

MECANISMO DE INMUNIDAD, DE TRANSLOCACIÓN Y  
DE CONVERSIÓN TIPO PRIÓN DE LA MICROCINA E492.

Tesis

entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Por

MARCELO ENRIQUE BAEZA CANCINO

Enero de 2003

Director de Tesis: Dra. Rosalba Lagos Mónaco.

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado Presentada por el candidato

**Marcelo Enrique Baeza Cancino**

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el 30 de Enero del 2003.

**Director de Tesis:**

Dra. Rosalba Lagos M.

---

**Comisión de Evaluación de Tesis:**

Dr. Carlos Jerez

---

Dra. Margarita Carú

---

Dr. Víctor Cifuentes

---

**Dedico esta tesis con todo mi amor a las tres personas que han sido pilares fundamentales en mi vida**

**A Sonia, mi madre, quién ha sido un ejemplo de lucha por la vida y a quién debo todo lo que soy.**

**A Joana, mi esposa, quién me demostró que el amor existe.**

**A Benjamín, mi hijo, incalculable tesorito de mi vida.**

## FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

El trabajo de esta tesis fue posible gracias al financiamiento proporcionado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), proyectos 1991017 y 1020757 (a la Dra. Rosalba Lagos), y proyecto 1990028 ( a Marcelo Baeza).

El alumno recibió el financiamiento de una beca de postgrado entre los años 1999 y 2000, y de una beca de término de tesis en el año 2002 otorgadas por la comisión Nacional de Investigación y Tecnología (CONICYT).

## AGRADECIMIENTOS.

Mis agradecimientos van en primer lugar a toda mi familia por el apoyo incondicional en toda empresa que he emprendido, por su comprensión y por el cariño con el que siempre me he sentido acompañado.

Deseo agradecer en forma especial a la Dra. Rosalba Lagos y al Dr. Octavio Monasterio, por acogerme en su laboratorio y por sus sabios consejos en lo académico y en lo personal.

Agradezco con mucho afecto a mis compañeros de laboratorio: Esteban, José Jaime, Erwin, Gino, Gloria, Maribel, Víctor, Gonzalo, César, Rodrigo, José Antonio, Daniel, Cristian y Mauricio por los gratos momentos de esparcimiento vividos, por el apoyo recibido en los momentos difíciles y por las discusiones que ayudaron al enriquecimiento del trabajo.

Agradezco también a los miembros de mi comisión, Dres. Carlos Jerez, Margarita Carú y Víctor Cifuentes por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar esta tesis.

## Tabla de Contenidos.

	<b>Página</b>
Lista de tablas.....	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xviii
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Bacteriocinas.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Sistema microcina E492.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1. Origen y propiedades de la microcina E492.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2. Genética del sistema microcina E492.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Mecanismo de acción de bacteriocinas formadoras de poros.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Sistema de translocación dependiente de TonB.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Inmunidad a bacteriocinas formadoras de poro.....</b>	<b>10</b>
<b>1.6. Adquisición de propiedades tóxicas por las microcinas.....</b>	<b>12</b>
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Materiales.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Técnicas moleculares.....</b>	<b>20</b>

	<b>Página</b>
<b>2.3. Aislamiento y purificación de microcinas.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1. Purificación de la forma activa.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2. Purificación de las formas inactivas de la microcina .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2.1. Purificación desde la fase estacionaria .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2.2. Purificación desde mutantes en los genes de maduración.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.3. Geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS) y marcación</b>	
fluorescente de las muestras de microcina.....	21
<b>2.3.4. Cromatografía en fase reversa.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.5. Caracterización de agregados formados por muestras de microcina.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Ensayos de la actividad bactericida de muestras de microcina.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.1. Ensayo en cultivos líquidos.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.2. Ensayo sobre césped bacteriano.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.3. Determinación de la actividad formadora de canales <i>in vitro</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5. Caracterización biológica de las distintas formas de la microcina E492.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1. Actividad sobre esferoplastos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1.1. Preparación de esferoplastos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1.2. Ensayo de sensibilidad a la microcina E492.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.2. Ensayo de inmunidad a la microcina E492.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.3. Ensayos de competencia entre las formas activa e inactiva</b>	
de la microcina E492.....	25
<b>2.5.4. Ensayo de competencia con el pentapéptido caja-TonB.....</b>	<b>25</b>

	<b>Página</b>
<b>2.6. Ensayos de conversión de la forma inactiva a la forma</b>	
activa de la microcina E492.....	26
<b>2.6.1. Activación en agua.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.2. Activación a pH ácido.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.3. Activación en metanol.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.4. Ciclos de activación.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7. Caracterización de formas activas e inactivas de la microcina.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7.1. Espectrometría de masas.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7.2. Dicroísmo circular.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7.3. Microscopía electrónica.....</b>	<b>28</b>
<b>2.8. Obtención de mutantes compensatorias entre MceB y TonB.....</b>	<b>29</b>
<b>2.8.1. Mutagénesis <i>in vitro</i> del gen <i>mceB</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>2.8.2. Sensibilidad a microcina de mutantes puntuales en MceB.....</b>	<b>29</b>
<b>2.8.3. Mutagénesis <i>in vitro</i> del gen <i>tonB</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>2.8.4. Sensibilidad de mutantes en TonB a la microcina E492.....</b>	<b>31</b>
<b>2.9. Construcción de fusiones entre la proteína de inmunidad a la</b>	
microcina E492 (MceB) y la proteína fosfatasa alcalina (PhoA) .....	33
<b>2.9.1. Construcción del la cepa pMST308(p157).....</b>	<b>33</b>
<b>2.9.2. Obtención de lisado del fago P22 (lisado-P22).....</b>	<b>33</b>
<b>2.9.3. Infección de <i>S. typhimurium</i> con fago P22 y selección de los clones</b>	
con fusiones.....	33
<b>2.9.4. Construcción de la cepa de <i>E. coli</i> CC118(DE3).....</b>	<b>34</b>



	<b>Página</b>
<b>2.9.5.</b> Obtención de las fusiones en <i>E. coli</i> y selección de fusiones en el gen de inmunidad.....	34
<b>2.9.6.</b> Caracterización de las fusiones mediante PCR.....	34
<b>2.9.7.</b> Secuenciación de las fusiones.....	35
<b>2.9.8.</b> Medición de la actividad de la fosfatasa alcalina.....	35
<b>3. Resultados</b> .....	36
<b>3.1.</b> La microcina E492 requiere de un proceso de maduración para ser producida en forma activa.....	36
<b>3.1.1.</b> La microcina E492 es producida en forma inactiva durante la fase estacionaria de crecimiento .....	37
<b>3.1.2.</b> Mutantes en los genes de maduración producen una forma inactiva de la microcina E492.....	37
<b>3.2.</b> El proceso de maduración de la microcina E492 es necesario para que ésta pueda reconocer un receptor en la célula blanco.....	39
<b>3.2.1.</b> Las microcinas producidas por mutantes en los genes de maduración forman canales iónicos en bicapas fosfolipídicas.....	40
<b>3.2.2.</b> Las formas inactivas de la microcina son incapaces de atravesar la membrana externa de la célula blanco.....	42
<b>3.2.3.</b> El requerimiento de TonB durante la translocación de la microcina E492 no involucra las interacciones proteicas con TonB mediadas por la secuencia caja-TonB.....	44
<b>3.2.4.</b> Las formas inactivas de la microcina son defectuosas en el reconocimiento de un receptor en la membrana externa de	

	<b>Página</b>
la célula blanco.....	46
<b>3.2.4.</b> La microcina E492 no presenta modificaciones postraduccionales.....	49
<b>3.3.</b> La microcina E492 presenta propiedades que la asemejan a un prión.....	51
<b>3.3.1.</b> Las formas activa e inactiva de la microcina E492 se diferencian en el contenido de estructura secundaria.....	51
<b>3.3.2.</b> Mcc <sup>a</sup> induce la activación de Mcc <sup>ia</sup> <i>in vitro</i> .....	55
<b>3.3.3.</b> El proceso de activación Mcc <sup>ia</sup> está asociado a cambios en la estructura secundaria.....	58
<b>3.3.4.</b> Mcc <sup>a*</sup> es capaz de producir la activación de Mcc <sup>ia</sup> .....	64
<b>3.3.5.</b> Mcc <sup>a</sup> y Mcc <sup>ia</sup> forman filamentos en solvente acuoso con diferencias morfológicas.....	66
<b>3.3.6.</b> Activación de Mcc <sup>ia</sup> por Mcc1-43 <i>in vivo</i> ... ..	72
<b>3.4.</b> Mecanismo de Inmunidad a la microcina E492 .....	73
<b>3.4.1.</b> La interacción entre las proteínas MceB y TonB esta implicada en el mecanismo de inmunidad a la microcina E492.....	76
<b>3.4.1.1.</b> Obtención de mutantes en MceB.....	76
<b>3.4.1.2.</b> Los cambios conservados en MceB afectan su acción protectora.....	78
<b>3.4.2.</b> Las mutantes en TonB son capaces de compensar mutaciones puntuales en MceB.....	82
<b>3.4.2.1.</b> Obtención de mutantes en TonB.....	82
<b>3.4.2.2.</b> Las mutantes compensatorias corresponden a mutantes de TonB que no cumplen su función biológica normal.....	84

	<b>Página</b>
<b>3.4.2.3.</b> Las mutantes de TonB son sensibles a la microcina .....	87
<b>3.4.3.</b> Topología de la proteína de inmunidad en la membrana citoplasmática....	89
<b>3.4.3.1.</b> Obtención de fusiones entre MceB y PhoA.....	89
<b>3.4.3.2.</b> Actividad de las fusiones MceB-PhoA.....	91
<b>3.4.3.3.</b> Caracterización molecular de las fusiones MceB-PhoA.....	94
<b>4.</b> Discusión.....	100
<b>4.1.</b> La producción de microcina E492 activa involucra un proceso de maduración .....	100
<b>4.2.</b> La proteína de inmunidad a la microcina E492 interactúa con la proteína TonB en el mecanismo protector .....	102
<b>4.3.</b> La microcina E492, primer príon bacteriano .....	107
<b>5.</b> Conclusiones.....	111
<b>6.</b> Referencias.....	112

## Lista de Tablas.

	Página
<b>Tabla 1.</b> Cepas bacterianas, plasmidios y fagos utilizados en este Trabajo.....	18
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR y Secuenciación.....	30
<b>Tabla 3.</b> Plasmidios que portan mutaciones puntuales en los genes <i>mceB</i> y <i>tonB</i> obtenidas mediante mutagénesis <i>in vitro</i> con hidroxilamina.....	32
<b>Tabla 4.</b> Efecto de microcinas producidas por mutantes en los genes de maduración sobre la sobrevivencia de esferoplastos.....	43
<b>Tabla 5.</b> Efecto del pentapéptido ETVIV sobre la actividad de la microcina E492.....	45
<b>Tabla 6.</b> Efecto de las microcinas inactivas sobre la actividad de la microcina E492.....	47
<b>Tabla 7.</b> Determinación de la masa de la microcina E492 activa aislada desde la cepa silvestre y la microcina inactiva aislada desde la fase estacionaria y mutantes en los genes de maduración.....	50
<b>Tabla 8.</b> Contenido de estructura secundaria de las formas de la microcina E492.....	53
<b>Tabla 9.</b> Activación de $Mcc^{ia}$ por $Mcc^a$ mediante evaporación a 90°C.....	56
<b>Tabla 10.</b> Activación de $Mcc^{ia}$ por $Mcc^a$ por evaporación a 35°C.....	57
<b>Tabla 11.</b> Activación de $Mcc^{ia}$ por $Mcc^a$ a pH ácido.....	59

	<b>Página</b>
<b>Tabla 12.</b> Contenido de estructura secundaria de diferentes formas de la microcina E492.....	63
<b>Tabla 13.</b> Diámetros de las fibras formadas Mcc <sup>a</sup> y Mcc <sup>ia</sup> .....	71
<b>Tabla 14.</b> Predicción de hélices de transmembrana de MceB silvestre o mutado.....	80
<b>Tabla 15.</b> Sensibilidad a la microcina E492 de mutantes puntuales en MceB....	83
<b>Tabla 16.</b> Sensibilidad a la microcina E492 de células que portan mutaciones en TonB y complementaciones con MceB.....	88
<b>Tabla 17.</b> Determinación de la actividad fosfatasa alcalina de fusiones MceB-PhoA.....	93

## Lista de Figuras.

	Página
<b>Figura 1.</b> Etapas en la producción y acción de la microcina E492.....	4
<b>Figura 2.</b> PAGE-SDS de microcinas aisladas desde cultivos de la cepa silvestre en fase exponencial y estacionaria (A), y desde mutantes en los genes de maduración (B).....	38
<b>Figura 3.</b> Fluctuaciones de conductancia inducidas en bicapas fosfolípicas por microcinas aisladas desde las cepas silvestre y diferentes mutantes en los genes de maduración.....	41
<b>Figura 4.</b> Estructura secundaria de las formas de la microcina E492.....	52
<b>Figura 5.</b> Activación de la Mcc <sup>ia</sup> en metanol.....	61
<b>Figura 6.</b> Estructura secundaria de las formas de la microcina E492.....	62
<b>Figura 7.</b> Ciclos de activación de la Mcc <sup>ia</sup> .....	65
<b>Figura 8.</b> Análisis mediante C4-HPLC de fase reversa de las formas de la microcina E492.....	67
<b>Figura 9.</b> Formación de agregados de microcina.....	69
<b>Figura 10.</b> Micrografías electrónicas de muestras de microcina en agua.....	70
<b>Figura 11.</b> Alineamiento entre la región prión PrP (111-133) y microcina E492 (16-38).....	73
<b>Figura 12.</b> Activación <i>in vivo</i> de la Mcc <sup>ia</sup> por la Mcc1-43.....	75
<b>Figura 13.</b> Ensayo de inmunidad sobre césped de <i>E. coli</i> VCS252pJEM15.....	77
<b>Figura 14.</b> Secuencia de ADN y proteica de MceB.....	79
<b>Figura 15.</b> Modelo de la topología de MceB en la membrana citoplasmática.....	81

	<b>Página</b>
<b>Figura 16.</b> Secuencia de ADN y proteica de la porción N-terminal de TonB.....	85
<b>Figura 17.</b> Mutantes en TonB que compensan el fenotipo inm <sup>-</sup> de mutaciones puntuales en MceB.....	86
<b>Figura 18.</b> Determinación de la topología de una proteína de membrana mediante fusiones con PhoA.....	90
<b>Figura 19.</b> Caracterización fenotípica de las fusiones MceB-PhoA.....	92
<b>Figura 20.</b> Caracterización mediante PCR de las fusiones MceB-PhoA.....	95
<b>Figura 21.</b> Secuencia de ADN y primaria de MceB, TnpHoA y diferentes fusiones entre estas proteínas.....	98-99

## Lista de Abreviaturas

A <sub>600</sub>	absorbancia a 600 nm
amp	ampicilina
APS	persulfato de amonio
AU	unidades arbitrarias
BCIP	5-bromo-4-indolilfosfato
bp	pares de bases
BSA	albúmina de suero de bovino
cm	cloranfenicol
DMSO	dimetilsulfóxido
DNTP	deoxinucleótido trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
kan	kanamicina
KOH	hidróxido de sodio
Mcc <sup>a</sup>	microcina activa
Mcc <sup>ia</sup>	microcina inactiva
MccE492	microcina E492
MES	ácido 2-N(morfolino)etano sulfónico
MOPS	ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico
Mr	movilidad relativa
mV	milivoltios



np	nanopura
pA	pico Ampere
p. a.	pro análisis
PAGE	electroforésis en gel de poliacrilamida
PC	fosfatidilcolina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PE	fosfatidiletanolamina
POPE	palmitoiloeoilfosfatidiletanolamina
pS	pico Siemens
SDS	dodecilsulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino
UFC	unidades formadoras de colonias
UV	ultravioleta

## RESUMEN

La microcina E492 (MccE492) es un polipéptido antibiótico que presenta actividad bactericida sobre cepas de la familia *Enterobacteriaceae* mediante la formación de canales iónicos en la membrana citoplasmática. Los determinantes genéticos necesarios para su producción, presentes en el genoma de *Klebsiella pneumoniae* RCY492, se clonaron y expresaron en *Escherichia coli*, obteniéndose una microcina recombinante con propiedades bioquímicas y biológicas idénticas a la producida por *Klebsiella*. Mediante mutagénesis con Tn5 se determinó la existencia de al menos 8 genes, además del gen estructural, involucrados en procesos de maduración, procesamiento y exportación de la microcina.

La MccE492 es secretada en forma activa (Mcc<sup>a</sup>) durante la fase exponencial de crecimiento, e inactiva (Mcc<sup>ia</sup>) durante la fase estacionaria, fenómeno asociado a la falta de expresión de los genes *mceI* y *J* durante esta última fase. Mutantes por transposición en los genes *mceC*, *I* y *J* sólo producen Mcc<sup>ia</sup> en forma independiente de la fase de crecimiento, indicando que la producción de Mcc<sup>ia</sup> es causada por la falta de un proceso de maduración a cargo de los productos de estos genes. Este proceso de maduración no implica modificaciones postraduccionales de la MccE492, ya que ambas formas de la microcina presentan la misma masa molecular, con un valor que es idéntico al valor esperado a partir de la secuencia del gen estructural. Se determinó que la diferencia funcional entre ambas formas de la microcina no se debe a diferencias en su estructura primaria, sino a diferencias en el contenido de estructura

secundaria. La Mcc<sup>ia</sup> presenta una mezcla de hélice- $\alpha$  y  $\beta$  estructura al azar, en tanto que Mcc<sup>a</sup> presenta un alto contenido de hoja- $\beta$ . La Mcc<sup>ia</sup> mantiene la capacidad para formar canales iónicos en la membrana citoplasmática, lo cual fue demostrado en experimentos *in vitro* con bicapas fosfolipídicas e *in vivo* mediante esferoplastos, los cuales son sensibles a la Mcc<sup>ia</sup>. Estos experimentos además demuestran que la Mcc<sup>ia</sup> es incapaz de atravesar la membrana externa de la célula blanco. Por otro lado, ensayos de competencia entre ambas formas de la microcina muestran que la actividad de Mcc<sup>a</sup> no es inhibida por Mcc<sup>ia</sup> en concentraciones saturantes (100 veces mayor). Este resultado sugiere que Mcc<sup>ia</sup> falla en el reconocimiento de un receptor, ya que si ésta quedara “atrapada” durante la translocación hacia el periplasma, bloquearía la vía de entrada de Mcc<sup>a</sup> e inhibiría su actividad bactericida. Por lo tanto, el proceso de maduración le confiere a la MccE492 la conformación/oligomerización correcta para que pueda reconocer/interaccionar con un receptor en la membrana externa de la célula blanco.

La existencia de dos formas funcionales de la MccE492 con idéntica estructura primaria pero con diferente conformación, asemejan a la MccE492 con el fenómeno que se ha descrito para priones. Un prión se define como una proteína con características infecciosas, que puede inducir un cambio desde una estructura normal a una infecciosa. Al igual como sucede en priones, la Mcc<sup>a</sup> (mayor contenido de estructura hoja- $\beta$ ) posee la capacidad de convertir a la forma inactiva hacia la forma activa, como se demostró en ensayos de activación diseñados para tal efecto, en los cuales se observó una ganancia en la actividad

que va desde 2 a 27 veces. Esta ganancia de actividad fue acompañada por un incremento en el contenido de conformación hoja- $\beta$ , determinado mediante dicroísmo circular en el UV-lejano. Estas conversiones se alcanzaron utilizando muestras de microcina altamente puras, y el fenómeno de activación fue propagado a través de ciclos de activación. Este resultado sugiere fuertemente que la información conformacional se transmite de proteína a proteína siendo menos probable la necesidad de algún otro factor. Un segmento de la MccE492 (residuos 16-38) presenta homología con la región conservada PrP (106-126) de los priones de mamíferos, responsable de la conversión conformacional. En ensayos de conversión *in vivo*, la cepa mutante np220 productora de MccE492(1-43), fue capaz de activar a Mcc<sup>ia</sup> lo que se observó como un halo de inhibición de crecimiento cuando ambas cepas son sembradas juntas sobre un césped de células sensibles, fenómeno que no se observa cuando ambas cepas son sembradas por separado. Estos resultados sugieren fuertemente que ésta región es la que le confiere el comportamiento priónico a la microcina E492.

La proteína integral de membrana MceB confiere inmunidad a la MccE492, en un mecanismo altamente eficiente y específico. El mecanismo más probable para su acción incluye una interacción con TonB, proteína esencial en la acción de la microcina. TonB sería necesaria para la inserción de la microcina en la membrana citoplasmática, ya que esferoplastos TonB<sup>-</sup> no presentan sensibilidad a Mcc<sup>a</sup> ni a Mcc<sup>ia</sup>. Se utilizó una aproximación genética de compensación de mutantes puntuales, para estudiar la existencia de una interacción entre MceB y TonB. Mediante mutagénesis química del gen *mceB* se aislaron las mutantes

puntuales MceBA17V y MceBA77V asociadas con una pérdida de la inmunidad, cambios ubicados en la primera y tercera hélice de transmembrana respectivamente, de acuerdo al modelo topológico de MceB. Este modelo es apoyado por fusiones obtenidas entre MceB y la proteína PhoA, ya que sólo las fusiones que ocurrieron en la vuelta periplasmática de MceB presentaron actividad PhoA, contrario a lo observado en fusiones en hélices de transmembrana. Los cambios obtenidos en MceB son conservados y afectarían la interacción específica de MceB con TonB a través de sus hélices de transmembrana, como consecuencia de un cambio en el empaquetamiento de la hélice, hecho que se ha demostrado disminuye la constante de unión entre hélices de transmembrana. Esto se demostró en experimentos de mutagénesis en los que se encontró mutantes de TonB con la capacidad de compensar el fenotipo  $imm^-$  de mutantes en MceB. Estas correspondieron a 3 tipos: las mutantes truncas  $TonB\Delta43-239$  y  $TonB\Delta109-239$ , y la mutante puntual  $TonBS16L$  localizada en la hélice de transmembrana de la proteína, mutantes de TonB que no cumplen su función biológica normal. TonB se encuentra en permanente transición entre isómeros energéticos, propiedad que depende de su interacción con receptores de membrana externa a través del extremo carboxilo terminal y con la proteína ExbB a través de la hélice de transmembrana. Las mutantes de TonB pierden esta capacidad, lo que aumentaría la disponibilidad de TonB para interactuar con MceB. De este modo se compensa la disminución en la afinidad entre ambas proteínas que provocan las mutaciones puntuales en MceB. No obstante, las células que portan las mutantes truncas de TonB presentaron sensibilidad a la

MccE492. Estos resultados nos permiten concluir que sólo la región N-terminal de TonB interactúa con MceB y, además, que sólo ésta región es necesaria para la acción de MccE492. Por lo tanto, la proteína TonB estaría implicada en la inserción de la MccE492 en la membrana interna, y no en la translocación de través de la membrana externa, a través del dominio periplasmático, como se ha descrito para otros procesos TonB-dependientes, incluida la acción de colicinas formadoras de poros. Lo anterior es apoyado por la resistencia a la microcina que presentan los esferoplastos TonB<sup>-</sup> y mediante ensayos con el pentapéptido sintético caja-TonB, el cual no posee un efecto inhibitorio sobre la actividad de la MccE492, como se ha descrito para la importación de moléculas que requieren de la proteína TonB para su translocación a través de la membrana externa.

## ABSTRACT

Microcin E492 (MccE492) is an antibiotic polypeptide active on strains of the family *Enterobacteraceae*. Its mechanism of action is through ion channels formation into the inner membrane of the target cell. The genetic determinants necessary for the production of active microcin are located in the chromosome of *Klebsiella pneumoniae* RCY492. These were cloned and expressed in *E. coli* and the recombinant microcin obtained had identical biochemical and biological properties compared with the native microcin. The existence of eight accessory genes necessary for the production of active microcin was determined through random Tn5 mutagenesis. These genes are involved in maturation, processing and export of microcin E492.

MccE92 is secreted in an active (Mcc<sup>a</sup>) and inactive (Mcc<sup>ia</sup>) form in the exponential and stationary phase of growth, respectively. This phenomenon correlated with the lack of transcription of *mceI* and J genes in the stationary phase. Mutations in *mceC*, I and J genes result in the production of Mcc<sup>ia</sup> at any growth phase, indicating that the production of Mcc<sup>ia</sup> is caused by the lack of a maturation process. This process does not imply posttranslational modifications of MccE492 because both forms, active and inactive, present the same molecular mass, with a value that is identical to the expected value deduced from the gen sequence. The functional difference between both microcin forms is not due to a difference in the primary structure, but to a difference in secondary structure. Mcc<sup>ia</sup> presents a high content of  $\alpha$ -helix structure, while Mcc<sup>a</sup> has a high content of  $\beta$ -sheet structure. Mcc<sup>ia</sup> is able to form ion channels in phospholipidic bilayers,

although with differences in conductance when compared with Mcc<sup>a</sup>. On the other hand, Mcc<sup>ia</sup> has a lethal effect when incubated with spheroplasts of sensitive cells, indicating that the inactive microcin is not able to cross the outer membrane of the target cell. In addition, the activity of Mcc<sup>a</sup> is not inhibited by high concentrations of Mcc<sup>ia</sup> (100-fold over Mcc<sup>a</sup> concentration), indicating that the defect of Mcc<sup>ia</sup> is at the level of receptor recognition, because a defect in the translocation process should result in a blockade of the entryway of Mcc<sup>a</sup>, reducing its lethal effect. Therefore, it is possible to conclude that the maturation process confers MccE492 the correct conformation/oligomerization necessary in the recognition/interaction with the receptor in the outer membrane of the target cell.

