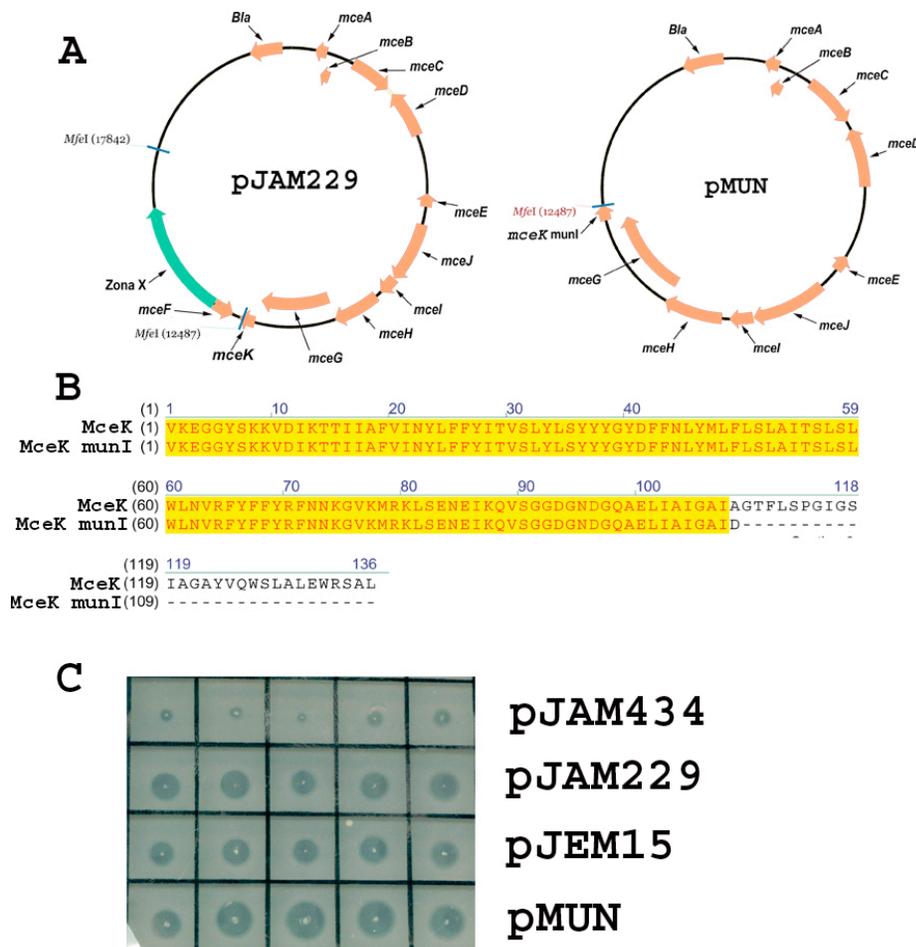
### 3.3 Eliminación de los genes *mceF* y *mceK*.

Los resultados anteriores sugieren que el fenotipo no productor de microcina E492 del plasmidio pJRS1 puede ser explicado por las siguientes alternativas: a) alteraciones en el carboxilo terminal de MceG inactivan al transportador; b) la ausencia de *mceF* o *mceK* resulta en el fenotipo no productor.

Para determinar cual de estas posibilidades explica el fenotipo no productor de microcina E492 se decidió generar una nueva construcción en la cual el carboxilo terminal de MceG no estuviese modificado, pero que careciera de *mceF* o *mceK*. La primera estrategia escogida para eliminar los genes *mceF* y *mceK* fue la metodología desarrollada por Datsenko y Wanner (**Datsenko y Wanner, 2000**). Las colonias generadas a partir de la aplicación de este método presentaban plasmidios sin el gen *mceF*, pero con un tamaño bastante menor al esperado. El análisis fenotípico determinó que estos clones no producen microcina E492, sin embargo son inmunes a esta microcina, pues crecen bien sobre un césped de bacterias productoras de microcina E492. Se realizaron muchos intentos siguiendo esta estrategia obteniéndose resultados similares, lo cual sugiere que la expresión del sistema de recombinación del fago lambda provoca un reordenamiento génico en el plasmidio pJAM434.

Como estrategia alternativa se buscaron enzimas de restricción que pudieran eliminar a *mceK* o *mceF* sin alterar al transportador de microcina. Mediante análisis de la secuencia de pJAM229 se determinó que la enzima MunI (isoesquizómero MfeI) permite eliminar al gen *mceF* del plasmidio pJAM229 sin alterar al transportador, pero produciendo una versión trunca de *mceK*. Utilizando esta enzima se generó la construcción pMunI. Una vez comprobada las características genéticas de la construcción pMunI se analizó su capacidad para producir microcina E492. El resultado de este experimento indicó que la construcción pMunI produce microcina E492 en cantidades comparables a las producidas por cepas que contienen a su plasmidio parental pJAM229 (**Figura 13**).

Una vez que se determinó que el gen *mceF* era prescindible para la producción y exportación de microcina E492 activa, se evaluó si MceK participaba de alguna manera en la producción de microcina E492, pues la construcción pMunI conserva una parte de esta proteína.



**Figura 13. El gen *mceF* es prescindible para la producción de microcina E492 activa.** El panel A muestra la comparación entre las construcciones pJAM229 y pMun en donde se señala la presencia de los genes necesarios para la producción de microcina activa y el sitio de restricción MunI. El Panel B muestra una comparación entre la secuencia del ORF *mceK* en pJAM229 y los cambios que este experimenta en la construcción pMunI. El panel C muestra una comparación de la capacidad de formar halos de inhibición de crecimiento entre las construcciones pJAM434, pJAM229, pJEM15 y pMun clonados en la cepa de *E.coli* VCS 257.

Para esto se eliminaron los genes *mceK* y *mceF* reemplazando esta región por un producto PCR que repara el C-terminal de MceG e introduce una resistencia a kanamicina. Esta metodología permitió obtener tres clones denominados pΔFK1, pΔFK2 y pΔFK3 que fueron sometidos a análisis de restricción y a secuenciación de DNA para verificar que el extremo carboxilo del gen *mceG* estaba reparado.

### **3.3.1 Ensayos de actividad microcina E492 de las construcciones pΔFK.**

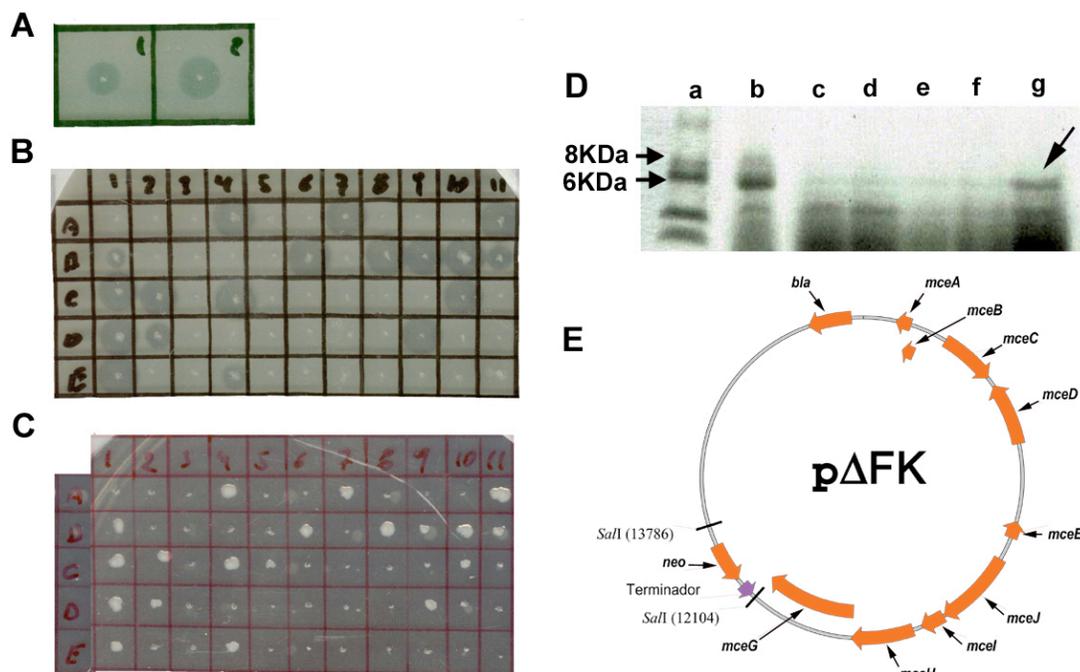
Mediante ensayos en placa sobre un césped sensible y SDS-PAGE, se analizó el fenotipo productor de microcina E492. Se determinó que bacterias conteniendo las construcciones pΔFK producen microcina E492 activa, formando halos de similar tamaño a los generados por bacterias conteniendo el plasmidio pJAM229.

Por otra parte, la eliminación del fragmento que repara el extremo C-terminal en las construcciones pΔFK mediante digestión con Sal I provoca una pérdida de la resistencia a kanamicina y una pérdida de la producción de microcina E492 (**Figura 14B**).

De este experimento se puede deducir que el fenotipo no productor de las cepas conteniendo el plasmidio pJRS1 se debe exclusivamente al cambio en la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo del transportador MceG.

### **3.3.2 Participación de los genes *mceK* y *mceF* en el sistema productor de microcina E492.**

Para determinar si *mceK* cumple un rol en el sistema productor de microcina en primer lugar se evaluó si este gen es transcrito a RNA. Dado que la posible proteína para la cual codifica este gen presenta homología con la proteína de inmunidad de la microcina M también se analizó el efecto de su expresión sobre la inmunidad a microcina M y la producción de microcina E492. Los resultados de estos experimentos indican que *mceK* se transcribe, pero no otorga inmunidad a la microcina M (datos no mostrados). El efecto de la expresión de *mceK* sobre la producción de microcina E492 se evaluó introduciendo construcciones derivadas de pBAD33 con los genes *mceK* y *mceFK* en cepas de *E. coli* que contenían los plasmidio pJAM229 o pJAM434. La comparación del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento de las diferentes construcciones no mostró diferencias con las cepas que contenían solo a pJAM434 o pJAM229.



**Figura 14. La modificación del C-terminal del transportador MceG impide la exportación de microcina E492.** El panel A muestra la capacidad de formar halos de inhibición de crecimiento de dos clones  $\Delta$ FK que presentan resistencia a kanamicina. El panel B muestra la capacidad de formar halos de inhibición de crecimiento de 50 clones obtenidos a partir de la digestión de la construcción  $p\Delta$ FK con *Sal* I y su posterior religación. La presencia del inserto que repara el C-terminal de *mceG* fue verificada analizando la capacidad para crecer en presencia de kanamicina (Panel C). El panel D muestra un SDS-PAGE de microcina E492 purificada a partir de cultivos de células conteniendo las construcciones  $p$ JAM229 (carril b),  $p$ MUN (carriles c,d,e,f) y  $p\Delta$ FK (carril g). La banda correspondiente a la microcina E492 se señala con una flecha. El panel E muestra un esquema de la construcción  $p\Delta$ FK.

Este resultado se observó en condiciones de inducción y represión del promotor de arabinosa, sugiriendo que *mceK* codifica para un producto no funcional (resultado no mostrado).

Respecto a *mceF* se expresó este gen junto con los plasmidios pJAM434 y pJAM229. Al igual que en el caso anterior, no se observaron diferencias en el tamaño de los halos de inhibición de crecimiento. Para determinar si la ausencia de MceF afecta la producción de microcina se comparó la producción de microcina entre las cepas pJAM229 y p $\Delta$ FK. Los resultados de estos experimentos indican que en ausencia de *mceF*, las preparaciones de microcina purificada aumentan entre 5 y 20 veces la actividad bactericida (**Tabla IV**).

En experimentos realizados con anterioridad en el laboratorio se había descrito que las cepas pJRS1 o pJI (pJRS1 carece de *mceF* en tanto que pJI carece de *mceFGHIJ*) experimentan pérdida de inmunidad a la microcina E492 en fase estacionaria de cultivo (PIFE), a pesar que el gen de inmunidad se expresa normalmente. Esto llevó a relacionar la PIFE con la ausencia del gen *mceF*. Como pJRS1 tiene una mutación en *mceG* se investigó si la cepa que porta el plasmidio  $\Delta$ FK mantiene la inmunidad en fase estacionaria. El resultado de estos experimentos indica que solo un 10% de las colonias que contienen el plasmidio pJRS1 son inmunes a la microcina E492 en fase estacionaria, en tanto que la restauración del carboxilo terminal del transportador de microcina E492 en p $\Delta$ FK restaura a un 100% la inmunidad en esta fase. Este resultado sugiere que MceF y MceK no participan en la regulación de la inmunidad en fase estacionaria, y que la PIFE está relacionada con la acumulación de microcina intracelular. También se evaluó si la sobreexpresión de MceF tiene algún efecto sobre la inmunidad en fase estacionaria. El resultado de este experimento indica que 50 de los 50 clones que contienen los plasmidios pBSC47 (genes *mceABC*) y pBAD33 fueron inmunes a la microcina E492. Por otra parte 45 de los 50 clones examinados que contenían los plasmidios pBSC47 (genes *mceABC*) y pMceF (*gen mceF*) fueron sensibles a la microcina E492 en fase estacionaria. De modo similar cuando *E. coli* que porta el plasmidio p157 (*mceB*) y plasmidio pBAD33 se observa que un 100% de las colonias que solo expresan la inmunidad son inmunes, en cambio solo un 10% de las cepas que contienen a p157 (*mceB*) y pMceF (*mceF*) son sensibles. De esta forma la pérdida de inmunidad estaría relacionada con la presencia de microcina intracelular y por la presencia del gen *mceF* que de algún modo afecta a la proteína de inmunidad).

| P1      | Genes P1             | P2     | Genes P2    | % IFE | Actividad Microcina (UA) |
|---------|----------------------|--------|-------------|-------|--------------------------|
| pJAM229 | <i>mceABCDEJIHGF</i> | -      | -           | 100   | 1,49 x 10 <sup>5</sup>   |
| pJRS1   | <i>mceABCDEJIHG*</i> | -      | -           | 10    | SA                       |
| pΔFK    | <i>mceABCDEJIHG</i>  | -      | -           | 100   | 1,06 x 10 <sup>6</sup>   |
| pBSC47  | <i>mceABC</i>        | pBAD33 | -           | 100   | SA                       |
| pBSC47  | <i>mceABC</i>        | pMceF  | <i>mceF</i> | 10    | SA                       |
| p157    | <i>mceB</i>          | pBAD33 | -           | 100   | SA                       |
| p157    | <i>mceB</i>          | pMceF  | <i>mceF</i> | 90    | SA                       |

**Tabla IV. Participación de *mceF* en la PIFE y en la producción de microcina activa.** En la tabla se resume el efecto sobre el fenotipo de inmunidad en fase estacionaria (% IFE) y producción de microcina de la cepa de *E. coli* VCS257 conteniendo los plasmidios de la columna P1 en combinación con los plasmidios de la columna P2. Contiguo a la columna de plasmidios se indican los genes presentes en cada construcción. La actividad de microcina fue determinada a partir de purificaciones de sobrenadantes de cada construcción. SA, sin actividad; UA, unidades arbitrarias.

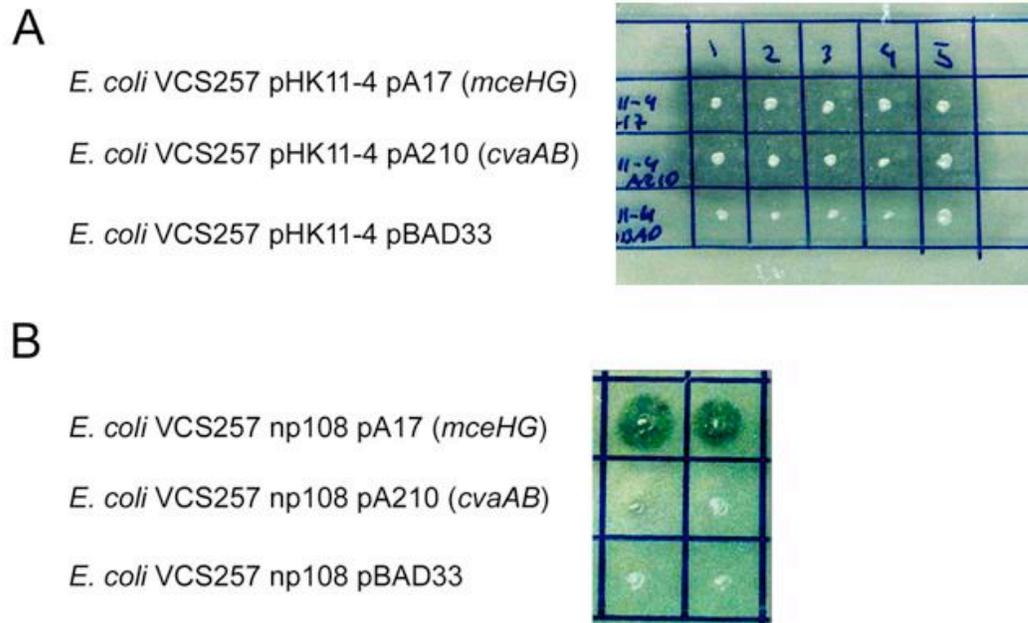
### **3.3.3 El gen *mceF* es prescindible en los sistemas de exportación de microcina E492 y colicina V.**

Los resultados presentados en esta tesis indican que el sistema de exportación de microcina es independiente del gen *mceF*, pero no descartan la posibilidad que este sea un factor de especificidad del transportador que explique por que el transportador de colicina no puede exportar microcina E492. Para examinar esta posibilidad se propuso realizar ensayos de complementación de mutantes en los transportadores de colicina y microcina E492 usando plasmidios que expresen solamente los genes del sistema de transporte de microcina E492 (*mceHG*) o del sistema de exportación de colicina V (*cvaAB*).

Los resultados de estos experimentos indican el sistema de transporte de microcina E492 (construcción pA17) complementa a mutantes en el sistema de transporte de colicina V (pHK11-4) o microcina E492 (np108), en cambio el sistema de exportación de colicina V (construcción pA210) no complementa a la mutante en el transportador de microcina E492, aunque la identidad entre ambos sistemas es altísima (>90%). Estos resultados muestran que existe una especificidad del sistema de transporte de colicina V por su propia bacteriocina. También es posible concluir de estos experimentos que los sistemas de transporte de colicina V y microcina E492 pueden funcionar en ausencia del gen *mceF*. La funcionalidad del sistema de exportación de colicina V (pA210) se comprobó mediante complementación de mutantes en el sistema de transporte de colicina V y por secuenciación de DNA (**Figura 15**).

### **3.4 El transportador CvaB no complementa a mutantes en *mceG*.**

La ausencia de complementación de una mutante en el sistema exportador de microcina E492 por parte del sistema de exportación de colicina V puede ser explicado porque CvaB no reemplaza a MceG o porque la proteína accesoria del sistema de microcina no interactúa con el transportador de CvaB.



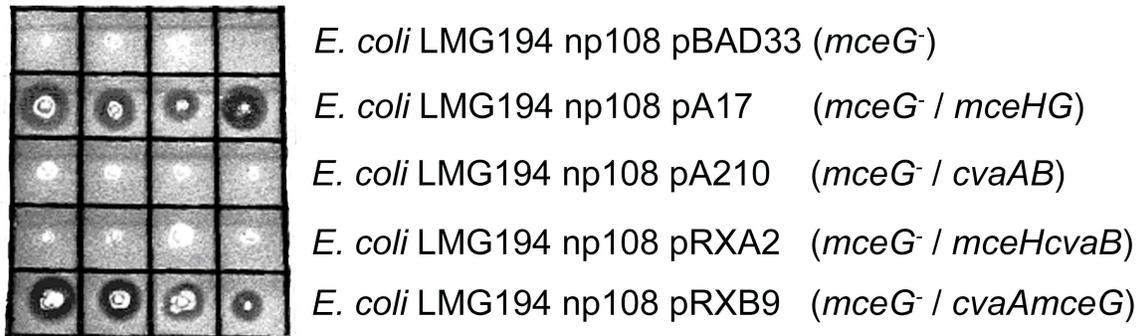
**Figura 15. Ensayos de complementación cruzada de los sistemas de transporte de la microcina E492 y de colicina V.** A) mutante pHK11-4 (*cvaB*::Tn5) complementada con pA17 (*mceHG*), pA210 (*cvaAB*) y pBAD33. B) mutante np108 (*mceG*::Tn5) complementada con pA17 (*mceHG*), pA210 (*cvaAB*) y pBAD33. El sistema de transporte de colicina V no reemplaza la función del sistema de transporte de microcina E492.

Para determinar si es el transportador ABC o la proteína accesoria del sistema de exportación de ColV el componente que confiere la especificidad, se construyeron sistemas de transporte híbridos combinando el exportador de un sistema con la proteína accesoria del otro sistema. Se obtuvieron las construcciones RXB9 (*cvaA mceG*) y RxA2 (*mceH cvaB*), las cuales fueron utilizadas para complementar a mutantes en el transportador de microcina E492.

Los resultados de estos experimentos indican que la construcción RxA2 no complementa a mutantes en el transportador de microcina E492, de lo cual se deduce que el transportador de colicina V (CvaB) no complementa la función del transportador de microcina E492 (MceG) (**Figura 16**).

### **3.4.1 Localización del dominio del transportador CvaB que confiere la especificidad para el transporte de colicina V.**

Los experimentos anteriores indican que el transportador CvaB es específico para la exportación de colicina V. Como se mencionó con anterioridad, este transportador presenta un 92% de identidad con el transportador de colicina V, lo cual significa que existen aproximadamente 58 residuos distintos entre CvaB y MceG. Esta situación imposibilita detectar mediante análisis de secuencia aminoacídica donde se encuentran los residuos que confieren especificidad. Con el fin de determinar donde se encuentran los residuos que confieren especificidad se decidió utilizar la estructura modular de los transportadores ABC. Brevemente, los transportadores CvaB y MceG presentan tres dominios conservados: Un dominio peptidasa encargado de procesar el péptido líder, un dominio transmembrana y un dominio ABC. Para determinar cual(es) dominio(s) del transportador de colicina V es (son) el (los) responsable(s) de la especificidad en la exportación de colicina V se utilizó una estrategia basada en la formación de proteínas de transporte quiméricas entre los dominios del transportador de colicina V y microcina E492. Esta estrategia permitió generar transportadores que contienen el dominio peptidasa del transportador de colicina V y los dominios transmembrana y ABC del transportador de microcina E492 (construcción p $\alpha$ BC). También se generó un transportador con el dominio ABC del transportador de colicina V y los dominios peptidasa y transmembrana del transportador de microcina E492 (construcción pAB $\gamma$ ). Estas construcciones fueron utilizadas para complementar mutantes en el transportador de microcina E492 y colicina V.