The existence of two functional forms of MccE492 with identical primary structures but with differences in their conformation resembles the phenomenon that has been described for prions. A prion is a protein with infectious properties that induces a change from a normal protein to an infectious one. As happens in prions, Mcc<sup>a</sup> (high  $\beta$ -sheet content) possesses the ability to convert the inactive form into the active form, as was shown in activation assays performed in different solvents, in which an increase of activity of 2 - 27 fold was observed. This increase in the activity was accompanied by an increase in the  $\beta$ -sheet conformation, determined by far-UV circular dichroism. These conversions were performed with highly purified microcin samples and the activation phenomenon was propagated in cycles of activation. These results strongly suggest that the conformational information is propagated from protein to protein and the need of another factor is less probable. A segment of the MccE492 (residues 16-38) is homologous to the



conserved region PrP (106-126) of mammalian prions, a region responsible for the conformational conversion process. A growth inhibition halo was observed when the mutants np220 (MccE492(1-43)) an inactive truncated microcin) and np133 (Mcc<sup>ia</sup>, a maturation mutant in *mceC*) were seeded together onto a sensitive cell lawn. This phenomenon was not observed when both strains were seeded separately, indicating that Mcc<sup>ia</sup> was activated by MccE492(1-43). These results strongly suggest that this region confers the prion-like properties to MccE492.

The integral membrane protein MceB confers immunity to MccE492, in a specific and highly efficient mechanism. The most probable mechanism includes an interaction with TonB, a protein that is essential for the microcin action. TonB is necessary for the insertion of microcin into the cytoplasmic membrane, because TonB<sup>-</sup> spheroplasts are not sensitive to Mcc<sup>a</sup> or to Mcc<sup>ia</sup>. To study the existence of an interaction between MceB and TonB, genetic experiments involving compensation of point mutations were performed. After chemical mutagenesis of the *mceB* gene, the point mutations MceBA17V and MceBA77V associated with the loss of immunity were isolated. Both mutants presented conserved changes, which are located in transmembrane helices according to a topological model of MceB. Fusions obtained between MceB and PhoA protein were consistent with this model, because fusions that occurred in the periplasmic loop of MceB presented PhoA activity, in contrast with the lack of activity found in the fusions that occurred in transmembrane-helices. The point mutations in MceB would modify the helix packing value, an important parameter in the interaction between transmembrane helices. In this way, point mutations in MceB would diminish the binding constant between this protein and TonB through their transmembrane segments. This was

confirmed by compensatory mutations in TonB. Three kinds of TonB mutants with the ability to compensate the  $\text{imm}^-$  phenotype of the MceB point mutants were isolated: truncated TonB $\Delta$ 43-239 and TonB $\Delta$ 109-239 mutants, and the TonBS16 point mutant. These mutants do not carry out the normal biological function of TonB. This protein is in a permanent transition between energetic isomers, property that depends on its interaction with the outer membrane receptors through the C-terminal region and with the ExbB protein through the transmembrane helix. The lack of isomerization process of TonB mutants would increase its availability to interact with MceB and in this way would compensate the decrease in the affinity between both proteins due to the point mutations in MceB. Truncated TonB proteins are sensitive to MccE492 action, indicating that only the N-terminal region of TonB is necessary for microcin action, probably for the insertion of MccE492 into the cytoplasmic membrane. TonB would not be involved in the translocation of microcin across the outer membrane, as it has been described for other TonB-dependent processes such as the action of pore-forming colicins, because the TonB mutants lack the C-terminal domain responsible for the interaction with the receptors. This is further confirmed by the lack of inhibition of microcin activity by the pentapeptide corresponding to a synthetic TonB-box. In similar conditions, this peptide produces the inhibition of the import of molecules that requires the TonB protein for their translocation across the outer membrane.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1. Bacteriocinas.

Las bacteriocinas son agentes antimicrobianos de naturaleza proteica producidas por una amplia variedad de bacterias gram positivas y negativas, que actúan sobre bacterias de la misma especie o especies relacionadas a la cepa productora (Riley y Wertz, 2002). Esta familia incluye una diversidad de proteínas en términos de tamaño, blanco bacteriano, modo de acción y mecanismo de inmunidad. Con respecto a las bacterias gram negativas, muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* producen sustancias antibióticas que inhiben el crecimiento de bacterias cercanamente relacionadas. Estas bacteriocinas han sido clasificadas dentro de 2 grupos: *colicinas* y *microcinas*. Las colicinas son proteínas tóxicas con tamaños que varían en el rango de 25 a 70 KDa, producidas en *E. coli* y activas contra este microorganismo y especies muy relacionadas. Estas proteínas que están codificadas en plasmidios, son producidas en grandes cantidades. Su producción es mediada por las condiciones que inducen el sistema SOS, y en su mayoría son liberadas al espacio extracelular mediante la ruptura selectiva de la célula (Lazdunski, 1998; Riley, 1993). Las microcinas representan una familia de antibióticos que se distingue de las colicinas por su menor tamaño molecular (<10 KDa) (Baquero y Moreno, 1984), no son inducidas por el sistema SOS y la liberación no es letal para la cepa productora, pues son secretadas por sistemas de exportación dedicados (Kolter y Moreno, 1992). Presentan resistencia a algunas proteasas, a condiciones extremas de pH y temperatura, y son solubles en metanol. La

actividad tóxica de las microcinas se lleva a cabo a través de diversos mecanismos, como la inhibición de la síntesis proteica (microcinas del grupo A y C), inhibición de la replicación del ADN (microcinas del grupo B) y disipación del potencial de energía celular (microcinas del grupo D y F) (Kurepina y Khumel, 1986). Tanto las cepas productoras de colicinas como microcinas se protegen de la autodestrucción mediante la síntesis de proteínas altamente específicas que han sido llamadas de “inmunidad”.

En el presente trabajo de tesis se tuvo como modelo de estudio la microcina E492, bacteriocina que ejerce su acción tóxica mediante la disipación del potencial de membrana de la célula blanco (Lagos *et al.*, 1993). Se estudiaron aspectos relacionados con su producción en forma activa y a su mecanismo de acción sobre la célula blanco. También se abordó el mecanismo de inmunidad a la microcina E492 en la célula productora, lo cual nos permitió entender algunos aspectos del mecanismo de acción de la microcina E492.

## **1.2. Sistema microcina E492.**

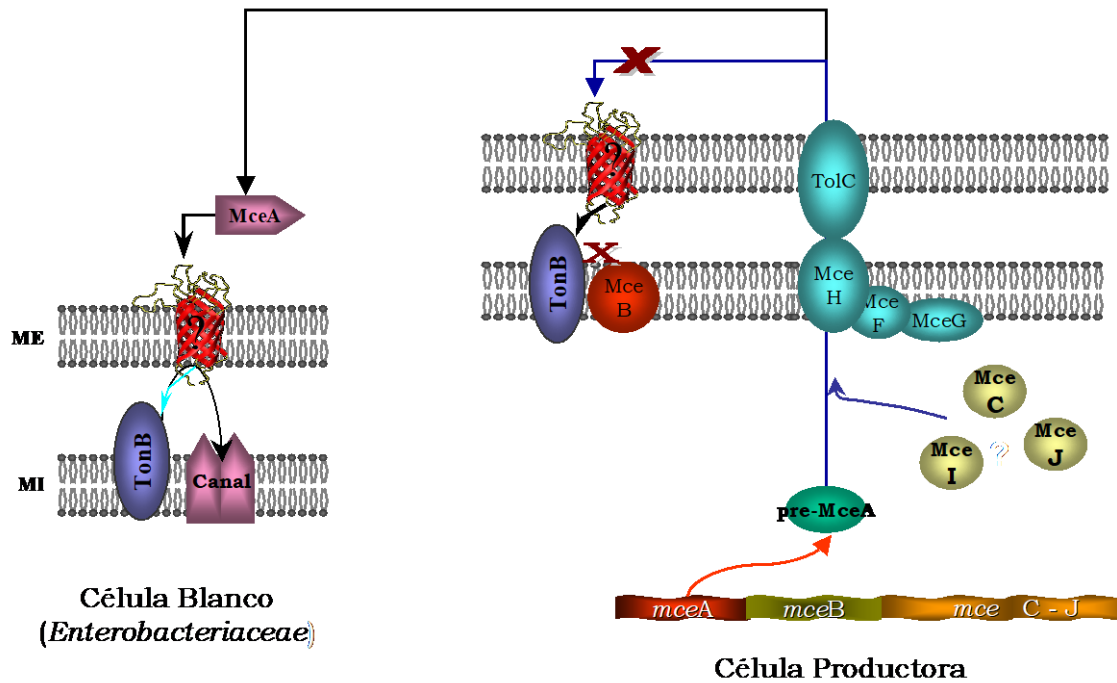
### **1.2.1. Origen y propiedades de la microcina E492.**

La cepa de *Klebsiella pneumoniae* RCY492 produce la microcina E492, un polipéptido antibiótico hidrofóbico con un pI de 3.8, que presenta toxicidad sobre cepas de *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y algunas cepas de *Vibrio* (de Lorenzo, 1984; de Lorenzo *et al.*, 1984; de Lorenzo y Pugsley, 1985). Es resistente a tripsina, a condiciones de pH ácido y a temperaturas sobre los 90°C. Mediante experimentos *in vitro* con bicapas fosfolipídicas, se determinó que la acción bactericida de la microcina E492 se debe a la formación de canales

iónicos que conducen a la despolarización de la membrana citoplasmática (Lagos *et al.*, 1993). Presenta la particularidad de ser producida en forma activa sólo durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano, hecho que la diferencia de las demás microcinas descritas, las cuales son producidas principalmente durante la fase estacionaria (de Lorenzo *et al.*, 1984; Orellana y Lagos 1996). En la fase estacionaria de crecimiento se produce una disminución en la actividad de la microcina, lo que se debe en parte a la producción de un antagonista el cual ha sido identificado como enteroquelina (Orellana y Lagos, 1996).

#### **1.2.2. Genética del sistema microcina E492.**

Los determinantes genéticos necesarios para la síntesis de microcina E492 y su inmunidad, presentes en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae* y que corresponden a un fragmento de 13 Kb, fueron clonados y expresados en *E. coli* VCS257 (Wilkins *et al.*, 1997). La microcina recombinante obtenida presenta las mismas propiedades bioquímicas y electrofisiológicas que la producida por *Klebsiella* (Wilkins *et al.*, 1997). Mediante mutagénesis al azar utilizando el transposón Tn5 se determinó la existencia de al menos 8 genes, además del gen estructural de la microcina, que son necesarios para la producción de una microcina activa (Lagos *et al.*, 2001). Los productos de estos genes estarían involucrados en procesos de maduración, procesamiento y exportación de la microcina E492 (figura 1). Mutantes en los genes *mceC*, *mceI* y *mceJ*, producen una microcina que es exportada al espacio extracelular y que presenta una



**Figura 1. Etapas en la producción y acción de la microcina E492.** ME, membrana externa; MI, membrana interna. La microcina E492 (MceA) es sintetizada como un precursor (pre-MceA) que sufre un proceso de maduración (MceC, I, J), procesamiento y exportación (MceG, H, F, TolC). La microcina no puede ejercer su acción sobre la cepa productora debido al efecto protector de la proteína de inmunidad MceB. La microcina madura interactúa con el receptor, es translocada a través de la membrana externa hacia el periplasma y se inserta en la membrana citoplasmática en la célula sensible.

movilidad relativa ( $M_r$ ) en geles denaturantes indistinguible a la producida por la cepa silvestre, pero que carece de actividad sobre la célula blanco (Lagos *et al.*, 2001). La comparación de secuencias para estos genes mostró que el gen *mceC* codificaría para una proteína de 370 aminoácidos, homóloga a una glicosiltransferasa, el gen *mceI* para una proteína de 163 aminoácidos con homología a una aciltransferasa, en tanto que el gen *mceJ* codificaría para una proteína de 524 aminoácidos sin homólogo conocido (Lagos *et al.*, 2001). Estos genes estarían implicados en un proceso de maduración de la microcina E492, proceso que podría corresponder a modificaciones de tipo postraduccionales como se ha descrito para otras microcinas. Este tipo de modificaciones confieren a la microcina la actividad tóxica que de otra forma no tendría, como es el caso del inhibidor de la DNA-girasa microcina B17, cuya eficacia antibiótica depende de modificaciones postraduccionales de 8 residuos de cisteína y serina a tiazoles y oxazoles respectivamente (Sinha *et al.*, 1998). Estas modificaciones son realizadas por un complejo enzimático denominado microcina B17 sintasa el cual está compuesto por tres enzimas codificadas en el sistema de la microcina B17: McbB, McbC y McbD ( Li *et al.*, 1996; Madison *et al.*, 1997).

### **1.3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas formadoras de poros.**

Como ya se mencionó, la microcina E492 forma canales iónicos en la membrana interna de la célula blanco. Existe escasa información acerca del modo de acción de otras microcinas formadoras de poros, en cambio sí existe variada bibliografía acerca del modo de acción de colicinas formadoras de poros. Debido a esto y a que la microcina presenta similitudes con algunas colicinas formadoras de

poros en cuanto al requerimiento proteico para poder ejercer su acción tóxica, en adelante analizaremos el mecanismo de acción de colicinas formadoras de poros paralelamente a la microcina E492 para un mejor entendimiento de su posible mecanismo de ingreso a la célula blanco.

La principal barrera en la acción de las bacteriocinas formadoras de poros en bacterias gram negativas es la presencia de la membrana externa, barrera que permite el paso hacia el periplasma sólo de moléculas hidrofílicas pequeñas (menor a 600 Da en *E. coli*) (Postle, 1990). En colicinas formadoras de poros, el modo de acción ha sido dividido en tres etapas. Primero se unen a un receptor específico en la superficie celular. Para este propósito, algunas colicinas utilizan proteínas de la membrana externa cuya función es dedicada al transporte de sideróforos (FepA, FhuA, FhuE, Cir), o vitamina B12 (BtuB), o nucleótidos (Tsx). Mutaciones en el receptor de una colicina en particular deja a la célula completamente resistente a la acción de ésta (Konisky, 1982; Pugsley y Reeves, 1976). Estudios destinados a encontrar un receptor para la microcina E492 no han tenido éxito, y sólo se ha descrito la obtención de una cepa mutante de *E. coli* (SemA<sup>-</sup>) que presentó una sensibilidad disminuida exclusivamente a esta microcina (Pugsley *et al.*, 1986). Sin embargo, el análisis en geles bidimensionales del contenido proteico de la membrana externa, no presentó diferencias entre la cepa normal y la mutante SemA<sup>-</sup>. Además, esta mutante presentó sensibilidad a altas concentraciones de microcina, lo cual sugiere la posibilidad que la microcina posea más de una vía para atravesar la membrana externa. Esto fue confirmado muy recientemente en nuestro laboratorio, donde se determinó que la microcina es



reconocida por tres receptores, FepA, Fiu y Cir (E. Strashburger y R. Lagos, resultados no publicados).

En la segunda etapa del mecanismo de acción de las colicinas formadoras de poros, llamada “translocación”, las colicinas atraviesan la membrana externa y el periplasma para finalmente alcanzar la membrana interna. Para este efecto, las colicinas y una variedad de bacteriófagos utilizan complejos proteicos destinados a la importación de nutrientes en la bacteria. Un grupo importante de mencionar debido a su similitud con la microcina E492, en cuanto al requerimiento proteico en esta etapa, son las colicinas del grupo B (A, B, E1, Ia, Ib, N, y K) las cuales dependen de la función de la proteína TonB para poder ejercer su acción (Lazdunski, 1998). Esta proteína es indispensable en la acción de la microcina E492 ya que mutantes carentes de TonB son resistentes a altas concentraciones de microcina (Pugsley *et al.*, 1986). En la tercera etapa, una vez que la colicina alcanza la membrana interna, ésta se inserta en la membrana citoplasmática y forma el canal iónico.

Consistente con las tres etapas en el modo de acción de las colicinas formadoras de poros, su cadena polipeptídica comprende tres dominios linealmente organizados correspondientes a cada una de estas etapas. El dominio N-terminal está envuelto en la etapa de translocación, el dominio central es responsable de la unión al receptor y el dominio C-terminal participa en la actividad tóxica. La microcina E492 debe cumplir esencialmente las mismas etapas para alcanzar su blanco de acción, y debido a su tamaño significativamente menor que las colicinas, la posible existencia de estos dominios funcionales en ella la convierte en un modelo de estudio muy atrayente.

Para poder tener una noción de la función que cumpliría la proteína TonB en el mecanismo de acción de la microcina E492, analizaremos la función biológica en la célula bacteriana y la función que se ha propuesto para esta proteína en la acción de las colicinas formadoras de poros.

#### **1.4. Sistema de translocación dependiente de TonB.**

TonB en *E. coli* es una proteína de 239 aminoácidos que está anclada a la membrana citoplasmática a través de su extremo amino terminal, atraviesa el espacio periplasmático y transduce energía desde la membrana citoplasmática a receptores en la membrana externa (Guerinot, 1994; Postle, 1990). En la función fisiológica normal, la proteína TonB parece estar envuelta únicamente en el transporte de solutos a través de la membrana externa hacia el espacio periplasmático, a través de una interacción con receptores de membrana externa a los cuales se unen estos solutos. En la actualidad se han identificado más de 20 proteínas de membrana externa cuya función depende de TonB, entre ellas los receptores de enteroquelina férrica (FepA), de ferricromo-Fe (FhuA) y de vitamina B12 (BtuB) (Postle, 1990). Estos receptores y las colicinas formadoras de poros comparten homología en una zona de su región N-terminal llamada caja-TonB (Asp[Glu]-Thr[Ile]-X-Val[X]-Val), secuencia importante como un mediador en algunas interacciones físicas entre TonB con receptores TonB-dependientes (Lazdunski *et al.*, 1998; Moeck y Coulton, 1998). En las colicinas se ha propuesto la existencia de una interacción directa de TonB con el complejo receptor-colicina, provocando un cambio conformacional en el receptor que conduciría a la

liberación de la colicina en el espacio periplasmático (Moeck y Coulton, 1998). Este paso de translocación finalmente sería comandado por la colicina, la cual compete ahora con su receptor por la unión a TonB, a través de la interacción de su dominio de translocación (que contiene la caja-TonB), que permite finalmente la translocación de su dominio C-terminal hacia la membrana interna (Wiener *et al.*, 1997; Goaux, 1997).

En su momento, el desconocimiento de los receptores involucrados en el paso de la microcina E492 a través de la membrana externa, dificultó la extrapolación de la función de TonB en la acción de la microcina. Mediante análisis de secuencia se examinó la posible existencia de una caja-TonB en la microcina E492, obteniéndose un resultado ambiguo, pues la única posible caja-TonB estaría en la región comprendida entre los aminoácidos 69 a 73 (Asp-His-Gly-Pro-Val) de la microcina, pero esta secuencia refleja solo pobremente la secuencia consenso (Lagos *et al.*, 1999). La posibilidad de que esta caja-TonB cumpla una función importante en la translocación de la microcina E492, fue explorada en ensayos de inhibición con un pentapéptido sintético caja-TonB, el cual inhibe procesos TonB-dependientes cuando es adicionado a un cultivo bacteriano (Tuckman y Osburne, 1992 ), resultados que se incluyen en esta tesis.

Los resultados obtenidos en nuestros estudios con células carentes de la barrera de permeabilidad que constituye la membrana externa (esferoplastos) indican la posible existencia de una interacción de la microcina E492 con TonB posterior a su translocación a través de la membrana externa. Además, microcinas aisladas desde mutantes en los genes de maduración que no presentan actividad sobre células intactas, presentan actividad sobre esferoplastos TonB<sup>+</sup>, pero no

sobre esferoplastos TonB<sup>-</sup>. Este resultado nos sugiere la existencia de una interacción entre la microcina E492 y TonB en el periplasma en forma independiente y posterior a su interacción con el receptor. Mediante experimentos de mutagénesis realizados en esta tesis determinamos que esta interacción ocurriría en la región N-terminal de TonB, diferente a lo descrito para colicinas formadoras de poros las cuales interactúan con la región C-terminal de TonB.

### **1.5. Inmunidad a bacteriocinas formadoras de poro.**

Las bacteriocinas no causan daño a la cepa que las produce, protección que es conferida por proteínas que han sido llamadas de inmunidad, codificadas en plasmidios o en el cromosoma de la célula productora de la bacteriocina (Lazdunski *et al.*, 1998). Para protegerse de la colicina liberada al espacio extracelular, la cepas productoras de colicinas sintetizan proteínas de inmunidad que son integrales de la membrana citoplasmática (Geli y Lazdunski, 1992), al igual que la proteína de inmunidad (MceB) de la microcina E492 (Lagos *et al.*, 1999). Las proteínas de inmunidad a colicinas formadoras de poros protegerían a la célula únicamente contra colicina externa, ya que ésta no podría formar el canal desde dentro de la célula debido a que la polaridad del potencial transmembrana es opuesto al requerido para su formación (Géli *et al.*, 1986). Teniendo en consideración que la cantidad de moléculas de colicina que alcanzan la membrana interna depende del número de sitios de importación ( $\approx 400$  por célula), una baja cantidad de proteínas de inmunidad sería suficiente para proteger a la célula, lo que explicaría porqué la inmunidad a colicinas formadoras de poros es

constitutivamente producida a un bajo nivel a pesar del alto nivel de expresión de la correspondiente colicina, como es el caso de la inmunidad a colicina E1 (Duché *et al.*, 1995; Song y Cramer, 1991). Este fenómeno también se observa en la inmunidad a la microcina E492, ya que cuando el gen *mceB* se clona bajo el control del promotor T7, se observa que las células son inmunes a altas concentraciones de microcina aún cuando el sistema no está inducido (Lagos *et al.*, 1999). La acción de estas proteínas de inmunidad es altamente específica y a menudo esta especificidad es utilizada para diferenciar colicinas cercanamente relacionadas (PilsI *et al.*, 1998). Esta alta especificidad sugiere la formación de un complejo molecular entre la proteína de inmunidad y la correspondiente colicina. Se han descrito dos mecanismos para la acción protectora de proteínas de inmunidad a colicinas formadoras de poros: **i)** una interacción directa de la proteína de inmunidad con el dominio formador de poro de la colicina, provocando su inactivación (colicinas A y B) (Geli y Lazdunski, 1992). **ii)** además, la proteína de inmunidad interaccionaría con proteínas del aparato de translocación (Cramer *et al.*, 1995).

Este último mecanismo explicaría mejor porqué bajos niveles de expresión de MceB confieren protección a la microcina E492, ya que la probabilidad de encuentro y asociación con el aparato de translocación sería mayor. En este contexto, el mecanismo de acción más probable de MceB implicaría una interacción con TonB, para impedir de esta forma la correcta inserción de la microcina en la membrana interna. Este modelo no descarta la posibilidad de la existencia de una interacción entre MceB y la microcina E492.

Las proteínas de inmunidad presentan variabilidad en cuanto a la inserción en la membrana (topología), lo que está de acuerdo con la especificidad que estas poseen. El conocimiento de la topología de la proteína de inmunidad es crucial para el entendimiento de su mecanismo protector. La topología de proteínas de inmunidad a colicina A y E1 (Cai y Cei, respectivamente) han sido determinadas en forma experimental. Cai contiene cuatro segmentos de transmembrana con sus regiones N- y C-terminal ubicadas hacia el citoplasma, mientras que Cei tiene solamente 3 segmentos de transmembrana con sus regiones N- y C-terminal dirigidos hacia el citoplasma y periplasma respectivamente (Géli *et al.*, 1988; Song *et al.*, 1991). De acuerdo a su perfil de hidrofobicidad y a programas de predicción de topología de proteínas de membrana, MceB constaría de 3 dominios transmembrana con su extremo N- y C-terminal ubicados hacia el periplasma y citoplasma respectivamente. Los resultados de los estudios de la topología de MceB en la membrana interna utilizando fusiones con la proteína fosfatasa alcalina (PhoA) obtenidos en esta tesis concuerdan con el modelo predictivo.

#### **1.6. Adquisición de propiedades tóxicas en las microcinas.**

Normalmente las microcinas son sintetizadas como precursores sin actividad bactericida, los cuales son modificados postraduccionalmente adquiriendo de esta forma su actividad tóxica. Como ya se mencionó, la microcina E492 requiere de un proceso de maduración para ser producida en forma activa, proceso en el cual están involucrados los productos de al menos tres genes (*mceC*, I, J). La falta de cualquiera de estos productos génicos resulta en la producción de una microcina inactiva, lo cual se observa al aislar microcina desde

el sobrenadante de cultivos en fase estacionaria o desde mutantes en los genes de maduración. En nuestro laboratorio determinamos que el defecto de la forma inactiva altera el reconocimiento de los receptores en la superficie de la célula blanco (Corsini *et al.*, 2002).