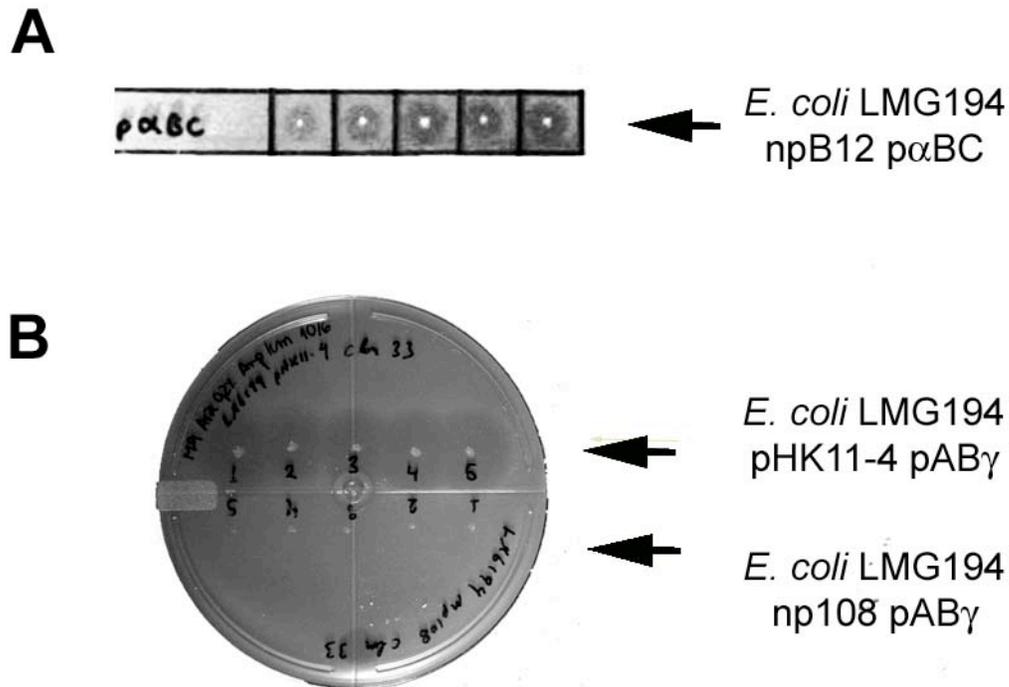


**Figura 16. Sistemas de transporte híbridos entre el exportador ABC y la proteína accesoria de los transportadores de microcina E492 y colicina V.** La figura muestra el resultado de los ensayos de complementación utilizando estos sistemas de transporte híbridos. La cepa LMG194 conteniendo una mutante en el transportador de microcina E492 fue complementada con los plasmidios pBAD33, pA17 (*mceHG*), pA210 (*cvaAB*), pRXA2 (*mceH cvaB*) y pRXB9 (*cvaA mceG*). La actividad productora de microcina E492 fue evaluada mediante formación de halos de inhibición de crecimiento sobre un césped de células sensibles.

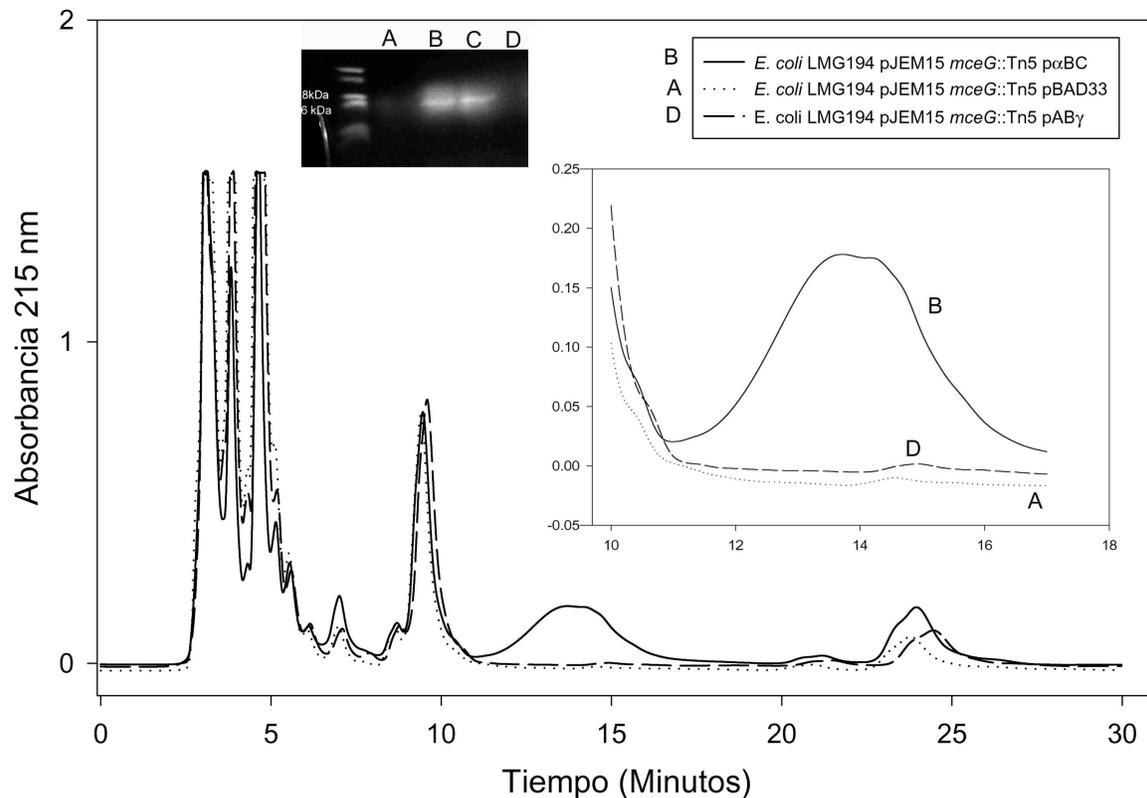
La construcción p $\alpha$ BC se introdujo en la cepa de *E. coli* LMG194 que contenía al plasmidio npB12, el cual presenta una mutación por transposición en el transportador de microcina. El fenotipo productor de microcina E492 fue evaluado picando colonias sobre un césped sensible. Los resultados de estos experimentos indicaron que células que llevan la construcción p $\alpha$ BC junto con el plasmidio npB12 forman halos de inhibición de crecimiento, señal inequívoca de la exportación de microcina E492 activa (**Figura 17**). De este experimento se puede concluir que el dominio peptidasa del transportador de colicina V permite la exportación de microcina E492. Posteriormente se investigó si el dominio ABC del transportador de colicina V era responsable de la especificidad exhibida por este transportador, para esto se complementó la cepa de *E. coli* LMG194 que contenía el plasmidio npB12 con la construcción pAB $\gamma$ . El ensayo de producción de microcina E492 activa medido por la formación de halos de inhibición de crecimiento mostró que estas cepas no producen microcina activa. Para verificar su funcionalidad, la construcción pAB $\gamma$  fue transformada sobre cepas que contenían el sistema productor de colicina V mutante en el transportador CvaB y se evaluó la exportación de colicina V por la formación de halos de inhibición de crecimiento sobre césped sensibles a colicina V. Estos experimentos mostraron que la construcción pAB $\gamma$  complementa mutantes en el transportador de colicina V indicando que esta construcción es funcional (**Figura 17**). La construcción pAB $\gamma$  se comporta como el transportador CvaB y por tanto es posible inferir que el dominio ABC confiere especificidad al transportador de colicina V.

### **3.4.2 La construcción pAB $\gamma$ no exporta microcina E492.**

Los resultados del experimento anterior indican que la construcción pAB $\gamma$  no restituye el fenotipo productor de halos de inhibición de crecimiento a las mutantes en el transportador de microcina E492. Para descartar que la ausencia de complementación de pAB $\gamma$  sea causada por la producción y exportación de microcina inactiva, se purificó microcina a partir de sobrenadantes de cultivos de las mutantes en el transportador complementadas la construcción pAB $\gamma$ . Los resultados de estos experimentos indican que la construcción pAB $\gamma$  es incapaz de exportar microcina E492 (**Figura 18**). De estos experimentos se puede concluir inequívocamente que es el dominio ABC, o de unión a ATP del transportador de colicina V es quien media la especificidad en el transporte de colicina V.



**Figura 17. Complementación de mutantes en los transportadores de colicina V y microcina E492 con transportadores quimeras.** El panel A muestra la complementación de la mutante en el transportador de microcina (MceG-) con la construcción p $\alpha$ BC, la cual contiene el dominio peptidasa del transportador de colicina. El Panel B muestra la complementación de mutantes en el sistema de exportación de colicina V con la construcción pAB $\gamma$  y el fenotipo de la mutante en el transportador de microcina complementada con la construcción pAB $\gamma$ , que poseen el dominio ABC del transportador de colicina V. En cada experimento se picaron 5 clones independientes.



**Figura 18. Exportación de microcina E492 por los transportadores híbridos  $\text{p}\alpha\text{BC}$  y  $\text{pAB}\gamma$ .** La figura muestra el cromatograma de muestras de microcina E492 obtenidas a partir de *E. coli* npB12 complementadas con pBAD33 (A),  $\text{p}\alpha\text{BC}$  (B) y  $\text{pAB}\gamma$  (D). Aproximadamente en el minuto 14 se aprecia el pico correspondiente a la microcina E492. En el recuadro de la derecha se muestra una ampliación de la zona del cromatograma donde aparece el pico que corresponde a la microcina E492 y en el recuadro superior izquierdo la imagen de un gel de SDS-PAGE donde se cargó la proteína presente entre los minutos 12 y 16 del cromatograma. Como control se utilizó microcina purificada a partir de pJAM229 (C).

### 3.5 Modelamiento del transportador de microcina E492.

Una función importante de los transportadores ABC en el sistema de exportación tipo I de bacterias gram negativo, es proporcionar energía al sistema de exportación promoviendo el ensamblaje con la proteína accesoria y la proteína de membrana externa TolC.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que el transportador ABC además de proporcionar energía al transporte también cumple un papel en la selección de la molécula a exportar. Al comparar la secuencia aminoacídica de los dominios ABC de MceG y CvaB la mayor parte de las diferencias se encuentran esparcidas a lo largo del dominio. Sin embargo estas diferencias podrían encontrarse espacialmente cercanas formando un parche que interactúa con la colicina o microcina E492. Para abordar esta hipótesis es necesario contar con un modelo 3D de alta resolución de los transportadores de microcina E492 y colicina V.

A la fecha existen dos grandes aproximaciones para determinar la estructura 3D de una proteína. La primera consiste en la determinación empírica usando difracción de rayos X o NMR. La segunda aproximación es el **modelamiento por comparación** que consiste en el modelamiento de la estructura 3D a partir de la información presente en la estructura primaria y en las bases de datos de proteínas con estructura ya determinada por métodos empíricos. Hasta el momento, no se ha logrado cristalizar un transportador ABC que participa en la exportación de proteínas, razón por la cual no es posible aplicar la primera aproximación y motivó a tomar el desafío de generar un modelo 3D de alta resolución mediante la estrategia de modelamiento por comparación.

### 3.5.1 Búsqueda de homólogos estructurales del transportador MceG.

Como el transportador de microcina E492 es una proteína compuesta por tres módulos (dominios), el primer paso en esta búsqueda fue seleccionar una o más estructuras como molde para cada dominio. Para esto se buscó en la base de datos PDB la presencia de homólogos estructurales. Los resultados de esta búsqueda se resumen en la **Tabla V** e indican que el mejor candidato a utilizar como molde es la estructura del transportador MsbA. El transportador MsbA es el encargado de la translocación del lípido A en bacterias gram negativo. Este transportador ha sido cristalizado en estado abierto (MsbAEc) (**Chang y cols., 2001**), cerrado (MsbAVc) (**Chang, 2003**), y en estado post translocación (MsbASt) (**Reyes y Chang, 2005**), lo cual permite el modelamiento del transportador MceG en todos estos estados.

Aunque los transportadores de lípido A son buenos candidatos para ser utilizados como molde, ellos sólo cubren los dominios ABC y transmembrana, pues estos transportadores no poseen el dominio amino terminal con actividad peptidasa. La búsqueda en la base de datos PDB mediante BLASTP, PSI-BLAST y dominios conservados no arrojó homólogos estructurales del dominio peptidasa. Para determinar que estructura utilizar como molde para el dominio peptidasa se utilizó la estrategia de “threading” la cual encontró dos candidatos. Ambos candidatos corresponden a cisteína proteasas (**Tabla V**). La estructura de la líder proteasa FMDV se escogió como molde pues presenta un mayor porcentaje de similitud y presenta un menor porcentaje de “gaps”.

| Proteína           | Código PDB | R (Å) | E value | (%) Gaps | (%) Identidad | (%) Similitud | Región de MceG | Tipo de Dominio |
|--------------------|------------|-------|---------|----------|---------------|---------------|----------------|-----------------|
| MsbASt             | 1Z2R       | 4,2   | 6e-043  | 1        | 26            | 49            | 200-698        | TM-ABC          |
| MsbAEc             | 1JSQ       | 4,5   | 5e-041  | 1        | 23            | 46            | 200-698        | TM-ABC          |
| MsbAVc             | 1PF4       | 3,4   | 3e-034  | 10       | 24            | 44            | 172-698        | TM-ABC          |
| HlyB               | 1MT0       | 2,6   | 1e-026  | 3        | 35            | 54            | 496-698        | ABC             |
| TAP1               | 1JJ7       | 2,4   | 1e-020  | 3        | 31            | 53            | 487-671        | ABC             |
| HisP               | 1B0U       | 1,5   | 1e-008  | 17       | 27            | 44            | 487-685        | ABC             |
| MalK               | 1G29       | 1,9   | 4e-008  | 13       | 22            | 43            | 514-698        | ABC             |
| MI0796             | 1L2T       | 1,9   | 4e-007  | 12       | 22            | 40            | 490-698        | ABC             |
| MI0796             | 1F30       | 2,7   | 5e-007  | 12       | 22            | 40            | 490-698        | ABC             |
| HlyB               | 1XEF       | 2,5   | 8e-026  | 3        | 40            | 60            | 496-698        | ABC             |
| FMDV <sup>LP</sup> | 1QMY       | 3,0   |         | 2,1      | 8,6           | 23,2          | 1-185          | PEP             |
| Casp8              | 1QDU       | 2,8   |         | 14       | 17            | 17            | 5-185          | PEP             |

**Tabla V. Resumen del resultado de la búsqueda de homólogos estructurales del transportador MceG.** La tabla muestra las proteínas con E-value significativos que alinean con al menos un dominio completo. (TM, dominio transmembrana; ABC, dominio ABC; PEP, dominio peptidasa). Las estructuras utilizadas como molde para el dominio peptidasa se obtuvieron mediante “Threading”. R corresponde a la resolución con la cual fue obtenida la estructura cristalográfica.

### 3.5.3 Modelamiento de la región transmembrana y dominio ABC de MceG en estado abierto y cerrado.

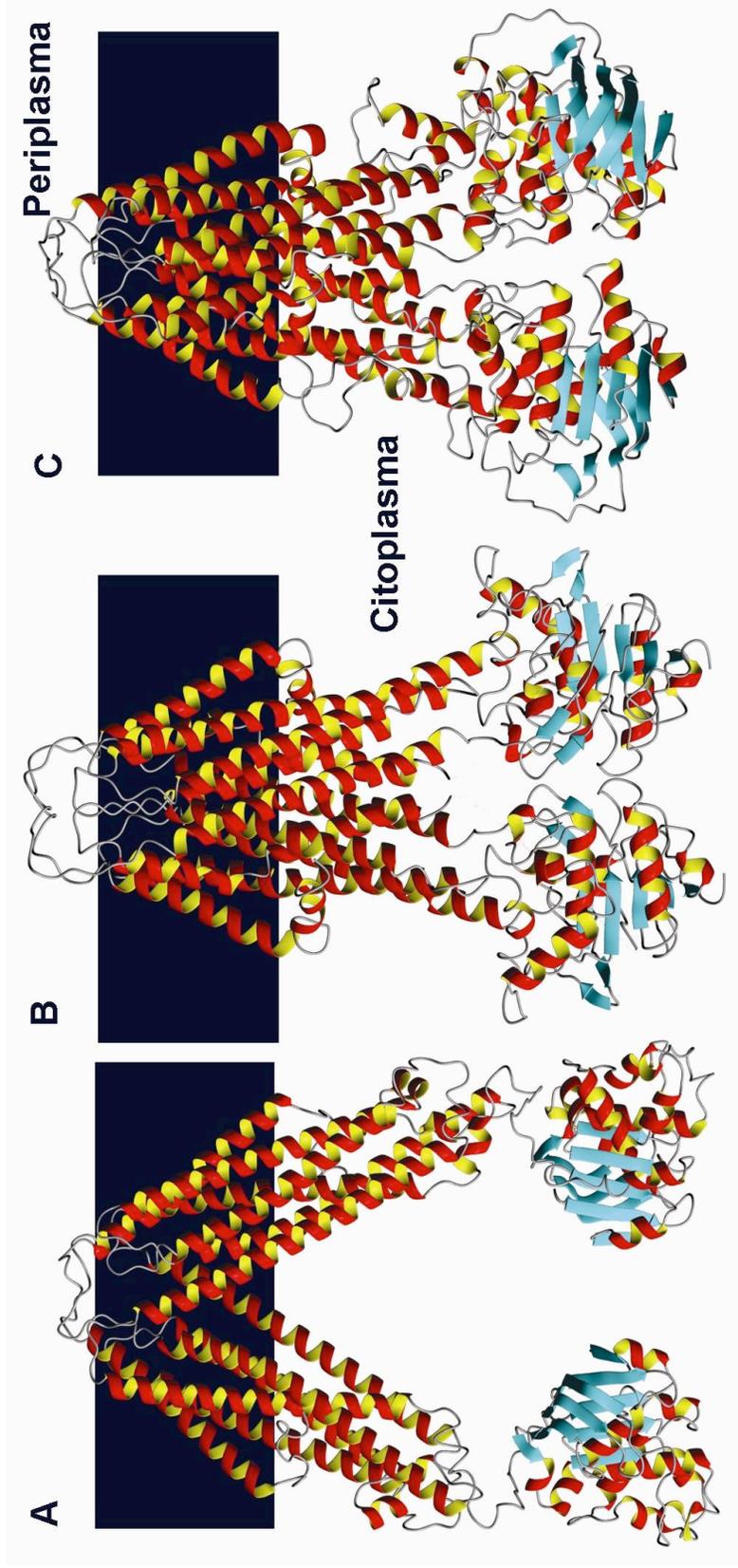
Para modelar el transportador MceG en estado abierto se utilizó la estructura cristalográfica de los transportadores MsbAEc o MsbASt. Ambas estructuras molde presentan dos “gaps” correspondientes a regiones no resueltas en la cristalografía los cuales fueron modelados utilizando la predicción de estructura secundaria y mediante la guía manual. El resultado del modelamiento se muestra en la **Figura 19**.

Para el estado estado cerrado del transportador se utilizó la información tridimensional del transportador de lípido A de *V. cholerae*. Un análisis adicional de esta estructura indicó que la interfase entre sus dominios ABC–ABC era inusual y no daba cuenta de una actividad ATPásica porque las regiones involucradas en la unión e hidrólisis de ATP no estaban en la conformación catalíticamente funcional (esencial para su actividad *in vivo*). Teniendo en cuenta este inconveniente se decidió modelar el dominio ABC del transportador MceG utilizando como molde la estructura de un dímero de dominios ABC (1L2T.pdb) (**Smith y cols., 2002**). Esta estructura está bien estudiada y representa la forma biológicamente funcional de un dominio ABC en estado de dímero (**Higgins y Linton, 2004**). Para realizar este ajuste fue necesario reconstruir la interfase entre los dominios ABC y transmembrana.

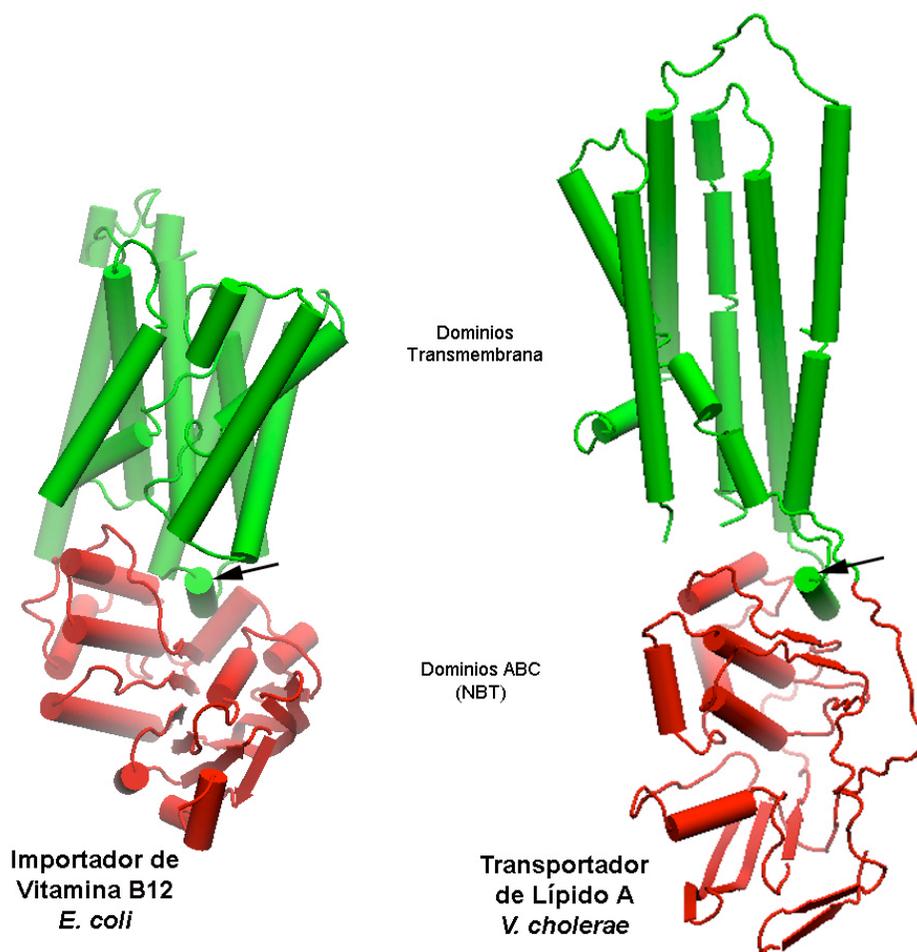
### 3.5.4 Estudio de la interfase entre los dominios ABC y transmembrana de los transportadores ABC.

El análisis comparativo de la estructura 3D de los dominios ABC cristalizados hasta el momento indica que todos ellos comparten la misma estructura espacial (**Jones y George, 2004**). Dado este amplio grado de conservación en sus estructuras 3D es muy probable que todos los dominios ABC compartan el mismo mecanismo de acción e interactúen de igual forma con el dominio transmembrana.