Uno de los objetivos de la presente tesis, fue estudiar las diferencias entre las formas activa e inactiva de la microcina, específicamente pensando que las diferencias entre ambas formas eran debidas a modificaciones postraduccionales. Los genes de la maduración sintetizarían proteínas encargadas de dicho proceso, y en la propuesta original se planteó su estudio. Sin embargo, durante el desarrollo de esta tesis esta posibilidad fue descartada al establecer que tanto la forma activa como la inactiva tienen la misma estructura primaria. La existencia de dos formas de una proteína, una activa y otra inactiva, ha sido descrita en priones de mamíferos, hecho que nos llevó a explorar la posibilidad que la microcina presente propiedades que la asemejen a un prión.

El prión fue originalmente identificado como el agente infeccioso causante de la encefalopatía espongiforme transmisible. Este agente carece por completo de ácidos nucleicos y consiste solo de una proteína “infecciosa” capaz de convertir la proteína normal, llamada PrP<sup>C</sup>, a la forma anormal PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner, 1998; Heppner y Aguzzi, 2001). El mayor contenido de estructura hoja-β presente en PrP<sup>Sc</sup> comparado con PrP<sup>C</sup> constituye la principal diferencia estructural entre ambas proteínas (Caughey *et al.*, 1991). En la actualidad se han identificado muchas enfermedades que son causadas por priones, las cuales han sido agrupadas como “desordenes conformacionales proteicos” y se caracterizan por: i)

cambios en la estructura terciaria o secundaria de la proteína sin cambios en su estructura primaria; ii) la proteína puede adoptar al menos dos conformaciones estables; iii) la forma tóxica es capaz de convertir la forma normal hacia la forma tóxica; iv) la forma priónica posee un alto contenido de estructura hoja- $\beta$ . Todo lo anterior lleva a una ganancia de una actividad tóxica o la pérdida de la función de la proteína que finalmente causa la enfermedad (Prusiner, 1998; Soto, 2001). Ambas isoformas de la proteína son idénticas en tamaño, secuencia y modificaciones postraduccionales. La conversión de PrP<sup>C</sup> dentro de PrP<sup>Sc</sup> involucra un cambio conformacional dramático donde el contenido de hélice- $\alpha$  y estructura al azar de la proteína normal disminuye y el contenido de hoja- $\beta$  aumenta (Cohen y Prusiner, 1998).

El fenómeno prión ha sido descrito también en levaduras, en las cuales los factores [*PSI+*] y [*URE3*] producen cambios fenotípicos heredables transmitidos en forma citoplasmática. (Wickner, 1994; Lindquist, 1997; Sparrer *et al.*, 2000). No obstante, en este caso los cambios no son transmitidos de célula a célula en forma horizontal y no tienen un efecto nocivo para la célula portadora. Puesto que se han encontrado priones primero en mamíferos y posteriormente en levaduras, es probable que estos también estén presentes en procariontes. La existencia de este fenómeno no ha sido descrito en bacterias, pero, los resultados obtenidos en nuestros estudios nos llevan a postular que la microcina presenta propiedades que la asemejan a un prión, lo que podría convertir a la microcina E492 en el primer prión bacteriano en ser descrito.



## HIPÓTESIS.

Sobre la base de los antecedentes presentados, se puede postular que la microcina E492 interacciona con la proteína TonB. Esta interacción es necesaria para su translocación e inserción en la membrana interna de la célula blanco. La baja cantidad de proteína de inmunidad que confiere protección a microcina E492 permite postular que el mecanismo más probable para su acción sería a través de su interacción con proteínas del aparato de translocación, impidiendo la translocación y/o inserción de la microcina en la membrana citoplasmática.

Se plantean las siguientes hipótesis de trabajo, las que serán sometidas a confirmación experimental:

1. El proceso de maduración de la microcina E492 es necesario para que ésta pueda interactuar con el receptor y/o con proteínas del sistema de translocación TonB.

2. La microcina E492 interacciona directamente con la proteína TonB y esta interacción sería necesaria para su inserción en la membrana citoplasmática de la célula blanco.

3. La proteína de inmunidad ejerce su acción protectora en la membrana citoplasmática por su interacción con proteínas del sistema de translocación TonB, evitando de este modo la inserción de la microcina en la membrana interna de la célula blanco. A este respecto se postula como hipótesis alternativa la existencia de una interacción directa entre la proteína de inmunidad y la microcina E492, o ambas interacciones.

## **O B J E T I V O S .**

### **Objetivo general**

Caracterizar la interacción tanto de la microcina E492 como de la proteína de inmunidad con el aparato de translocación TonB.

### **Objetivos específicos:**

1. Determinar la interacción de la microcina E492 con proteínas del aparato receptor/translocador, y la importancia del proceso de maduración en esta interacción.
2. Establecer la naturaleza del proceso de maduración de la microcina E492.
3. Identificar los dominios de la proteína de inmunidad que están involucrados en su posible interacción con la proteína TonB y determinar la topología que presenta en la membrana citoplasmática.

## **Materiales y Métodos.**

### **2.1. Materiales.**

Cepas bacterianas, fagos y plasmidios obtenidos desde fuente externa están descritos en la tabla 1.

De Gibco, BRL (Grand Island, NY, USA) se obtuvo enzimas de restricción, Taq DNA polimerasa, Elongasa, desoxinucleótidos, marcador DNA  $\lambda$  *HindIII*, CIAP, kit CONCERT™ Rapid PCR Purification System, PCR dsDNA Cycle Sequencing System.

De Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo, USA) se obtuvo ribonucleasa A, fluorescamina, anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, bis-acrilamida, BSA, SDS, azida de sodio, fosfato di-ácido de potasio, azul brillante de Coomassie, estándar de bajo peso molecular para péptidos, glucosa, Tween 20, tricina.

De Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania) se obtuvo DNAsa I

De Amersham Bitech Ltda (UK) se obtuvo membranas de nitrocelulosa.

De BioRad Laboratories Inc., Hercules (Ca, USA) se obtuvo acrilamida, persulfato de amonio, TEMED.

De Merck, (Darmstadt Alemania) se obtuvo azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, carbonato ácido de sodio, cloruro de calcio.

De Winkler Limitada (Santiago, Chile) se obtuvo cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio hexahidratado, dimetilformamida, cloruro de guanidinio, tris, glicina,

**Tabla 1.** Cepas bacterianas, plasmidios y fagos utilizados en este trabajo.

Cepa	Genotipo/Fenotipo	Fuente o Referencia
<b>E. coli</b>		
CC118	<i>araD139Δ(ara. Leu)7697ΔlacX74ΔphoA20 galE galK recA1 rpsE</i>	Manoil y Beckwith 1985
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT r <sub>B</sub> m <sub>B</sub>	Novagen
K38pGP1-2	HfrC (λ) portando plasmidio que codifica el gen cl857 y RNA-polimerasa de T7 bajo control de P <sub>L</sub> , kan <sup>r</sup>	Tabor y Richarson 1985
X8605	F <sup>-</sup> <i>trpR Δ(lac)U169 strA Δ(tonB-lacP)</i>	Guarente y Beckwith 1978
VCS257	DP50 <i>sup F[supE44 supF58 hsd53(rB mB) dapD8 lacY1 glnV44 D(gal-uvrB)47 tyrT58 gyrA29 tonA53D(thyA57)]</i>	Stratagene
<b>S. typhimurium</b>		
MST2002	<i>hisC10091::TnphoAhis(HoA)9556::MudP22/PJS28 P22 gen 9+ Amp<sup>r</sup></i>	S. Maloy
MST308	<i>phoN51::Tn10Tet</i>	S. Maloy
Plasmidios		
pJEM15	Codifica los determinantes genéticos para microcina E492 e inmunidad. Duplicación del fragmento de 2.5kb <i>SalI</i> (gen <i>mceF</i> ).	Wilkens <i>et al.</i> , 1997.
p157	fragmento de 0.3-kb <i>NdeI-EcoRI</i> ( <i>mceB</i> ) desde pBSC-47 en pT7-7.	Lagos <i>et al.</i> , 1999.
pIM91	pSU2718 <i>tonB</i>	Traub <i>et al.</i> , 1993
<b>Fagos</b>		
P22 HT hint	<i>int-201</i>	Anderson y Roth 1978.

glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, BSA, MOPS, formamida,  $\beta$ -mercaptoetanol, citrato de sodio, marcador de proteína preteñido, agarosa, acetato de amonio 7.5 M, pH 7.5, glicerol, sacarosa, TEMED, acrilamida, bis-acrilamida, fenol-cloroformo básico, marcador DNA LAMBDA/HindIII, marcador DNA escala 1kb, marcador DNA escala 100 bp, Tritón X-100, 5-bromo-cloro-indolil fosfato, fenol saturado básico, mitomicina C, dodecilsulfato de sodio, DL-ditiotreitol, EDTA sal disodica 2-hidrato,

De Novagen se obtuvo  $\lambda$ DE3 Lisogenization kit.

De FERMELO (Santiago, Chile) se obtuvo Kit Wizard Plus SV, nucleótido 10 mM dNTP set,  $^{32}$ P-  $\gamma$ ATP 500  $\mu$ Ci,

De TCL (Santiago, Chile) se obtuvo reactivos grado técnico: ácido acético, etanol, metanol, acetona, ácido clorhídrico.

De Fundación Para Estudios Biomédicos Avanzados de la Facultad de Medicina Universidad de Chile, se obtuvieron los partidores T7-pro, HC-rev, y el péptido ETVIV.

De BUHOS Sociedad Comercial Industrial Limitada (Santiago, Chile), se obtuvo Rx Revelador P/4 LTS KODAK, RX Fijador P/4 LTS KODAK.

De Fluka Chemie AG Messerschmittstr (Suiza) se obtuvo cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio.

De DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, USA) se obtuvo triptona, extracto de levadura, casamioácidos.

De J. T. Baker Edo de México (México) se obtuvo hidróxido de sodio.

De Polaroid (Santiago Chile) se obtuvo película instantánea 667.

De Waters (USA) se obtuvo cartuchos Sep-Pak C18.

De US Biologicals Swampscott (MA USA) se obtuvo arabinosa.

De Flamingo Pharmaceúticals se obtuvo cloranfenicol.

De Laboratorio Benguerel, Ltda. (Santiago, Chile) se obtuvo tetraciclina.

De Lyka Lab. Limited se obtuvo ampicilina.

De Boehringer Mannheim Corp. (Indianapolis, USA) se obtuvo Tritón X-100.

## **2.2. Técnicas moleculares.**

Todas las operaciones no detalladas (subclonamientos, PCR, aislamiento de ADN, preparación de células electrocompetentes, transformación, electroporación, secuenciación etc.) se realizaron utilizando métodos estandarizados (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1992).

## **2.3. Aislamiento y purificación de microcinas.**

### **2.3.1. Purificación de la forma activa.**

La forma activa de la microcina E492 fue extraída desde el sobrenadante de la cepa de *E. coli* VCS257pJEM15 crecida en medio mínimo M9 (Miller, 1972) suplementado con citrato y glucosa al 2 % p/v (Orellana y Lagos, 1996). El sobrenadante de 1 litro de cultivo en fase exponencial ( $A_{600} \sim 0.7$ ) se filtró a través de una columna Sep-Pack C18 (Waters). La columna se lavó con 5 ml de metanol 60% y la microcina se eluyó con 3 ml de metanol 95% (de Lorenzo, 1984). La microcina obtenida en metanol es estable y mantiene su actividad por meses.

### **2.3.2. Purificación de formas inactivas de la microcina.**

#### **2.3.2.1. Purificación desde la fase estacionaria.**

La cepa de *E. coli* VCS257pJAM434 se creció en medio M9 suplementado con glucosa y citrato al 2% p/v, y 200  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> hasta la fase estacionaria. Las células se obtuvieron por centrifugación, se lavaron 2 veces y se resuspendieron en el mismo volumen de medio fresco. Después de incubaciones de 6 a 14 h a 37°C, la microcina producida en fase estacionaria se purificó desde el sobrenadante de acuerdo a lo descrito en el punto 2.3.1.

#### **2.3.2.2. Purificación desde mutantes en los genes de maduración.**

La microcina se aisló desde el sobrenadante de las cepas de *E. coli* np133, np205, np218 y np221, utilizando la metodología descrita en el punto 2.3.1.

#### **2.3.3. Geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS) y marcación fluorescente de las muestras de microcina.**

Alícuotas de 100  $\mu$ l de muestra de microcina se evaporaron a 35°C al vacío (Labconco Centrivap Console) hasta un volumen final de 10  $\mu$ l. Se adicionó 8  $\mu$ l de solución de fluorescamina en DMSO, 4  $\mu$ l de borato de sodio 0.4 M, pH 9.0, y 4  $\mu$ l de amortiguador de carga 4x. La mezcla se calentó a 100°C por 3 min y se resolvió en PAGE-SDS al 16%.

#### **2.3.4. Cromatografía en fase reversa.**

Las microcinas se sometieron a una mayor purificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Beckman System Gold).

Alícuotas de 1.5 ml de la muestra de microcina se diluyeron con agua np hasta un volumen final de 5 ml y se inyectaron en un sistema de columna C4 (Vydac). La purificación mediante HPLC de fase reversa se realizó usando un gradiente lineal de metanol en agua desde 30 a 100% con un flujo de 0.5 ml/min durante 60 min. Se registró la absorbancia a 214 nm y se determinó la actividad microcina de las fracciones colectadas sobre un césped sensible. En el caso de las formas inactivas, la aparición de microcina en las fracciones colectadas se determinó mediante PAGE-SDS.

### **2.3.5. Caracterización de agregados formados por muestras de microcina.**

La formación de agregados en soluciones que contienen las muestras de microcina se determinaron mediante dispersión de luz en un espectrométero de Luminiscencia Perkin Elmer LS50, utilizando una celda de 1 cm de paso de luz y atenuadores de intensidad de 2%. Se registró la luz dispersada en un ángulo de 90° con respecto de la luz incidente de 350 nm.

## **2.4. Ensayos de la actividad bactericida de muestras de microcina.**

### **2.4.1. Ensayo en cultivos líquidos.**

Cada vez que se ensayó la actividad de la microcina en cultivos celulares, el metanol se evaporó y la muestra se resuspendió en el mismo volumen de agua o buffer correspondiente. Alícuotas de 100 µl de la muestra de microcina se mezclaron con 100 µl de un cultivo de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)p11α2 ( $A_{600} = 0.6$ ) sensible a la microcina y se incubó por 15 min a 37°C. Diluciones seriadas de



esta mezcla fueron sembradas sobre agar-LB y el número de células sobrevivientes fue determinado mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC). El porcentaje de células sobrevivientes fue estimado con respecto al control sin tratamiento con microcina.

#### **2.4.2. Ensayo sobre césped bacteriano.**

Alícuotas de 5  $\mu$ l de diluciones seriadas de la muestra de microcina fueron depositadas sobre un césped de *E. coli* BL21(DE3)p11 $\alpha$ 2. Después de una incubación de 12 h a 37°C, la actividad bactericida se visualizó como un halo de inhibición de crecimiento y se expresó en unidades arbitrarias por ml (AU/ml) (Mayr-Harting *et al.*, 1972).

#### **2.4.3. Determinación de la actividad formadora de canales *in vitro*.**

Las bicapas se formaron usando una mezcla 4:1 de palmitoil-oleoil-fosfatidiletanolamina (POPE) y fosfatidilcolina (PC) para dar una concentración final de 20 mg/ml en decano (Lagos *et al.*, 1993). La membrana separó dos compartimentos acuosos de 0.1 M KCl, 0.01 M ácido 2-N(morfolino)etanosulfónico (MES)-KOH, pH 6.7. Uno de los compartimentos (lado *cis*) fue conectado a una fuente de poder que permitió la aplicación de potenciales desde 0 a  $\pm$  200 mV. El flujo de corriente a través de la membrana, como resultado del potencial aplicado, fue medido por un transductor de corriente-voltaje conectado al otro compartimiento (lado *trans*). La corriente se registró simultáneamente en papel, en

un osciloscopio y se grabó en una cinta de vídeo para análisis posteriores. La microcina se adicionó directamente sobre la membrana en el compartimiento *cis*.

## **2.5. Caracterización biológica de las distintas formas de la microcina E492.**

### **2.5.1. Actividad sobre esferoplastos.**

#### **2.5.1.1. Preparación de esferoplastos..**

Los esferoplastos se prepararon básicamente de acuerdo a lo descrito por Weiss (1976). La cepa de interés se creció en 100 ml de medio M9 suplementado con glicerol al 0.5% p/v hasta una  $A_{600} \sim 0.5$ . Las células se colectaron por centrifugación, se lavaron 2 veces con 20 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, y se resuspendieron en 20 ml de 100 mM Tris-HCl, 20% p/v de sacarosa, pH 8.0. Mientras se aplicaba agitación constante, se adicionó 1 ml de solución de lisozima (6 mg/ml) y se incubó la mezcla por 15 min a 37°C. Se adicionó lentamente 2 ml de una solución de 0.1 M EDTA, pH 8.0, y se incubó por otros 15 min. En forma rutinaria la cantidad de esferoplastos se determinó por la disminución del título celular después de diluciones en agua (solución hipotónica).

#### **2.5.1.2. Ensayo de sensibilidad a microcina.**

Se incubaron alícuotas de 100  $\mu$ l de esferoplastos con 100  $\mu$ l de muestra de microcina por 15 min a 37°C. Se sembraron diluciones seriadas sobre placas agar-LB, el título celular fue determinado mediante el conteo de las UFC y el porcentaje de sobrevivencia de los esferoplastos se estimó respecto del control sin tratamiento con microcina.

### **2.5.2. Ensayo de inmunidad a la microcina E492.**

Alícuotas de 300  $\mu$ l de cultivo de la cepa a analizar se mezclaron con 3 ml de agar blando ( 0,75 % p/v) y se esparcieron sobre placas agar-LB. Sobre este césped se sembraron alícuotas de 5  $\mu$ l de diluciones seriadas de microcina E492 purificada. Las células inmunes no presentaron la formación de halos de inhibición.

### **2.5.3. Ensayos de competencia entre las formas activa e inactiva de la microcina E492.**

Los ensayos se realizaron utilizando la aproximación experimental descrita por Orellana y Lagos (1996). 100  $\mu$ l de la forma inactiva de la microcina se adicionaron a 100  $\mu$ l de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3)p11 $\alpha$ 2 ( $A_{600} = 0.6$ ) y la mezcla se incubó por 15 min a 37°C. Posteriormente se adicionó 100  $\mu$ l de la forma activa y se incubó por otros 15 min a 37°C. El título celular se determinó mediante el conteo de UFC sobre placas de agar-LB.

**2.5.4. Ensayo de competencia con pentapéptido caja-TonB.** Los ensayos se realizaron de acuerdo a lo descrito por Tuckman y Osburne (1992). Se utilizó el pentapéptido sintético caja-TonB Glu-Thr-Val-Ile-Val. Cultivos de *E. coli* BL21 ( $A_{600} = 0.6$ ) se trataron con 100  $\mu$ g/ml del pentapéptido caja-TonB por 1 h a 37°C. Se adicionó microcina E492, se incubó por 15 min y se determinó el título celular.

## **2.6. Ensayos de conversión de la forma inactiva a la forma activa de la microcina E492.**

Los ensayos de conversión consistieron básicamente en incubar la forma activa de la microcina con un exceso molar de la forma inactiva, la mezcla fue sometida a una desnaturación suave, después de lo cual se determinó la actividad microcina resultante. Se utilizaron tres métodos en la activación, los que se diferenciaron básicamente en el solvente utilizado.

### **2.6.1. Activación en agua.**

Alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de una mezcla de forma inactiva y activa de la microcina 9:1 (v/v) en metanol 95% se evaporaron a 35°C al vacío (Labconco Centrivap Console) hasta un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ . Se adicionó 90  $\mu\text{l}$  de agua np y se incubó por 10 min a 37°C. La actividad de la muestra se determinó mediante ensayo en cultivo líquido como se describe en el punto 2.4.1.

### **2.6.2. Activación a pH ácido.**

Este ensayo correspondió a una variación del ensayo descrito en el punto anterior. En lugar de agua, las muestras se resuspendieron en 90  $\mu\text{l}$  de amortiguador 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 2.3, e incubadas por 60 min a 37°C.

### **2.6.3. Activación en metanol.**

La mezcla de ambas formas de la microcina (9 inactiva : 1 activa v/v) se evaporó hasta un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ , se adicionó 10  $\mu\text{l}$  de agua np estéril y se incubó por 10 min a 37°C. Se adicionó 80  $\mu\text{l}$  de metanol p.a. y la actividad se determinó mediante el ensayo sobre césped sensible.

En cada ensayo de activación los controles correspondientes a la forma activa e inactiva de la microcina por separado se trataron de la misma forma que la mezcla de activación.

### **2.6.4. Ciclos de activación.**

En los experimentos de ciclos de activación, la microcina que ya ha sido activada en un primer ciclo se utilizó para activar a más forma inactiva en un segundo ciclo. Cada ciclo de activación se realizó como se describió en el punto 2.6.3.

## **2.7. Caracterización de formas activas e inactivas de la microcina.**

### **2.7.1. Espectrometría de masa.**

Alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de las muestras de microcinas en metanol se evaporaron en un concentrador Centrivap y se resuspendieron en el mismo volumen de solución de acetonitrilo, ácido trifluoroacético 0.1%, metoxietanol e isopropanol. Se inyectó directamente 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra en la fuente del espectrómetro de masas y se analizaron utilizando un instrumento Quattro II con un analizador de masa de triple cuádruplo (SOP MS - 102) con un rango de masa

m/z 1350-2850. La elución se efectuó usando los mismos volúmenes de acetonitrilo, ácido trifluoroacético al 0.1%, metoxietanol e isopropanol a un flujo de 10  $\mu$ l/min (SOP MS - 108).

### **2.7.2. Dicroísmo circular.**

Los espectros de soluciones que contenían las muestras de microcina en metanol se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-810 a 25°C, utilizando una celda de 0.1 cm de paso de luz. Se acumularon los espectros de 10 corridas a intervalos de 1 nm en un rango de longitud de onda entre 190-250 nm. El espectro de metanol obtenido bajo condiciones idénticas fue restado. Los datos se analizaron mediante los programas contenidos en DICROPROT (<http://dicroprot-pbil.ibcp.fr/Documentation-dicroprot.html>) y entre ellos el programa CONTIN (Provencher, 1982a,b) se utilizó para expresar el porcentaje de estructura secundaria.

### **2.7.3. Microscopía electrónica.**

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

## **2.8. Obtención de mutantes compensatorias entre MceB y TonB.**

### **2.8.1. Mutagénesis *in vitro* del gen *mceB*.**

La mutagénesis se realizó de acuerdo a lo descrito por Miller (1972). El plasmidio p157 (que porta el gen *mceB*), se incubó durante 36 h a 37°C con 0.4 M hidroxilamina, 0.5 M fosfato de potasio, 5 mM EDTA. Las muestras se dializaron contra 2 L de 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5, por 2 h a 4 °C con cambios de buffer cada 40 min. El ADN se precipitó con etanol y se utilizó para transformar mediante electroporación la cepa de *E. coli* X8605 ( $\Delta$ tonB). Las células transformantes que presentaron un fenotipo  $\text{imm}^-$  se seleccionaron mediante réplica de placa sobre agar-LB/amp y césped de *E. coli* VSC257pJEM15 (cepa productora de microcina E492). El fenotipo  $\text{imm}^-$  se confirmó sembrando 5  $\mu$ l de cultivo celular de cada clon sobre un césped productor de microcina, seleccionándose los clones incapaces de crecer sobre este césped. Se aisló el ADN plasmidial de los clones seleccionados y el gen *mceB* se secuenció utilizando los partidores T7-pro y HC-Rev (tabla 2).

### **2.8.2. Sensibilidad a microcina de mutantes puntuales en MceB.**

La sensibilidad a la microcina de mutantes en MceB se analizó en cultivos líquidos y en césped como se describe en los puntos 2.4.1 y 2.5.2 respectivamente.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR y secuenciación.

Partidor	Secuencia (5'→3')
Tn1	AGGTCACATGGAAGTCAGATGCTGGAAAA
T7-pro	TAATACGACTCACTATAGGG
HC-rev	ATCGATGATAAGCTTGGGCT
M13F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
MP18	AGCGGATAACAATTTACACAGGAT



### **2.8.3. Mutagénesis *in vitro* del gen *tonB*.**

El plasmidio pIM91 (que porta el gen *tonB*) se trató con hidroxilamina como se describió para el plasmidio p157 y se transformó mediante electroporación en las cepas de *E. coli* X8605(pM157A17) y X8605(pM157A77), las cuales corresponden a células TonB<sup>-</sup> que portan una mutante puntual de MceB codificada por los plasmidios indicados en paréntesis (tabla 3). La suspensión celular obtenida después del tratamiento se separó en alícuotas de 100 µl y se incubaron por 2 h a 37°C. A cada alícuota se adicionó 100 µl de microcina E492 purificada, se incubó por 15 min a 37°C y la mezcla se esparció sobre placas agar-LB/amp/cm. Las colonias obtenidas en las placas (fenotipo imm<sup>+</sup>) se crecieron en caldo LB/amp/cm y alícuotas de 5 µl se depositaron un sobre césped productor de microcina para confirmar el fenotipo imm<sup>+</sup>. Se aisló el ADN plasmidial desde estos clones y se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* X8605. Las transformantes se analizaron mediante réplica de placa sobre placas agar-LB/cm y agar-LB/amp, seleccionándose los clones que presentaron un fenotipo amp<sup>s</sup> - cm<sup>r</sup> (clones que portan solo el plasmidio pIM91 mutado), desde los cuales fue secuenciado el gen *tonB* utilizando los partidores M13F y MP18 (tabla2).