Basados en esta hipótesis se decidió utilizar la información de la interfase entre el dominio ABC-transmembrana del importador de vitamina B12 de *E. coli* en el modelamiento de MceG. Tanto el dominio transmembrana del transportador MsbA, como el transportador de vitamina B12 presentan una proyección con estructura lazo-hélice-lazo que interactúa con el dominio ABC (**Figura 20**).



**Figura 19. Modelamiento del transportador MceG en estado abierto.** La proteína MceG se modeló utilizando dos moldes distintos. En el panel A se muestra el modelo obtenido al usar como templatado para la región transmembrana el transportador de lípido A de *E. coli* (estado abierto) y el dominio ABC de sistema presentador de antígenos (1jj7). El panel B muestra la estructura del transportador de lípido A de *S. typhimurium* (estado abierto, post-exportación). El panel C muestra el modelo de MceG obtenido al usar como molde el transportador de lípido A de *S. typhimurium*. Los recuadros en negro representan la membrana interna de la bacteria.



**Figura 20. Comparación de las estructuras de los transportadores de vitamina B12 de *E. coli* y de lípido A de *V. cholerae*.** En la figura se muestra una comparación entre el importador de vitamina B12 y el exportador de lípido A. La flecha señala la estructura del dominio transmembrana (verde) que interactúa con el dominio ABC (rojo). Esta estructura es conservada a pesar de las diferencias en función y secuencia de aminoácidos de los transportadores.

Esta interacción se encuentra bien detallada en el transportador de vitamina B12, sin embargo en el transportador de lípido A no se encuentra completa debido a la baja resolución de la estructura de MsbAEc, y esto trae por consecuencia que ciertas regiones del dominio ABC no se encuentren bien resueltas. Para corregir y completar la información de las regiones con baja resolución se calcularon las distancias C $\alpha$ -C $\alpha$  entre el lazo-hélice-lazo y el dominio ABC del transportador de vitamina B12. Paralelamente se realizó un alineamiento estructural entre: a) las regiones lazo-hélice-lazo de los transportadores de microcina y vitamina B12, y b) los dominios ABC de ambos transportadores.

Con esta información se establecieron las equivalencias entre los residuos de los transportadores de microcina y vitamina B12 (**Tabla VI**). De esta forma se estableció la interfase entre los dominios ABC y transmembrana del transportador MceG en estado cerrado. Finalmente, con la información de la interfase, los alineamientos entre la secuencia aminoacídica de MsbAVc, la secuencia de MceG, y la secuencia del dominio ABC se modeló el transportador de microcina MceG en estado cerrado (**Figura 21**).

### **3.5.5 Modelo del dominio peptidasa de MceG**

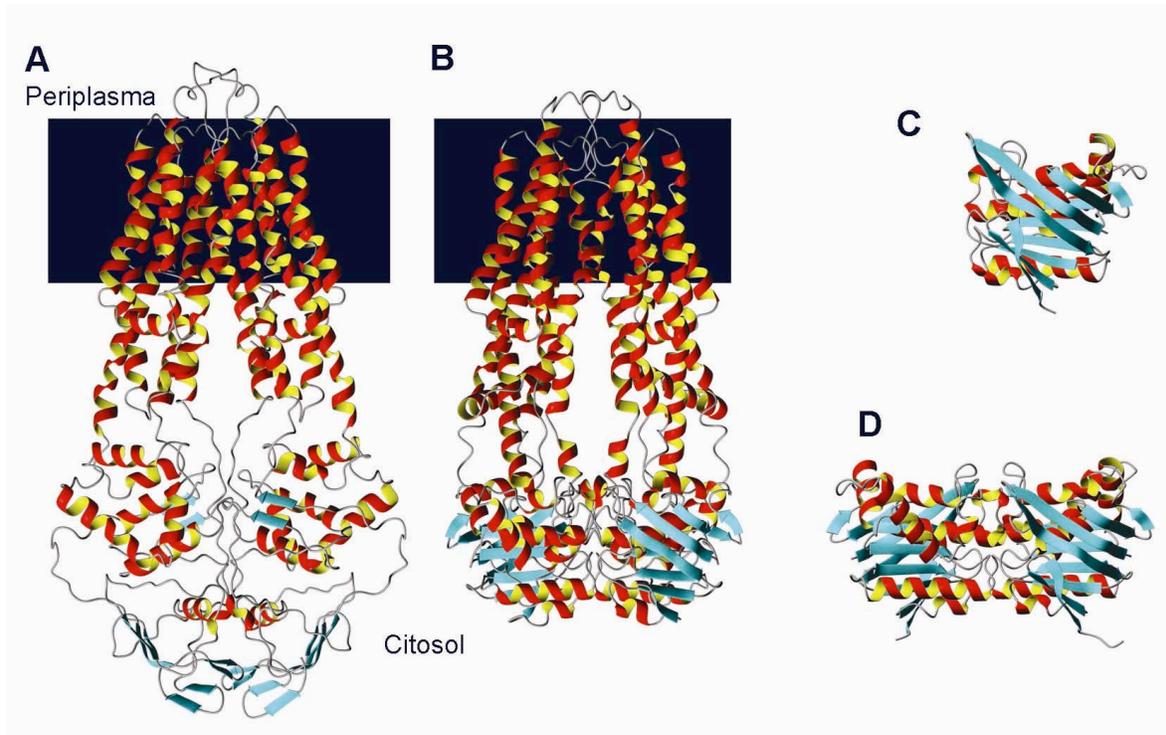
Como se mencionó con anterioridad, no fue posible encontrar un homólogo estructural mediante BLAST, PSI-BLAST o búsqueda de dominios conservados del dominio peptidasa de MceG. Por esta razón se buscó el tipo de plegamiento al que pertenece esta proteína mediante la búsqueda de homólogos de estructura secundaria. Con esta estrategia se determinó que el plegamiento de la estructura 3D de la proteasa del péptido líder del virus de la fiebre aftosa (FMDV) podía ser aplicado al dominio peptidasa, y empleando este molde se modeló la estructura 3D del dominio peptidasa (**Figura 22**).

### **3.5.6 Evaluación de los modelos generados.**

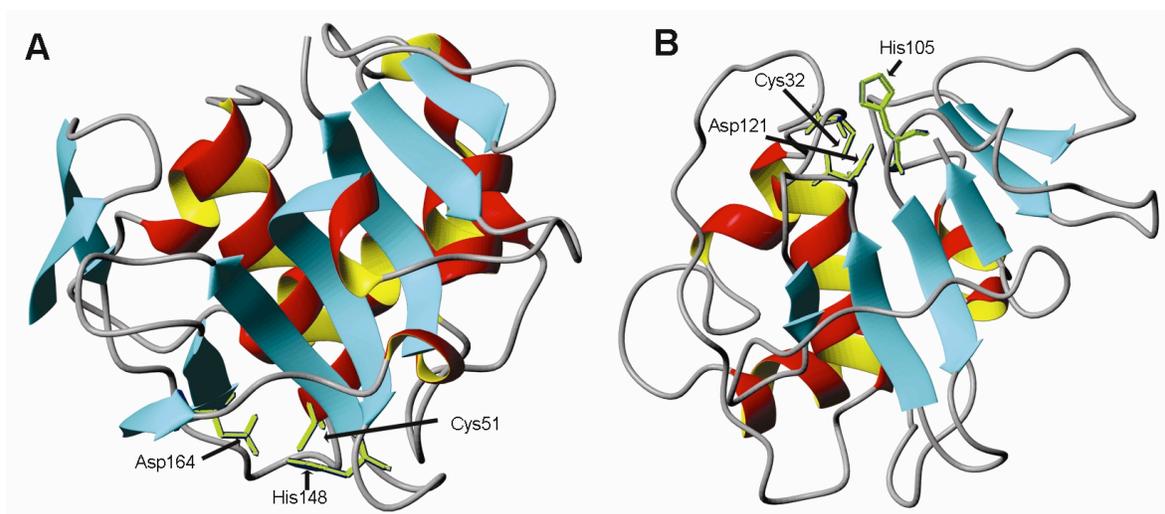
Tanto los modelos de los dominios transmembrana, ABC, y peptidasa se evaluaron mediante VERIFY 3D. Los detalles de este proceso de evaluación así como la descripción detallada del transportador en estado cerrado se muestran en el **Anexo I**.

| Distancias C $\alpha$ -C $\alpha$ entre los residuos de la interfase BtuC-BtuD del transportador BtuCD |              |               | Residuos equivalentes en MceG |            |
|--|--------------|---------------|-------------------------------|------------|
| BtuD (1L7V)  | BtuC (1L7V)  | Distancia (Å) | Dominio ABC                   | Dominio TM |
| T69 (H2)   | G225 (H7-L2) | 4,16          | I562                          | L270       |
| A68 (H2)   | G225 (H7-L2) | 4,35          | N563                          | L270       |
| A72 (H2)   | L224 (H7-L2) | 5,07          | H566                          | K269       |
| Y77 (S6)   | S220 (L2)    | 7,8           | C571                          | F265       |
| Y77 (S6)   | I219 (L2)    | 8,52          | C571                          | Y264       |
| A76 (S6)   | L224 (H7-L2) | 7,53          | A570                          | K269       |
| A76 (S6)   | I219 (L2)    | 10,92         | A570                          | Y264       |
| Q82 (S6-H3)  | G217 (L1-L2) | 7,56          | D576                          | L262       |
| P85 (S6-H3)  | G217 (L1-L2) | 6,86          | F579                          | L262       |

**Tabla VI. Distancias entre los dominios ABC y transmembrana.** Las estructuras hélice-lazo-hélice-lazo-hélice (H-L-H-L-H) de los dominios transmembrana del modelo de MceG y del dominio transmembrana del importador de vitamina B12 (Loche y cols., 2002) fueron superpuestos y se establecieron las equivalencias mediante inspección visual. Luego se establecieron los residuos pertenecientes a la interfase entre BtuC y BtuD y se midieron las distancias entre los C $\alpha$  de la estructura H-L-H-L-H del dominio transmembrana (BtuC) y el dominio y los residuos de la interfase presentes en el dominio ABC (BtuD). Los resultados de estas mediciones se resumen en esta tabla.



**Figura 21. Modelo del transportador de microcina E492 en estado cerrado.** El panel A muestra la estructura del transportador MsbAVc utilizada como template para modelar el dominio transmembrana del transportador MceG en estado cerrado (Panel B). El panel C y D muestra la estructura cristalográfica del monómero y dímero de dominios ABC Mj0796. La información 3D del dominio ABC Mj0796 se utilizó para modelar el dominio ABC de MceG (Panel B). Los rectángulos en negros representan la membrana plasmática.



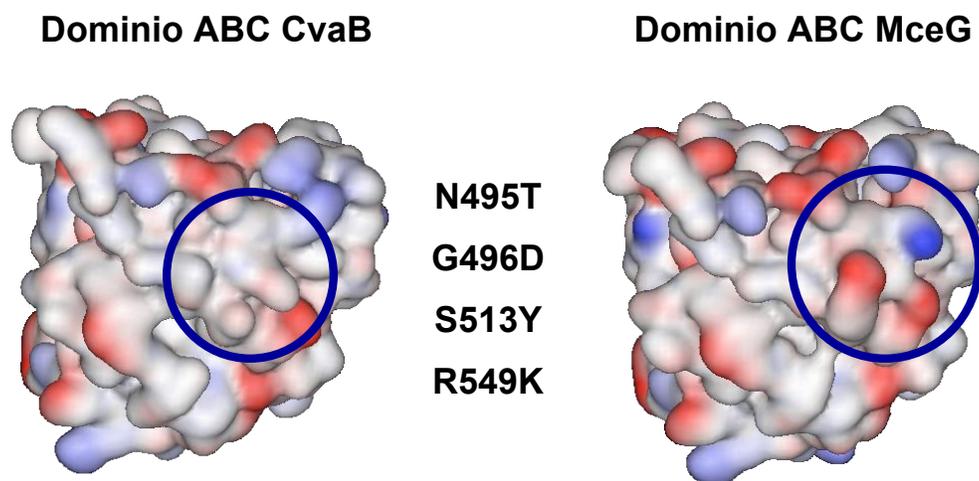
**Figura 22. Modelo del dominio peptidasa del transportador de microcina E492.** El panel A muestra la estructura molde que corresponde a la proteasa del péptido líder del virus de la fiebre aftosa. El panel B muestra el modelo generado a partir de esta estructura. Los residuos catalíticos de cada peptidasa se muestran en color verde. Nótese que los residuos catalíticos se encuentran en caras opuestas de la molécula en las respectivas estructuras.

### **3.6 Las diferencias en el dominio ABC de los exportadores MceG y CvaB se concentran en una región del modelo 3D.**

Los experimentos realizados con los transportadores ABC quiméricos entre los dominios de los transportadores de colicina V y microcina E492 indicaron que el dominio ABC del transportador de colicina es el responsable de la especificidad observada en este transportador. Para ubicar los determinantes moleculares responsables de esta especificidad se utilizó el modelo 3D generado durante esta tesis. La comparación de la secuencia del dominio ABC de los transportadores de microcina E492 y colicina V muestra 12 cambios conservados y 10 cambios no conservados. Con el fin de determinar si estos cambios se ubican en una región específica del dominio ABC, estos residuos se localizaron en el modelo 3D. Esta aproximación indicó que los cambios se encuentran distribuidos en la superficie del dominio ABC, pero 4 de los cambios no conservados se encuentran en una región del subdominio F1-ATPasa que participa en la unión del nucleótido. Estos cambios corresponden a N495T, G496D, S513Y y R549K donde el primer residuo corresponde al aminoácido presente en CvaB, el número corresponde al residuo y la segunda letra corresponde a la identidad del residuo en MceG. Una explicación que da cuenta de la especificidad es que, esta región a través de su interacción con la microcina E492 o colicina V modula la dimerización de los dominios ABC y así el proceso de exportación (**Figura 23**).

### **3.7 Estudio de la región C-terminal de MceG y su relación con el procesamiento de la microcina E492.**

Como se mencionó anteriormente, el último paso en la construcción de un modelo es la validación de éste. Los modelos pueden ser validados por métodos bioinformáticos (**ver Anexo I**) o por su capacidad de predecir o interpretar correctamente resultados experimentales que relacionan la estructura y la función. Con el fin de probar el modelo 3D se analizó la participación de los últimos cuatro aminoácidos en la exportación de colicina V y microcina E492.



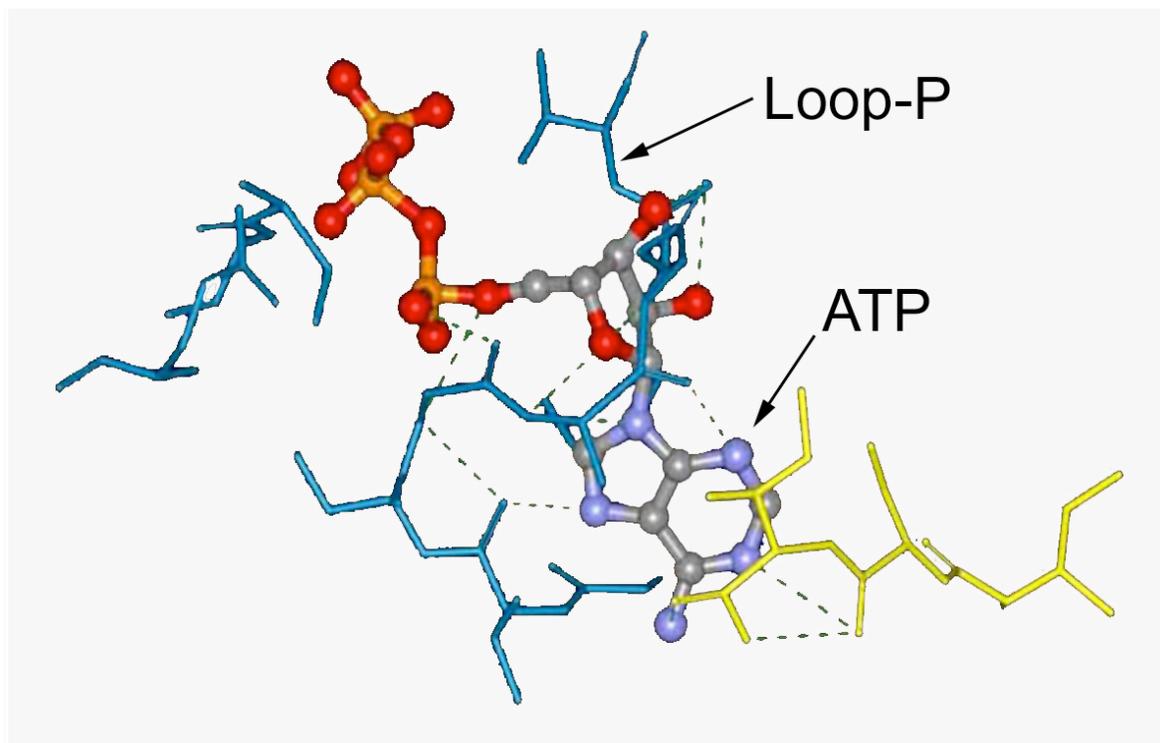
**Figura 23. Comparación de los dominios ABC del transportador de microcina E492 y colicina V.** La figura muestra los potenciales electrostáticos de superficie de los dominios ABC del transportador de colicina V (recuadro izquierdo) y del transportador de microcina E492 (recuadro derecho). El círculo azul destaca la región donde se concentran las diferencias entre ambos dominios. Estos cambios corresponden a  $N^{CvaB}495T^{MceG}$ ,  $G^{CvaB}496D^{MceG}$ ,  $S^{CvaB}513Y^{MceG}$ ,  $R^{CvaB}549K^{MceG}$ .

Los resultados presentados en esta tesis indican que el cambio de la secuencia del C-terminal de MceG (TISI a CP) en la mutante pJRS1 impide la exportación de la microcina E492. Cuatro posibles escenarios podrían explicar este fenotipo: 1) la presencia de cisteína y prolina afectarían la función del transportador por una alteración en la estructura secundaria o en la formación de puentes di-sulfuros; 2) los últimos cuatro aminoácidos serían necesarios para el reconocimiento de la microcina E492; 3) la alteración del dominio C-terminal impediría la función del dominio transmembrana o peptidasa; y 4) la estructura que conforman estos últimos cuatro aminoácidos sería esencial para la actividad del transportador. El modelo predice que la estructura que conforman estos últimos cuatro aminoácidos está en contacto con el “loop-P” y el nucleótido. De esta manera la modificación de esta secuencia alteraría la unión de ATP impidiendo el transporte (**Figura 24**).

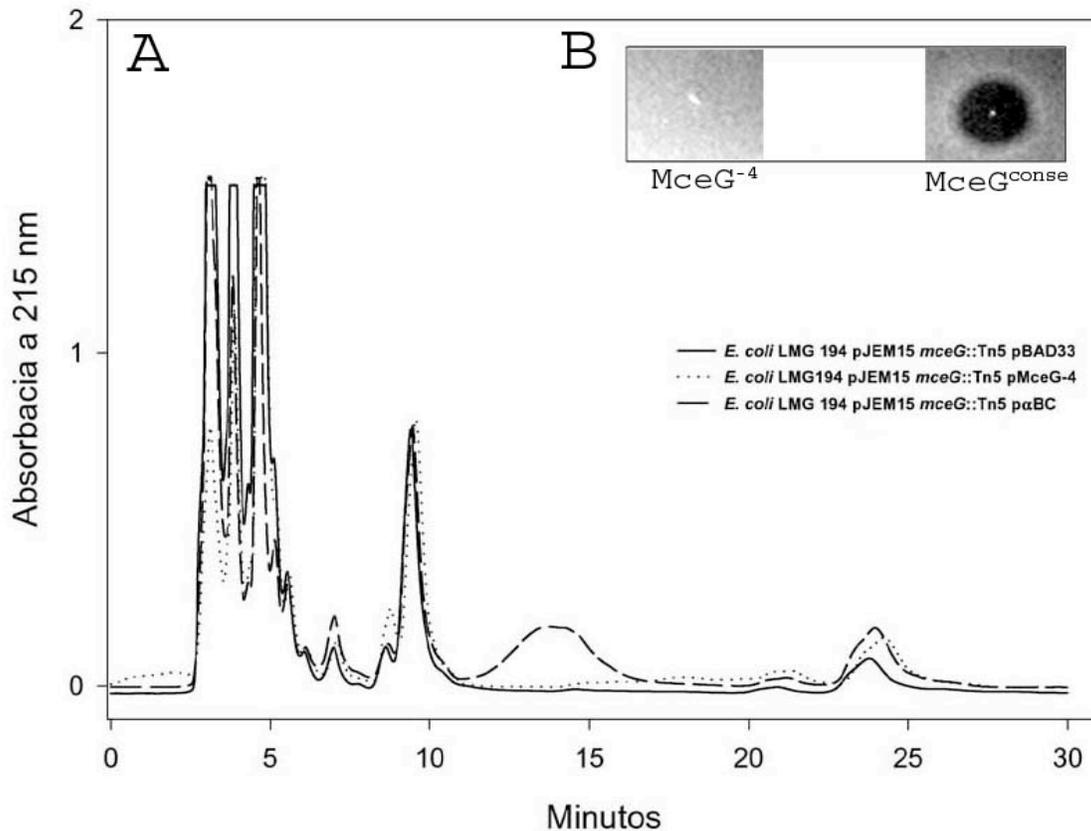
El modelo también predice que la eliminación de los últimos cuatro aminoácidos debería impedir la exportación de microcina E492. El reemplazo de los últimos cuatro aminoácidos por una secuencia distinta pero que forme la misma estructura debería producir un fenotipo productor de microcina E492. Para comprobar si el modelo predice adecuadamente la función de los últimos cuatro aminoácidos se generaron las construcciones pMceG-4 (carente de los últimos cuatro aminoácidos) y pMceG<sup>conse</sup> que reemplaza los últimos cuatro aminoácidos TISI por la secuencia consenso IIVL. La producción de microcina E492 activa se analizó a través de la formación de halos de inhibición de crecimiento y HPLC. Los resultados de estos experimentos indican que la construcción trunca es incapaz de exportar microcina E492, en cambio la construcción MceG<sup>conse</sup> exporta microcina E492 activa (**Figura 25**). Estos resultados muestran que la estructura que conforman los últimos cuatro aminoácidos es importante para el buen funcionamiento del transportador y que el modelo predice adecuadamente su función.

### **3.8.1 Interacción del dominio peptidasa con los otros dominios del transportador.**

El primer modelo del transportador en estado cerrado sólo contemplaba los dominios transmembrana y ABC. Aunque es posible modelar el dominio peptidasa en forma independiente no existe información que permita determinar como el dominio peptidasa interactúa con el resto de los dominios del transportador de microcina E492.