### **2.8.4. Sensibilidad de mutantes en TonB a la microcina E492.**

La sensibilidad a la microcina de mutantes puntuales de MceB se realizó como se describe en el punto 2.5.2. El mismo método se utilizó para ensayos de complementación entre TonB y MceB.

**Tabla 3.** Plasmidios que portan mutaciones puntuales en los genes *mceB* y *tonB* obtenidas mediante mutagénesis *in vitro* con hidroxilamina.

Plasmidio	Vector origen → mutante
pM157A17	p157 → MceBA17V
pM157A77	p157 → MceBA77V
pIM16	pIM91 → TonBS16L
pIM42	pIM91 → TonB $\Delta$ 43-239
pIM108	pIM91 → TonB $\Delta$ 109-239

Para cada plasmidio se indica el vector desde el cual fue obtenido mediante mutagénesis con hidroxilamina, y la mutante puntual para la cual codifican es indicada después de la flecha.

## **2.9. Construcción de fusiones entre la proteína de inmunidad a la microcina (MceB) y la proteína fosfatasa alcalina (PhoA).**

### **2.9.1. Construcción de la cepa pMST308(p157).**

La cepa de *S. typhimurium* MST308 se transformó mediante electroporación con el plasmidio p157, y las transformantes obtenidas fueron analizadas mediante replica de placa sobre placas agar-LB/amp y césped productor de microcina. Se seleccionaron los clones capaces de crecer sobre el césped productor (fenotipo imm<sup>+</sup>) y el fenotipo fue confirmado mediante ensayos de inmunidad a la microcina E492 como se describe en el punto 2.5.2.

### **2.9.2. Obtención de lisado del fago P22 (lisado-P22).**

La cepa de *S. typhimurium* MST2002 se creció a 37°C hasta fase exponencial media ( $A_{600} = 0.5$ ), se adicionó mitomicina C a una concentración final de 2 µg/ml y se incubó por 12 h. El cultivo se centrifugó para eliminar los restos celulares y se adicionaron gotas del cloroformo al sobrenadante (que contiene las partículas del fago P22), el cual fue alicuotado y guardado a -80°C hasta su uso.

### **2.9.3. Infección de *S. typhimurium* con fago P22 y selección de clones con fusiones.**

Alícuotas de 100 µl de la cepa receptora de *S. typhimurium* pMST308(p157) crecida en medio NB se mezcló con volúmenes crecientes (0, 50, 100 y 200 µl) de lisado-P22 diluido 1/50 en solución 0.85% p/v de NaCl estéril. Se realizó un control solamente con 200 µl de lisado-P22, para descartar la presencia de bacterias en éste. La mezcla se esparció sobre placas agar-NB/amp-kan y las colonias

obtenidas en cada placa se resuspendieron en 1 ml de medio NB, suspensión celular desde la cual se extrajo el ADN plasmidial.

#### **2.9.4. Construcción de la cepa de *E. coli* CC118(DE3).**

La cepa de *E. coli* CC118 (PhoA<sup>-</sup>) se transformó en CC118(DE3) utilizando el “λDE3 Lysogenization Kit” de Novagen y de acuerdo a las instrucciones descritas por el proveedor.

#### **2.9.5. Obtención de las fusiones en *E. coli* y selección de fusiones en el gen de inmunidad.**

El ADN plasmidial obtenido en el punto 2.9.3 se utilizó para transformar mediante electroporación la cepa de *E. coli* CC118(DE3). Las transformantes se seleccionaron sobre placas agar-LB/amp/kan a las cuales se ha adicionado el reactivo cromogénico BCIP a una concentración final de 40 µg/ml. Este reactivo permite diferenciar entre fusiones PhoA<sup>+</sup> (colonias azules) y fusiones PhoA<sup>-</sup> (colonias blancas). Las fusiones que presentaron la inserción del transposón en el gen de inmunidad se seleccionaron mediante replica de placa sobre placas agar-LB/amp/kan y césped *E. coli* VSC257pJEM15, seleccionándose aquellas colonias incapaces de crecer en este césped (fenotipo imm<sup>-</sup>). Los clones seleccionados se crecieron en caldo LB/amp/kan y alícuotas de 5 µl de cada cultivo se sembraron sobre un césped productor de microcina para confirmar el fenotipo imm<sup>-</sup>.

#### **2.9.6. Caracterización de las fusiones mediante PCR.**

Se aisló el ADN plasmidial de cada uno de los clones seleccionados y se utilizó en reacciones de PCR en las que se utilizaron los partidores T7-pro y Tn1. Los productos de la reacción se resolvieron en geles de agarosa al 3% y los clones se agruparon de acuerdo al tamaño del producto de PCR obtenido. Para

estimar la localización donde ocurrió la fusión, del tamaño del amplificado obtenido se restó 136 bp, valor que corresponde a ambos partidores más parte de la secuencia de sus respectivos vectores (pT7-7, Tn5). La diferencia, que corresponde exclusivamente a la secuencia de *mceB*, se dividió por 3: G150bp →  $(150-136)/3 = 5$ , G200bp →  $(200-136)/3 = 21$ , G320bp →  $(320-136) / 3 = 61$ .

### **2.9.7. Secuenciación de las fusiones.**

Una vez que los clones se agruparon mediante PCR, se eligieron clones representativos de cada grupo y el ADN se secuenció por ambas hebras utilizando los partidores T7-pro y HC-rev.

### **2.9.8. Medición de la actividad de fosfatasa alcalina.**

Se centrifugaron alícuotas de 1 ml de cultivo celular ( $A_{600} = 0.5$ ) y las células se resuspendieron en 1 M Tris-HCl, pH 8.0. Se adicionó 50  $\mu$ l de cloroformo y 50  $\mu$ l de SDS 0.1% p/v, se agitó la mezcla en Vortex y se incubó a 37°C por 5 min. Se adicionó 100  $\mu$ l de 0.4% p/v p-nitrofenol, y se incubó por otros 20 min. La reacción se detuvo por la adición de 100  $\mu$ l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH8.0, las células se removieron por centrifugación y se midió la absorbancia del sobrenadante a 410 y 550 nm. La actividad fosfatasa alcalina específica se calculó de acuerdo a lo descrito por Brickman y Beckwith (1975).

## Resultados.

### 3.1. La microcina E492 requiere de un proceso de maduración para ser producida en forma activa.

La microcina E492 es producida en forma activa sólo en la fase exponencial de crecimiento. Mediante experimentos de RT-PCR se ha determinado que el gen estructural (*mceA*) como el de la inmunidad a la microcina (*mceB*) son transcritos tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento (Corsini *et al.*, 2002). Resultados de nuestro laboratorio muestran que es posible aislar la proteína microcina desde el sobrenadante de cultivos en fase estacionaria (determinado mediante PAGE-SDS), lo cual descarta la posibilidad de que la producción de microcina sea reprimida a nivel traduccional en dicha fase. Durante la fase estacionaria de crecimiento se observó la producción de un inhibidor de la microcina, el cual fue identificado como enteroquelina. Se determinó que esta molécula quelante de hierro posee un efecto inhibitorio sobre la actividad de la microcina sólo cuando se encuentra en su forma no-férrica, efecto que no es observado cuando la enteroquelina está acomplejada con hierro. Sin embargo, la producción de este inhibidor no sería la responsable de la inactivación total de la microcina producida durante la fase estacionaria (Orellana y Lagos, 1996). Una posibilidad es que durante esta fase de crecimiento la microcina sea producida y excretada al medio en forma inactiva, fenómeno que se debería al apagamiento que se ha observado en la transcripción de los genes *mcel* y *J* durante esta fase,

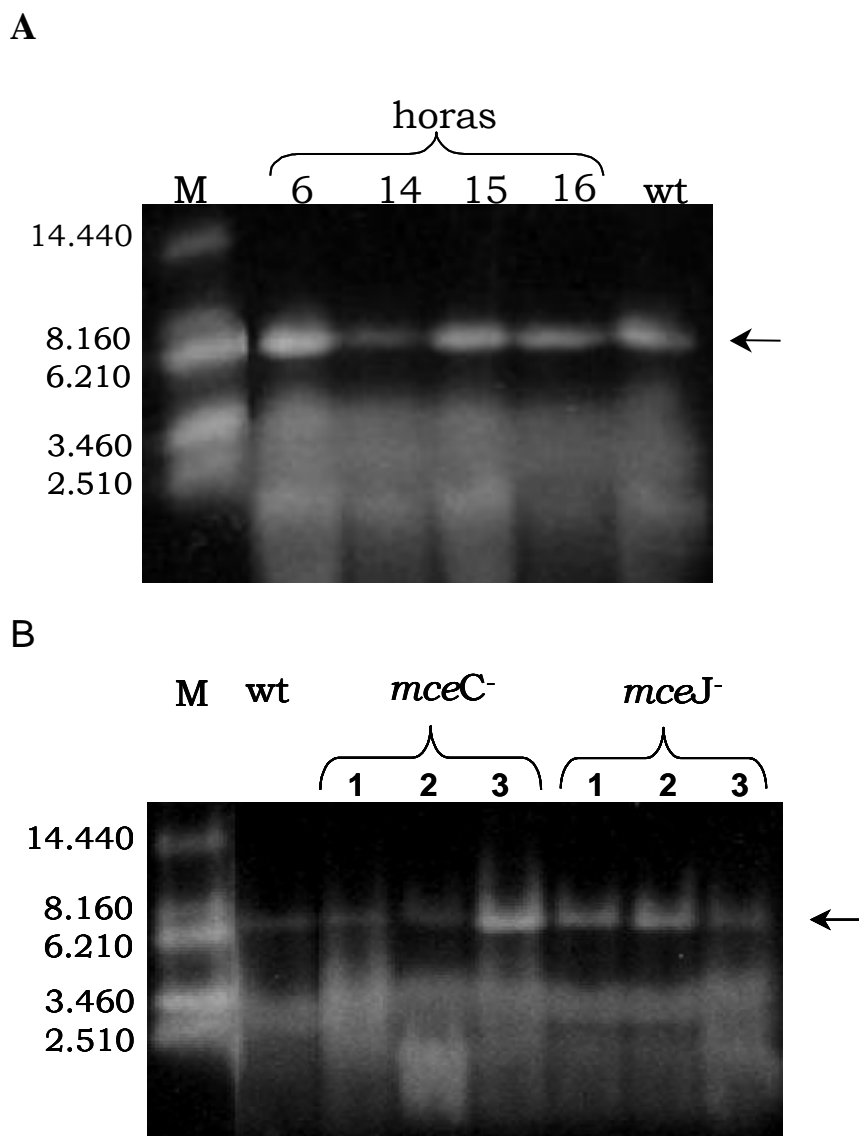
genes que están implicados en el proceso de maduración de la microcina (Corsini *et al.*, 2002).

### **3.1.1. La microcina E492 es producida en forma inactiva durante la fase estacionaria de crecimiento.**

Para confirmar si la falta de los productos de los genes de maduración determinan la producción de una microcina que es inactiva, se purificó microcina desde cultivos de la cepa productora creciendo en fase estacionaria. Para evitar la sobreproducción de enteroquelina no-férrica, los cultivos se crecieron en medios suplementados con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$ . El sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria tardía se reemplazó por el mismo medio fresco, lavado, y después de una incubación de 6 a 16 h se purificó solamente la microcina producida durante la fase estacionaria. En la figura 2A se puede observar que existe producción de proteína microcina durante la fase estacionaria. La microcina producida en esta fase presenta una Mr en PAGE-SDS que es indistinguible a la producida en fase exponencial y no presenta actividad cuando se ensaya sobre un césped de células sensibles.

### **3.1.2. Mutantes en los genes de maduración producen una forma inactiva de la microcina E492.**

En nuestro laboratorio se dispone de una colección de mutantes obtenidas mediante mutagénesis con el transposón Tn5, las cuales se aislaron por su incapacidad para producir un halo de inhibición de crecimiento sobre un césped de



**Figura 2. PAGE-SDS de diferentes preparaciones de microcina.** A, microcinas aisladas desde cultivos de la cepa de *E. coli* pJAM434 en fase exponencial y a distintos tiempos de incubación en fase estacionaria. B, microcinas aisladas desde mutantes en los genes de maduración, los números indican diferentes preparaciones. Las muestras se purificaron utilizando columnas Sep Pak-C18, marcadas covalentemente con fluorescamina y se resolvieron en PAGE-SDS como se describe en Materiales y Métodos. El marcador de peso molecular (M) corresponde a fragmentos de mioglobina y sus Mr están indicadas a la izquierda de cada figura. La flecha indica la banda de proteína correspondiente a la microcina.



células sensibles. Se obtuvieron varios clones que presentaron la inserción del transposón en genes que estarían implicados en la maduración de la microcina. La microcina producida por estas mutantes se purificó desde el sobrenadante de las cepas, y se analizó mediante PAGE-SDS. En la figura 2B se observa que los mutantes en los genes *mceC* y *J* producen una microcina que presenta una  $M_r$  indistinguible de la silvestre y que es inactiva.

La producción de microcina inactiva desde mutantes en *mceJ* y *mceI* es acorde con los resultados obtenidos al purificar la microcina desde la fase estacionaria. En el caso de mutantes en el gen *mceC*, la producción de una microcina inactiva no se relaciona en forma directa con lo que sucede en fase estacionaria, ya que este gen es transcrito tanto en la fase exponencial como estacionaria de crecimiento. Estos resultados demuestran que los productos génicos *MceC*, *I* y *J* participan en el proceso de maduración de la microcina E492 y que son necesarios para la producción de la forma activa de la microcina.

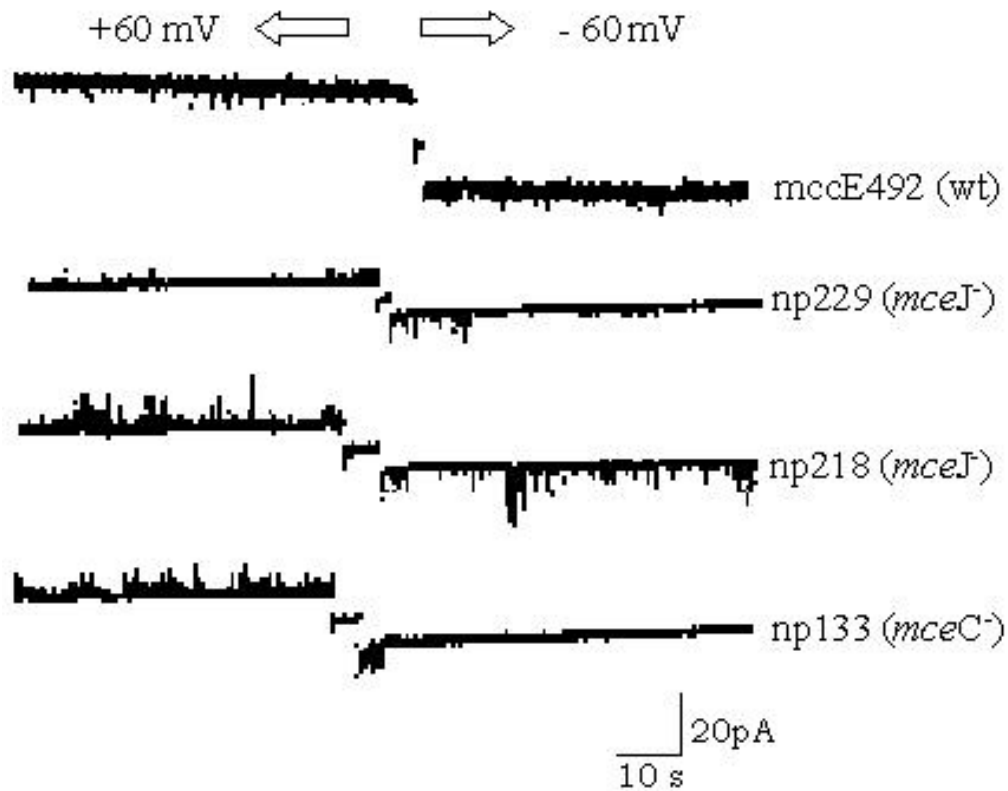
### **3.2 El proceso de maduración de la microcina E492 es necesario para que ésta pueda reconocer a un receptor en la célula blanco.**

La microcina debe alcanzar la membrana citoplasmática de bacterias gram negativas para poder ejercer su efecto tóxico, proceso en el cual la membrana externa presente en estas células constituye la principal barrera. El paso de componentes desde el medio externo al interno en bacterias gram negativas consta de al menos 3 etapas: **a)** reconocimiento de un receptor en la membrana externa; **b)** translocación a través de la membrana externa y liberación en el

espacio periplasmático; y **c)** introducción en la célula o inserción en la membrana citoplasmática. En el caso de la microcina E492, una vez en el periplasma, ésta debe interactuar con la proteína TonB para poder insertarse en la membrana interna y formar el canal. En este contexto, la falta de actividad de las microcinas producidas por mutantes en genes de maduración, podría deberse a que estas microcinas son defectuosas en una (o varias) de las etapas mencionadas.

3.2.1. Las microcinas producidas por mutantes en los genes de maduración forman canales iónicos en bicapas fosfolipídicas.

Para investigar si la falta de actividad de las formas inmaduras de la microcina se debe a una incapacidad para formar canales iónicos, se analizó esta propiedad en experimentos *in vitro* con bicapas fosfolipídicas artificiales, método que fue utilizado para definir el mecanismo tóxico de la microcina E492 (Lagos *et al.*, 1993). En la figura 3 se muestran los resultados de estos experimentos y en ella se puede observar que las microcinas producidas por las mutantes son capaces de formar canales iónicos en estas bicapas, aunque con algunas propiedades distintas a la microcina silvestre, como es la magnitud de la conductancia. Estos resultados sugieren fuertemente que la falta de actividad de las microcinas aisladas desde mutantes no está relacionada con su incapacidad de inserción en la membrana citoplasmática de la célula blanco, ni con la formación del canales iónicos.



**Figura 3. Fluctuaciones de conductancia inducidas en bicapas fosfolipídicas por microcinas aisladas desde las cepas silvestre y diferentes mutantes en los genes de maduración.** Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. Las conductancias de canal único para microcina silvestre fueron 333 pS y 327 pS a  $\pm 60$  mv; para np229 fueron de 125pS y 83 pS a  $\pm 60$  mv; para np218 fueron de 125 pS a  $\pm 60$  mv; y para np133 fue de 83 pS a  $\pm 60$  mv.

### **3.2.2. Las formas inactivas de la microcina son incapaces de atravesar la membrana externa de la célula blanco.**

Como ya se mencionó, el primer paso necesario en la acción de la microcina E492 es el reconocimiento de un receptor en la membrana externa y la translocación a través de ésta. Con el fin de verificar si la membrana externa es la barrera que impide la acción de las formas inactivas de la microcina, las células se trataron como se describe en Materiales y Métodos para la formación de esferoplastos. Con este tratamiento se logra permeabilizar la membrana externa lo que permitiría la interacción directa de la microcina con TonB. En la tabla 4 se puede observar que las microcinas aisladas desde mutantes en los genes *mceJ* y *mceC* presentan una actividad bactericida significativa sobre los esferoplastos. En el control de esferoplastos TonB<sup>-</sup>, no se observó un efecto tóxico por parte de la microcina aisladas desde la cepa silvestre o desde las mutantes, indicando que la proteína TonB es crítica para la inserción de la microcina en la membrana citoplasmática y/o en la formación del canal propiamente tal. Este resultado nos confirma que las microcinas inmaduras son capaces de formar canales iónicos en la membrana interna de la célula blanco, y nos sugiere fuertemente que la falta de actividad de dichas microcinas se debe a su incapacidad de atravesar la membrana externa de la célula blanco. La microcina aislada desde mutantes en el gen *mceI* no presentó actividad bactericida sobre esferoplastos. En análisis realizados mediante PAGE-SDS de muestras de microcina obtenidas desde esta mutante, se observó la aparición de una banda de proteína microcina difusa. Una

**Tabla 4.** Efecto de las microcinas producidas por mutantes en los genes de maduración sobre la sobrevivencia de esferoplastos.

	% sobrevivencia <i>E. coli</i> BL21		
	Células TonB <sup>+</sup> no tratadas	Esferoplastos células TonB <sup>+</sup>	Esferoplastos células TonB <sup>-</sup>
control	100	100	100
mccE492 (wt)	0.0007 ± 0.0005	0.0002 ± 0.00027	106 ± 8
np133 ( <i>mceC</i> <sup>-</sup> )	94 ± 6	0.22 ± 0.33	112 ± 25
np205 ( <i>mceI</i> <sup>-</sup> )	101 ± 29	106 ± 31	82 ± 10
np218 ( <i>mceJ</i> <sup>-</sup> )	89 ± 17	4 ± 2.8	86 ± 12
np221 ( <i>mceJ</i> <sup>-</sup> )	105 ± 11	0.021 ± 0.015	110 ± 15
np229 ( <i>mceJ</i> <sup>-</sup> )	91 ± 11	3 ± 2.6	130 ± 25

Los porcentajes son el promedio de tres experimentos independientes. La cepa bacteriana usada como TonB<sup>+</sup> fue *E. coli* BL21(DE3) y como TonB<sup>-</sup> *E. coli* X8605. La concentración final de las microcinas utilizadas varió de 50 a 100 µg/ml. Los esferoplastos se prepararon como se describe en Materiales y Métodos. El metanol de las muestras de microcina se evaporó y reemplazó por el mismo amortiguador de los esferoplastos.

posible explicación para estos resultados es que las preparaciones de microcinas fueron inestables y sensibles a proteasas cuando se ensayaron *in vivo* con esferoplastos (Lagos *et al.*, 2001). Por esta razón no se utilizó esta forma de la microcina en las caracterizaciones posteriores.

### **3.2.3. El requerimiento de TonB durante la translocación de la microcina E492 no involucra interacciones proteicas con TonB mediadas por la secuencia caja-TonB.**

Para cumplir la función de la translocación de componentes a través de la membrana externa, la región C-terminal de TonB interacciona con una secuencia del receptor denominada caja-TonB, interacción que permite la liberación del ligando en el periplasma. Esta secuencia caja-TonB también existe en colicinas formadoras de poros, en las cuales mediaría la interacción directa entre la colicina y TonB necesaria para la liberación de la colicina en el periplasma en la etapa de translocación a través de la membrana externa (Wiener, 1997; Moeck y Coulton, 1997; Lazdunski *et al.*, 1998). Mediante la adición al medio de cultivo del pentapéptido sintético ETVIV (consenso caja-TonB) se logra inhibir los procesos dependientes de TonB, incluidos el importe de enteroquelina-férrica, infección por el fago  $\phi$ -80, y acción del colicinas (Tuckman y Osburne, 1992 ). Se determinó el efecto que produce este pentapéptido sobre la actividad de la microcina. En los ensayos realizados no se observó un efecto inhibitorio del peptapéptido sobre la actividad de la microcina E492 (tabla 5), indicativo de que las interacciones descritas para la región C-terminal de TonB no serían fundamentales para la

**Tabla 5.** Efecto del pentapéptido ETVIV sobre la actividad de la microcina E492.

---

% de sobrevivencia de <i>E. coli</i> BL21	
Control	100
+PP	129 ± 25
+Mcc	2.1 ± 0.4
+PP + Mcc	2.6 ± 0.2

---

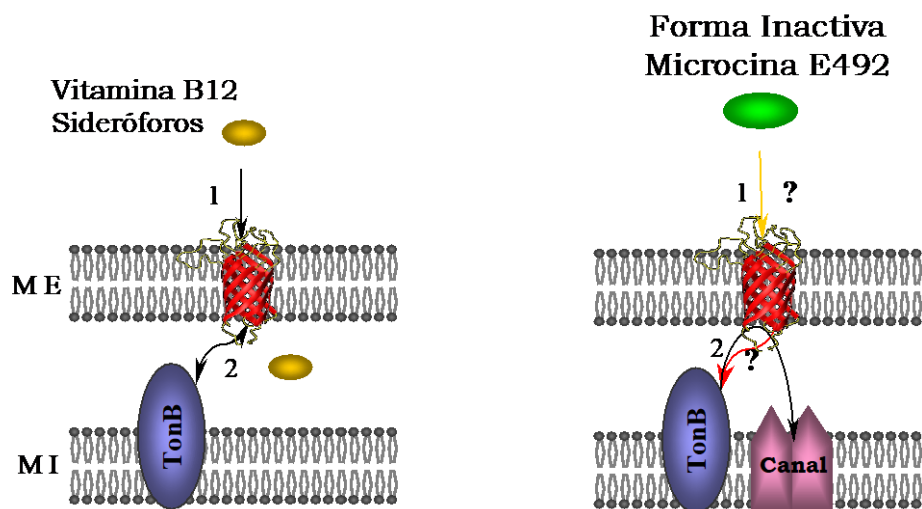
Las determinaciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son el promedio de tres mediciones independientes. Mcc, microcina; PP, pentapéptido caja-TonB. La concentración de PP utilizada fue de 100 µg/ml, concentración a la cual inhibe los procesos TonB-dependientes (Tuckman y Osburne, 1992). La concentración de Mcc utilizada fue de 75 µg/ml.

acción de microcina E492. Esto nos sugiere que la función de TonB en el mecanismo de acción de la microcina no sería a nivel de la translocación a través de la membrana externa en el modo clásico en que se ha descrito para otros procesos dependientes de TonB.