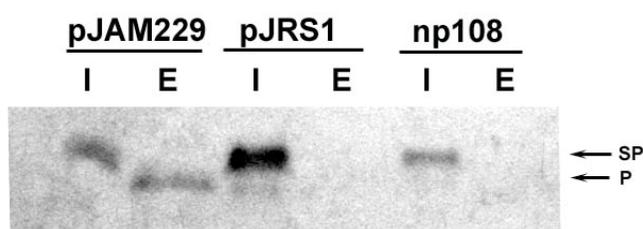
**Figura 24. Modelo de la región C-terminal de MceG.** La figura muestra las interacciones entre los último cuatro aminoácidos del transportador de microcina E492 (residuos en amarillo) con la base nitrogenada de la molécula de ATP (en azul y gris). En azul se representan los residuos S<sup>631</sup> (trans), Q<sup>634</sup> (trans) pertenecientes al “Signature Motif” y los residuos T<sup>527</sup>SGAK<sup>532</sup> pertenecientes al Loop-P. Las líneas punteadas representan los puentes de hidrógeno.



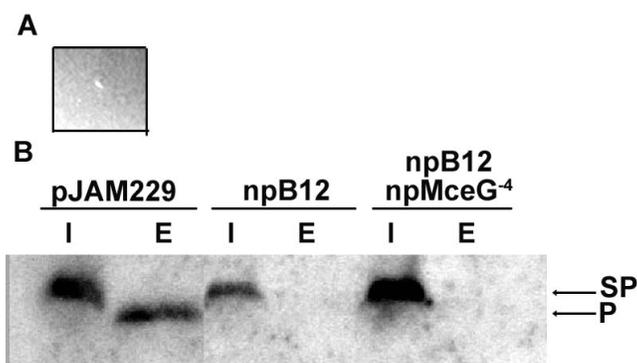
**Figura 25. El extremo C-terminal de MceG es fundamental para la exportación de microcina E492.** El panel A muestra los perfiles de HPLC de sobrenadantes de cultivos de células mutantes en *mceG*, complementadas con la construcción pMceG-4, pαBC (control positivo) y pBAD33 (control negativo). El pico correspondiente a la microcina E492 se ubica en el minuto 14 del cromatograma. El panel B muestra un ensayo de formación de halos de inhibición de crecimiento sobre un césped sensible a la microcina E492 de mutantes en *MceG* complementadas con pMceG<sup>-4</sup> y pMceG<sup>conse</sup>.

Experimentos realizados con los transportadores de colicina V y lactococina muestran que mutaciones en el dominio peptidasa impiden la exportación. Sin embargo, se desconoce si el dominio ABC modula de alguna manera la actividad del dominio peptidasa. Con el fin de investigar si mutaciones en el dominio ABC alteran la actividad peptidasa se analizó el estado del procesamiento de la microcina intracelular en las mutantes en el dominio ABC (pJRS1, np108, MceG<sup>-4</sup>). Las primeras mutantes analizadas correspondieron al transportador de microcina E492 presente en las construcciones pJRS1 y np108. Ambas construcciones presentan un dominio peptidasa intacto y un dominio ABC mutante en los últimos cuatro aminoácidos (pJRS1) o carente de todo el dominio ABC (np108). Como control se analizó el estado de la microcina intracelular de cepas que contienen el plasmidio pJAM229. El resultado de estos experimentos indica que en la cepa control y en la cepa que contiene la construcción np108 la microcina E492 se acumula en una forma no procesada y no es posible detectar microcina E492 procesada. Por otra parte en la cepa que contiene al plasmidio pJRS1 se detecta mayoritariamente la forma no procesada y una pequeña cantidad de microcina procesada (**Figura 26**).

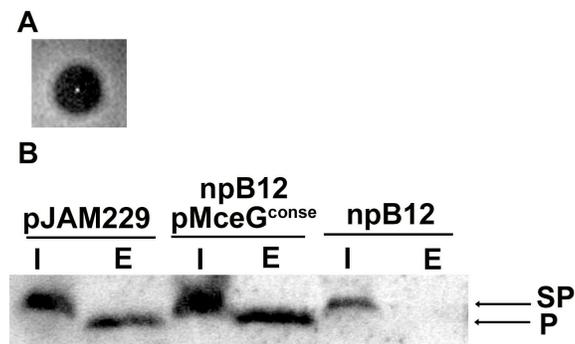
También se analizó si este mismo fenotipo se observa con una versión trunca del transportador (MceG<sup>-4</sup>), y en la construcción que porta la secuencia consenso (MceG<sup>conse</sup>). Los resultados de estos experimentos muestran que la microcina presente en extractos celulares totales de las cepas que expresan el transportador MceG<sup>-4</sup> se encuentra bajo la forma no procesada, indicando que los últimos cuatro aminoácidos son necesarios para el procesamiento y exportación de microcina E492, en tanto que la microcina presente en el extracto celular total de la cepa que contiene a la construcción MceG<sup>conse</sup> se encuentra sin procesar al igual que la microcina de la cepa silvestre. Sin embargo, a diferencia de la cepa que contiene la construcción MceG<sup>-4</sup>, la construcción MceG<sup>conse</sup> es capaz de exportar microcina E492 al espacio extracelular (**Figuras 27 y 28**). Estos resultados apuntan a que existe una coordinación entre el procesamiento y exportación de microcina E492, y que ambos procesos requieren que el dominio ABC se encuentre completamente funcional. Esta relación podría explicarse por la interacción física entre el dominio ABC y el dominio peptidasa. Si esta hipótesis es verdadera, se espera que mutaciones en el dominio peptidasa también impidan la exportación. Basados en estos antecedentes se decidió estudiar en detalle el sitio activo del dominio ABC utilizando el modelo molecular.



**Figura 26. Estado de procesamiento del péptido líder de la microcina intracelular.** Para determinar si el dominio peptidasa procesa la microcina que se acumula en el citoplasma se realizaron ensayos de western blot. La figura muestra un western blot de extractos totales (I) y del sobrenadante (E) de cultivos de las mutantes np108 y pJRS1. Como control se usó la cepa que porta al plasmidio pJAM229. SP, microcina sin procesar; P, microcina procesada.



**Figura 27. Participación de los residuos TIS1 del transportador MceG en el procesamiento y exportación de la microcina E492.** El panel A muestra el fenotipo productor de halos de inhibición de crecimiento de mutantes en *mceG* complementadas con la construcción *pMceG<sup>-4</sup>* (que porta una versión trunca del transportador de microcina). El panel B corresponde a un western blot de extractos celulares totales (I) y sobrenadantes (E) de cultivos de *pJAM229* (control positivo), *npB12* (control negativo) y *npB12* complementada con *pMceG<sup>-4</sup>*. SP, microcina sin procesar; P, microcina procesada.



**Figura 28. Reemplazo del C-terminal de MceG por una secuencia de consenso.** El panel A muestra el fenotipo productor de halos de inhibición de crecimiento de mutantes en *mceG* complementadas con la construcción *pMceG<sup>conse</sup>* (que porta una versión del transportador de microcina en la cual se ha reemplazo la secuencia TISI por la secuencia consenso IIVL). El panel B corresponde a un western blot de extractos celulares totales (I) y sobrenadantes (E) de cultivos de *pJAM229* (control positivo), *npB12* (control negativo) y *npB12* complementada con *pMceGconse*. SP, microcina sin procesar; P, microcina procesada.

### 3.8.2 Potencial sitio activo del dominio peptidasa de MceG.

El dominio peptidasa presente el transportador de microcina MceG corresponde al dominio pfam 03412.10. Este dominio peptidasa se encuentra conservado en los transportadores de colicina V, microcina H47, L, M y en los transportadores ABC de bacteriocinas y factores de “quorum sensing” de bacterias gram positivo. Los residuos de C32 y H105 del transportador de colicina V son esenciales para la actividad proteolítica de este dominio (**Wu y Tai, 2004**). El análisis de la secuencia de los dominios peptidasa de las 38 proteínas con las cuales fue construido indicó que cinco de ellos no presentan la cisteína catalítica. Esto se debe a que en la construcción de los dominios pfam incluye proteínas hipotéticas sin actividad biológica comprobada experimentalmente.

Al eliminar estas proteínas del alineamiento, los residuos del dominio peptidasa de MceG Q26, C32, H105, D121 y P122 se encuentran 100% conservados entre otros miembros de la familia peptidasa C39 (**Figura 29A**). Debido a que mutaciones en el residuo de cisteína del dominio peptidasa de CvaB y del transportador de lactocina causan la pérdida de la actividad proteolítica se cree que las proteínas que presentan este dominio pertenecen a la familia de las cisteína proteasas. Las cisteína proteasas ejercen su actividad catalítica a través de una triada conformada por residuos Cys, His y Asp. La estructura templado utilizada para modelar al dominio peptidasa también es una cisteína proteasa cuya triada catalítica está conformada por C51/H148/D163. En el caso del dominio peptidasa del transportador de colicina V, los residuos C32 y H105 son indispensables para su actividad proteolítica y se cree que forman parte del sitio activo, sin embargo el tercer residuo de esta triada aún no se encuentra identificado. Estos residuos también se encuentran conservados en MceG, lo cual sugiere fuertemente que estos residuos cumplen la función recién mencionada. Para probar el modelo del dominio peptidasa se localizaron los residuos de C32 e H105 en la estructura 3D, y si el modelo es correcto estos residuos del sitio activo deberían ubicarse uno frente a otro formando una triada. El resultado de este análisis indicó que los residuos C32 e H105 se encuentran enfrentados cumpliendo el requisito mínimo para ejercer catálisis. Además se observó que vecino a estos aminoácidos se localiza el residuo D121 (**Figura 29B**), el cual se encuentra conservado en otras proteínas que presentan este dominio peptidasa.

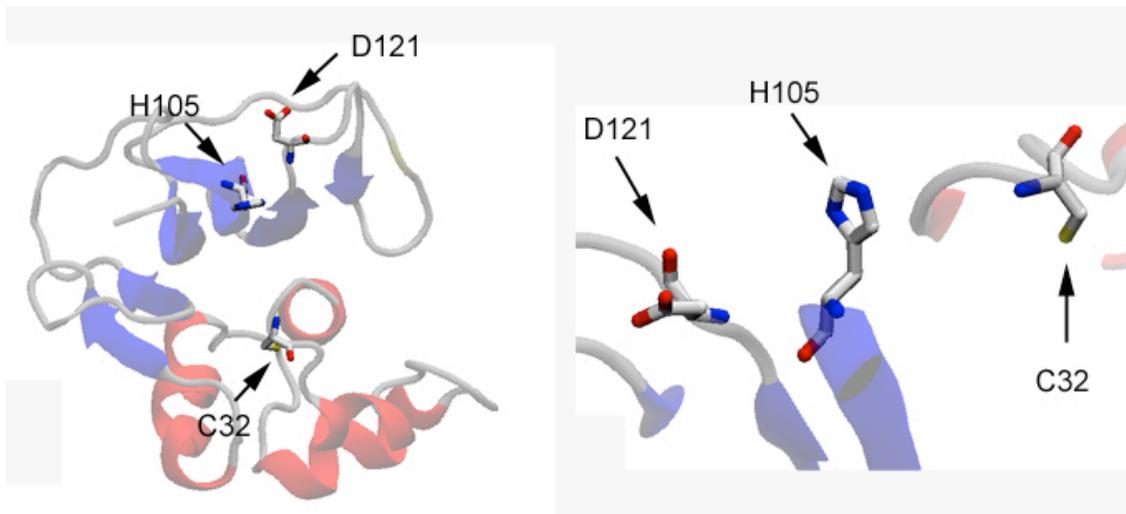
A

Coma (S. pneumoniae)  
 MesD (L. mesenteroides)  
 LncC (L. lactis)  
 Aopt (L. salivarius)  
 Sapt (L. sakei)  
 Sppt (L. sakei)  
 PhnG (L. plantarum)  
 Lin F (L. johnsonii)  
 PapD (P. acidilactici)  
 EntF (E. faecium)  
 CbaT (C. piscocola)  
 LagD (L. lactis)  
 SxtL (L. sakei)  
 SnnB (B. subtilis)  
 MIB (E. coli)  
 MceG (K. pneumoniae)  
 MchF (E. coli)  
 MclB (E. coli)  
 CvaB (E. faecalis)  
 SntT (S. pyogenes)  
 SntT (S. pyogenes)  
 LetT (L. lactis)  
 MutT (S. mutans)  
 RumT (R. granus)  
 CybB (L. lactis)  
 MstB (B. subtilis)  
 SstT (S. salivarius)

181  
 180  
 179  
 178  
 177  
 176  
 175  
 174  
 173  
 172  
 171  
 170  
 169  
 168  
 167  
 166  
 165  
 164  
 163  
 162  
 161  
 160  
 159  
 158  
 157  
 156  
 155  
 154  
 153  
 152  
 151  
 150  
 149  
 148  
 147  
 146  
 145  
 144  
 143  
 142  
 141  
 140  
 139  
 138  
 137  
 136  
 135  
 134  
 133  
 132  
 131  
 130  
 129  
 128  
 127  
 126  
 125  
 124  
 123  
 122  
 121  
 120  
 119  
 118

Coma (S. pneumoniae)  
 MesD (L. mesenteroides)  
 LncC (L. lactis)  
 Aopt (L. salivarius)  
 Sapt (L. sakei)  
 PhnG (L. plantarum)  
 Lin F (L. johnsonii)  
 PapD (P. acidilactici)  
 EntF (E. faecium)  
 CbaT (C. piscocola)  
 LagD (L. lactis)  
 SxtL (L. sakei)  
 SnnB (B. subtilis)  
 MIB (E. coli)  
 MchF (E. coli)  
 CvaB (E. faecalis)  
 SntT (S. pyogenes)  
 SntT (S. pyogenes)  
 LetT (L. lactis)  
 MutT (S. mutans)  
 RumT (R. granus)  
 CybB (L. lactis)  
 MstB (B. subtilis)  
 SstT (S. salivarius)

236  
 235  
 234  
 233  
 232  
 231  
 230  
 229  
 228  
 227  
 226  
 225  
 224  
 223  
 222  
 221  
 220  
 219  
 218  
 217  
 216  
 215  
 214  
 213  
 212  
 211  
 210  
 209  
 208  
 207  
 206  
 205  
 204  
 203  
 202  
 201  
 200  
 199  
 198  
 197  
 196  
 195  
 194  
 193  
 192  
 191  
 190  
 189  
 188  
 187  
 186  
 185  
 184  
 183  
 182  
 181  
 180  
 179  
 178  
 177  
 176  
 175  
 174  
 173  
 172  
 171  
 170  
 169  
 168  
 167  
 166  
 165  
 164  
 163  
 162  
 161  
 160  
 159  
 158  
 157  
 156  
 155  
 154  
 153  
 152  
 151  
 150  
 149  
 148  
 147  
 146  
 145  
 144  
 143  
 142  
 141  
 140  
 139  
 138  
 137  
 136  
 135  
 134  
 133  
 132  
 131  
 130  
 129  
 128  
 127  
 126  
 125  
 124  
 123  
 122  
 121  
 120  
 119  
 118

**B**

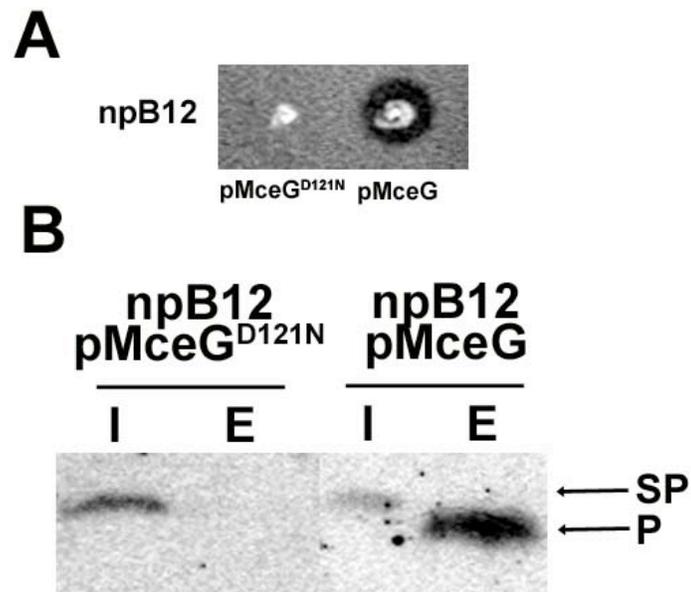
**Figura 29. Sitio activo del dominio peptidasa del transportador de microcina E492.** El panel A (Página anterior) muestra un alineamiento múltiple entre los dominios peptidasa de transportadores ABC que realizan el procesamiento del péptido líder. Todos estos transportadores se encuentran caracterizados experimentalmente y participan en la exportación de péptidos con señal de exportación en el extremo amino. En cuadro amarillo con letras rojas se destacan los residuos 100 % conservados y en celeste los residuos conservados en mas de un 50 %. El panel B muestra una vista frontal (izquierda) y lateral (derecha) de los residuos C32, H105 y D121 que conforman la posible triada catalítica.

Al comparar la distribución de los residuos catalíticos de MceG<sup>pep</sup> con la líder peptidasa FMDV, se observa que en ambos casos se encuentra formando un plano, aunque en caras opuestas (**Figura 22**). Para comprobar si el residuo D121 participa en el procesamiento y exportación de la microcina E492 se realizó una mutación sitio dirigida en el transportador de microcina, cambiando el residuo D121 de aspártico a asparragina (D121N). Los resultados de este experimento indican que la mutación puntual D121N en el transportador MceG anula el procesamiento y exportación de la microcina E492, indicando que el modelo 3D del dominio peptidasa predice adecuadamente su función (**Figura 30**).

### **3.9 Ensamblaje de los tres dominios del transportador MceG.**

Los resultados anteriores sugieren que los dominios peptidasa y ABC se comunican entre si. Esta comunicación debe ser a través de la interacción física pues ambos dominios distan a más de 200 aminoácidos en la secuencia lineal de la proteína. De esta manera el modelo completo del transportador de MceG debe dar cuenta de las interacciones entre los tres dominios. Para lograr un modelo de MceG que incluyera los tres dominios, ABC, transmembrana y peptidasa, se decidió estudiar la superficie del modelo del dominio peptidasa y de los dominios ABC del transportador en estado cerrado. Dos criterios se utilizaron para proponer el sitio donde el dominio peptidasa interactúa con el resto del transportador. El primer criterio utilizado dice relación con la superficie de interacción entre los dominios.

Esta superficie de interacción debe contener elementos que permitan la unión entre el dominio peptidasa y el resto del transportador (ej. complementariedad electrostática). La superficie de interacción además debería cumplir un segundo criterio, y que es de carácter topológico, pues la región donde se produce la interacción debería acomodar espacialmente al dominio peptidasa.

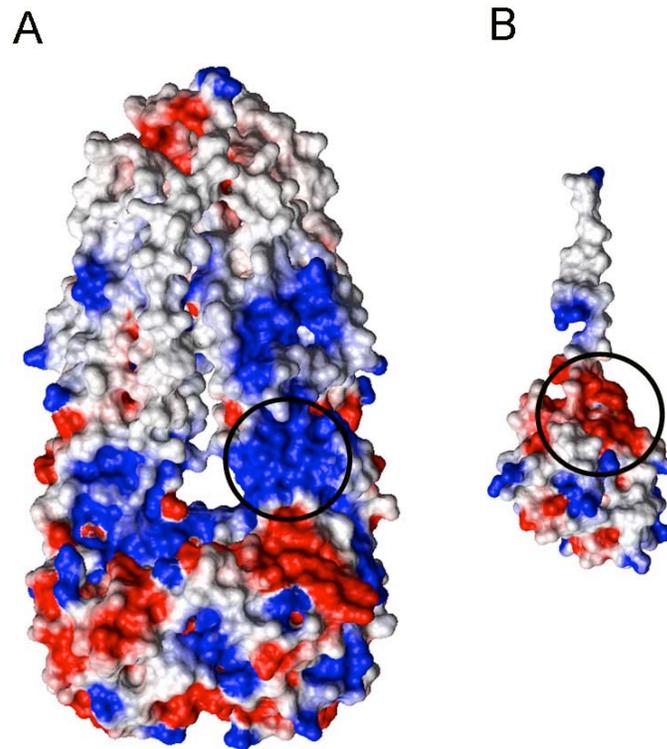


**Figura 30. La mutación D121N en el dominio peptidasa de MceG anula el procesamiento y exportación de la microcina E492.** El panel A muestra el fenotipo productor de halos de inhibición de crecimiento de mutantes en *mceG* complementadas con la construcción pMceG y pMceGD121N. El panel B muestra un western blot de extractos celulares totales (I) y sobrenadantes (E) de cultivos de npB12 complementada con pMceGD121N y pMceG. SP, microcina sin procesar; P, microcina procesada.

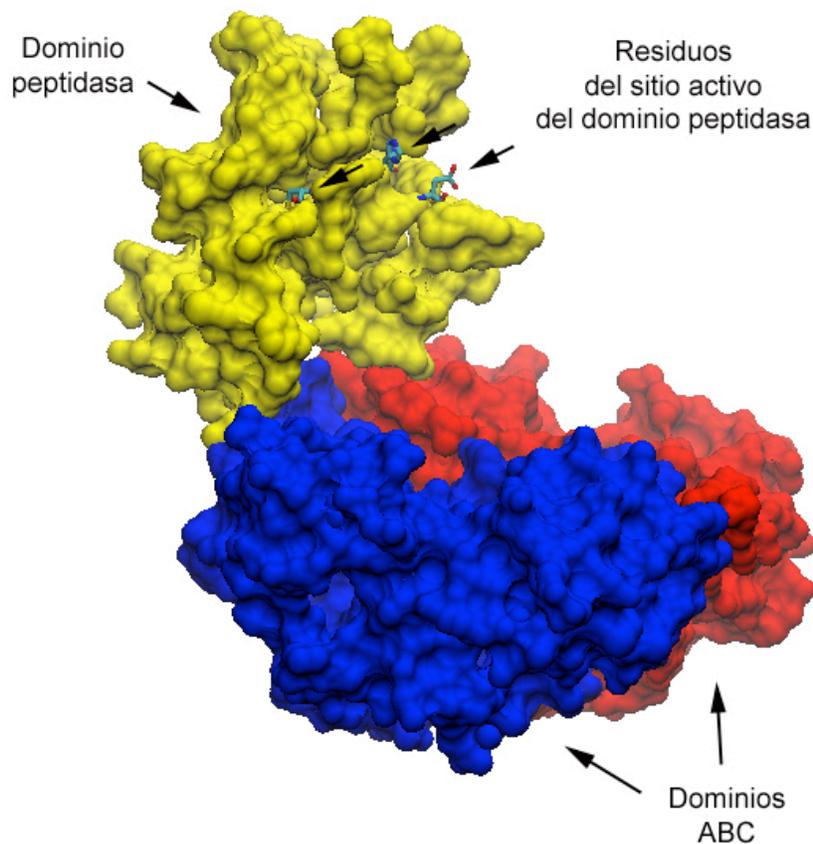
El estudio de la superficie de los dominios peptidasa y el resto del transportador indicó que el dominio peptidasa presenta un parche de cargas negativas cerca de su base. Por otra parte, el modelo en estado cerrado de los dominios ABC y transmembrana presenta un parche de cargas positivas en la región que comunica el dominio transmembrana y ABC, y este parche presenta una continuidad a través de ambos dominios ABC que forman el dímero. Esta región de cargas positivas se encuentra cerca del sitio donde comienza el dominio transmembrana y además conforma una cavidad que acomoda el dominio peptidasa. Basados en estas características se modeló el transportador completo utilizando como restricción la interacción entre cargas negativas y positivas del dominio peptidasa y los dominios transmembrana-ABC (**Figura 31**).