#### **3.2.4. Las formas inactivas de la microcina son defectuosas en el reconocimiento de un receptor en la membrana externa de la célula blanco.**

El paso de componentes a través de la membrana externa consta básicamente de 2 etapas, que son el reconocimiento de un receptor y la translocación a través de esta membrana. En el sistema de translocación TonB-dependiente, la unión del ligando a su receptor provoca un cambio conformacional en éste que permite la interacción de TonB con el complejo receptor-ligando. Esta última interacción permite la liberación del ligando en el periplasma (etapas 1 y 2 respectivamente en esquema de la tabla 6). Básicamente, se han descrito las mismas etapas en la translocación de colicinas del grupo B a través de la membrana externa (Lazdunski, 1998), grupo de bacteriocinas con las cuales la microcina E492 presenta semejanza en cuanto al requerimiento de la proteína TonB para su acción. En el caso de las formas inactivas de la microcina, su incapacidad de atravesar la membrana externa podría deberse a defectos en uno de estos pasos. Para distinguir entre ambas posibilidades realizamos ensayos de competencia entre las formas inactivas y activa de la microcina. En estos ensayos, si la microcina inactiva no es capaz de interactuar con el receptor (disminución o pérdida de la afinidad por este), no representaría un impedimento para que la





**Tabla 6.** Efecto de microcinas inactivas sobre la actividad de microcina E492.

		% de células sobrevivientes			
		+ microcina E492 (wt), [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]			
Fuente microcina	[ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	0	1.5	15	150
no adición	0	100 $\pm$ 20	0.43 $\pm$ 0.12	0.07 $\pm$ 0.025	0.003 $\pm$ 0.001
desde fase (14h)	85	80 $\pm$ 16	0.23 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.004	0.004 $\pm$ 0.001
estacionaria* (6h)	220	71 $\pm$ 6	0.22 $\pm$ 0.18	0.02 $\pm$ 0.002	0.004 $\pm$ 0.001
no adición	0	100 $\pm$ 45	0.45 $\pm$ 0.30	0.10 $\pm$ 0.01	0.022 $\pm$ 0.003
np133 ( <i>mceC</i> <sup>-</sup> )	150	145 $\pm$ 90	0.90 $\pm$ 0.26	0.15 $\pm$ 0.07	0.017 $\pm$ 0.009
np205 ( <i>mceI</i> <sup>-</sup> )	150	75 $\pm$ 25	0.45 $\pm$ 0.30	0.05 $\pm$ 0.02	0.023 $\pm$ 0.002
np221 ( <i>mceJ</i> <sup>-</sup> )	150	124 $\pm$ 9	0.20 $\pm$ 0.09	0.16 $\pm$ 0.02	0.019 $\pm$ 0.001

\*La microcina inactiva se aisló desde la cepa silvestre después de 6 o 14 h de incubación en fase estacionaria. Los porcentajes son representativos de 3 experimentos independientes. Cada determinación fue hecha por duplicado. En el esquema se muestra la translocación de componentes a través de la ME mediada por TonB. (1) interacción del ligando con el receptor; (2) interacción del receptor con TonB y liberación del ligando en el periplasma. Las formas inactivas de la microcina fallarían en uno de estos pasos (?).

forma activa (afinidad mayor) pueda interactuar con este. En cambio si la forma inactiva interacciona con el receptor pero no puede ser liberada hacia el periplasma, bloquearía de esta forma la vía de entrada de la forma activa lo que se traduciría en un efecto inhibitorio sobre la actividad de esta última (esquema de la tabla 6). Los resultados de estos ensayos están resumidos en la tabla 6, y en ella se puede observar que tanto las formas inactivas aisladas desde un cultivo en fase estacionaria como las aisladas desde mutantes en los genes de maduración no presentaron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la forma activa en condiciones muy saturantes para la forma inactiva (10 a 100 veces). Sobre la base de estos resultados podemos concluir que la falta de actividad de las formas inactivas de la microcina E492 se debe a su incapacidad de interactuar de manera eficiente con un receptor en la membrana externa de la célula blanco.

La incapacidad de las formas inactivas de la microcina E492 para interactuar con un receptor en la célula blanco, se debe a la falta de un proceso de maduración en el que están implicados los productos de los genes *mceC*, I, J. Se exploró la posibilidad que este proceso de maduración implicara modificaciones postraduccionales como se ha descrito para otras microcinas, en las cuales este tipo de modificaciones otorgan a la microcina el efecto tóxico que de otra forma no tendría. De acuerdo con estudios de homología de secuencia de los genes de maduración, estas modificaciones podrían corresponder a glicosilaciones y/o acilaciones (*mceC*→glicosiltransferasa; *mceI*→aciltransferasa) (Lagos *et al*, 2001). Sin embargo, como se describirá a continuación este resultó no ser el caso.

#### **3.2.4. La microcina E492 no presenta modificaciones postraduccionales.**

Para determinar si durante el proceso de maduración la microcina E492 es modificada en forma covalente, y si la falta de actividad de las microcinas inmaduras se debe a la falta de algún tipo de modificación, muestras de ambas formas de la microcina se analizaron mediante espectrometría de masas. La microcina E492 es sintetizada como un precursor que es procesado en un motivo de doble glicina durante su exportación y la masa esperada para la forma procesada es de 7885.5 (Lagos *et al.*, 1999; 2001). Como se observa en la tabla 7, la forma activa de la microcina presentó una masa experimental de 7886.15, valor que se corresponde con el esperado a partir de la secuencia del gen estructural. Además, las microcinas inactivas aisladas ya sea desde la fase estacionaria o desde mutantes en los genes de maduración, presentaron una masa que es idéntica a la masa de la microcina activa. Estos resultados descartan la existencia de modificaciones de tipo covalente en la microcina, lo que implicaría un mecanismo novedoso de maduración para esta bacteriocina. Por otro lado, la diferencia funcional existente entre ambos tipos de microcina no puede ser atribuida a diferencias en la estructura primaria de éstas.

Ambas formas de la microcina corresponden a la misma entidad molecular, por esto en adelante serán referidas como Mcc<sup>a</sup> para el caso de la microcina activa y como Mcc<sup>ia</sup> para la forma inactiva. Cuando sea necesario especificar la fuente de Mcc<sup>ia</sup>, ellas serán referidas como Mcc<sup>ia</sup>(C), Mcc<sup>ia</sup>(J) y Mcc<sup>ia</sup>(st) para formas inactivas aisladas desde mutantes en los genes de maduración *mceC*, *mceJ* y desde fase estacionaria respectivamente.

**Tabla 7.** Determinación de las masas de la microcina E492 activa aislada desde la cepa silvestre y de las microcinas inactiva aisladas desde la fase estacionaria y desde mutantes en los genes de maduración.

Fuente de Mcc	Masa molecular observada <sup>a</sup> .
wt (activa)	7886.15 ± 0.02
wt fase estacionaria (inactiva)	7886.93 ± 1.04
mutante <i>mceC</i> <sup>-</sup> (inactiva)	7885.65 ± 0.23
mutante <i>mceJ</i> <sup>-</sup> (inactiva)	7886.02 ± 0.88

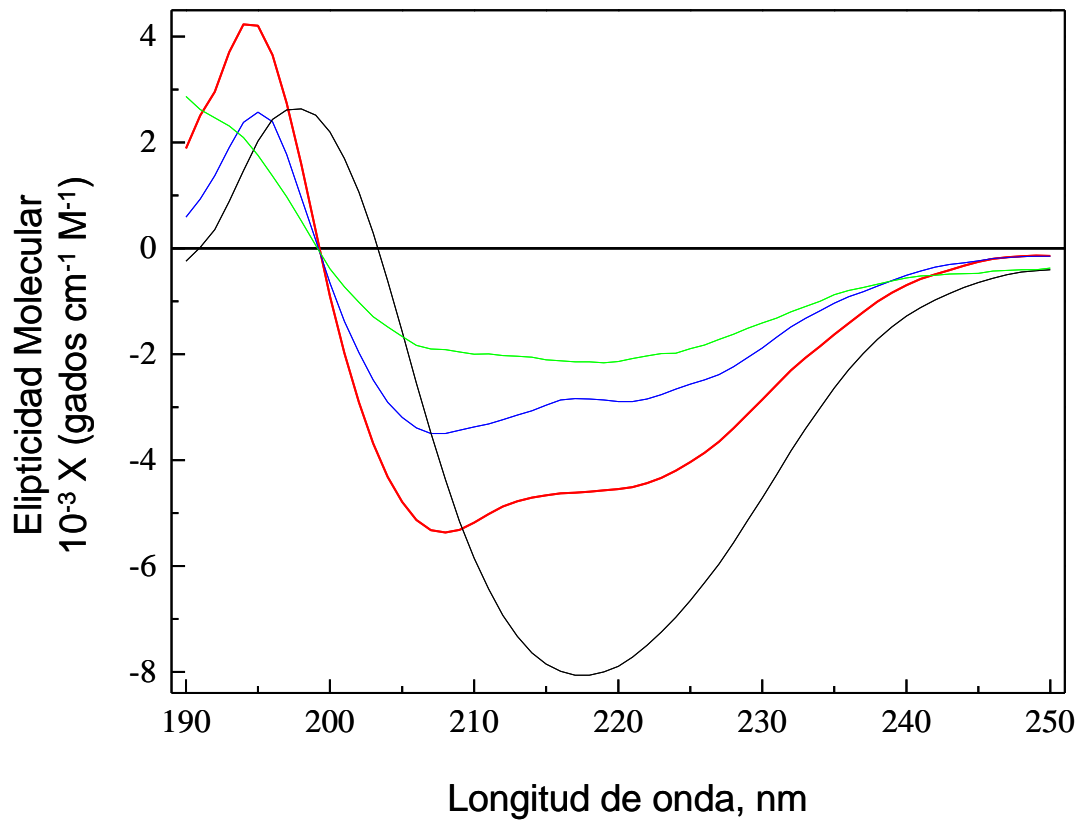
La masa se determinó por espectrometría de masa “electrospray”.

La existencia de formas activas e inactivas de la microcina E492, implica necesariamente la existencia de diferencias estructurales entre ellas. Ya que esta diferencia no se encuentra a nivel de la estructura primaria de las proteínas, se estudió la posibilidad que esta diferencia funcional sea producto de diferencias en la estructura secundaria.

### **3.3. La microcina E492 presenta propiedades que la asemejan a un príón.**

#### **3.3.1. Las formas activa e inactiva de la microcina E492 se diferencian en la estructura secundaria.**

La posibilidad de que  $Mcc^a$  y  $Mcc^{ia}$  se diferencien en la estructura secundaria, se investigó mediante dicroísmo circular en el UV-lejano. La figura 4 muestra que la  $Mcc^a$  posee un espectro característico de un alto contenido de estructura hoja- $\beta$  (mínimo a 216 nm), en tanto que  $Mcc^{ia}(C)$  y  $Mcc^{ia}(J)$  presentan un espectro acorde con un alto contenido de estructura hélice- $\alpha$  (mínimos a 208 y 221 nm), al igual que  $Mcc^{ia}(st)$ . Los porcentajes de cada tipo de estructura se calcularon utilizando el programa computacional CONTIN, y estos resultados se resumen en la tabla 8. Ambas formas de la microcina presentaron un contenido similar de vuelta y estructura al azar, diferenciándose en el contenido de estructura hoja- $\beta$  y hélice- $\alpha$ . Mientras el contenido de estructura hoja- $\beta$  en  $Mcc^a$  es casi el doble que de hélice- $\alpha$  (29% y 16% respectivamente), esta proporción en  $Mcc^{ia}$  se invierte. Este resultado indica que la diferencia funcional entre  $Mcc^a$  y  $Mcc^{ia}$  es consecuencia de diferencias en su estructura secundaria. Además podemos



**Figura 4. Estructura secundaria de diferentes formas de la microcina E492.** (—),  $Mcc^a$ ; (—),  $Mcc^{ia}$  aislada desde fase estacionaria; (—),  $Mcc^{ia}(C)$ ; (—),  $Mcc^{ia}(J)$ . El análisis de la estructura secundaria de las muestras de microcina en metanol 95%, se realizó mediante dicroísmo circular en el UV-lejano como se describe en Materiales y Métodos.

**Tabla 8.** Contenido de estructura secundaria de diferentes formas de la microcina E492.

Fuente Mcc	Porcentaje de			
	Hélice- $\alpha$	Hoja- $\beta$	Vuelta	Azar
Mcc <sup>a</sup>	16 $\pm$ 4	29 $\pm$ 4	24 $\pm$ 2	31 $\pm$ 2
Mcc <sup>ia</sup> (st)	29 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1	26 $\pm$ 1
Mcc <sup>ia</sup> (C)	37 $\pm$ 3	16 $\pm$ 4	28 $\pm$ 2	19 $\pm$ 2
Mcc <sup>ia</sup> (J)	33 $\pm$ 2	17 $\pm$ 3	29 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1

Las determinaciones se realizaron mediante dicroísmo circular en el UV-lejano y analizadas utilizando el programa CONTIN para el cálculo de los porcentajes de estructura secundaria.

concluir que la actividad tóxica de la microcina E492 (que tiene que ver con el reconocimiento de un receptor) está asociada con un alto contenido de estructura hoja- $\beta$ , el cual se ve disminuido en la forma inactiva, aumentando el contenido de hélice- $\alpha$ .

La existencia de dos formas funcionales de la microcina E492 ( $Mcc^a$  y  $Mcc^{ia}$ ) con igual estructura primaria pero con notables diferencias en su conformación, se corresponde con el fenómeno que ha sido descrito para priones de mamíferos. Por ello se estudió la posibilidad que la microcina posea propiedades que son características de los priones descritos en la literatura.

Un prión es definido como una proteína infecciosa capaz de propagar información biológica en ausencia de ácidos nucleicos a través de replicación de plegamiento proteico (Prusiner, 1998). La proteína infecciosa corresponde a una forma conformacionalmente alterada de una proteína celular con idéntica secuencia. La forma priónica, que posee un mayor contenido de estructura hoja- $\beta$  es capaz de convertir a la forma normal hacia la forma tóxica, proceso que involucra un cambio conformacional dramático con aumento en el contenido de hoja- $\beta$  y una disminución del contenido de hélice- $\alpha$  y estructura al azar de la proteína normal (Cohen y Prusiner, 1998).

De las dos formas de la microcina, la  $Mcc^a$  es la que posee un mayor contenido de estructura hoja- $\beta$ , hecho que la convierte en nuestro candidato para comportarse como un prión. De ser así, ésta debería poseer la capacidad de convertir la forma inactiva de la microcina a una forma activa.



### 3.3.3. Mcc<sup>a</sup> induce la activación de Mcc<sup>ia</sup> *in vitro*.

Para investigar la posibilidad de que Mcc<sup>ia</sup> pueda ser activada por una interacción con la forma activa de la proteína, desarrollamos ensayos de activación que básicamente consistieron en mezclar Mcc<sup>a</sup> con un exceso molar de Mcc<sup>ia</sup>. Habitualmente la microcina se conserva en metanol, por lo que el primer paso fue evaporar el metanol de las mezclas y resuspender las muestras en el solvente adecuado. Después de incubar las muestras se determinaron las actividades de éstas comparándolas con los controles de Mcc<sup>a</sup> y Mcc<sup>ia</sup> que se sidon trataron de igual forma que el ensayo de activación. En los primeros ensayos utilizamos condiciones drásticas, como es la evaporación de la mezcla de microcinas a 90 °C y posterior resuspensión en agua. En estos experimentos se observó una marcada activación de Mcc<sup>ia</sup> como se resume en la tabla 9 (menor sobrevida en la mezcla de activación comparada con el control de Mcc<sup>a</sup>), sin embargo los resultados obtenidos presentaron mucha variabilidad con activaciones en el rango de 4 a 100 veces, variaciones que se pueden atribuir a lo extremo del tratamiento. Un método mas reproducible consistió en evaporar el metanol de la mezcla de microcinas a 35 °C al vacío, resuspensión en agua, e incubación por 10 min a 37°C, resultados que son resumidos en la tabla 10. En esta tabla se observa que la Mcc<sup>a</sup> fue capaz de activar a la Mcc<sup>ia</sup>(C) y Mcc<sup>ia</sup>(J) en 13 y 17 veces respectivamente. Este resultado sugiere que la Mcc<sup>a</sup> actuaría como semilla para la conversión de Mcc<sup>ia</sup>. Para Mcc<sup>ia</sup>(st) también se observó una activación significativa que varió de 4 a 7 veces.

**Tabla 9.** Activación de la  $Mcc^{ia}$  por la  $Mcc^a$  mediante evaporación a 90 °C.

Fuente de Mcc	% de sobrevivencia de <i>E. coli</i> BL21			Razón de activación
	+ $Mcc^a$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		$[Mcc^{ia}]$	
	0	2.5	$\frac{[Mcc^{ia}]}{[Mcc^a]}$	
no adición	100	$6.8 \pm 5.6$	—	1
$Mcc^{ia}$ (C)	$115 \pm 25$	$0.33 \pm 0.32$	60	21
$Mcc^{ia}$ (J)	$93 \pm 20$	$0.43 \pm 0.47$	64	16

Los resultados son el promedio de 10 experimentos independientes.  $Mcc^{ia}$  (C) y  $Mcc^{ia}$  (J), microcinas inactivas aisladas desde el sobrenadante de mutantes en los genes *mceC* y *mceJ* respectivamente. Las concentraciones utilizadas de  $Mcc^{ia}$  (C) y  $Mcc^{ia}$  (J) fueron de 150 y 160  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

**Tabla 10.** Activación de Mcc<sup>ia</sup> por Mcc<sup>a</sup> por evaporación a 35°C.

Fuente de Mcc	% de sobrevivencia de <i>E. coli</i> BL21			Razón de activación
	+ Mcca (µg/ml)		[Mcc <sup>ia</sup> ]	
	0	3	[Mcc <sup>a</sup> ]	
no adición	100	9.3 ± 3.0	—	1
Mcc <sup>ia</sup> (st-6h)*	96 ± 25	2.5 ± 0.13	67	4
Mcc <sup>ia</sup> (st-14h)*	96 ± 16	1.4 ± 0.2	30	7
Mcc <sup>ia</sup> (C)	125 ± 23	0.56 ± 0.17	60	17
Mcc <sup>ia</sup> (J)	168 ± 28	0.74 ± 0.23	50	13

Los resultados son el promedio de 8 experimentos independientes. Mcc<sup>ia</sup> (C) y Mcc<sup>ia</sup> (J), microcinas inactivas aisladas desde el sobrenadante de mutantes en los genes *mceC* y *mceJ* respectivamente. \*, microcinas inactivas aisladas desde el sobrenadante de la cepa silvestre después 6 y 14 h de incubación en la fase estacionaria. Las concentraciones utilizadas de Mcc<sup>ia</sup> (C), Mcc<sup>ia</sup> (J), Mcc<sup>ia</sup>(st-6h) y Mcc<sup>ia</sup> (st-14h) fueron de 180, 150, 200 y 90 µg/ml respectivamente. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

La microcina es inestable en agua y pierde su actividad rápidamente. Por esta razón, los tiempos de incubación utilizados en los ensayos de activación con agua fueron relativamente cortos (10 min). Resultados previos indican que la microcina es mucho más estable y soluble a pH ácido que a pH neutro (Wilkens, 1996). Realizamos ensayos de activación en los cuales el agua se reemplazó por un buffer a pH 2.3, lo que permitió la incubación de la mezcla por 1 h a 37°C. En la tabla 11 podemos observar que a este pH existe una conversión más eficiente, ya que la razón de activación promedio obtenida fue de 27 veces, razón bastante mayor que la obtenida en agua.

De estos resultados podemos concluir que la  $Mcc^a$  posee la capacidad de convertir a la forma inactiva hacia la forma activa. Los cambios involucrados en esta conversión podrían ser a nivel de la estructura secundaria de la proteína, en un mecanismo de propagación de información conformacional similar al descrito para priones de mamíferos (Cohen y Prusiner, 1998; Saborio *et al.*, 2001).

### **3.3.2. El proceso de activación $Mcc^{ia}$ está asociado a cambios en la estructura secundaria.**

Los estudios estructurales mediante dicroísmo circular de la microcina E492 se realizaron con muestras disueltas en metanol, ya que estos estudios no se pueden realizar en solventes acuosos debido a que en estos solventes la microcina presenta la formación de agregados. Para poder estudiar la existencia de cambios en la estructura secundaria durante la activación de  $Mcc^{ia}$ , primero fue necesario determinar si el fenómeno de activación se mantiene cuando las

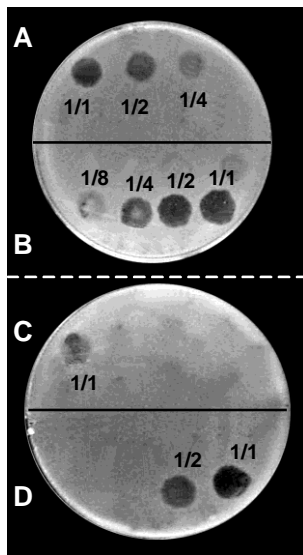
**Tabla 11.** Activación de la Mcc<sup>ia</sup> por la Mcc<sup>a</sup> a pH ácido.

Experimento	% de sobrevivencia de <i>E. coli</i> BL21			
	1	2	3	promedio
no adición	100	100	100	
Mcc <sup>ia</sup> (C) [150 µg/ml]	68 ± 18	68 ± 18	52 ± 0.8	63 ± 12
Mcc <sup>a</sup> [3 µg/ml]	0.79 ± 0.09	0.79 ± 0.09	0.38 ± 0.13	0.65 ± 0.1
Mcc <sup>ia</sup> (C) + Mcc <sup>a</sup> (50:1)	0.022 ± 0.008	0.031 ± 0.012	0.019 ± 0.004	0.024 ± 0.008
Razón activación	36	25	20	27

Mcc<sup>ia</sup> (C) microcina inactiva aislada desde el sobrenadante de la mutante en el gen *mceC*. 1, 2 y 3, ensayos de activación independientes. Cada determinación se realizó por triplicado. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

muestras se disuelven en metanol. Para ello se realizaron ensayos de activación en los cuales las muestras se disolvieron en metanol como se describe en Materiales y Métodos. Se determinó la actividad de las muestras mediante la formación de halos de inhibición de crecimiento sobre un césped de células sensibles. En la figura 5 se observa que la activación de Mcc<sup>ia</sup> se mantiene en este solvente, con una activación de 2 veces. La menor razón de activación puede ser explicada por la menor sensibilidad del método de detección ya que requiere más de 90% de inhibición del crecimiento del césped para producir un halo de inhibición visible. Esta explicación es avalada por experimentos de activación a pH ácido, en los cuales la actividad resultante se determinó por ambos métodos, observándose una razón de activación mucho menor en las determinaciones sobre césped (4 veces) comparada con el título celular (17 veces).

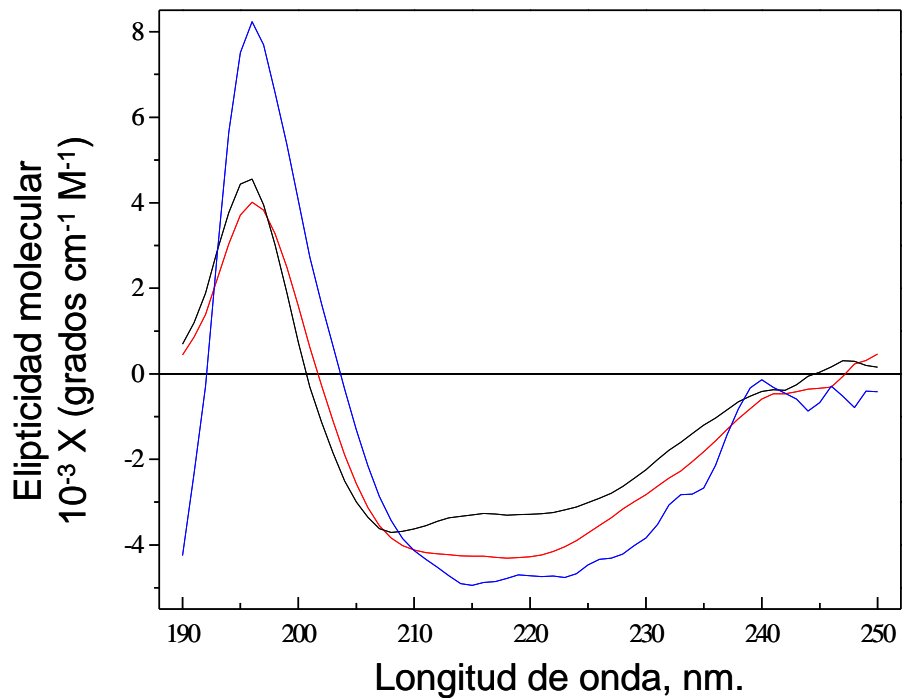
El contenido de estructura secundaria de Mcc<sup>ia</sup> antes y después de la activación se determinó mediante dicroísmo circular en el UV-lejano (figura 6). El perfil obtenido para Mcc<sup>ia</sup> antes de la activación es característico de un mayor contenido de estructura hélice- $\alpha$ . Después de la activación se observa un cambio en este perfil que lo asemeja más al perfil obtenido para Mcc<sup>a</sup>, y acorde con un mayor contenido de estructura hoja- $\beta$ . Esta observación es ratificada al calcular los porcentajes de estructura secundaria utilizando el programa CONTIN, resultados que están resumidos en la tabla 12. En ella se observa que mientras los porcentajes de estructura al azar y vuelta permanecen prácticamente constantes antes y después de la activación, el porcentaje de estructura hoja- $\beta$  aumenta notablemente (12%→26%) acompañado de una disminución del porcentaje de



	Título*
A. $Mcc^a$ (15 $\mu\text{g/ml}$ )	1/4
B. $Mcc^{ia}(C) + Mcc^a$ [5:1]	1/8
C. $Mcc^a$ (15 $\mu\text{g/ml}$ )	1/1
D. $Mcc^{ia}(J) + Mcc^a$ [4:1]	1/2

\*Última dilución que forma halo de inhibición de crecimiento.

**Figura 5. Activación de  $Mcc^{ia}$  en metanol.** Alícuotas de 5  $\mu\text{l}$  de diluciones seriadas de las muestras se sembraron sobre un césped de células sensibles a la microcina.  $Mcc^{ia}$  (C) y  $Mcc^{ia}$  (J), microcinas inactivas aisladas desde el sobrenadante de mutantes en los genes *mceC* y *mceJ* respectivamente. Las concentraciones utilizadas de  $Mcc^{ia}$  (C) y  $Mcc^{ia}$  (J) fueron de 75 y 60  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.



**Figura 6. Estructura secundaria de diferentes formas de la microcistina E492.** (—), Mcc<sup>ia</sup>; (—), Mcc<sup>a\*</sup>; (—), Mcc<sup>a</sup>. El análisis de la estructura secundaria de las muestras de microcistina en metanol 95%, se realizó mediante dicroísmo circular en el UV-lejano como se describe en Materiales y Métodos. Mcc<sup>a\*</sup>, Mcc<sup>ia</sup> que ha sido activada.



Tabla 12. Contenido de estructura secundaria de diferentes formas de la microcina E492.

Fuente de la microcina	Porcentaje de			
	Hélice- $\alpha$	Hoja- $\beta$	Vuelta	Azar
Mcc <sup>a</sup>	16 $\pm$ 4	29 $\pm$ 4	24 $\pm$ 2	31 $\pm$ 2
Mcc <sup>ia</sup> (C)	36 $\pm$ 4	12 $\pm$ 4	25 $\pm$ 2	26 $\pm$ 2
Mcc <sup>a</sup> (1) + Mcc <sup>ia</sup> (C) (6) <sup>*</sup>	23 $\pm$ 1	26 $\pm$ 2	26 $\pm$ 1	26 $\pm$ 1

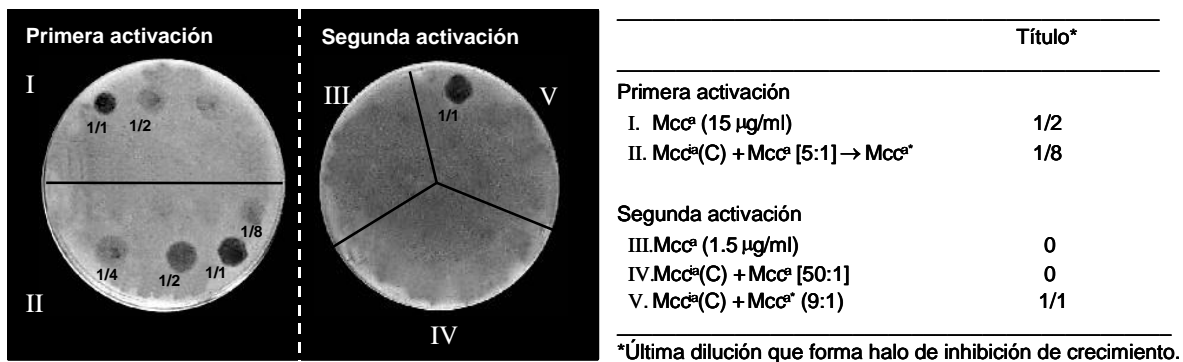
Las determinaciones se realizaron mediante dicroísmo circular en el UV-lejano y analizadas utilizando el programa CONTIN para el cálculo del porcentaje de estructura secundaria. \* La conversión se realizó como se describe en Materiales y Métodos.

estructura hélice- $\alpha$  (36%→23%). Este resultado nos permite concluir que la activación de  $Mcc^{ia}$  se debe a un aumento del contenido de estructura hoja- $\beta$  y además nos reafirma que la actividad tóxica de la microcina E492 está asociada con su contenido de este tipo de estructura.

Hemos podido determinar que la  $Mcc^a$  es capaz de traspasar información conformacional a la  $Mcc^{ia}$  produciendo su conversión estructural con la consiguiente activación de la propiedad tóxica, lo cual asemeja a la microcina E492 con los priones de mamíferos.

### **3.3.3. La $Mcc^{a*}$ es capaz de producir la activación de la $Mcc^{ia}$ .**

Otra característica importante de los priones de mamíferos es su capacidad para propagar el cambio conformacional de proteína a proteína. Esto implica que aquella proteína que ha sido convertida desde su forma normal a la anormal ( $PrP^{Sc}$ ), es a su vez capaz de inducir el cambio de nueva proteína normal ( $PrP^C$ ) hacia la conformación anormal (Prusiner, 1998; Soto, 2001). Para determinar si  $Mcc^{a*}$  presenta la capacidad de propagar su información conformacional y por consiguiente su actividad, realizamos experimentos de ciclos de activación en los cuales  $Mcc^{a*}$  obtenida en un primer ensayo de activación se incubó con un exceso molar de nueva  $Mcc^{ia}$  en un segundo ensayo. Los ensayos se realizaron en metanol, pues como ya se explicó, en este solvente la microcina es soluble y mantiene su actividad por largo tiempo. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 7. En el primer ensayo de activación

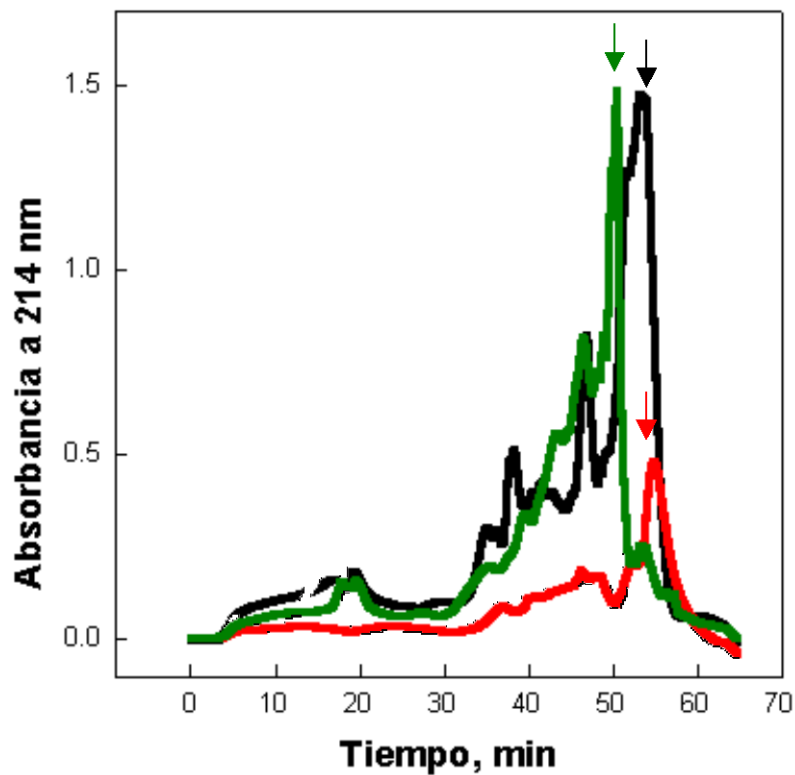


**Figura 7. Ciclos de activación de la  $Mcc^{ia}$ .** Microcina que ya ha sido activada en un primer ciclo ( $Mcc^{a*}$ ) fue utilizada para activar a  $Mcc^{ia}$  en un segundo ciclo.  $Mcc^{ia}$  (C), microcina inactiva aislada desde el sobrenadante de mutante en el gen *mceC*. La concentración utilizada de  $Mcc^{ia}$  (C) fue de 75  $\mu\text{g/ml}$ . Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

se utilizó una razón  $[Mcc^{ia}]:[Mcc^a]$  de 5:1, observándose una activación de 4 veces. En el segundo ciclo de activación, se utilizó  $Mcc^{a*}$  para activar a  $Mcc^{ia}$  en una razón de 1:9 v/v y se observó la aparición de un halo de inhibición sobre el césped de células sensibles en la muestra sin diluir (1/1) (figura 7V). En el segundo ciclo, la concentración remanente de  $Mcc^a$  producto de la dilución es de 1.5  $\mu$ g/ml, concentración a la cual no se observó actividad en el control que contiene solo  $Mcc^a$  (figura 7III). Este resultado indica que la actividad observada en el segundo ciclo es producto de la activación de  $Mcc^{ia}$  y no de la actividad residual de  $Mcc^a$ . La relación entre  $[Mcc^a]$  y  $[Mcc^{ia}]$  en el segundo ciclo fue de 1:50 y cuando se utilizó esta relación para activar directamente  $Mcc^{ia}$  con  $Mcc^a$  no se observó formación de halo de inhibición de crecimiento sobre el césped sensible (figura 7IV). Este resultado nos permite descartar que la pequeña cantidad de  $Mcc^a$  proveniente del primer ciclo de activación active a la  $Mcc^{ia}$ . Estos resultados nos sugieren fuertemente que la información necesaria para la activación de  $Mcc^{ia}$  es propagada de proteína a proteína.

#### **3.3.4. La $Mcc^a$ y la $Mcc^{ia}$ forman filamentos en solvente acuoso con diferencias morfológicas.**

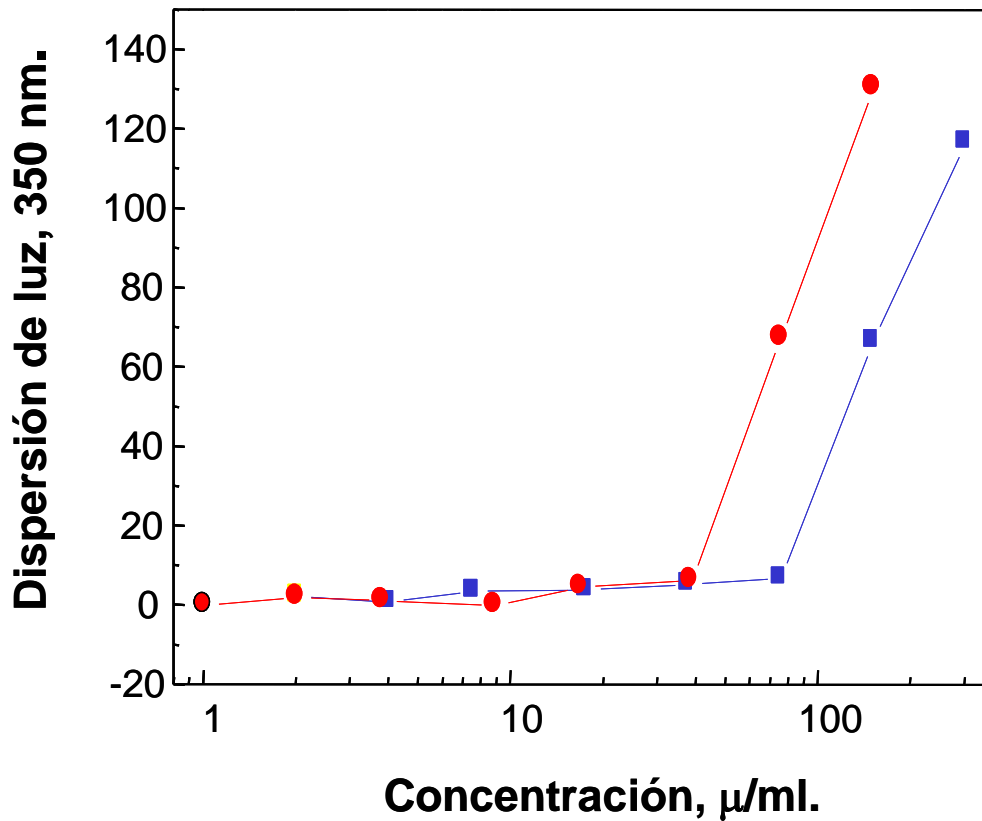
Como ya se mencionó la microcina E492 forma agregados en solventes acuosos. Los perfiles de elución obtenidos en la purificación de microcina mediante C4-HPLC de fase reversa sugieren que ambos tipos de microcina presentarían diferentes estados de agregación ya que  $Mcc^{ia}$  presentó mayores tiempos de elución que  $Mcc^a$ , como se muestra en la figura 8. Para caracterizar



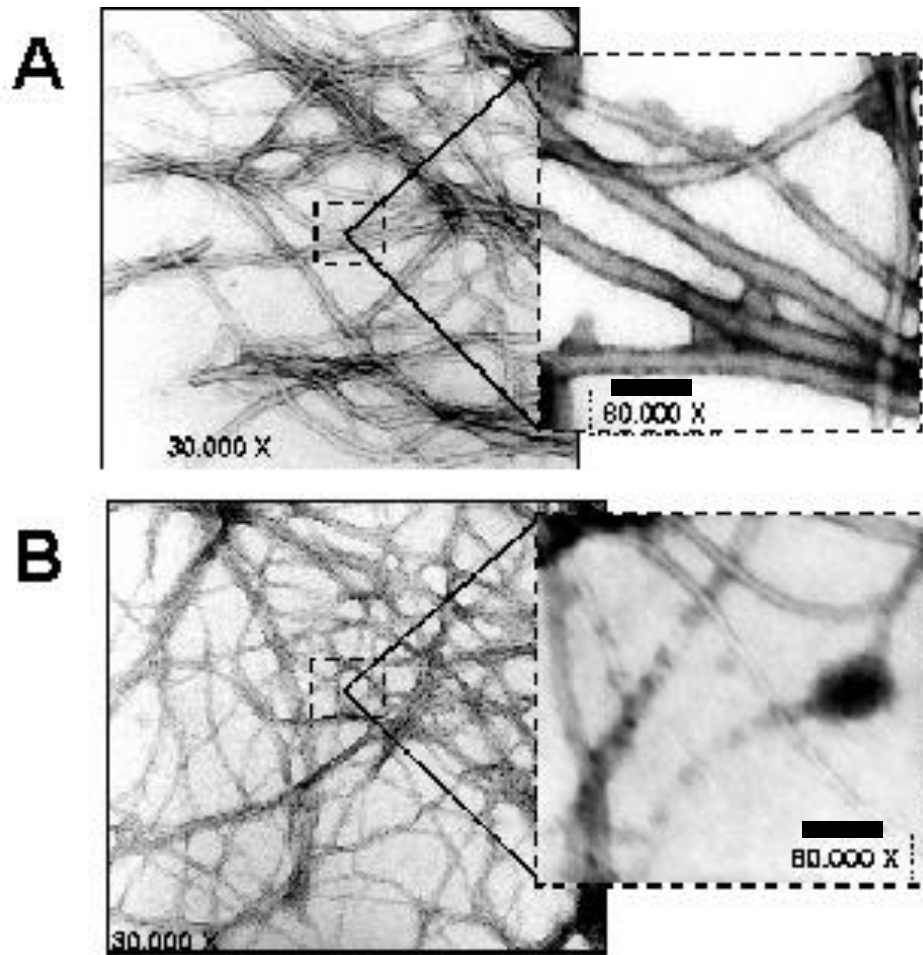
**Figura 8. Análisis mediante C4-HPLC de fase reversa de diferentes formas de la micrococcina E492.** La flecha indica el pico correspondiente a las fracciones en que se observó la elución de la micrococcina. La presencia de  $Mcc^a$  (—), de  $Mcc^{ia}$  (C) (—) y de  $Mcc^{ia}(J)$  (—) en cada fracción se determinó como se describe en Materiales y Métodos.

estos agregados en cuanto a la concentración crítica requerida para su formación, se registró la aparición de agregados de cada forma de la microcina mediante dispersión de luz de 350 nm a distintas concentraciones de microcina. La concentración crítica se puede calcular desde la gráfica de dispersión de luz en función de la concentración de la microcina, a partir de la intersección de la recta obtenida en el eje de la concentración. En la figura 9 se observa que existen diferencias en la concentración necesaria para la formación de agregados entre ambas formas de la microcina.  $Mcc^{ia}(J)$  presentó una concentración crítica menor ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) que  $Mcc^a$  ( $60 \mu\text{g/ml}$ ).

La forma tóxica de los priones posee la capacidad de formar polímeros, los que han sido denominados fibras amieloides. Esta capacidad estaría dada por el mayor contenido de estructura hoja- $\alpha$  la que interactúa en forma lateral y forma estas estructuras macromoleculares. La microcina E492 posee un menor contenido de estructura hoja- $\beta$  y es altamente hidrofóbica, en consecuencia la probabilidad de formación de agregados amorfos es alta. Para determinar la morfología de los agregados formados, las muestras de microcinas se analizaron mediante microscopía electrónica. En la figura 10 se observa que tanto la  $Mcc^a$  como  $Mcc^{ia}(J)$  forman estructuras filamentosas, pero los filamentos formados por  $Mcc^a$  presentan un diámetro mayor ( $\approx 33 \text{ nm}$ ) que los formados por  $Mcc^{ia}(J)$  ( $\approx 19 \text{ nm}$ ) (tabla 13). El diámetro de los filamentos formados sería dependiente de la concentración de la microcina, ya que una muestra de  $Mcc^a$  diluida 100 veces ( $1.5 \mu\text{g/ml}$ ) presentó la formación de filamentos con diámetros de  $\approx 11 \text{ nm}$ . Un hecho interesante es que cuando se utiliza esta concentración de



**Figura 9. Formación de agregados de microcina.** La formación de agregados se registró mediante la dispersión de luz a 350 nm como se describe en Materiales y Métodos, utilizando distintas concentraciones de Mcc<sup>a</sup> (—) y Mcc<sup>ia</sup> (J) (—).



**Figura 10. Micrografías electrónicas de muestras de microcina en agua.** Las muestras se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2%. A,  $Mcc^a$ . B, microcina inactiva aislada desde el sobrenadante de mutante en el gen *mceJ* ( $Mcc^{ia}(J)$ ). La barra indica 10 nm.



**Tabla 13.** Diámetros de fibras formadas por Mcc<sup>a</sup> y Mcc<sup>ia</sup>.

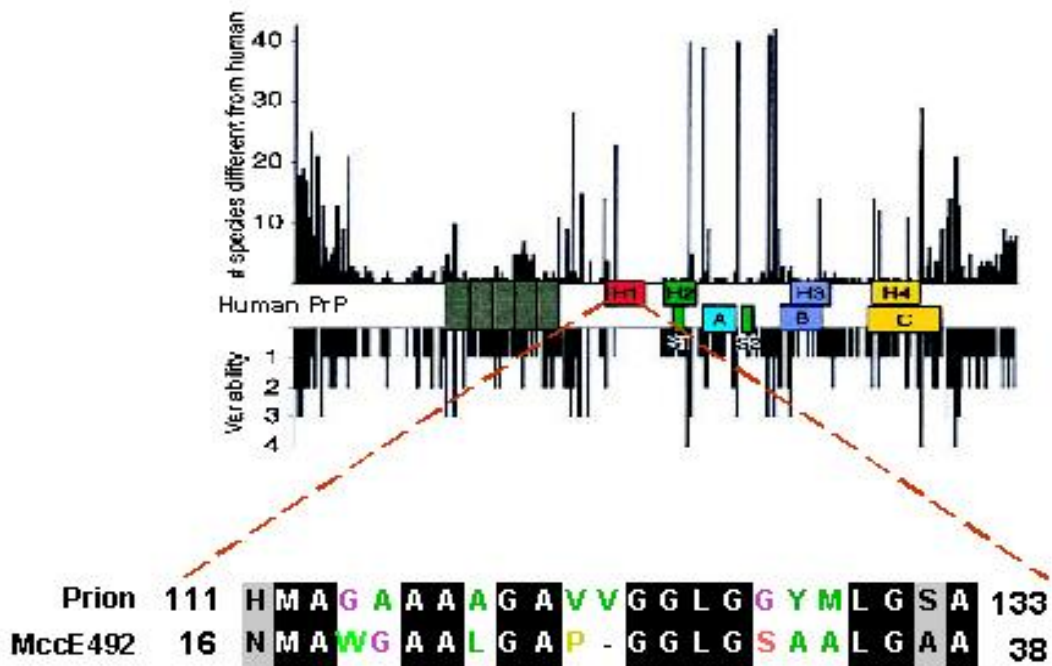
Mcc	Diámetro (nm)
Mcc <sup>a</sup> [150 µg/ml]	32.8 ± 4
Mcc <sup>ia</sup> (J) [150 µg/ml]	18.8 ± 3
Mcc <sup>a</sup> [1.5 µg/ml]	10.8 ± 2
Mcc <sup>ia</sup> (J) + Mcc <sup>a</sup> [135 µg/ml] [1.5 µg/ml]	26.0 ± 4

Los diámetros se midieron en amplificación de 80.000X y representan el promedio de 7 mediciones. El análisis estadístico mediante el test de Student de los diámetros obtenidos para Mcc<sup>ia</sup>(J) antes y después de la activación indican que éstos son significativamente diferentes (95 % de confianza).

Mcc<sup>a</sup> para activar a Mcc<sup>ia</sup>(J) en una razón 1:90, se observa la formación de filamentos de un diámetro intermedio ( $\approx 26\text{nm}$ ). Esto implicaría que aún a bajas concentraciones, la Mcc<sup>a</sup> sería capaz de inducir en Mcc<sup>ia</sup> la formación de filamentos con morfología similar a los formados por Mcc<sup>a</sup> utilizando el mismo rango de concentraciones. El hecho de que los filamentos obtenidos en Mcc<sup>a\*</sup> no presentan el mismo diámetro que Mcc<sup>a</sup>, puede explicarse postulando que no toda la microcina Mcc<sup>ia</sup> es convertida, lo cual es consistente con lo observado en ensayos de activación, donde la conversión de Mcc<sup>ia</sup> no alcanza el 100%. Se puede inferir además que la inducción de cambios a nivel de la estructura secundaria de Mcc<sup>ia</sup> por Mcc<sup>a</sup> van acompañados de cambios en la formación de estructuras macromoleculares. La Mcc<sup>ia</sup>(C) no presentó la formación de estas estructuras en las condiciones descritas para Mcc<sup>a</sup> y Mcc<sup>ia</sup>(J).

### **3.3.5. Activación de Mcc<sup>ia</sup> por Mcc1-43 *in vivo*.**

Todos los priones descritos presentan una región muy conservada correspondiente a los residuos 111-133 de PrP (figura 11), siendo esta región la que le confiere las propiedades priónicas (Prusiner, 1998). Al alinear esta secuencia con la secuencia de la microcina entre los residuos 16 al 38 se encuentra un 57% de identidad y un 74% de similitud. Se investigó la posibilidad que esta región de la microcina sea responsable de la capacidad de traspasar información conformacional. Para ello se utilizó la cepa de *E. coli* np220, la cual presenta una inserción del transposón Tn5 que interrumpe la proteína microcina en el aminoácido 43 (Mcc1-43). Se ideó un ensayo sobre un césped de células

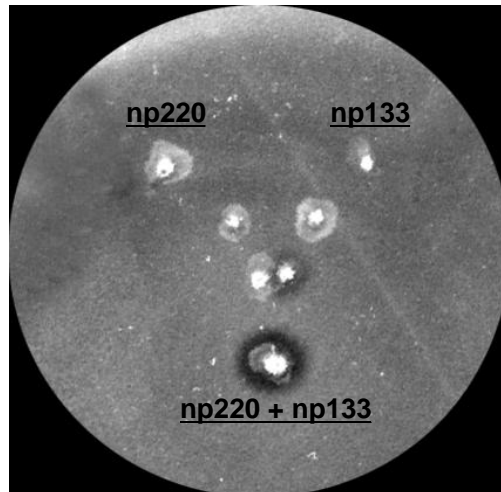


**Figura 11. Alineamiento entre la región príon PrP (111-133) y la microcina E492 (16-38).** Estas secuencias presentan un 57% de identidad y 74% de similitud. Residuos idénticos se indican en negro y las sustituciones conservadas en gris. La figura superior representa la comparación de todos los priones descritos con respecto al de humano (eje X). El eje Y superior representa el número de especies que difieren del PrP humano en un residuo determinado, y el eje Y inferior el número de residuos alternativos en cada posición (Prusiner, 1998)

sensibles a microcina (*E. coli* BL21), sembrándose sobre éste las cepas np133 (Mcc<sup>ia</sup>) y np220 (Mcc1-43) en la forma que se muestra en la figura 12. Se observa que ambas cepas por separado no presentan la formación de halo de inhibición sobre el césped. A medida que la distancia que separa ambas cepas disminuye, se observa la aparición de un halo de inhibición hacia la cepa np133, halo que es muy evidente cuando ambas cepas son sembradas juntas. Este resultado nos sugiere fuertemente que el segmento de Mcc1-43 es suficiente para activar a la Mcc<sup>ia</sup>. Así, al igual como se ha postulado para la conversión de PrP, esta región sería clave en dicho proceso.