Este conjunto de estrategias permitió generar un modelo 3D completo de MceG. En este modelo el dominio peptidasa se encuentra en contacto con el dominio ABC lo que explica la comunicación que existe entre ambos dominios (**Figura 32**).

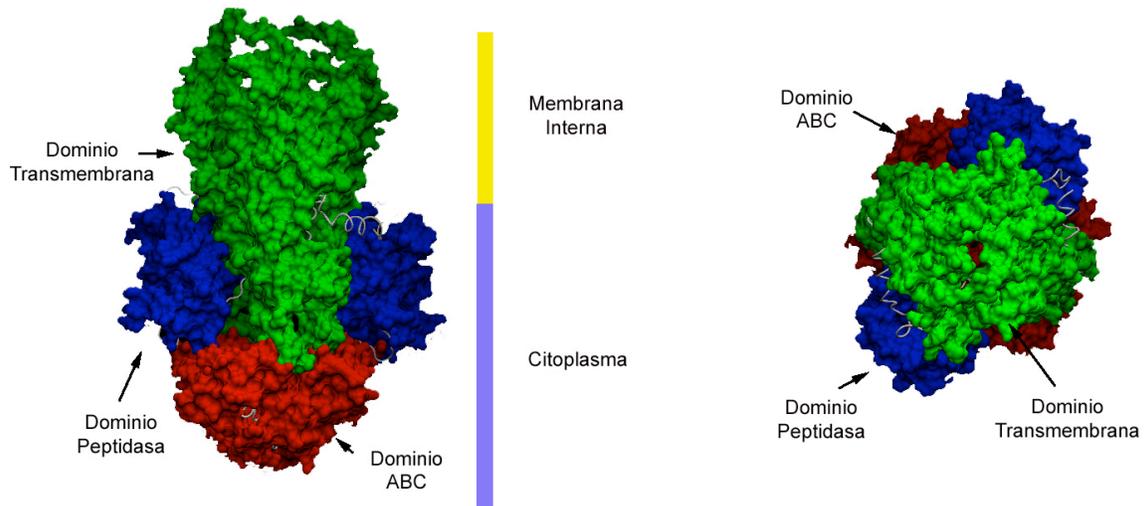
El modelo de MceG describe un transportador en estado dimérico con tres dominios por monómero, y en este modelo el dominio peptidasa interactúa con los dominios transmembrana y ABC de su propia cadena, así como con los dominios transmembrana y ABC de la otra cadena que conforma el dímero. En este transportador el dominio transmembrana conforma un canal a través de la membrana interna que se encuentra bloqueado en su extremo inferior por el dímero de dominios ABC. Por otra parte la cavidad conformada por los dominios transmembrana se comunica con el citoplasma a través de una puerta que esta adyacente al dominio peptidasa (**Figura 33**).



**Figura 31. Análisis de los potenciales electrostáticos de superficie del exportador MceG.** El panel A muestra los potenciales electrostáticos de superficie de los dominios transmembrana y ABC en estado cerrado. El panel B muestra los potenciales electrostáticos de superficie del modelo del dominio peptidasa de MceG. En el círculo negro se destacan las regiones de complementariedad topología y electrostática. El color rojo representa potenciales con carga negativa y en azul se representan los potenciales con carga positiva.



**Figura 32. Interacción del dominio peptidasa con el dominio ABC.** La figura muestra la interacción del dominio peptidasa con los dominios ABC del transportador de microcina. En azul y rojo se representan los dominios ABC en estado de dímero. En amarillo se representa uno de los dos dominios peptidasa. Los residuos del sitio activo del dominio peptidasa se señalan mediante flechas. Para una mejor visualización en esta representación se han omitido los dominios transmembrana y uno de los dos dominios peptidasa.



**Figura 33. Modelo completo del transportador de microcina E492 en estado cerrado.** La figura de la izquierda muestra una visión frontal del modelo 3D de MceG. La franja de color amarillo representa la región que está incluida en la membrana interna y la franja azul la región citoplasmática del transportador. La figura de la derecha muestra una visión apical del transportador. En azul se representa el dominio peptidasa, en verde el dominio transmembrana y en rojo el dominio ABC.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Especificidad del transporte.

El objetivo central de esta tesis fue investigar cuales son los determinantes que confieren especificidad en los transportadores ABC. Para ello se utilizó el modelo microcina E492-colicina V por compartir sus exportadores sobre un 90 % de similitud, pero a su vez no tener exportación recíproca de sus bacteriocinas. Evidencia previa indicaba que existía una relación entre el gen *mceF*, la producción de microcina E492 y la especificidad de transporte. Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la incapacidad de mutantes por delección en el gen *mceF* (pJRS1 y pC1) se debe a una mutación que produce una alteración en los últimos cuatro aminoácidos del transportador microcina E492. Esta alteración impide tanto la exportación de colicina V como de microcina E492. A pesar de descartar la participación de MceF en la especificidad de exportación, se investigó cual podría ser la función de esta proteína en la producción de microcina E492. El gen que codifica para MceF se encuentra conservado en los sistemas productores de microcina M y H47, por lo tanto es probable que participe de alguna manera en la producción de microcina. Para probar la participación de MceF en la producción de microcina E492 se construyeron mutantes en el gen *mceF* mediante corte y pegado con enzimas de restricción y reparando el extremo del C-terminal del transportador de microcina E492. Ambas estrategias demostraron que el gen *mceF* es prescindible para la producción de microcina E492 activa. Sorprendentemente, la presencia o expresión del gen *mceF* parece estar inversamente correlacionada con la actividad de la microcina E492, pues los experimentos de co-expresión de mutantes carentes del gen *mceF* con plasmidios que expresan al gen *mceF* bajo el promotor que posee en pJAM434 disminuyen la actividad de los extractos de microcina E492.

El análisis de la secuencia del gen *mceF* indica que codifica para una proteasa de la familia de las prenilproteasas. Experimentos en el laboratorio mostraron que cepas incapaces de exportar microcina E492 presentan pérdida de inmunidad en fase estacionaria. Se demostró que esta pérdida depende de la acumulación de microcina al interior de la célula productora y que la inmunidad se recobra sobreexpresando la proteína de inmunidad (Corsini, 2004). Basados en estos antecedentes se postuló que la proteasa

para la cual codifica el gen *mceF* podría degradar a la proteína de inmunidad. Cuando se co-expresó el gen *mceF* junto con un plasmidio que porta a los genes *mceBA* se pierde en un 100% la inmunidad en fase estacionaria, sin embargo, si solo se co-expresa en presencia de MceB la cepa resulta ser inmune en ambas fases de crecimientos. El hecho que *mceF* actúe como un regulador negativo de la proteína de inmunidad explica por qué cepas que tienen aumentada la expresión de *mceF* producirían menos microcina activa, pues la producción de microcina resultaría tóxica. Otro antecedente a tomar en cuenta es la disposición del gen *mceF*, que se encuentra enfrentado en orientación divergente a 200 pb del gen *mceK*. Estos mensajeros podrían apagarse mutuamente mediante antisentido, al igual como ocurre con el mecanismo de regulación del número de copias de los plasmidio ColE1 (**Carpousis, 2003**). De esta forma un aumento en la expresión de los genes *mceHG* traería por consecuencia una disminución en la tasa de traducción del gen *mceF* aumentando la producción de microcina activa. Por el contrario una aumento en transcripción del gen *mceF* (como en pJAM434) traería por consecuencia un aumento de la actividad tóxica de la microcina, especialmente al inicio de la fase estacionaria donde la microcina alcanza su mayor actividad, regulando negativamente su propia producción. Esto implica que MceF puede actuar como un sistema de chequeo de la integridad del sistema productor de microcina E492, detectando mutaciones que impidan la transcripción del operón *mceJIHG* y reduciendo la viabilidad de estas mutantes que aumentan su sensibilidad a la microcina extracelular e intracelular. Esta explicación también da cuenta de por qué mutantes por transposición en los genes *mJIHG* presenta una menor tasa de crecimiento.

Debido a que *mceF* no era el responsable de la especificidad de los transportadores de microcina E492, se analizó la especificidad de transporte mediante una estrategia que consistió en la generación de sistemas de exportación híbridos. Esta estrategia tomó ventaja del alto porcentaje de identidad entre los sistemas de exportación de microcina E492 y colicina V lo cual permitió encontrar regiones mayores de 20 pb con un 100 % de identidad entre ambos sistemas. La estrategia consistió en utilizar estas regiones como segmentos que permitieran el alineamiento entre dos productos PCR de tal manera que cada uno actúe como partidor del otro. Esta estrategia permitió generar sistemas híbridos combinando la proteína accesoria de un sistema de exportación con el transportador ABC del otro sistema, y conservar la estequiometría entre la proteína accesoria y el transportador. Ambos genes se ubican bajo el control del mismo promotor y

respetan los sitios de inicio de traducción naturales, de tal manera de impedir una sobreexpresión que podría conducir a generar artefactos. A este respecto se ha reportado que la sobreexpresión de proteínas de membrana interna como los transportadores ABC es generalmente tóxica para la célula. Para evitar esta situación y mejorar la probabilidad de clonar estas construcciones, se escogió utilizar el vector de expresión pBAD33 (**Guzmán y cols, 1995**) que permite regular fuertemente la transcripción de los genes clonados, pues es posible reprimir la transcripción con glucosa, sobreexpresar agregando arabinosa o permanecer en una transcripción basal al agregar como fuente de carbono aminoácidos o glicerol. Para analizar inicialmente la exportación se utilizó la formación de halos de inhibición de crecimiento sobre césped sensibles a microcina E492 y colicina V. Esta técnica es extremadamente sensible a la producción de bacteriocina permitiendo detectar cantidades inferiores a tres picogramos de microcina lo que corresponde a alrededor de  $3,6 \times 10^{-16}$  moles de microcina ( $2,2 \times 10^8$  moléculas). Si suponemos que una colonia posee alrededor de  $10^8$  células, este método detectaría la exportación de 2 moléculas de microcina activa por célula.

Se estableció que el transportador CvaB de colicina no complementa a *mceG*. Este resultado no produce sorpresa, pues ha sido ampliamente descrito que el transportador ABC es la proteína que selecciona la molécula a exportar (**Holland y cols., 2005**). Sin embargo, lo hace un modelo ideal para estudios de especificidad de transporte desde la perspectiva del transportador ABC, pues los transportadores ABC que exportan distintas proteínas también presentan bajos porcentajes de identidad, y por lo tanto ante esta situación es esperable encontrar especificidad. La alta identidad y la no complementación recíproca de los sistemas de microcina E492-colicina V permitieron usar este modelo para comprender las bases moleculares del transportador para seleccionar y exportar proteínas. Todos los estudios en este ámbito han sido realizados desde la perspectiva de la molécula a exportar, identificando las señales de exportación (**Holland y cols., 2005**). La ubicación de los residuos responsables de la especificidad que exhibe el transportador de colicina V por sus propia bacteriocina fue abordada desde la perspectiva de la estructura modular de los transportadores de microcina E492 y colicina V. La estructura modular de las proteínas parece ser el camino escogido a lo largo de la evolución para construir proteínas con funciones complejas a partir de funciones más simples que pueden ser combinadas como bloques. Esta estrategia evolutiva había sido sugerida con anterioridad, sin embargo intentos previos no habían dado resultado debido

a la amplia diferencia entre los transportadores analizados. Además del alto porcentaje de identidad existente entre los transportadores de microcina E492 y colicina V este sistema permite la rápida evaluación de la funcionalidad de estos transportadores mediante ensayos de complementación sobre césped sensibles. Estos experimentos mostraron que el intercambio del dominio peptidasa produce transportadores capaces de exportar colicina V y microcina E492, indicando que el dominio peptidasa es capaz de procesar ambas bacteriocinas. Este resultado es coherente con el hecho que la zona más conservada entre las pre-proteínas de la microcina E492 y colicina V es la región correspondiente al péptido líder, y también están de acuerdo con los experimentos donde se intercambian los péptido líder de microcina E492 y colicina V que indican que ambos pueden ser utilizados indistintamente por el sistema de exportación de microcina y colicina V (**Castillo, 2003**).

La mayor sorpresa fue descubrir que el dominio ABC estaba involucrado en el reconocimiento de la molécula a exportar. Cuando se intercambia el dominio ABC del transportador de colicina V con el dominio ABC del transportador de microcina E492, se observa que el transportador que posee los dominios peptidasa y transmembrana del transportador de microcina, y el dominio ABC del transportador de colicina V, se comporta como el transportador de colicina V. Es decir, esta construcción no permite la exportación de microcina E492, sin embargo permite la exportación de colicina V, indicando que este híbrido es funcional y específico. Estos resultados fueron inicialmente evaluados mediante la formación de halos de inhibición de crecimiento de la cepa complementada con el transportador híbrido. Como la microcina E492 puede ser exportada en una forma inactiva, en el caso de la complementación negativa fue necesario purificar microcina a partir de cultivos en medio líquido. Para analizar la presencia de microcina se utilizaron geles de SDS-PAGE y HPLC, esta última técnica se escogió pues es más sensible que el método de tinción con fluorescamina y posterior visualización con geles de poliacrilamida. Los resultados de este análisis indicaron que el transportador híbrido no permite la exportación de microcina E492. Este resultado está de acuerdo con los experimentos que indican que el dominio ABC del transportador de hemolisina B interactúa específicamente con la señal de exportación de la hemolisina (**Benabdelhak y cols., 2003**). Es interesante que la señal de exportación (C-terminal) de hemolisina es una región de aproximadamente 60 aminoácidos, rica en glicina, al igual que la microcina E492 y colicina V (**Holland y cols., 2005**). Este hallazgo podría estar relacionado con los

resultados del laboratorio del Dr. Kolter que indican que el transportador de hemolisina puede exportar colicina V (**Fath y cols., 1991**). Es posible que la región rica en glicina del C-terminal de la hemolisina active al dominio ABC para que éste pueda dimerizar. En forma análoga, la secuencia rica en glicina de la colicina V podría realizar esta función.

Uno de los inconvenientes que ha impedido el rápido avance en la determinación de los elementos de especificidad de los sistemas de transporte ABC dedicado es la falta de una estructura cristalográfica obtenida a partir de uno de estos transportadores. El estudio de la estructura de estos transportadores mediante cristalografía de rayos X o NMR se ha dificultado, pues aún no se dispone de buenos métodos para obtener cristales o solubilizar grandes cantidades de proteínas de membrana (**Seddon y cols., 2004**). Actualmente los únicos transportadores ABC cristalizados son los de lípido A y el importador de vitamina B12. Los resultados de esta tesis indican que es el dominio ABC del transportador de colicina V quien selecciona específicamente a su propia bacteriocina. Sin embargo, para seguir profundizando en el mecanismo de especificada era necesario obtener un modelo de alta resolución del transportador de microcina E492 y colicina V.

## 4.2 Modelamiento del transportador MceG.

El modelamiento por homología o modelamiento por comparación, es una herramienta útil para obtener información 3D de proteínas que aun no se encuentran cristalizadas (**Blundell y cols., 1987; Sánchez y Sali, 1998; Sánchez y col., 2000; Marti-Renon, 2000; Centeno y col., 2005**). El modelamiento por comparación utiliza la estructura 3D (determinada experimentalmente) de una proteína (molde) para predecir la estructura de otra proteína (blanco). Esta metodología se basa en que a través de la evolución, la estructura de una proteína es más conservada que la secuencia aminoacídica. De esta forma, proteínas muy parecidas exhiben una estructura casi idéntica y proteínas distantes pueden tener el mismo plegamiento (**Clothia y Lesk, 1986; Lesk y Clothia, 1980**). La limitante de este método es el reducido número de estructuras determinadas experimentalmente, aunque en la actualidad se estima que es posible modelar al menos un dominio en la mitad de las proteínas conocidas (**Piepper y cols., 2002**). Las estimaciones realizadas sobre el número de plegamientos distintos indican que son limitados y muy inferior al número de secuencias (**Liu y cols., 2004**). Dado que existe un mayor número de proteínas que tipos de plegamiento, el paso limitante en la obtención de la estructura 3D de una proteína es reconocer a que tipo de plegamiento pertenece.

Hasta el momento se han descrito varios métodos destinados a encontrar el tipo de plegamiento, entre los cuales destacan los alineamientos simples (**Durbin y cols., 1998**), alineamientos múltiples entre miembros de una familia (**Altschul y cols., 1997**), predicción de patrones de estructura secundaria y generación de perfiles 3D-1D (**Bowie y cols., 1991**). Estos métodos presentan diferentes sensibilidades y se ocupan dependiendo del porcentaje de identidad existente entre la proteína de interés y el molde. En general el método de los alineamientos directos funcionan bien con identidades superiores al 30%; el de los alineamientos múltiples entre miembros de una familia permite lograr buenas asignaciones hasta con un 20% de identidad (**Chakravarty y Sanchez, 2004**); los métodos que incorporan los patrones de estructura secundaria y los perfiles 3D-1D pueden encontrar homólogos con solo un 10% de identidad (**Kelley y cols., 2000**). Es necesario aclarar que a medida que disminuye el porcentaje de identidad empieza a pesar más el porcentaje de similitud, y que estos métodos funcionan bien siempre y cuando el porcentaje de similitud sea superior al porcentaje de identidad. De no ser así, el error aumenta exponencialmente a medida que baja el porcentaje de identidad (**Chakravarty y Sánchez, 2004**).

Para establecer el tipo de plegamiento, se utilizó en forma secuencial los tres primeros métodos. La búsqueda directa mediante BLAST permitió encontrar como homólogo estructural a los transportadores de lípido A que en promedio presentan un 25% de identidad con los dos últimos tercios de MceG. Con un porcentaje parecido se encontraron las proteínas cristalizadas de los dominios ABC. Una excepción correspondió al dominio ABC del transportador de hemolisina, que presenta en promedio un 58% de identidad con el dominio ABC de MceG. Estos porcentajes, con excepción del dominio ABC del transportador de hemolisina, se encuentran en el límite de seguridad del método (**Rost, 1999**). Para tener una adecuada asignación se utilizó el segundo método, que mejora los alineamientos incorporando a diversos miembros de la familia de proteínas a la cual pertenece la proteína de interés y además permite encontrar regiones conservadas (dominios) con otras proteínas (**Chakravarty y cols., 2004; Marchler-Bauer y cols., 2004**). Este método encontró los mismos candidatos y permitió mejorar los alineamientos al permitir sopesar la variabilidad que existen en las regiones menos conservadas. Ambos métodos sólo permitieron asignar un tipo de plegamiento a los dominios transmembrana y ABC. Esto puede ser interpretado como la incapacidad de ambos métodos para detectar homología estructural entre proteínas con porcentajes de identidad menores al 20%. Para

encontrar el plegamiento del dominio peptidasa, se utilizó el método que incorpora los patrones de estructura secundaria tanto de los posibles moldes, como la estructura secundaria predicha para la molécula de interés. Usando esta aproximación encontramos dos posibles moldes, la caspasa-8 y la proteasa del péptido líder del FMVD. Ambas candidatas corresponden a cisteína peptidasas, indicando que este método pudo encontrar al menos una relación funcional entre el molde y el dominio peptidasa. Se escogió como molde la estructura de la proteasa del péptido líder del FMVD privilegiando el porcentaje de similitud y no el de identidad (**Chakravarty y Sánchez, 2004**). El dominio peptidasa fue modelado independientemente, basado en el alineamiento de estructura secundario construido por el servidor 3D-PSSM. Para la construcción de este alineamiento el método evalúa en la proteína de interés el perfil 3D-1D, el patrón de estructura secundaria predicho por el programa PSI-PRED el cual tiene un 77% de certeza (**Jones y cols., 1999**) y la variabilidad observada en cada residuo al construir un grupo de proteínas basados en el alineamiento usando PSI-BLAST a convergencia (**Kelley y cols., 2002**). Además de las estructuras molde, la secuencia blanco y el alineamiento, el programa Modeller 6.2 contempla una serie de herramientas que permiten optimizar el modelo construido. Se decidió utilizar estas herramientas por que permiten agregar información biológica al modelo. Esta información es necesaria para evaluar si el modelo generado da cuenta de sus propiedades ya caracterizadas. Dentro de las herramientas usadas se encuentran las restricciones de distancia para establecer la relación entre las subunidades o entre los monómeros del transportador y la optimización de las cadenas laterales de tal manera de minimizar los impedimentos estéricos. Este conjunto de aplicaciones permite mejorar significativamente el modelo obtenido (**Sali y Blundell, 1993**).

En el modelamiento del transportador en estado abierto se utilizó el transportador de lípido A de *E. coli*. Este transportador es un homodímero, en el cual cada monómero presenta una cadena con un dominio transmembrana y ABC. Esta distribución es la misma observada en los transportadores ABC del sistema de exportación del tipo I y en los factores de multiresistencia a antibióticos y a antineoplásicos. La primera estructura del transportador del lípido A (MsbA) se obtuvo a baja resolución de manera que sólo se logró obtener la posición espacial de los C- $\alpha$ .

Esta estructura ha resultado ser controversial por su baja resolución (**Buchaklian, y cols., 2004; Shilling, y cols., 2003; Campbell, y cols., 2003**), sin embargo el uso de

modelamiento por homología ha permitido realizar estudios estructurales en el transportador de lípido A y de la glicoproteína-P (**Campbell, y cols., 2003; Seigneuret y Garnier-Suillerot, 2003**). Dado que los dominios ABC (dímeros) de este transportador se encuentran separados, se cree que esta molécula representa un estado abierto que no permite la exportación del lípido A. Como la estructura molde sólo presentaba la distribución de los C- $\alpha$ , para generar el modelo fue necesario asignar el resto de los átomos. Esta estrategia ha sido utilizada para generar un modelo de MsbA completo a partir de su misma estructura (**Campbell, y cols., 2003**). Debido a que el dominio ABC de esta estructura no se encuentra totalmente resuelto, el dominio ABC fue modelado a partir de la estructura del dominio ABC del Tap1, 1jj7, que en ese momento era el dominio ABC cristalizado con mayor porcentaje de identidad.

#### **4.2.1 Modelamiento en estado cerrado.**

Para modelar el transportador de microcina E492 en estado cerrado se utilizó principalmente la estructura del transportador de lípido A de *V. cholerae* (**Chang, 2003**). Esta estructura representa el estado cerrado del transportador porque presenta una amplia región de contacto tanto en la región transmembrana como en el dominio ABC. Hasta el momento se cree que el transportador ABC en estado abierto une al alócritro y en el estado cerrado lo exporta (**Chang, 2003**).