#### **3.4. Mecanismo de inmunidad a la microcina E492.**

La inmunidad a la microcina E492 es conferida por la proteína integral de membrana MceB, a través de un mecanismo de acción que es altamente eficiente ya que muy bajos niveles de expresión de esta proteína son suficientes para conferir inmunidad cuando se emplean altas concentraciones de microcina purificada (Lagos *et al.*, 1999). En células productoras de colicinas formadoras de poros el mecanismo protector de las proteínas de inmunidad se debe a una interacción directa con la colicina (dominio formador de poro) y/o con proteínas del sistema receptor/translocador necesario para la acción de la colicina (Geli y Lazdunski, 1992; Cramer *et al.*, 1995). Este último mecanismo explicaría de mejor forma la alta eficiencia protectora de MceB, ya que la probabilidad de encuentro y asociación sería mayor.



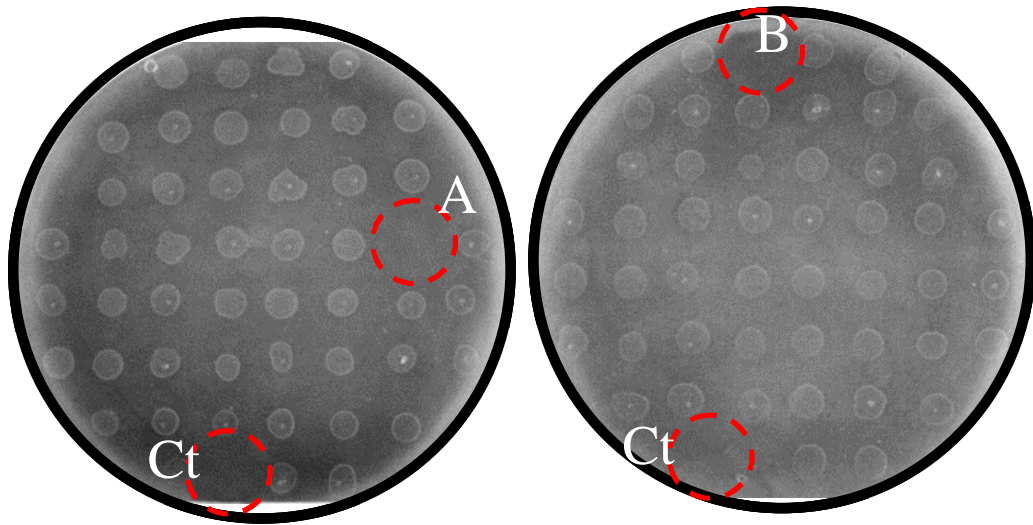
**Figura 12. Activación *in vivo* de Mcc<sup>ia</sup> por Mcc1-43.** Las cepas np220 productora del fragmento de microcina 1-43 y np133 productora de Mcc<sup>ia</sup> se sembraron sobre un césped de *E. coli* BL21 a distintas distancias que convergen en la parte inferior.

### **3.4.1. La interacción entre las proteínas MceB y TonB está implicada en el mecanismo de inmunidad a la microcina E492.**

Para investigar la existencia de una interacción funcional entre MceB y TonB se realizaron experimentos genéticos de compensación de mutaciones puntuales *in vivo*. Esta metodología consiste en obtener mutantes puntuales en MceB que afecten su actividad protectora (fenotipo  $imm^-$ ), para posteriormente encontrar mutantes puntuales en TonB que sean capaces de compensar el fenotipo  $imm^-$  de las primeras.

#### **3.4.1.1. Obtención de mutantes en MceB.**

Para obtener mutantes puntuales en MceB se realizó mutagénesis *in vitro* del plasmidio p157 que porta el gen *mceB*. El agente químico utilizado fue hidroxilamina, el cual reacciona con citosina para formar N4-hidroxicitosina, induciendo las transiciones G:C→A:T. El plasmidio tratado con hidroxilamina se introdujo mediante electroporación en *E. coli* K38pGp1-2. Mediante réplica de placas sobre placas agar-LB/amp y césped productor de microcina, se analizaron mas de 20.000 clones, seleccionándose aquellos que fueron incapaces de crecer sobre el césped (fenotipo  $imm^-$ ). Para confirmar el fenotipo los clones seleccionados se crecieron en medio LB/amp y se sembraron alícuotas de 5  $\mu$ l sobre un césped productor de microcina, método que permite diferenciar los falsos positivos de los clones que efectivamente han perdido la inmunidad. En la figura 13, se muestran 2 clones (A y B) que no presentaron crecimiento, al igual



**Figura 13. Ensayo de inmunidad sobre de césped *E. coli* VCS252pJEM15.** Alícuotas de 5  $\mu$ l de cultivos celular de los candidatos imm<sup>-</sup> se sembraron sobre el césped. Ct, control de *E. coli* K38pGP1-2 sin transformar con el plasmidio p157. A y B, clones que han perdido la inmunidad a la microcina E492.

que el control negativo de *E. coli* K38pGP1-2 (Ct), indicativo de la pérdida de inmunidad.

#### **3.4.1.2. Cambios conservados en MceB afectan su acción protectora.**

Para determinar el tipo de cambio ocurrido en el gen de inmunidad de los clones con fenotipo  $\text{imm}^-$ , se aisló el ADN plasmidial de cada clon y el gen *mceB* se secuenció utilizando los partidores T7-pro y HC-rev. En la figura 14 se muestra la secuencia nucleotídica y proteica de MceB y se indican los cambios en las mutantes asociados a un fenotipo  $\text{imm}^-$ . De los 16 clones secuenciados, 4 presentaron un cambio puntal en la secuencia primaria de *mceB* correspondiente al cambio de un residuo de alanina por valina en las posiciones 17 (mutante pM7205) y 77 (mutantes pM824, pM1143 y pM12431). En adelante estas mutantes serán referidas como MceBA17V y MceBA77V respectivamente. El cambio de un residuo de alanina por valina corresponde a un cambio conservado ya que ambos aminoácidos son hidrofóbicos. Estos cambios estarían ubicados en regiones de la proteína inmersa en un ambiente hidrofóbico, de acuerdo con programas de predicción de la topología de proteínas de membrana, los cuales arrojan como resultado que MceB tendría 3 dominios de transmembrana comprendidos entre los aminoácidos 1 - 21, 35 - 55 y 66 - 90, con los extremos N- y C-terminal ubicados hacia el periplasma y citoplasma respectivamente (tabla 14, figura 15). Estos cambios no afectarían la topología de MceB, ya que la predicción topológica con cuatro diferentes programas de predicción de hélices de transmembrana no varían al hacer el reemplazo de estos aminoácidos (tabla 14). Este resultado nos sugiere fuertemente que las



	10	20	30	40	50	60
ATG ACA TTA CTT TCA TTT GGA TTT TCT CCT GTT TTC TTT TCA GTC ATG					T	
M T L L S F G F S P V F F S V M					A F C I	
					V (1 mutante)	
	70	80	90	100	110	120
ATT TCA CGT AGT AAA TTC TAT CCG CAG AGA ACG CGA AAC AAA GTT ATT GTT CTG ATT TTA						
I S R S K F Y P Q R T R N K V I V L I L						
	130	140	150	160	170	180
CTA ACT TTT TTT ATT TGT TTT TTA TAT CCA TTA ACA AAA GTG TAT CTG GTG GGA AGT TAC						
L T F F I C F L Y P L T K V Y L V G S Y						
	190	200	210	220	230	240
GGT ATA TTT GAC AAA TTC TAC CTC TTT TGC TTT ATT TCT ACG TTA ATT GCA ATA GCA ATT					T	
G I F D K F Y L F C F I S T L I A I A I					V (3 mutantes)	
	250	260	270	280	290	
AAC GTA GTG ATA CTT ACA ATA AAT GGA GCT AAG AAT GAG AGA AAT TAG						
N V V I L T I N G A K N E R N *						

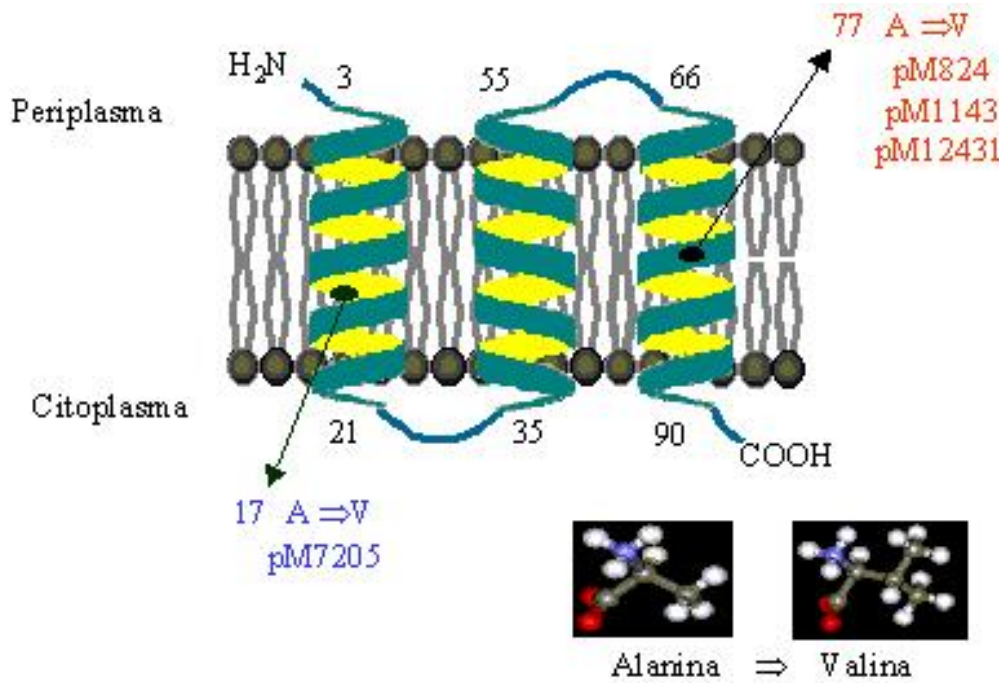
**Figura 14. Secuencia de ADN y proteica de MceB.** Las mutantes puntuales asociadas con la pérdida de inm unidad a la microcina E492 están señaladas en rojo. \*, codon de término.

**Tabla 14.** Predicción de hélices de transmembrana de MceB silvestre o mutado.

Se utilizó un consenso de 4 métodos.

Predicción	Proteína	N-terminal*	Hélice1	Hélice2	Hélice3
TmPred	MceBwt	P	3-21	35-55	66-90
	MceBA17V	P	3-21	35-55	66-90
	MceBA77V	P	3-21	35-55	66-85
TopPred	MceBwt	P	1-21	33-53	67-87
	MceBA17V	P	2-22	33-53	67-87
	MceBA77V	P	1-21	33-53	67-87
HMMTOP	MceBwt	P	2-21	35-54	68-87
	MceBA17V	P	2-21	35-54	68-87
	MceBA77V	P	2-21	35-54	68-87
SOSUI	MceBwt	P	2-23	35-57	67-89
	MceBA17V	P	2-23	35-57	67-89
	MceBA77V	P	2-23	35-57	67-89

\*, ubicación del extremo amino terminal. P, periplasma. Se utilizaron 4 programas para la predicción: Tmpred (Hoffman y Stoffel, 1993), TopPred (Claros y von Heijne 1994), HMMTOP (Tusnady y Simon, 2001) y SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998).



**Figura 15 . Modelo de la topología de MceB en la membrana citoplasmática.** Se indican las mutaciones puntuales asociadas con la pérdida de funcionalidad de MceB. El modelo se creó utilizando el programa TmPred (Hoffman y Stoffel, 1993).

mutaciones no estarían afectando la estructura de la proteína, sino mas bien afectarían una interacción de MceB con otra proteína en la membrana citoplasmática, interacción que sería necesaria para que la proteína de inmunidad pueda ejercer su acción protectora.

En ambos tipos de mutantes obtenidas el cambio aminoacídico fue idéntico (A→V) diferenciándose sólo en la posición en que dicho cambio ocurrió. Para determinar el efecto de la mutación sobre la función de MceB, se determinó en forma cuantitativa la sensibilidad de las mutantes a la microcina E492 en ensayos sobre césped y cultivo celular (tabla 15). La mutante MceBA17V presentó una mayor sensibilidad a la microcina que la mutante MceBA77V, sensibilidad que es similar a la que presenta el control sin MceB (TonB<sup>+</sup>). Este resultado nos indica que la mutación en la hélice N-terminal de MceB presenta un mayor efecto sobre la acción protectora de la proteína de inmunidad que la mutante puntual en la hélice C-terminal.

### **3.4.2. Mutantes en TonB son capaces de compensar las mutaciones puntuales en MceB.**

#### **3.4.2.1. Obtención de mutantes en TonB.**

Para determinar si la pérdida de inmunidad en mutantes puntuales de MceB se debe a defectos en su posible interacción con TonB, se realizaron experimentos por separado en los que se buscaron mutaciones en TonB con la capacidad para compensar el fenotipo imm<sup>-</sup> de las mutantes MceBA17V y MceBA77V. Para ello el plasmidio pIM91, que tiene clonado el gen TonB y que es resistente a cm, se

**Tabla 15.** Sensibilidad a la microcina E492 de mutantes puntuales en MceB.

Cepa	Diámetro halo (mm)	Sobrevida de <i>E. Coli</i> BL21 (%)
TonB <sup>+</sup>	16	4.6 x 10 <sup>-5</sup>
TonB <sup>-</sup>	0	48
TonB <sup>+</sup> / MceBWt	0	176
TonB <sup>+</sup> / MceBA17V	15	3.9 x 10 <sup>-4</sup>
TonB <sup>+</sup> / MceBA77V	6	7.0 x 10 <sup>-2</sup>

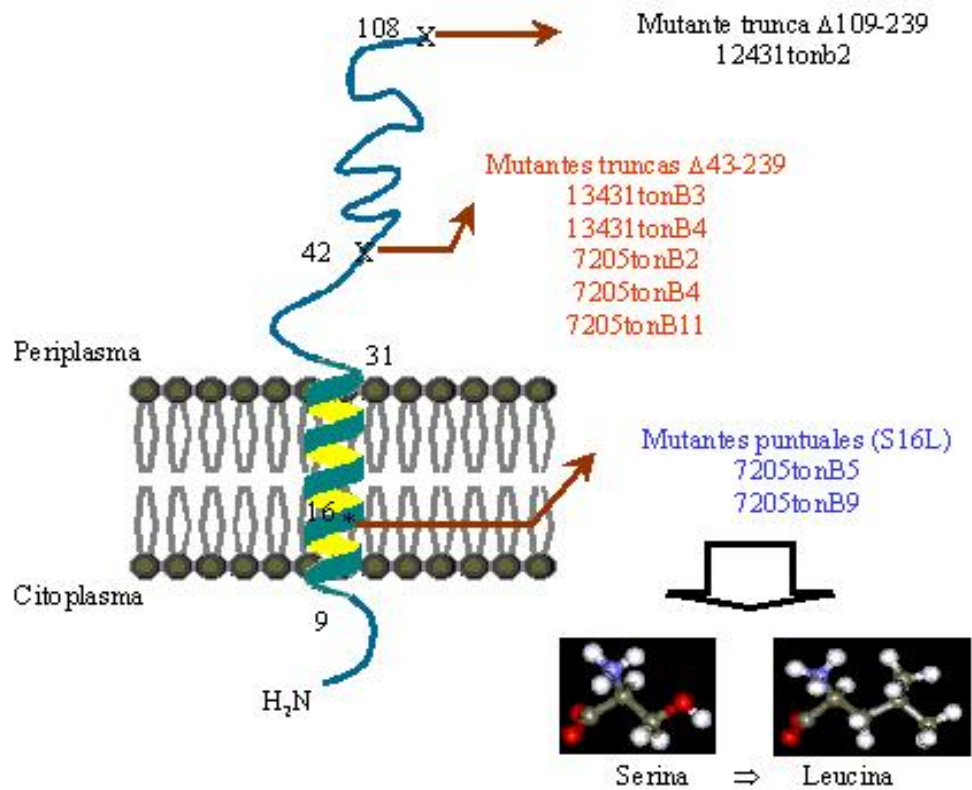
Los porcentajes de sobrevida se calcularon en cada caso con respecto al control sin tratamiento con microcina.

trató con hidroxilamina y se introdujo por medio de electroporación en las cepas de *E. coli* X8605(pM157A17) y X8605(pM157A77). Los clones que presentaron la recuperación del fenotipo  $\text{imm}^+$  se seleccionaron sobre céspedes productores de microcina y el fenotipo se confirmó en ensayos de inmunidad en césped empleando microcina purificada. Mediante esta metodología se obtuvo 19 clones que presentaron una recuperación del fenotipo  $\text{imm}^+$ : 9 clones para la mutante MceBA17V y 10 para MceBA77V. Se extrajo el ADN plasmidial de cada clon obtenido y se transformó la cepa de *E. coli* X8605. Mediante réplica de placas se seleccionaron los transformantes que presentaron el fenotipo  $\text{cm}^r\text{-amp}^s$ , indicativo de la presencia en la célula sólo del plasmidio que porta el gen *tonB*.

#### **3.4.2.2. Las mutantes compensatorias corresponden a mutantes de TonB que no cumplen su función biológica normal.**

Para determinar el tipo de mutantes de TonB que son capaces de compensar mutaciones puntuales en MceB, el gen *tonB* de estos clones se secuenció utilizando los partidores M13F y MP18 (figura 16). Todos los clones analizados presentaron un cambio puntual en el gen *tonB*. Al traducir la secuencia de ADN se observa que seis mutantes presentaron la formación de codones de término que llevarían a la producción una proteína TonB trunca, correspondiente a los primeros 42 (5 mutantes) y 108 residuos (1 mutante). Estas proteínas truncas tendrían las regiones citoplasmática, transmembrana y una pequeña fracción periplasmática (figura 17). Además se obtuvo una mutante que presentó un cambio puntual de un residuo de serina por leucina en la posición 16, cambio que estaría inserto en la región transmembrana de TonB (figura 16 y 17). En adelante





**Figura 17. Mutantes en TonB que compensan el fenotipo  $imm^-$  de mutaciones puntuales en MceB.** El esquema se realizó de acuerdo la topología de TonB en la membrana determinada experimentalmente (Roof *et al.*, 1991).



estas mutantes serán referidas como TonB $\Delta$ 43-239, TonB $\Delta$ 109-239 y TonBS16L respectivamente. Estos resultados apoyan la hipótesis de la existencia de una interacción entre las proteínas MceB y TonB en el mecanismo de inmunidad a la microcina E492. Además sugieren fuertemente que sólo la región N-terminal de TonB estaría implicada en dicha interacción.

#### 3.4.2.3. Las mutantes de TonB son sensibles a la microcina E492.

Debido a la importancia de la proteína TonB en la acción de la microcina, existe la posibilidad que las mutaciones obtenidas en esta proteína, por si solas generen resistencia a la acción de la microcina. Por ello se ensayó la sensibilidad de estas mutantes a la microcina en ausencia de MceB. En la tabla 16 se observa que todas las mutantes de TonB presentaron sensibilidad a la microcina, aunque disminuida con respecto a la silvestre. Si estas células son transformadas con los plasmidios que portan el gen *mceB* silvestre o mutado, se observa una recuperación del fenotipo *inm*<sup>+</sup> en casi todos los ensayos, exceptuando el ensayo de compensación entre TonB $\Delta$ 43-239/MceBA17V en el cual solo se observa una disminución de la sensibilidad a la microcina. Se puede concluir que sólo la región N-terminal de TonB es necesaria para la acción de la microcina E492 en la membrana citoplasmática. Por lo tanto, en el mecanismo de acción de la microcina E492 la proteína TonB sería necesaria para la inserción de la microcina en la membrana citoplasmática. La obtención de mutaciones en MceB que presentan diferentes grados de pérdida de inmunidad, y además sobre las cuales una mutante de TonB posee diferente capacidad compensatoria, es indicativo de

**Tabla 16.** Sensibilidad a microcina E492 de células que portan mutaciones en TonB y complementaciones con MceB.

Mutante	Titulo actividad *			MceBwt
	+ proteína de inmunidad			
	MceBA17V	MceBA77V		
TonBwt	1/64	1/32	1/16	Ns
TonB $\Delta$ 43-239	1/32	1/8	Ns	Ns
TonB $\Delta$ 109-239	1/2	Ns	Ns	Ns
TonBS16L	1/4	Ns	Ns	Ns

Las determinaciones se realizaron depositando diluciones seriadas de microcina E492 purificada sobre un césped de la cepa a analizar. La mutante trunca TonB $\Delta$ 109-239 se obtuvo en experimentos compensatorios para MceBA77V y la mutante puntual TonBS16L, para la mutante MceBA77V. La mutante TonB $\Delta$ 43-239 se obtuvo en experimentos compensatorios para la ambos tipos de mutantes en la inmunidad (MceBA17V y MceBA77V). \*, última dilución que genera un halo de inhibición de crecimiento. Ns, no sensible.

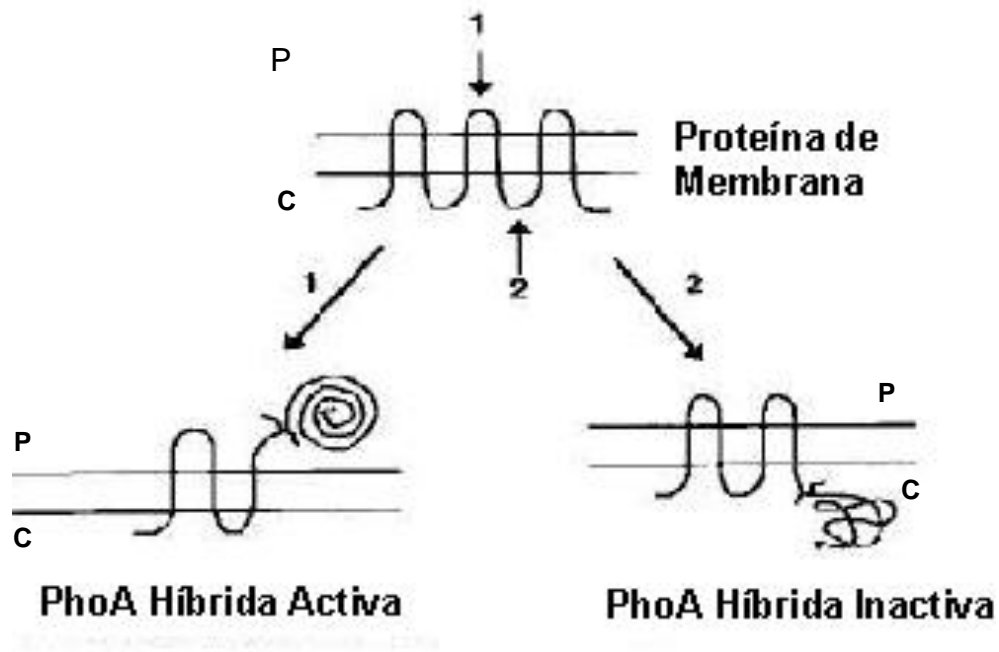
interacciones específicas entre regiones de MceB con TonB.

### 3.4.3. Topología de la proteína de inmunidad en la membrana citoplasmática.

Como ya se mencionó, los cambios puntuales en MceB asociados con una pérdida de su función protectora estarían ubicados en hélices de transmembrana, esto de acuerdo al modelo topológico de la proteína, predicción que debe ser comprobada experimentalmente. Un método muy usado en la determinación de la topología de proteínas de membrana es la fusión con la proteína fosfatasa alcalina (PhoA) codificada por el gen *phoA*. Esta proteína posee la característica de ser activa sólo cuando es exportada hacia el periplasma. Se utilizó el transposón *Tn<sub>phoA</sub>*, que es un derivado resistente a kanamicina de Tn5 y que lleva clonado el gen *phoA* sin un sitio de iniciación de la traducción y sin péptido líder, esencial para su exportación. Las inserciones de *Tn<sub>phoA</sub>* tendrán actividad PhoA sólo si la inserción forma una proteína de fusión en un gen blanco que puede aportar la señal para la exportación de PhoA y si ésta queda hacia el periplasma (figura 18) (Manoil y Beckwith, 1985, 1986; Song y Cramer, 1991).