Una inspección visual de este transportador determinó que la región correspondiente al dominio ABC presenta un plegamiento distinto a los demás dominios ABC cristalizados. Por esta razón podría corresponder a una estructura mal plegada, a pesar de haber sido obtenida a partir de cristalografía de rayos X. Esta suposición esta de acuerdo con los resultados de los programas basados en potenciales estadísticos como PROSA-II o en los patrones 3D-1D de VERIFY3D (**Lütty y cols., 1992; Sippl, 1993**) que indican la presencia de zonas con potenciales correspondientes a regiones mal plegadas. En vista de esto, para modelar el transportador en estado cerrado se utilizó la información 3D presente en 1L2T, el cual corresponde a un dímero de dominio ABC de la proteína Mj0796. Al tomar esta decisión se perdió la información correspondiente a la interfase entre los dominios ABC y TM. Se decidió que era posible reconstruir la interfase utilizando la información del importador de vitamina B12 pues se estima que el mecanismo de exportación entre importadores y exportadores ABC es el mismo. La evidencia para esta estimación proviene de la comparación de la estructura de los dominios ABC que

presentan el mismo plegamiento característico. La observación de las estructuras del importador de vitamina B12 y de los transportadores de lípido A indicó que ambos tienen una estructura hélice-lazo-hélice-lazo-hélice en el dominio transmembrana que interacciona con el dominio  $\alpha$  del dominio ABC. El grupo de Chan también ha sugerido que esta región participa en la transducción de información entre ambos dominios (Chang, 2003; Loche y cols., 2002). El modelo de MceG obtenido utilizando estas aproximaciones describe una estructura cuyo patrón de plegamiento no tenía representación en la base de datos, al menos al momento de obtener el modelo. Posteriormente, este modelo y los criterios utilizados para su construcción fueron apoyados por la estructura cristalina del transportador de lípido A de *S. typhimurium* (Reyes y Chang, 2005). Sorprendentemente, este transportador presenta el mismo patrón de plegamiento que nuestro modelo. La mayor diferencia se encuentra en los dominios ABC, los cuales no se encuentran en contacto como ocurre con el dímero de dominios ABC de la proteína Mj0796 (1L2T) o del transportador de hemolisina (1XEF), por lo que corresponde a un transportador en estado abierto.

El patrón de plegamiento obtenido para MceG en estado cerrado se aplicó a la secuencia de los transportadores de colicina V, microcina H47, microcina L y hemolisina. Para la construcción de estos modelos se utilizó el modelo de MceG como template, por lo cual es esperable que los errores asociados a esta aproximación solo se encuentren en la disposición de las cadenas laterales de los aminoácidos y no en el plegamiento general del transportador.

Para validar el modelo generado es necesario realizar evaluaciones. Estas evaluaciones pueden ser mediante métodos bioinformáticos (ver **Anexo I**) o desafiando al modelo a dar explicación a antecedentes empíricos, o predecir el comportamiento del transportador.

El primer punto evaluado fue la participación de los últimos cuatro aminoácidos del carboxilo terminal. Estos aminoácidos conforman la hebra  $\beta$ core5 del subdominio "F1-type ATP binding core". El análisis del modelo indica que esta región se encuentra en contacto con el "loop P" y con el ATP, y esto explicaría porque mutaciones que alteran esta región (incluida la delección) impiden la exportación de microcina E492 al impedir la hidrólisis de ATP. El modelo también predecía que el reemplazo de la secuencia TISI por otra que forme la misma estructura debería restituir la función de exportación. Esta hipótesis fue comprobada cambiando la secuencia en esta zona por una secuencia consenso obtenido

a través de alineamientos múltiples entre otros dominios ABC. El reemplazo de los últimos cuatro aminoácidos por la secuencia consenso produce un transportador completamente funcional, indicando que es la estructura de esta región la importante para la permitir la exportación. Es interesante que la comparación entre múltiples dominios ABC indica que existe una gran variabilidad en la secuencia del C-terminal, y que el C-terminal de los transportadores de microcina H47, E492, ColV, L, M son los transportadores con los C-terminal más cortos. Esto sugiere fuertemente que representa la mínima unidad funcional de un dominio ABC que permite energizar el transporte de moléculas.

#### **4.2.2 Modelos de los transportadores y especificidad de transporte.**

El objetivo principal de esta tesis fue comprender los mecanismos de especificidad de los transportadores ABC dedicados. Los modelos 3D de MceG y CvaB son útiles para entender el mecanismo de especificidad del transportador de colicina V pues permiten realizar análisis comparativo de sus estructuras. La localización 3D de las diferencias entre los transportadores de colicina V y microcina E492 indicó que todas se encuentran en la superficie del transportador y no en las interfases entre dominios. Esta situación apoya nuestra estrategia de intercambio de dominios y explica por qué, a pesar de generar transportadores quiméricos, estos son funcionales. Respecto a la especificidad de transporte otorgada por el dominio ABC del transportador de colicina V, resulta interesante que la mayor parte de la diferencias entre el dominio ABC de ambos transportadores (CvaB y MceG) corresponden a cambios conservados distribuidos sin un patrón obvio en la superficie del dominio ABC. Sin embargo, los cambios no conservados se concentran en el subdominio “core F1 ATPase”. Esta región es parte del sitio de unión a nucleótido por lo tanto es posible que la bacteriocina al interactuar con esta región module la dimerización de los dominios ABC. Esto explicaría la influencia de la molécula a exportar sobre el dominio ABC. La otra región con diferencias es la que conecta los dominios ABC y transmembrana. Esta región está formada por una zona helicoidal contigua al dominio transmembrana y un gran lazo que comunica ambos dominios. En la región helicoidal contigua al dominio transmembrana se encuentra un cambio conservado y un cambio no conservado. Esta región cierra el canal conformado por el dominio transmembrana. El análisis de los transportadores ABC que participan en el eflujo de xenobióticos ha mostrado que la unión de éstos se produce en el dominio transmembrana (Ecker y cols., 2004). De esta forma el mecanismo que regula la exportación de

proteínas sería diferente al de exportación de xenobióticos, pues en la exportación de proteínas el dominio ABC estaría encargado de energizar y dar especificidad a la exportación, en cambio en la exportación de xenobióticos el dominio ABC solo energizaría el transporte.

### 4.2.3 Generación de un modelo completo del transportador ABC.

La generación de un modelo completo del transportador de microcina E492 presentó un singular desafío, pues no se contaba con información acerca de la interacción entre el dominio peptidasa (PEP) con los demás dominios. Puesto que mutaciones en el dominio peptidasa impiden el transporte de bacteriocinas y colicinas, (**Havarstein y cols., 1995; Wu y Tai, 2004**) se estima que este dominio debe estar en contacto íntimo con los dominios TM y ABC del transportador. Esta situación explicaría la baja actividad en ensayos *in vitro* que presenta el dominio PEP del exportador ComA o CvaB (**Ishii y cols., 2006; Wu y Tai, 2004**). La actividad enzimática del dominio PEP estaría entonces influenciada por la interacción con otros dominios del transportador que actuarían como factores estimulantes. Es interesante destacar que el dominio peptidasa del transportador de colicina V muestra una actividad dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en un rango de 1 a 10 mM (**Wu y Tai, 2004**), siendo esta concentración alrededor de 1000 veces superior a la concentración que existe en el medio de cultivo M9, que es el medio donde se cultivan las células productoras de microcina E492, por lo que al interior de la célula la función que cumple el ión  $\text{Ca}^{2+}$  podría ser suplida por la interacción con otras proteínas.

En este trabajo se analizó la actividad del dominio peptidasa observando el estado de procesamiento del péptido líder de la microcina E492 en extractos celulares totales. Para este análisis se utilizaron las mutantes en el dominio ABC que no permiten la exportación de microcina E492, y que tienen intacto el dominio peptidasa. Los resultados al analizar mutantes por delección del dominio ABC (np108) y mutantes en el C-terminal (pJRS1, MceG<sup>-4</sup>) muestran que la microcina E492 se acumula al interior de la célula en una forma no procesada, indicando que el dominio peptidasa, aunque intacto, es incapaz de procesarla. Este estudio sugiere fuertemente una interacción el dominio ABC y el dominio peptidasa, con lo cual se concluye que el procesamiento de la microcina ocurre en forma concomitante con la exportación, y mas aún, que este procesamiento se encuentra enganchado al mecanismo de exportación de tal modo de impedir la acumulación de microcina intracelular procesada. Este mecanismo probablemente se seleccionó porque la

acumulación de microcina intracelular procesada es tóxica para la célula productora aun cuando cuenta con el gen de inmunidad (**Corsini, 2005**).

Basados en los antecedentes que apoyan la interacción física entre los dominios ABC y transmembrana se intentó predecir el lugar donde interactúa el dominio ABC con el resto del transportador. Se utilizaron dos criterios: el primero fue una complementariedad topológica; y el segundo criterio fue la complementariedad de los potenciales electrostáticos de superficie. El potencial electrostático de superficie es una de las caracterizaciones de la molécula modelada que entrega nueva información (**Chakravarty y Sanchez, 2004**). Esto se debe a que generalmente las regiones de interacción con moléculas se caracterizan por parches de cargas que permiten la unión de estas regiones. Estos parches pueden variar de una proteína a otra permitiendo que un mismo plegamiento pueda cumplir funciones diferentes. Basados en estos dos criterios se encontró un sitio de unión para el dominio peptidasa en el transportador modelado en estado cerrado. Este sitio es una cavidad formada por los dímeros de las regiones transmembrana y ABC que sólo se forma en el estado cerrado. La interacción entre el dominio peptidasa y ABC también explicaría por qué mutaciones en el dominio peptidasa impiden la exportación. Mutaciones puntuales en el dominio peptidasa del transportador de colicina V demostraron que los residuos C32 o H105 eliminan la actividad proteolítica (**Wu y Tai, 2004**). Como se mencionó anteriormente el alineamiento las proteínas con función peptidasa demostrada arrojó que los residuos de C32 y H105 se encuentran 100% conservados. Además de estos residuos, se encuentran conservados los residuos Q26, D121 y P122, los cuales podrían estar involucrados en el mecanismo de proteólisis. En la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) el dominio peptidasa pertenece al clan de las “papain-like cystein peptidase”. Estas proteasas necesitan una triada catalítica para hidrolizar el enlace peptídico, que está formada por los residuos C, H y D. Sin embargo, para el caso de los dominios peptidasa de esta familia de exportadores solo se habían caracterizado los residuos equivalentes a C32 y H105. El modelo propuesto en este trabajo predice que el residuo D121 es el tercer residuo involucrado, pues se encuentra vecino a los residuos de C32 y H105, y adicionalmente está conservado en otros dominios peptidasa de transportadores de bacteriocinas. El análisis mediante mutación sitio dirigida y western blot confirmó que el residuo es importante para el procesamiento y exportación, indicando que el modelo 3D predice adecuadamente el

sitio activo del dominio peptidasa. El residuo D121 se encuentra próximo a la hebra  $\beta 4$ , en el “lazo” conformado por la hebra  $\beta 4$  y  $\beta 5$  a 5,5 Å de H105 y a 15,5 Å de C32.

A continuación se discutirán las interrogantes acerca de cómo el dominio ABC modula el procesamiento y cómo el procesamiento modula la exportación.

Experimentos *in vitro* con el dominio peptidasa del transportador de colicina V mostraron que la actividad proteolítica es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y que esta enzima pertenecería a la familia de proteasas tipo calpaína (Wu y Tai, 2004). La familia de proteasas tipo calpaína son proteasas dependientes de calcio que unen este ión mediante dominios “EF-hand” como los que se encuentran en la estructura de la calmodulina. El análisis del patrón de estructura secundaria de MceG<sup>pep</sup> indicó que sus primeros 80 residuos comparten un patrón de plegamiento similar al de troponina C, otra proteína que une calcio mediante motivos “EF-hand”. La comparación visual de las estructuras de troponina C, calmodulina, calpaína, líder peptidasa FMDV y MceG<sup>pep</sup> muestra que el subdominio aminoterminal de MceG<sup>pep</sup> presenta un plegamiento similar al que presentan los dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  “EF-hand” de troponina C y calpaína. Sin embargo, el alineamiento múltiple de los dominios peptidasa de diferentes transportadores ABC no arroja residuos de Asp o Glu conservados en todos los dominios peptidasa, lo que no permite una clara identificación del sitio de unión a calcio en MceG<sup>pep</sup>. Sin embargo, basados en la ubicación del ión calcio en la calpaína, los residuos que participan en su quelación pueden ser los residuos D14 y D4.

En el modelo de MceG, el sitio donde debería estar el ión  $\text{Ca}^{2+}$  está interactuando con el dominio ABC. Es por tanto posible que el dominio ABC cumpla la función del ión calcio en las proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto conectaría la actividad proteasa con la dimerización del dominio ABC y con la exportación y con la observación que la actividad peptidasa *in vitro* de CvaB requiere de una alta concentración de este ión (Wu y Tai, 2004). También explicaría porqué mutaciones que afectan la actividad del dominio ABC repercuten en la actividad del dominio peptidasa.

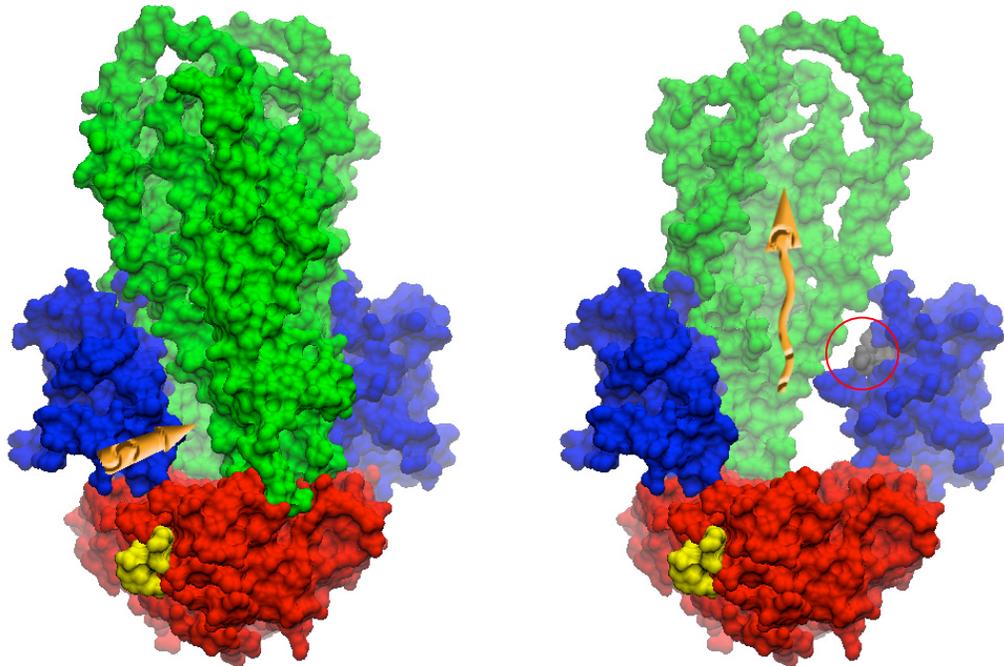
Como prueba final del modelo, se simuló el estado cerrado de MceG a partir del modelo del transportador en estado abierto (modelado utilizando principalmente la información 3D de transportador de lípido A de *S. typhimurium*). Interesantemente, en este modelo no existe una interfase con carga positiva con la cual el dominio peptidasa

pueda interactuar, por lo tanto en el estado abierto el dominio peptidasa se encuentra más libre. Para simular el estado cerrado a partir del estado abierto se agregó al modelo del transportador en estado abierto la información del dominio ABC de hemolisina cristalizado como dímero, y se asignó como restricción las distancias existentes entre los monómeros del dímero de hemolisina. La inspección visual del modelo obtenido mostró una sorprendente similitud con nuestro modelo en estado cerrado (construido utilizando principalmente la información 3D de transportador de lípido A de *V. cholerae*). Esto permitió determinar que la transición entre ambos estados ocurre con movimientos de la ICD1 de un monómero respecto de la ICD1 del otro monómero. Estos desplazamientos podrían propagarse a través de las hélices transmembrana produciendo una apertura del canal y también provocarían la apertura del canal en la base de éste, permitiendo así la entrada de la molécula a exportar.

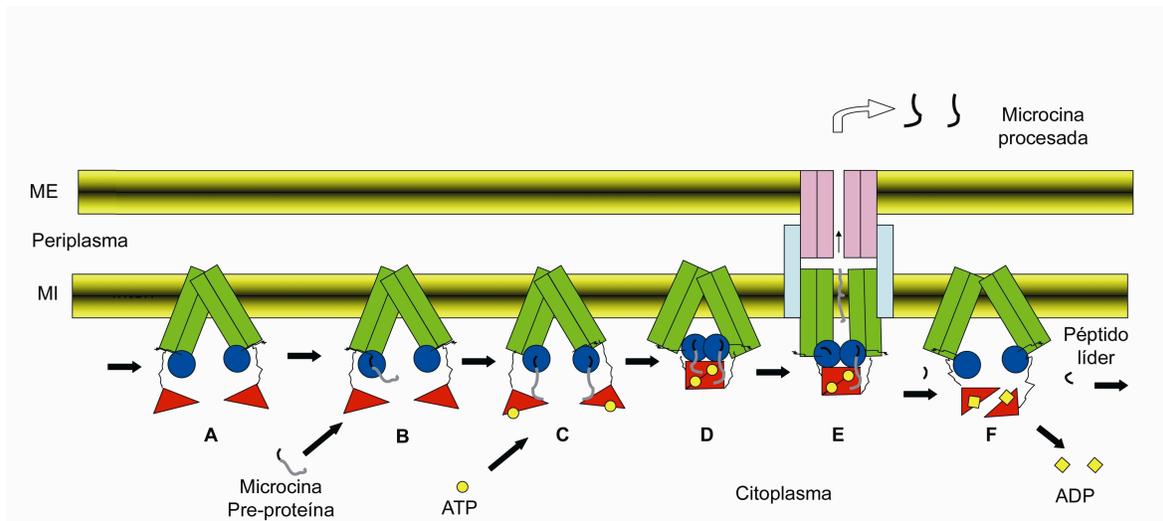
### 4.3 Modelo de la exportación de microcina E492.

Basados en los antecedentes expuestos en la literatura, el modelo 3D de MceG, los experimentos realizados con los transportadores quiméricos y la relación que existe entre el procesamiento y exportación se propone la siguiente secuencia de eventos para el proceso de exportación de microcina E492 (**Figura 34 y Figura 35**).

Primero debe ocurrir una **interacción de la bacteriocina con el dominio ABC**, y esta interacción ocurriría a través del subdominio F1. La interacción de la bacteriocina con el dominio ABC permitiría la **unión de ATP y dimerización**. Como consecuencia de la dimerización de los dominios ABC ocurriría una **activación del dominio peptidasa e hidrólisis del enlace peptídico**. El procesamiento del péptido líder también permitiría la apertura del transportador y así el **transporte de la microcina**. Posteriormente, el dominio peptidasa inhibiría la actividad ATPásica del dominio ABC hasta que ocurra el procesamiento del péptido líder. Una vez procesada la microcina ocurriría la **hidrólisis de ATP** lo cual disociaría los dominios ABC y así se reiniciaría el ciclo.



**Figura 34. Representación de MceG.** En la figura se representa en rojo el dominio ABC, en verde el dominio transmembrana y en azul el dominio peptidasa. La región en amarillo corresponde a los posibles residuos involucrados en el reconocimiento de la bacteriocina y que le dan especificidad al exportador. En gris y encerrados en un círculo rojo se destacan los residuos catalíticos del dominio peptidasa. Las flechas indican la posible trayectoria de la bacteriocina al ingresar al transportador (figura izquierda) y durante la exportación (figura derecha). En la figura de la derecha se ha eliminado de la representación uno de los dominios transmembrana, a fin de permitir la visualización de cavidad interna del transportador.



**Figura 35. Modelo de reconocimiento y exportación del sistema de secreción de tipo I.** La figura representa el mecanismo de exportación de bacteriocinas a través del sistema de tipo I. En la primera etapa (A) el transportador se encuentra sin la bacteriocina en estado abierto, luego se produce la unión de la bacteriocina a través de su péptido líder (B) y el transportador permanece aún en estado abierto. En C la bacteriocina interactúa con el dominio ABC y permite que éste una ATP. La unión de ATP produce dimerización de los dominios ABC (D). La dimerización de los dominios ABC activa a la peptidasa y simultáneamente ocurre reclutamiento de la proteína accesorio y de la proteína de membrana externa. Durante la exportación el dominio ABC permanece como dímero (E). El dominio peptidasa activa la actividad ATPásica del dominio ABC produciendo su hidrólisis y disociando el dímero de dominios ABC, permitiendo que el sistema vuelva a su punto inicial (F). Los triángulos rojos representan los dominios ABC, los círculos azules los dominios peptidasa, los rectángulos verdes los dominios transmembrana. En celeste se muestra la proteína accesorio y en rosado la proteína de membrana externa. ME, membrana externa; MI, membrana interna.

## 5. CONCLUSIONES

- El gen *mceF* no participa en la exportación de microcina E492.
- El dominio ABC del transportador CvaB es el responsable de la especificidad que presenta el sistema de exportación de colicina V por su propia bacteriocina.
- La estructura de los últimos cuatro aminoácidos del transportador de microcina es esencial para la exportación de microcina E492.
- El modelo 3D del transportador MceG es consistente con un acoplamiento entre el procesamiento y la exportación de la microcina E492.
- Este modelo también da cuenta de los fenotipos observados en las mutantes D121N y pJRS1, MceG<sup>-4</sup> y MceG<sup>conse</sup>.

## 6. ANEXO I

### Modelamiento, descripción y evaluación del modelo de MceG, el transportador de la microcina E492.

#### 6.1 Modelamiento de la estructura 3D de una proteína.

Las proteínas son los elementos encargados de comunicar el programa genético almacenado en una molécula de DNA con el medio externo que lo rodea. Esta comunicación se establece a través una complicada arquitectura de reacciones químicas que en su conjunto se denomina metabolismo. El extensivo estudio del metabolismo y las proteínas que lo conforman ha permitido establecer que existe una fina maquinaria de regulación cuyas bases se encuentra en la estructura 3D de las proteínas. Es así que tan importante como la actividad enzimática que ejecutan las proteínas es su arquitectura, y como esta arquitectura se relaciona con otras proteínas. Es por esta razón que en la actualidad la comprensión global de un problema biológico pasa por la caracterización de la estructura 3D de las proteínas involucradas. La estructura 3D de una proteína no es otra cosa que un patrón de plegamiento de estructura secundaria en el espacio. Predicciones realizadas en función del número de combinaciones posibles de la estructura secundaria indica que el número total de plegamientos es finito, y muy inferior al número total de proteínas existentes. En la actualidad la determinación de la estructura 3D de una proteína puede lograrse por métodos empíricos (cristalografía de rayos X o NMR) o puede predecirse mediante modelamiento. El fundamento de la determinación de la estructura 3D de una proteína mediante modelamiento yace en el limitado número de patrones de plegamiento. El problema de modelar una proteína se transforma en encontrar cual es su patrón de plegamiento. Los tipos de modelamiento que existen son el modelamiento por homología o comparación y el "threading." El modelamiento por homología consiste en la asignación de la estructura 3D de una proteína "A", de estructura conocida, a una proteína "B" de estructura desconocida, siempre que "A" y "B" presentan identidad significativa en su estructura primaria. El "threading" (Kelley y cols., 2000) consiste en la asignación de la estructura 3D de una proteína "A" a otra proteína "B"

siempre que A y B presentan identidad significativa en su patrón de estructura secundaria. Debido a que no existe información acerca de exportadores ABC estrechamente relacionados con el sistema de la microcina E492, se decidió predecir la estructura 3D mediante modelamiento en el cual se combinó el modelamiento por comparación y el “threading”.

## 6.2 Descripción del transportador MceG.

### 6.2.1 Dominio peptidasa.

El dominio peptidasa de MceG (MceG<sup>pep</sup>) corresponde al tipo de dominio peptidasa C39 (pfam 03412.10). Este dominio está comprendido entre los residuos 24 y 150 de MceG. La líder peptidasa FMDV utilizada para el modelamiento de este dominio es una cisteína proteasa con una estructura global globular compuesta por dos subdominios. Un subdominio N-terminal compuesto por cuatro  $\alpha$  hélices ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ ) y dos hebras  $\beta$  antiparalelas ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ).

El subdominio C-terminal está compuesto por hojas  $\beta$  mixtas, formada por dos hebras  $\beta$  paralela ( $\beta_3$  y  $\beta_4$ ) y seis antiparalelas ( $\beta_4$  a  $\beta_9$ ). El modelo de MceG<sup>pep</sup> también presenta dos subdominios. El subdominio N-terminal está compuesto por cuatro  $\alpha$ -hélices ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ ): la hélice  $\alpha_1$  comprende los residuos 19 al 29, la hélice  $\alpha_2$  los residuos 36 al 38, la hélice  $\alpha_3$  los residuos 49 al 56 y la hélice  $\alpha_4$  los residuos 69 al 75. MceG<sup>pep</sup> presenta la misma distribución de  $\alpha$ -hélices que la líder peptidasa FMDV, sin embargo  $\alpha_3$  de MceG<sup>pep</sup> es seis residuos más pequeña que la  $\alpha$ -hélice de la líder peptidasa FMDV. El subdominio C-terminal de MceG<sup>pep</sup> presenta la misma estructura básica que el subdominio C-terminal de la líder peptidasa FMDV, sin embargo los equivalentes a las hebras  $\beta_8$  y  $\beta_9$  están ausentes. La distribución de las hebras  $\beta$  de MceG<sup>pep</sup> es la siguiente: los residuos 79 al 83 para la hebra  $\beta_1$ , residuos 90 al 93 para la hebra  $\beta_2$ , residuos 106 al 109 para la hebra  $\beta_5$ ; residuos 107 al 109 para la hebra  $\beta_3$  y los residuos 143 al 146 para la hebra  $\beta_4$ . La hebras  $\beta_4$  y  $\beta_5$  están conectadas por un lazo de 22 aminoácidos donde deberían encontrarse las hebras  $\beta_8$  y  $\beta_9$  de la peptidasa FMDV.

## 6.2.2 Dominio transmembrana.

El dominio transmembrana del transportador de microcina E492 (pfam 00664.11) está comprendido entre los residuos 176 y 446. Este dominio se encuentra en la membrana interna de la bacteria y forma un canal compuesto por dos dominios transmembrana. El modelo de MceG basado en la estructura del transportador de lípido A de *V. cholerae* indica que cada dominio transmembrana consta de seis regiones transmembrana: TMR1 (residuos 176-201), TMR2 (residuos 218-240), TMR3 (residuos 285-308), TMR4 (residuos 315-337), TMR5 (residuos 400-423) y TMR6 (427-450). Las regiones transmembrana están conectadas por lazos cortos de orientación periplasmática y grandes segmentos citoplasmáticos (ICD). El ICD1 ubicado entre la TMR2 y TMR3 es una prolongación de las estructuras  $\alpha$ -hélice de las TMR2 y TMR3 que se encuentra unida por una estructura lazo-hélice-lazo. La ICD2 ubicada entre la TMR4 y TMR5 no se encuentra resuelta en la estructura de MsbAVc, sin embargo, la predicción de su estructura secundaria indica que esta región posee una estructura hélice-lazo-hélice-lazo-hélice. De esta manera en el modelo de MceG la ICD2 está formada por una prolongación de las TMR4 y TMR5 conectadas por un lazo (residuos 361-368)-hélice(residuos 369-385)-lazo(residuos 386-390). La predicción de regiones transmembrana mediante los programas SUSUI, TMpred y PredicProtein identifican claramente las TMR1-TMR5, y fallan en la predicción de la TMR6. Sin embargo estos programas también fallan en la predicción de una de las hélices transmembrana de la proteína BtuC. El canal de transporte conformado por las dos unidades de dominios transmembrana se formaría por la interacción de la TMR2 de una subunidad con la TMR5 de la otra subunidad. Esta región presenta un punto isoeléctrico de 9,48 con una distribución mayoritaria de cargas positivas al interior del canal y en las regiones ICD.

## 6.2.3 Dominio ABC.

El dominio ABC de MceG está comprendido entre los residuos 492 al 698. El modelo basado en la estructura del dímero de dominios ABC (1L2T) muestra una estructura general típica compuesta por tres subdominios: el subdominio "F1-type ATP binding core", el subdominio  $\beta$  antiparalelo y un subdominio  $\alpha$ -hélice.

**El subdominio  $\beta$  antiparalelo ( $\beta$ ABC)** presenta cuatro hebras  $\beta$ :  $\beta$ ABC $\beta$ 1 (residuos 496-499),  $\beta$ ABC $\beta$ 2 (residuos 509-512),  $\beta$ ABC $\beta$ 3 (residuos 546-552),  $\beta$ ABC $\beta$ 4

(residuos 555-557), y una  $\alpha$ -hélice,  $\alpha$ ABC $\beta$ 1 (residuos 562-568). Este subdominio presenta la misma estructura general que el subdominio respectivo de 1L2T y el monómero del dominio ABC del transportador de hemolisina (1MT0), sin embargo  $\alpha$ ABC $\beta$ 1 es cuatro residuos más pequeño que su contraparte en 1L2T. En este subdominio se ubica el residuo Y499 que participa en la unión de la base nitrogenada del ATP, y que se localiza entre  $\beta$ ABC $\beta$ 1 y  $\beta$ ABC $\beta$ 2.

**El subdominio “F1-type ATP binding core”** está compuesto por  $\beta$ core1 (residuos 520-524),  $\alpha$ core1-2 (residuos 532-539),  $\beta$ core2 (residuos 570-572),  $\beta$ core3 (residuos 650-654),  $\alpha$ core3-4 (residuos 557-673),  $\beta$ core4 (residuos 679-683),  $\alpha$ core4-5 (residuos 587-589) y  $\beta$ core5 (residuos 695-698). La estructura  $\alpha$ core3-4 de MceG es dos vueltas más pequeña que su contraparte en 1L2T, y el lazo que conecta con  $\beta$ core4 es 3 aminoácidos más corto. En conjunto, estos cambios estructurales dan cuenta de una diferencia de 4 aminoácidos en esta región.

**El subdominio  $\alpha$ -hélice (ABC $\alpha$ )** está compuesto por  $\alpha$  ABC $\alpha$ 1 (residuos 583-587),  $\alpha$  ABC $\alpha$ 2 (residuos 594-603),  $\alpha$  ABC $\alpha$ 2a (residuos 607-613),  $\beta$  ABC $\alpha$ 1 (residuos 621-623),  $\alpha$  ABC $\alpha$ 2b (residuos 625-627),  $\alpha$  ABC $\alpha$ 3 (residuos 632-644). Las estructuras  $\alpha$  ABC $\alpha$ 2a,  $\beta$  ABC $\alpha$ 1 y  $\alpha$  ABC $\alpha$ 2b no están presentes en el cristal 1L2T, en cambio el cristal 1MT0 presenta las estructuras  $\alpha$  ABC $\alpha$ 2a y  $\beta$  ABC $\alpha$ 1. Las estructuras  $\alpha$  ABC $\alpha$ 1 y ABC $\alpha$ 2 son una vuelta más pequeña que sus respectivas contrapartes de 1L2T.

El modelo de MceG<sup>ABC</sup> presenta una RMSD (root mean square deviation) de 1,4 Å con la estructura 1L2T, y un RMSD de 1,31 Å con el dominio ABC del transportador de hemolisina (1MT0). Las principales diferencias en estructura de MceG<sup>ABC</sup> con 1L2T y 1MT0 se encuentran presentes en el subdominio  $\alpha$ -hélice. Este subdominio presenta 5 estructuras  $\alpha$ -hélice, a diferencia de las tres que presenta el cristal 1L2T o cuatro del dominio ABC del transportador de hemolisina. Un análisis del potencial electrostático de superficie del subdominio de  $\alpha$ -hélice de MceG<sup>ABC</sup>, de 1MT0 y de 1L2T arroja que MceG<sup>ABC</sup> presenta un fuerte potencial electrostático negativo MceG<sup>ABC</sup> comparado con el respectivo subdominio de 1MT0, en tanto que 1L2T presenta un fuerte potencial electrostático positivo.

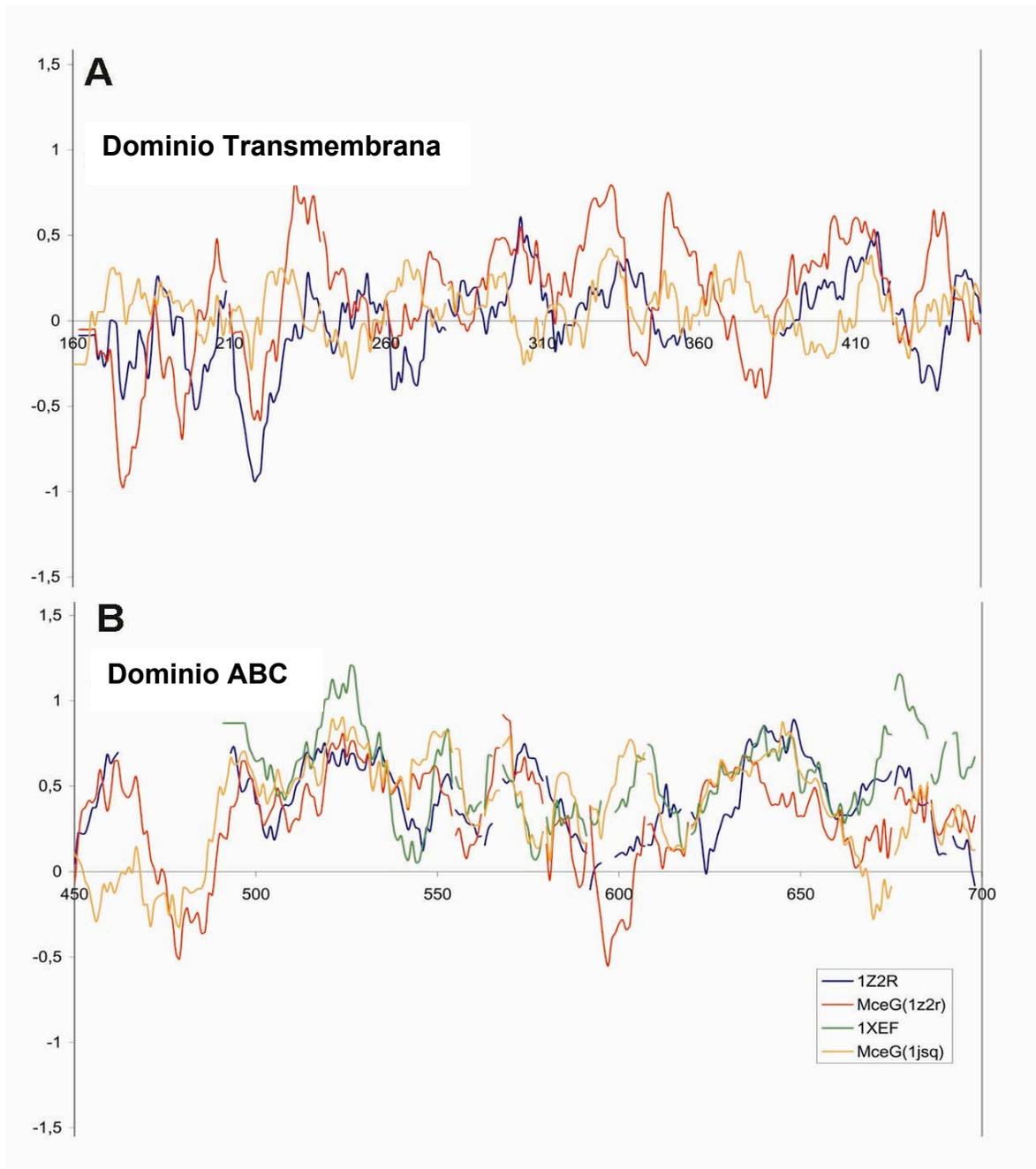
**Interfase del dímero de los dominios ABC.** La interfase del dímero MceG<sup>ABC</sup> presenta un ASA (Accessible Surface Area) de 1190 Å<sup>2</sup> comparada con los 760 Å<sup>2</sup> de la

interfase de 1L2T, y está constituida en un 53,8% por residuos no polares. Su índice de planaridad es 2,03 y presenta 13 puentes de hidrógeno. El subdominio  $\alpha$ -hélice da cuenta de un 24.87 % de la interfase y el subdominio “F1-type ATP binding core” participa en un 43,19% en esta interfase. Al igual que en 1L2T, dos moléculas de ATP se ubican en la interfase del dímero MceG<sup>ABC</sup>. Estas moléculas están atrapadas entre la secuencia Walker de un monómero y la secuencia LSSG del otro, y ambos conforman el sitio activo para la hidrólisis de ATP.

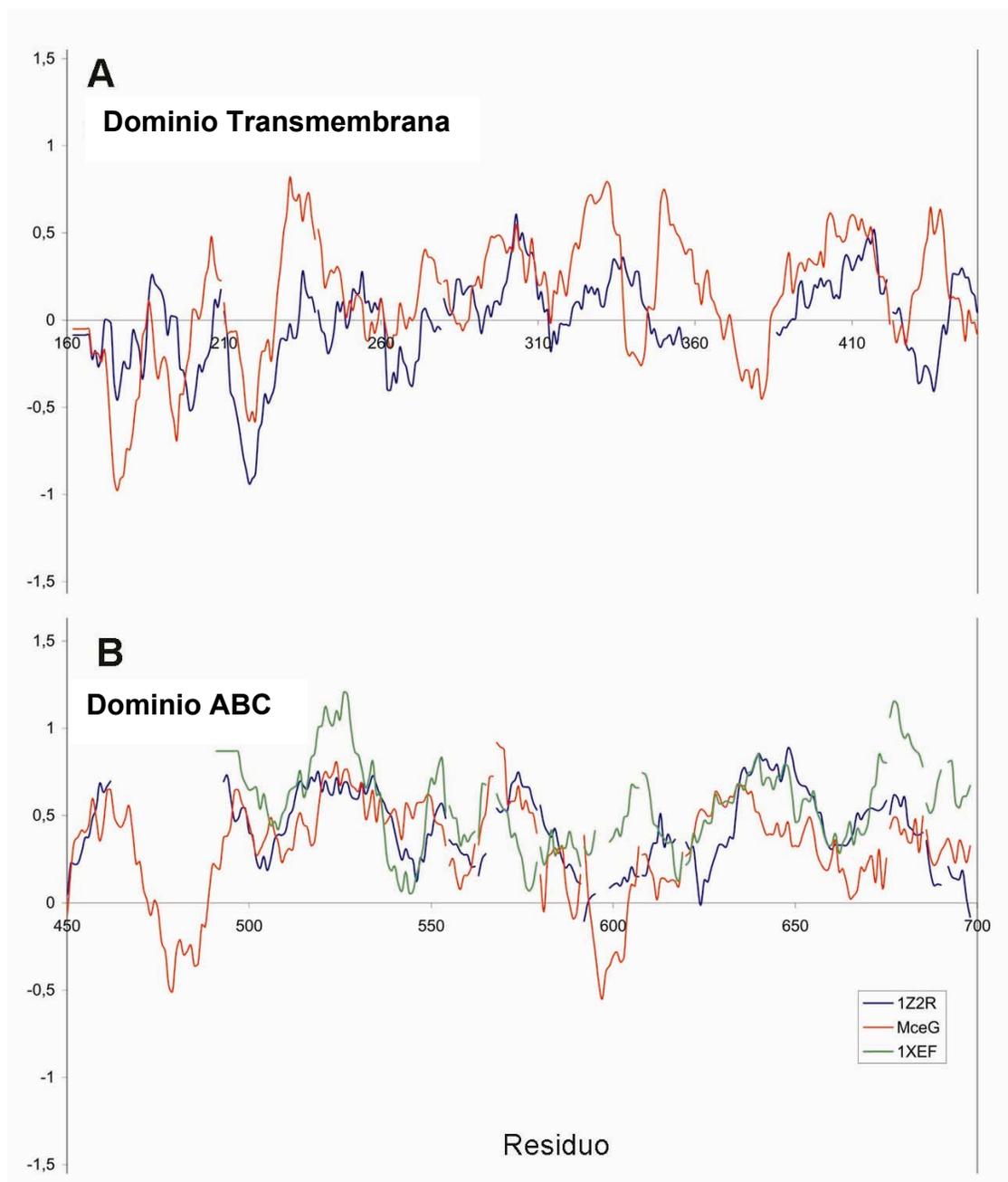
### 6.3 Evaluación de los modelos del transportador de microcina.

Los modelos obtenidos fueron evaluados mediante el programa VERIFY 3D. Este programa evalúa el ambiente que rodea a un respectivo residuo aminoacídico, otorgando un valor positivo de acuerdo a si se comporta como el resto de los residuos presentes en la base de datos. Para una adecuada evaluación del modelo, el perfil obtenido fue contrastado con el perfil de las estructuras moldes utilizados. El análisis de estos perfiles mostró que en general el modelo sigue la tendencia de su estructura molde, indicando que la disposición de los residuos obtenidos en el modelo está de acuerdo a lo descrito en la base de datos, especialmente en las regiones presentes en los dominios ABC y peptidasa (**Figuras 36, 37 y 38**). En la región transmembrana se aprecian zonas con valores negativos que también se encuentran en las estructuras molde, indicando que esta disposición se encuentra poco representada en la base de datos.

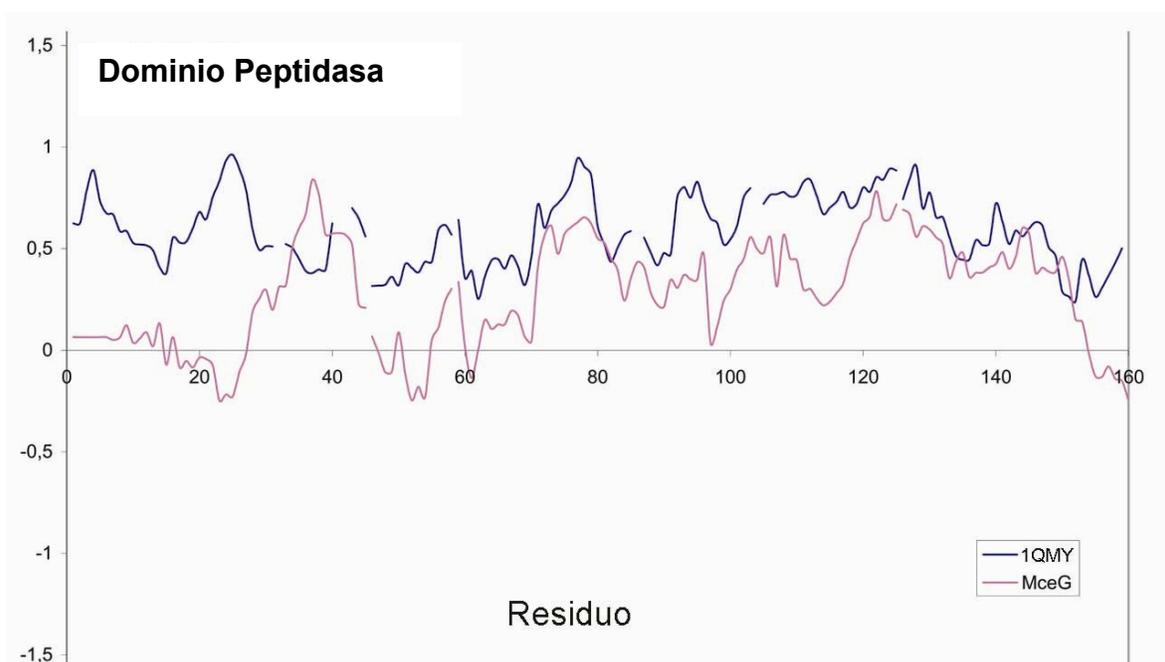
El modelo fue evaluado con el programa VERIFY3D (**Lütty y cols., 1992**) pues el método que aplica este software no se basa en potenciales estadísticos, que es el método que ocupa MODELLER para optimizar el modelo. El programa VERIFY3D analiza el medioambiente que rodea a la cadena lateral de un aminoácido y compara éste con el observado en una base de datos. Los parámetros que caracterizan el ambiente que rodea a la cadena lateral del residuo son la estructura secundaria, el área total en contacto con carbono (C) y oxígeno (O) y el porcentaje del área cubierta por C y O.



**Figura 36. Evaluación de los modelos de MceG en estado abierto.** Las estructuras 3D del transportador de microcina obtenidas mediante el modelamiento usando como molde al transportador de lípido A de *S. typhimurium* o el transportador de lípido A de *E. coli* fueron evaluadas mediante el programa VERIFY 3D. Los valores positivos reflejan una disposición representada en la base de datos. A, corresponde al dominio transmembrana y B, al dominio ABC.



**Figura 37. Evaluación de los modelos de MceG en estado cerrado.** Las estructuras 3D obtenidas mediante el modelamiento usando como molde al transportador de lípido A de *V cholerae* y el dominio ABC en estado de dímero (1L2T) fueron evaluadas mediante el programa VERIFY 3D. Los valores positivos reflejan una disposición representada en la base de datos. A, corresponde al dominio transmembrana y B, al corresponde al dominio ABC.



**Figura 38. Evaluación del modelo del dominio peptidasa de MceG.** La estructura 3D obtenidas mediante el modelamiento usando como molde la proteasa del péptido líder del virus de la fiebre aftosa (1QMY) fueron evaluadas mediante el programa VERIFY 3D. Los valores positivos reflejan una disposición representada en la base de datos.

Esto permite generar un perfil donde las regiones bien evaluadas (es decir que se comportan de acuerdo a una generalidad presente en una base de datos) tienen un valor positivo (**Bowie y cols., 1991**). Para una adecuada comparación también es necesario determinar el perfil obtenido de la molécula molde. Este programa, al igual que PROSA II, evalúa mejor a proteínas o dominios citosólicos que a regiones TM. La comparación de los perfiles de VERIFY3D del modelo junto con sus moldes indicó que los modelos de los dominios estaban bien contruidos, salvo en las regiones transmembrana, donde tanto la molécula molde como el modelo presentan regiones negativas. Es interesante que el perfil de los modelos y el molde sigan la misma tendencia. Esto refleja que el transportador de microcina presenta el mismo patrón de plegamiento que la molécula molde lo cual apoya la elección del molde. Sin embargo, en el dominio ABC del modelo en estado abierto (1z2r) se observa una región que presenta un mal plegamiento que corresponde a la región que se encuentra en contacto con el dominio transmembrana. Es posible que esto se deba a que el programa MODELLER no es capaz de construir adecuadamente las interacciones entre ambos dominios. Es interesante que el potencial de esta región cambie de modelo en modelo, indicando que para mejorar el modelo de esta región sólo es necesario aumentar el número de modelos generados. Así, es probable que se necesiten más de 20 para lograr obtener una molécula donde esta región se encuentre bien evaluada. A este respecto, también es interesante mencionar que esta región es la que presenta mayor variabilidad entre los cristales de dominio ABC (**Schmitt y cols., 2003**).

## 7. REFERENCIAS

**Abele, R.** y Tampe, R. (2004) The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology* **19**:216-224.

**Altschul, S.**, Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z. y Miller, W. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* **25**:3389–33402.

**Asencio, C.** y Pérez-Díaz (1976) A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**:7-14.

**Baeza, M.** (2003) Mecanismo de inmunidad, de translocación y deconversión tipo prión de la microcina E492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

**Banker, R.** y Carmeli, S. (1999) Inhibitors of serine proteases from a waterbloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron* **55**:10835–10844.

**Baquero, F.** y Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**:117-124.

**Baumler, A.**, Norris, T., Lasco, T., Voigt, W., Reissbrodt, R., Rabsch, W. y Heffron, F. (1998). IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **180**:1446-1450.

**Benabdelhak, H.**, Kiontke, S., Horn, C., Ernst, R., Blight, M., Holland, I. y Schmitt, L. (2003) A specific interaction between the NBD of the ABC transporter HlyB and

a C-terminal fragment of its transport substrate haemolysin A. *J. Mol. Biol.* **327**:1169–1179.

**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.

**Biemans-Oldehinkel, E.**, Doeven, M. y Poolman, B. (2005) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains *FEBS* [doi:10.1016/j.febslet.2005.11.079](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.079).

**Bishop, L.**, Agbayani, R., Ambudkarti, S., Maloneyt, P. y Ames, G. (1989) Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:6953-6957.

**Blight, M.** y Holland, I. (1990) Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators. *Mol. Microbiol.* **4**:873–880.

**Blundell, T.**, Sibanda, B., Sternberg, M. y Thornton, J. (1987) Knowledgebased prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* **326**:347-352.

**Bouveret, E.**, Journet, L., Walburger, A., Cascales, E., Bénédicti, H., y Lloubès R.(2002) Analysis of the *E. coli* Tol–Pal and TonB systems by periplasmic production of Tol, TonB, colicin, or phage capsid soluble domains. *Biochimie* **84**:513-516.

**Bowie, J.**, Luthy, R. y Eisenberg, D. (1991) A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* **253**:164-170.

**Boyer, A.** y Tai, P. (1998) Characterization of the *cvaA* y *cvi* promoters of the colicin V. Export system: iron-dependent transcription of *cvaA* is modulated by downstream sequences. *J. Bacteriol.* **180**:1662-1672.

**Braun, V.**, Patzer, S., y Hantke, K. (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* **84**:365-380.

**Buchaklian, A.**, Funk, A. y Klug, C. (2004) Resting state conformation of the MsbA homodimer as studied by site-directed spin labeling. *Biochemistry* **43**:8600–8606.

**Campbell, J.**, Biggin, P., Baaden, M. y Sansom, M. (2003) Extending the structure of an ABC transporter to atomic resolution: modeling and simulation studies of MsbA. *Biochemistry* **42**:3666–3673.

**Carpousis, A.** (2003) Degradation of targeted mRNAs in *Escherichia coli*: regulation by a small antisense RNA. *Genes Dev.* **17**:2351-2355.

**Castillo, J.** (2003) Mecanismo de exportación y procesamiento de la microcina E492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

**Centeno, N.**, Planas-Iglesias, J., Oliva, B. (2005) Comparative modelling of protein structure and its impact on microbial cell factories. *Microb. Cell Fact.* **4**:20-31.

**Chakravarty, S.**, Bhardwaj, N., Anand, P. y Sowdhamini, R. (2004) Improvement of alignment accuracy utilizing sequentially conserved motifs. *BMC Bioinformatics* **5**:167-179.

**Chakravarty, S. y Sanchez, R.** (2004) Systematic analysis of added-value in simple comparative models of protein structure. *Structure* **12**:1461–1470.

**Chang, A.** y Cohen, S. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from p15A cryptic mini plasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141-1156.

**Chang, G.** (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J. Mol. Biol.* **330**:419-430.

**Chang, G.** y C. Roth, (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: A homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293**: 1793-1800.

**Chavan, M.,** Ra, H., Wertz, J., Goldstone, C. y Riley, M. (2005) Phage associated bacteriocins reveal a novel mechanism for bacteriocin diversification in *Klebsiella*. *J. Mol. Evol.* **60**:546-556.

**Chothia C.** y Lesk, A. (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* **5**:823-826.

**Corsini, G.,** Baeza, M., Monasterio, O. y Lagos, R. (2002) The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochimie* **84**:539-544.

**Datsenko, K.,** y B. Wanner, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:6640-6645.

**Davidson, A.** y Chen, J. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:241-268.

**Davies, J.** y Reeves, P. (1975) Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: cross-resistance among colicins of group B. *J. Bacteriol.* **123**:96-101.

**Davies, R.**, Whittam, T., y Selander, R. (2001) Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (*lktA*) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *J. Bacteriol.* **183**:1394–1404.

**de Lorenzo, V.** (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **139**:72-75.

**de Lorenzo, V.** y Pugsley, A. (1985) Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:666-669.

**de Saizieu, A.**, Gardes, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T., Keck, W., Amrein, K. y Lange, R. (2000) Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J. Bacteriol.* **182**:4696-4703.

**Dean, M.** (2005) The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol.* **400**:409-429.

**Dean, M.**, Rzhetsky, A. Allikmets, R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**:1156-1166.

**Delepelaire, P.** (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**:149-161.

**Delgado, M.**, Rintoul, M., Farias, R. y Salomón, R. (2001) *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* **183**:4543-4550.

**Destoumieux-Garzón, D.**, Peduzzi, J. y Rebuffat, S. (2002) Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie* **84**:511–519.

**Destoumieux-Garzon, D.**, Thomas, X., Santamaria, M., Goulard, C., Barthelemy, M., Boscher, B., Bessin, Y., Molle, G., Pons, A., Letellier, L., Peduzzi, J. y Rebuffat S. (2003) Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**:1031-1041.

**Diep, D.B.**, L.S. Håvarstein y I.F. Nes, (1996) Characterization of the Locus Responsible for the Bacteriocin Production in *Lactobacillus plantarum* C11 *J. Bacteriol.* **178**: 4472–4483.

**Dobrindt, U.**, Blum-Oehler, G., Hartsch, T., Gottschalk, G., Ron, E., Fünfstück y R. y J. Hacker. (2001) S-Fimbria-encoding determinant *sfa<sub>I</sub>* is located on pathogenicity Island III<sub>536</sub> of Uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **69**:4248-4256.

**Doerrler W.**, Gibbons, H. y Raetz, C. (2004) MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**:45102–45109.

**Durbin, R.**, Eddy, S., Krogh, A. y Mitchinson, G. (1998). Biological Sequence Analysis, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Ecker, G.**, Pleban, K., Kopp, S., Csaszar, E., Poelarends, G., Putman, M., Kaiser, D., Konings, W. y Chiba, P. (2004) A three-dimensional model for the substrate binding domain of the multidrug ATP binding cassette transporter LmrA. *Mol. Pharmacol.* **66**:1169-1179.

**Fath, M.**, Skvirsky, R. y Kolter, R. (1991) Functional complementation between bacterial MDR-like export systems: Colicin V, Alpha-Hemolysin, and Erwinia Protease. *J. Bacteriol.* **173**:7549-7556.

**Faust, B.**, Hoffmeister, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Haag, S., Schneider, P., Decker, H., Kunzel, E., Rohr, J. y Bechthold, A. (2000) Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces fradiae* Tu2717. *Microbiology* **146**:147-154.

**Ferrer, S.**, Viejo, M., Guasch, J., Enfedaque, J. y Regue, M. (1996) Genetic evidence for an activator required for Induction of colicin-like bacteriocin 28b production in *Serratia marcescens* by DNA-damaging agents *J. Bacteriol.* **178**:951-960.

**Fischbach, M.**, Lin, H., Liu, D. y Walsh, C. (2005) In vitro characterization of IroB, apathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**:571-576.

**Franke, C.**, Tiemersma, J., Venema, G. y Kok J. (1999) Membrane topology of the Lactococcal bacteriocin ATP-binding cassette transporter Protein LcnC. *J. Biol. Chem.* **274**:8484-8490.

**Gaggero, C.**, Moreno, F. y Laviña, M. (1993) Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J. Bacteriol.* **175**:5420-5427.

**Gajic, O.**, Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O. y Kok, J. (2003) Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by Lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* **278**:34291-34298.

**Garrido, M.,** Herrero, M., Kolter, R. y Moreno, F. (1988) The export of the DNA replication inhibitor microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* **7**:1853–1862.

**Gilson L,** Mahanty H. y Kolter R. (1987) Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J. Bacteriol.* **169**:2466-2470.

**Gilson, L.,** Mahanty, H. y Kolter, R. (1990) Genetics analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J.* **9**:3875-3884.

**González-Pastor, J.,** San Millán, j., Castilla, M. y Moreno, F. (1995) Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. *J. Bacteriol.* **177**:7131–7140.

**Grozdánov, L.,** Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J. y Dobrindt, U. (2004) Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **186**:5432-5441.

**Guijarro, J.,** Gonzalez-Pastor, J., Baleux, F., San Millan, J., Castilla, M., Rico, M., Moreno, F. y Delepierre, M. (1995) Chemical structure and translation inhibition studies of the antibiotic microcin C7. *J. Biol. Chem.* **270**:23520-23532.

**Guzmán, L.,** Belin, D., Carson, M.J. y Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4121-4130.

**Haruhiko, M.** y Ogawa, T. (2002) The modes of action of colicins E5 and D, and related cytotoxic tRNases. *Biochimie* **84**:433–438.

**Havarstein, L.S.**, Diep, D. y Nes, I. (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* **16**:229-240.

**Hécharad, Y.** y Sahl, H. (2002) Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **84**:545–557.

**Heddle, J.**, Blance, S. Zamble, D., Hollfelder, F., Miller, D., Wentzell, L., Walsh, C. y Maxwell, A. (2001) The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. *J. Mol. Biol.* **307**:1223-1234.

**Hetz, C.**, Bono, M., Barros, L. y Lagos R. (2002) Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:2696-2701.

**Higgins, C.** y Linton, K. The ATP switch model for ABC transporters (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:918-926.

**Hohn, B.** y Collins, J. (1980) A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* **11**:291-298.

**Holland, I.**, Kenny, B., Steipe, B. y Pluckthun, A. (1990) Secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **182**:132-143.

**Holland, I.**, Schmitt, L. y Young, J. (2005) Type I protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol. Membr. Biol.* **22**:29-39.

**Ishii, S.**, Yano, T. y Hayashi, H. (2006) Expression and characterization of the peptidase domain of *Streptococcus pneumoniae* ComA, a Bi-functional ABC transporter involved in quorum sensing pathway.

<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M512516200>.

**Jones, D. (1997)** Progress in protein structure prediction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**:377-387.

**Johnson, T., Siek, K., Johnson, S. y Nolan, L. (2006)** DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* **188**:745-758.

**Jones, D., Tress, M., Bryson, K. y Hadley, C. (1999)** Successful recognition of protein folds using threading methods biased by sequence similarity and predicted secondary structure. *Proteins: Struct. Funct. Genet. Suppl.* **3**:104-111.

**Jones, P. y George, A. (2004)** The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**:682–699.

**Kelley, L., MacCallum, R. y Sternberg M. (2000)** Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J. Mol. Biol.* **299**:499-520.

**Klaenhammer, T. (1993)** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:39-85.

**Kolade, O., Carr, S., Kühlmann, U., Pommer, A., Kleanthous, C., Bouchcinsky, C. y Hemmings, A. (2002)** Structural aspects of the inhibition of DNase and rRNase colicins by their immunity proteins. *Biochimie* **84**:439–446.

**Kolter, R. y Moreno, F. (1992)** Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:141-163.

**Kuhnert, P., Schlatter, Y. y Frey, J. (2005)** Characterization of the type I secretion system of the RTX toxin ApxII in *Actinobacillus porcitonisillarum*. *Veterinary Microbiology* **107**:225–232.

**Lagos, R.**, Villanueva, J. 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., Vergara, C. y Monasterio, O. (2001) Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocina. *Mol. Microbiol.* **42**:229-243.

**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.

**Laviña, M.**, Gaggero, C., y Moreno, F. (1990) Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:6585-6588.

**Lazzaroni, J.**, Dubuisson, J. y Vianney, A. (2002) The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the translocation of group A colicins. *Biochimie* **84**:391–397.

**Lesk, A.** y Chothia, C. (1980) How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globins. *J. Mol. Biol.* **136**:225-270.

**Leslie, E.**, Deeley, R. y Cole, S. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* **204**:216–237.

**Letoffe, S.**, Delepelaire, P. y Wandersman, C. (1991) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Serratia marcescens* metalloprotease gene: secretion of the

protease from *E. coli* in the presence of the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion functions. *J. Bacteriol.* **173**:2160-2166.

**Li, Y.**, Milne, G., Madison, L., Kolter, R. y Walsh, C. (1996) From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: Microcin B17 synthase. *Science* **274**:1188-1193.

**Lin, H.**, Fischbach, M., Liu, D. y Walsh, C. (2005) In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**:11075-11084.

**Linton, K.** y Higgins, C. (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.* **28**:5-13.

**Liu, X.**, Fan, K. y Wang W. (2004) The number of protein folds and their distribution over families in nature. *Proteins: Struct. Funct. Bioinfo.* **54**:491–499.

**Locher, K.**, Lee, A. y Rees, D. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**:1091-1098.

**Lüthy, R.**, Bowie, J. y Eisenberg, D (1992) Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356**:83-85.

**Marchler-Bauer, A.**, Anderson, J., Cherukuri, P., DeWeese-Scott, C., Geer, L., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D., Jackson, J., Ke, Z., Lanczycki, C., Liebert, C., Liu, C., Lu, F., Marchler, G., Mullokandov, M., Shoemaker, B., Simonyan, V., Song, J., Thiessen, P., Yamashita, R., Yin, J., Zhang, D. y Bryant S. (2005) CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic. Acids Res.* **33**: D192–D196.

**Martinez, J.** y Perez-Diaz, J. (1986) Isolation, characterization, and mode of action on *Escherichia coli* strains of microcin D93. *Antimicrob. Agents chemother.* **29**:456-460.

**Marti-Renom, M.**, Stuart, A., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F. y Sali, A. (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**:291-325.

**Mayr-Harting, A.**, Hedges, A. y Berkeley, C. (1972) Methods for studying bacteriocins. *Methods Microbiol.* **7A**:315-422.

**Michel-Briand, Y.** y Baysse, C. (2002) The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **84**:499–510.

**Michiels, J.**, G. Dirix, J. Vanderleyden y C. Xi, (2001) Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **9**:164-168.

**Milne, J.**, Eliot, A., Kelleher, N. y Walsh, C. (1998) ATP/GTP hydrolysis is required for oxazole and thiazole biosynthesis in the peptide antibiotic microcin B17. *Biochemistry* **37**:13250-13261.

**Milne, J.**, Roy, R., Eliot, A., Kelleher, N., Wokhlu, A., Nickels, B. y Walsh, C. (1999) Cofactor requirements and reconstitution of microcin B17 synthetase: a multienzyme complex that catalyzes the formation of oxazoles and thiazoles in the antibiotic microcin B17. *Biochemistry* **38**:4768-4781.

**Novoa, M.**, Diaz-Guerra, L., San Millan, J. y Moreno, F. (1986) Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C7 production and immunity. *J. Bacteriol.* **168**:1384-1391.

**Orellana, C.** y Lagos, R. (1996) The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcina antagonist. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**:297-303.

**Otten, S.**, Liu, X., Ferguson, J. y Hutchinson C. (1995) Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius* *dnrQS* genes encoding a daunosamine biosynthesis enzyme and a glycosyl transferase involved in daunorubicin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **177**:6688-6692.

**Patzer, S.**, Baquero, M.R., Bravo, D., Moreno, F. y Hantke, K. (2003) The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology* **149**:2557-2570.

**Pei, J.** y Grishin, N. (2001) Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloprotease. *Trends in Biochemical Sciences* **26**:275-277.

**Pieper, U.**, Eswar, N., Stuart, A., Ilyin, V. y Sali, A. (2002). MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models. *Nucleic. Acids Res.* **30**:255–259.

**Pons, A.**, Delalande, F., Duarte, M., Benoit, S., Lanneluc, I., Sable, S., Dorsselaer, A. y Cottenceau, G. (2004) Genetic analysis and complete primary structure of microcin L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:505-513.

**Pons, A.**, Zorn, N., Vignon, D., Delalande, F., Van Dorsselaer, A. y Cottenceau, G. (2002) Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:229-230.

**Pugsley, A.**, Moreno, F. y de Lorenzo, V. (1986) Microcin-E492-insensitive mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **132**:3253-3259.

**Rangland, W.**, Pace, L. y Kemper, D. (1974) Fluorometric scanning of fluorescamine-labelled proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **53**:24-33.

**Reyes, C.** y Chang, G. (2005) Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP vanadate and lipopolysaccharide. *Science* **308**:963-965.

**Riley, M.** y Wertz, J. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:117-137.

**Rost, B.** (1999) Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.* **12**:85-94.

**Sali, A.** y Blundell, T. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**:779-815.

**Salomon, R.** y Farias, R. (1993) The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *J. Bacteriol.* **175**:7741-7742.

**Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2 a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**San Millan, J.**, Hernandez-Chico, C., Pereda, P. y Moreno F. (1985) Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin B17 production and immunity. *J. Bacteriol.* **163**:275-281.

**Sanchez, R.**, Pieper, U., Melo, F., Eswar, N., Marti-Renom, M. Madhusudhan, M., Mirkovic, N. y Sali, A. (2000) Protein structure modeling for structural genomics. *Nat. Struct. Biol.* **7** Suppl:986-990.

**Sanchez, R.**, y Sali, A. (1998). Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**:13597–13602.

**Saurin, W.**, Hofnung, M. y Dassa, E. (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.* **48**:22-41.

**Schägger, H.**, y von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**:368-379.

**Schmitt, L.**, Benabdelhak, H., Blight, M., Holland, I. y Stubbs M. (2003) Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter Haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domain. *J. Mol. Biol.* **330**:333-342.

**Seddon, A.**, Curnow, P. y Booth, P. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**:105-117.

**Seigneuret, M.** y Garnier-Suillerot, A. (2003) A structural model for the open conformation of the mdr1 P-glycoprotein based on the MsbA crystal structure. *J. Biol. Chem.* **278**:30115–30124.

**Shilling, R.**, Balakrishnan, L., Shahi, S., Venter, H., van Veen, H. (2003) A new dimer interface for an ABC transporter. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:200-204.

**Silver, S.** y Walderhaug, M (1992). Gene regulation of plasmid and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **56**:195-228.

**Sippl, M. (1993)** Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* **17**:355-362.

**Skvirsky, R., Reginald, S. y Shen, X. (1995)** Topology analysis of the colicin V export protein CvaA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:6153-6159.

**Smith, P., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J., Rosen, J., Thomas, P. y Hunt, J.(2002)** ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell.* **10**:139-149.

**Solbiati, J., Ciaccio, M., Farias, R. y Salomón, R. (1996)** Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J. Bacteriol.* **178**:3661-3663.

**Solbiati, J., Ciaccio, M., Farias, R., Gonzalez-Pastor, J., Moreno, F., Salomón, R. (1999)** Sequence analysis of the four plasmid genes required to produce the circular peptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* **181**:2659-2662.

**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.

**Tam, A., Schmidt, W. y Michaelis, S. (2001)** The multispanning membrane protein Ste24p catalyzes CAAX proteolysis and NH<sub>2</sub>-terminal processing of the Yeast a-factor precursor. *J. Biol. Chem.* **276**:46798–46806.

**Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. y Koronakis, V. (1998)** Substrate-induced assembly of contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane traslocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* **17**:6487-6496.

**Thomas, X.**, Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Afonso, 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.

**Trujillo, M.**, Rodríguez, E. y Lavina M.(2001) ATP synthase is necessary for microcin H47 antibiotic action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3128-3131.

**Urbatsch, I.**, al-Shawi, M. y Senior, A. (1994) Characterization of the ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein. *Biochemistry.* **33**:7069-7076.

**van Belkum, M.**, Worobo, R. y Stiles, M. (1997) Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **23**:1293-1301.

**Walker, J.**, Saraste, M., Runswick, M., y Gay, N. (1982) Distantly related sequences in the alpha and beta subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**:945-951.

**Wandersman, C.**, Delepelaire, P. y Letoffe, S. (1990) Secretion processing and activation of *Erwinia chrysanthemi* proteases. *Biochimie* **72**:143-146.

**Watanabe, S.**, Kita, A. y Miki, K. (2005) Crystal structure of atypical cytoplasmic ABC-ATPase SufC from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Mol. Biol.* **353**:1043–1054.

**Waterst, V.** y Crosa, J.(1991) Colicin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.* **55**:437-450.

**Welch, R.**, Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E., Liou, S., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G., Rose, D., Zhou, S., Schwartz, D., Perna, N., Mobley, H., Donnenberg, M. y Blattner, R. (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**:17020–17024.

**Wilkens, M.**, Villanueva, J., Cofré, J., Chnaiderman, J. y 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.

**Wu, K.** y Tai, P. (2004) Cys<sup>32</sup> and His<sup>105</sup> are the critical residues for the calcium-dependent cysteine proteolytic activity of CvaB, an ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* **279**:901-909.

**Yang, C.** y Konisky, J. (1984) Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J. Bacteriol.* **158**:757–759.

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