#### 3.4.3.1. Obtención de fusiones entre MceB y PhoA.

La construcción de fusiones proteicas se realizó en cepas de *Salmonella typhimurium* mediante el sistema "Tn<sub>phoA</sub> hopping kit" el cual utiliza la construcción mud d-P22. La cepa de *S. typhimurium* MST2002 posee la secuencia de *Tn<sub>phoA</sub>* cercana a Mud d-P22, de modo que la inducción del ciclo lítico del fago con agentes que dañan el ADN (mitomicina C) produce un lisado con una muy alta frecuencia de partículas que incluyen *Tn<sub>phoA</sub>*. Este lisado se utilizó para



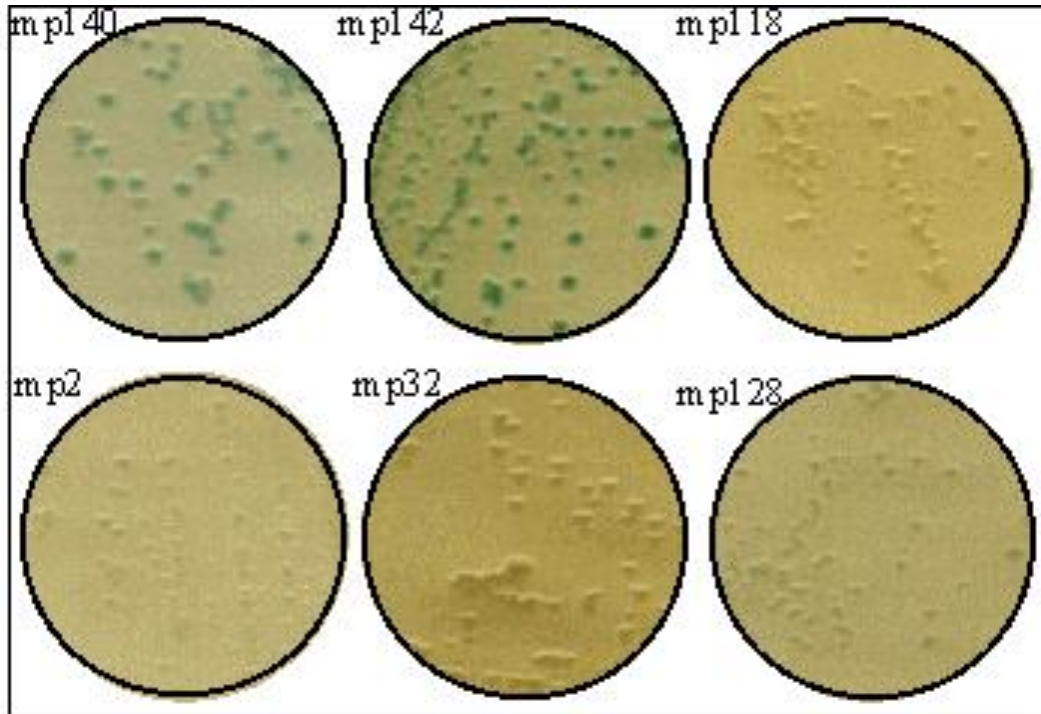
**Figura 18. Determinación de la topología de una proteína de membrana, mediante fusiones con PhoA.** La fusión de PhoA en un loop periplasmático de la proteína producirá híbridos que presentaran actividad fosfatasa alcalina (1), en tanto que la fusión que deja a PhoA hacia el lado citoplásmico carece de actividad (2). P, periplasma; C, citoplasma.

infectar la cepa de *S. typhimurium* MST308(p157) que porta el plasmidio en el cual está clonado el gen *mceB*. Para obtener sólo las inserciones que ocurrieron en el plasmidio, las transductantes obtenidas en placas agar-LB-amp-kan se suspendieron en caldo LB, aislándose el ADN plasmidial desde esta suspensión celular. Este ADN se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* CC118(DE3), y mediante réplica de placa se seleccionaron las transformantes incapaces de crecer sobre un césped de células productoras de microcina (fenotipo  $\text{imm}^-$ ), indicativo de que el transposón se insertó en el gen *mceB*.

#### 3.4.3.2. Actividad de las fusiones MceA-PhoA.

Se obtuvieron 42 clones que presentaron la inserción de *TnphoA* en el gen de inmunidad y sólo cuatro de ellas formaron colonias azules sobre placas agar-LB que contienen el reactivo cromogénico BCIP, reactivo que permite diferenciar entre las fusiones  $\text{PhoA}^+$  (colonias azules) y  $\text{PhoA}^-$  (colonias blancas) (figura 19). La actividad PhoA observada en estos clones indica que sintetizan una proteína de fusión que exporta PhoA hacia el periplasma.

La determinación cuantitativa de la actividad PhoA de las fusiones obtenidas se realizó mediante ensayos en cultivos líquidos como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados de estas determinaciones están resumidos en la tabla 17, en la cual se observa que solo los clones mp140 y mp142 presentan actividad PhoA, actividad que fue aproximadamente la mitad que el control positivo de *E. coli* VCS257. Al igual que el control negativo de *E. coli* CC118(DE3), los demás clones analizados no presentaron actividad PhoA (valores cercanos a 0). Estos resultados confirman lo observado en placas



**Figura 19. Caracterización fenotípica de fusiones MceB-PhoA.** Cultivos de cada clon fueron esparcidos sobre placas LB-BCIP. En las fotos se pueden diferenciar claramente las fusiones PhoA<sup>+</sup> (colonias azules) de las PhoA<sup>-</sup> (colonias blancas).

Tabla 17. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina de fusiones MceB-PhoA.

Cepa	Actividad (UA/ml)
VCS	31.3 ± 4.7
CC118(DE3)	0.1 ± 0.2
mp2	0.03 ± 0.06
mp32	0.01 ± 0.02
mp118	0.05 ± 0.03
mp129	0.1 ± 0.1
mp140	14 ± 2
mp142	13.7 ± 1.2

Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes. La actividad fosfatasa alcalina se determinó como se describe en Materiales y Métodos.

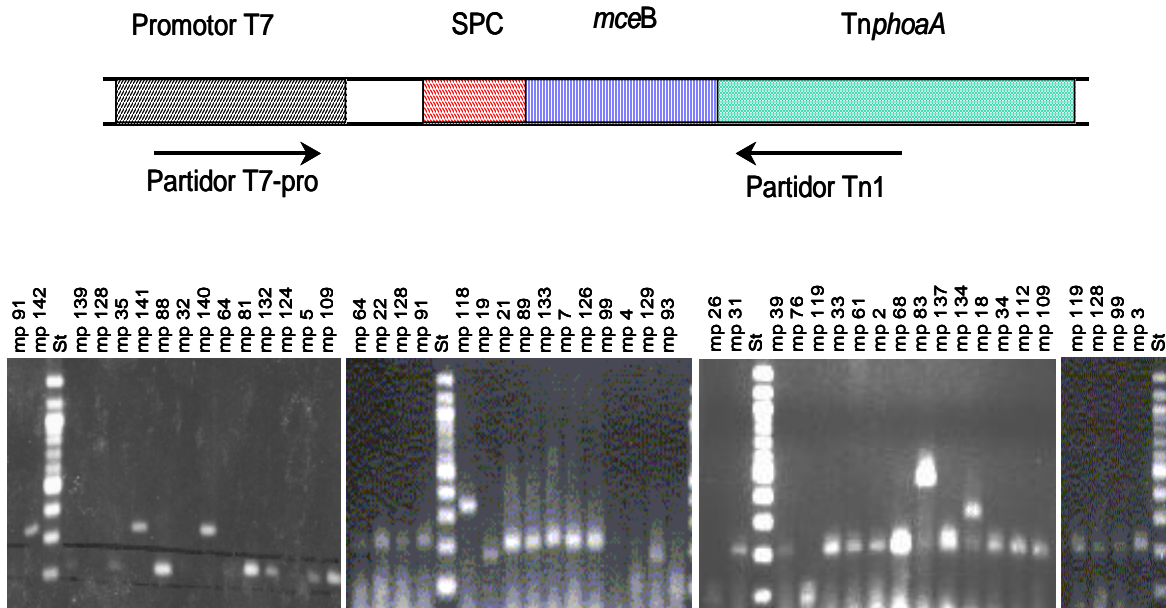
LB-BCIP, ya que solo se detectó actividad PhoA en los clones que presentaron la formación de colonias azules.

#### 3.4.3.3. Caracterización molecular de las fusiones MceB-PhoA.

Las fusiones se caracterizaron en forma preliminar de acuerdo al tamaño del amplificado obtenido en reacciones de PCR utilizando los partidores T7-pro y Tn1 (figura 20), que son complementarios al promotor de T7 bajo el cual esta clonado el gen *mceB*, y a la secuencia de inserción de Tn5. Los clones se dividieron en 3 grupos de acuerdo al tamaño aproximado del producto de PCR obtenido: G150bp (mp26, 76, 92 y 4), G200bp (mp2, 3, 5, 7, 8, 10, 19, 21, 23, 31, 32, 34, 35, 64, 81, 61, 88, 89, 91, 99, 109, 112, 119, 126, 128, 129, 131, 132, 133 y 134) y G320bp (mp137, 118, 140, 141, 142). El clon mp83 que presentó un producto de PCR con tamaño aproximado de 500 bp fue descartado en los análisis posteriores debido a que los resultados obtenidos en la secuenciación de la fusión fue anómalo.

De acuerdo al tamaño del producto de PCR obtenido, se puede estimar la región de MceB donde ocurrió la fusión (ver Materiales y Métodos). La fusión en los clones de grupo G150pb y G200bp ocurrirían aproximadamente en los residuo 5 y 21 respectivamente, ambos ubicados en hélices de transmembrana, según el modelo topológico de MceB. En el caso de los clones del grupo G320bp la fusión ocurriría en la posición aminoacídica 61, localizada en la única vuelta hacia el lado periplasmático presente en la proteína de inmunidad. Los clones del grupo G320bp son los únicos que presentaron actividad PhoA tanto en ensayos sobre





**Figura 20. Caracterización mediante PCR de fusiones MceB-PhoA.** Los productos de los PCRs utilizando los partidores T7-pro y Tn1 se resolvieron en agarosa al 3% p/v. St, marcador de peso molecular (1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp). En el primer gel de la izquierda la última banda corresponde a 200bp. El esquema superior muestra la región que es amplificada cuando se utilizan los partidores mencionados. Desde el tamaño del producto de PCR obtenido se puede calcular en forma aproximada el lugar de MceB donde ocurrió la fusión, como se describe en Materiales y Métodos.

placas como en medios líquidos, resultado que concuerda con el modelo predictivo de la topología de MceB en la membrana citoplasmática.

Se eligieron clones representativos de cada grupo y se procedió a secuenciar las fusiones por ambas hebras de ADN utilizando los partidores T7-pro y HC-rev, con el fin de determinar el lugar exacto donde ocurrió la fusión. El partidador HC-rev corresponde a la secuencia final del sitio de policlonamiento del vector pT7-7, donde está clonado en gen *mceB*. Los resultados de estas secuenciaciones, se resumen en la figura 21. Mediante el alineamiento de las secuencias de MceB , TnphoA y las fusiones, pudimos determinar el residuo de MceB donde ocurrió la fusión. En los clones de los grupos G150bp y 200bp, la fusión ocurre en los residuos 5 y 17 respectivamente, resultado que concuerda con los estimados mediante caracterización por PCR. Los clones del grupo G320bp presentaron la inserción en el residuo 56, resultado que también es acorde con el estimado desde las reacciones de PCR. En adelante estas fusiones serán denominadas como MceB(5)-PhoA, MceB(17)-PhoA y MceB(56)-PhoA. Estos resultados apoyan el modelo propuesto para la inserción de MceB en la membrana citoplasmática, ya que las fusiones MceB(5)-PhoA y MceB(17)-PhoA (que no presentan actividad PhoA) estarían ubicadas en hélices de transmembrana, mientras que MceB(56)-PhoA (que presenta actividad PhoA) se localizaría en la vuelta periplasmática de MceB. No obstante, si bien los resultados obtenidos para las actividades, caracterización por PCR y localización de la inserción de acuerdo a las secuencias de las fusiones concuerdan entre si, al realizar la traducción de todas las secuencias obtenidas se observa que la inserción de TnphoA no ocurrió en el marco de lectura apropiado, por lo que al

	10	20	30	40	50	60
<i>mceB</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
	ATGACATTACTTTTCATTTGGATTTTCTCCTGTTTTCTTTTCAGTCATGGCGTTCTGTATC					
	M T L L S F G F S P V F F S V M A F C I					
<i>G150bp</i>	ATGACATTACTTTTCATTTGACTCTTATACACAAGTAGCGTCCTGGACGGAACCTTTCCC					
	M T L L S F * L L Y T S S V L D G T F P					
<i>TnphoA</i>	-----NCTGACTCTTATACACAAGTAGCGTCCTGGACGGAACCTTTCCC					
	X D S Y T Q V A S W T E P F P					
	70	80	90	100	110	120
<i>mceB</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
	ATTTTCACGTAGTAAATTCTATCCGCAGAGAACGCGAAACAAAGTTATTGTTCTGATTTTA					
	I S R S K F Y P Q R T R N K V I V L I L					
<i>G150bp</i>	GTTTTGCCCTGTTCTGGAAAACCGGGCTGCTCAGGGCGATATTACTGCACCCGGCGGTGC					
	V L P C S G K P G C S G R Y Y C T R R C					
<i>TnphoA</i>	GTTTTGCCCTGTTCTGGAAAACCGGGCTGCTCAGGGCGATATTACTGCACCCGGCGGTGC					
	F C P V L E N R A A Q G D I T A P G G A					
	10	20	30	40	50	60
<i>mceB</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
	ATGACATTACTTTTCATTTGGATTTTCTCCTGTTTTCTTTTCAGTCATGGCGTTCTGTATC					
	M T L L S F G F S P V F F S V M A F C I					
<i>G200bp</i>	ATGACATTACTTTTCATTTGGATTTTCTCCTGTTTTCTTTTCAGTCATGGCGCTGACTCTT					
	M T L L S F G F S P V F F S V M A L T L					
<i>TnphoA</i>	-----NCTGACTCT					
	X D S					
	70	80	90	100	110	120
<i>mceB</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
	ATTTTCACGTAGTAAATTCTATCCGCAGAGAACGCGAAACAAAGTTATTGTTCTGATTTTA					
	I S R S K F Y P Q R T R N K V I V L I L					
<i>G200bp</i>	ATACACAAGTAGCGTCCTGGACGGAACCTTTCCCCTTTCCAGGATCTGATCTTCCATGT					
	I H K * R P G R N L S R F P G S D L P C					
<i>TnphoA</i>	TATACACAAGTAGCGTCCTGGACGGAACCTTTCCCCTTTGCCCCTGTTCTGGAAAACCGG					
	Y T Q V A S W T E P F P F C P V L E N R					

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
mceB   ATTTACG TAGTAAATTCTATCCGCAGAGAACGCGAAACAAAGTTATTGTTCTGATTTTA
        I S R S K F Y P Q R T R N K V I V L I L
G320bp ATTTACG TAGTAAATTCTATCCGCAGAgAACGCGAAACAAAGTTATTGTTCTGATTTTA
        I S R S K F Y P Q R T R N K V I V L I L
TnphoA -----

                130      140      150      160      170      180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
mceB   CTAAC TTTTTT TATTTG TTTTTT ATATCC ATTAAC AAAAGT GTATCT GGTGG GAAGTT AC
        L T F F I C F L Y P L T K V Y L V G S Y
G320bp CTAAC TTTTTT TATTTG TTTTTT aTATCC ATTAAC AAAAGT GTATCT GACTCT TATAC AC
        L T F F I C F L Y P L T K V Y L T L I H
TnphoA -----NCTGACTCTTATACAC
                                X D S Y T

                190      200      210      220      230      240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
mceB   GGTA TATTTT GACAAATT CTACCT CTTTTG CTTTAT TTTCTAC GTTAATT GCAATAG CAATT
        G I F D K F Y L F C F I S T L I A I A I
G320bp AAGTAG CGTCCT GGAACCTT TCCCGT TTTG CCGTGT TCTGG AAAACCG GGGCTG CTC
        K * R P G R N L S R F A L F W K T G L L
TnphoA AAGTAG CGTCCT GGAACCTT TCCCGT TTTG CCGTGT TCTGG AAAACCG GGGCTG CTC
        Q V A S W T E P F P F C P V L E N R A A

```

**Figura 21. Secuencia de ADN y aminoacídica de MceB, TnphoA y diferentes fusiones entre estas proteínas.** Las secuencias mostrada para cada grupo corresponde a resultados idénticos obtenidos en la secuenciación de varios clones en cada grupo: G150bp, mp9, mp19 y mp134; G200bp: mp2 y mp89; G320bp: mp34, mp140 y mp142. La base marcada con N al inicio de la secuencia de TnphoA corresponde una base que debe ser aportada por el gen blanco, de modo que el primer codón de TnphoA corresponderá a NCT. Esta es la única forma de inserción que permite que TnphoA quede en fase. \*, generación de un codón sin sentido.

traducirse quedaría fuera de fase. Sin embargo existe actividad PhoA, lo cual es aparentemente contradictorio con este resultado. La secuenciación del ADN se realizó 2 veces para descartar un error. Una explicación es que en estas secuencias ocurriría naturalmente un corrimiento del marco de lectura como ha sido descrito para otros sistemas, entre los que se incluyen secuencias de inserción de la familia IS1 e IS3 (Baranov *et al.*, 2001; Barry y Miller, 2002).

## DISCUSIÓN.

### **4.1. La producción de microcina E492 activa involucra un proceso de maduración.**

La producción microcina E492 activa ocurre sólo en fase exponencial de crecimiento de la cepa productora, disminuyendo la actividad de la microcina aislada desde el sobrenadante de cultivos en fase estacionaria. La producción de microcina inactiva durante la fase estacionaria de crecimiento está asociada a la falta de transcripción de los genes de maduración *mceI* y *mceJ* en esta fase (Corsini *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que la microcina inactiva producida durante la fase estacionaria corresponde a microcina inmadura, puesto que las mutantes por transposición en cada uno de los genes de maduración (*mceC*, I y J) producen una microcina inactiva en forma independiente de la fase de crecimiento. Los resultados obtenidos en experimentos con bicapas fosfolipídicas, esferoplastos y de competencia entre la microcina activa e inactiva, sugieren fuertemente que el proceso de maduración de la microcina E492 es necesario para que esta pueda interactuar con un receptor en la membrana externa de la célula blanco, paso necesario para que la microcina pueda ser translocada a través de esta membrana. Las microcinas inactivas aisladas ya sea desde la fase estacionaria de crecimiento o desde mutantes en los genes de maduración, sólo presentaron diferencias en el contenido de estructura secundaria con respecto a la microcina activa. La actividad tóxica de la microcina E492 no estaría asociada a modificaciones en su esqueleto polipeptídico y, por lo tanto el

proceso de maduración de esta microcina implicaría un mecanismo novedoso que excluye un proceso de modificación postraducciona. La participación de los productos de los genes de maduración podría ser directa o indirecta, pudiendo plantearse varios posibles mecanismos para la explicación de estos resultados. Una posibilidad en una acción indirecta de estos productos génicos, es que la “conformación activa” del polipéptido de microcina E492 sea producto de la acción de moléculas que actúan como cofactores, los cuales serían los blancos de acción de las proteínas MceC, I y J, o estas proteínas simplemente permitirían la asociación de estos metabolitos a la microcina E492.

Una posible explicación alternativa es que los productos génicos MceC y J conserven la actividad sugerida por el análisis de secuencia, es decir, glicosiltransferasa y aciltransferasa respectivamente, especialmente en el caso de la aciltransferasa en la cual la región conservada corresponde al sitio activo (Lagos *et al* 2001). El blanco de acción de estas proteínas podrían ser otras proteínas pertenecientes al sistema de la microcina E492 o al huésped bacteriano, pudiendo por ejemplo interactuar con proteínas implicadas en la exportación de la microcina, de esta forma induciendo la conformación activa de la microcina E492 concomitante con su exportación. Un modelo alternativo de acción directa, es que algunas o todas estas proteínas (MceC, I, J) pueden actuar como chaperonas moleculares promoviendo la conformación activa por interacción directa con la microcina E492. Este modelo es menos probable ya que ninguno de los genes de maduración presenta homología con chaperonas descritas hasta ahora. Por otro lado, estas proteínas presentan perfiles de hidrofobicidad compatibles con

proteínas solubles, lo cual hace improbable su acción al momento de la exportación.

La estructura secundaria de la forma activa de la microcina E492 presentó un mayor contenido de estructura tipo hoja- $\beta$  que la forma inactiva, observándose una proporción inversa en cuanto al contenido de estructura hélice- $\alpha$ . La actividad tóxica de la microcina E492 está asociada con un mayor contenido de estructura hoja- $\beta$ , y los posibles cambios en conformación/oligomerización de la microcina E492 dependientes del proceso de maduración conferirían la capacidad para reconocer un receptor en la superficie de la célula blanco, reconocimiento que no ocurriría en microcinas inmaduras.

#### **4.2. La proteína de inmunidad a la microcina E492 interactúa con la proteína TonB en el mecanismo protector.**

Los resultados obtenidos en los experimentos genéticos de compensación de mutaciones apoyan la hipótesis de la existencia de una interacción entre MceB y TonB en el mecanismo de inmunidad a la microcina E492. Se observó una pérdida de la función de MceB asociada un cambio puntual conservado en la posición 17 o 77 de un residuo de alanina por valina (ambos residuos hidrofóbicos). Tomando en cuenta la naturaleza conservada de dichos cambios y su localización (hélices de transmembrana), estos cambios no afectarían la estructura de la proteína, sino mas bien su interacción con otra(s) proteína(s) a través de sus hélices de transmembrana. Para entender como un cambio, que a primera vista aparece como conservado, puede afectar la interacción entre dos



hélices de transmembrana, es necesario conocer algunos principios que rigen este tipo de interacciones. Dos hélices de transmembrana pueden interactuar en forma lateral, interacción que es reversible y mediada por varios tipos de enlaces no-covalentes (enlaces hidrógeno, electroestáticos, hidrofóbicos, fuerzas de van der Waals) (Fleming y Engelman, 2001; Adamian y Liang, 2001). La fuerza (afinidad) de formación de estos tipos de enlaces se incrementa con la proximidad de los grupos involucrados, siendo muy importante la “complementariedad de forma” para una interacción fuerte. De acuerdo con esto, las hélices deben funcionar como piezas de un “engranaje” para de esta forma permitir la correcta formación de las interacciones que finalmente determinaran su afinidad. Un parámetro importante en el estudio del plegamiento, estabilidad y asociación de proteínas de membrana es el llamado “empacamiento de la hélice”, parámetro que ha sido crítico en la evaluación de modelos estructurales, diseño de nuevas proteínas y generalmente en el entendimiento de cómo la estructura terciaria final de una proteína es codificada en su estructura primaria (Eilers *et al.*, 2000 y 2002). El valor promedio de empacamiento de una proteína es simplemente el promedio de los valores de empacamiento de todos los aminoácidos que la conforman (Eilers *et al.*, 2000). Un caso bien estudiado es la interacción hélice-hélice de la glicoporina A, en la cual se ha demostrado una disminución significativa en la interacción a causa de un cambio aparentemente inocuo, como Gly63→Ala. Sin embargo, los valores de empacamiento en hélices de transmembrana para estos residuos son de 0.512 y 0.471 respectivamente (White y Wimley, 1999; Eilers *et al.*, 2000). En nuestro caso obtuvimos cambios conservados de una ala→val,

cuyos valores determinados de empaquetamiento son de 0.471 y 0.408 respectivamente (Eilers *et al.*, 2000). Por tanto, estos cambios puntuales en hélices transmembrana de MceB que a primera vista parecen conservados, podrían estar afectando el empaquetamiento de la hélice y de esta forma no permitirían el acercamiento óptimo de los grupos necesarios para la obtención de una unión eficiente entre ambas hélices. Un cambio de este tipo no produce una pérdida total de la interacción entre dos proteínas de membrana sino que sólo una disminución en su afinidad (White y Wimley, 1999).

En este contexto una mutante compensatoria en TonB podría corresponder a mutantes que aumentan nuevamente la afinidad entre ambas proteínas, o en su defecto mutantes que aumentan la disponibilidad de TonB para su interacción con MceB, como se explica a continuación.

Las mutantes obtenidas de TonB que compensan mutaciones puntuales en MceB correspondieron a mutantes que no cumplen la función fisiológica normal de TonB. La proteína TonB funciona como un translocador de energía, aparentemente “tomando” la energía protón motriz de la membrana citoplasmática para conducir un transporte activo en la membrana externa de bacterias gram negativas. De acuerdo con la fuente de energía, se ha sugerido un modelo dinámico de transducción de energía, con transiciones de TonB desde un isómero de alta energía asociado con la fuente de energía, a un isómero de menor energía coincidente con la liberación de energía al complejo receptor-ligando en la membrana externa (Larsen *et al.*, 1999; Larsen y Postle, 2001). De esta forma la actividad de TonB es dependiente de la conformación, y su habilidad para adoptar estas conformaciones depende de su interacción con la proteína ExbB, con la cual

interactúa a través del segmento de transmembrana (Larsen *et al.*, 1994; Larsen y Postle, 2001). La importancia de esta interacción ha sido demostrada en fraccionamientos celulares en los que se observó la presencia de TonB en las fracciones de membrana interna y externa de la célula silvestre, en tanto que se localizó sólo en la fracción de membrana externa en mutantes carentes de ExbB (Letain *et al.*, 1997). Por lo tanto la proteína de inmunidad a la microcina E492 debe poseer una afinidad por TonB lo suficientemente alta como para permitir una unión eficiente con una proteína muy dinámica que debe estar ciclando entre varios estados y para ello, además, interaccionando con otras proteínas de membrana. Por esto una mutación en MceB que disminuye su afinidad por TonB, la incapacita de competir en el concierto de interacciones y cambios que sufre esta proteína. Esto podría explicar porqué mutantes truncas en TonB (TonB $\Delta$ 43-239 y TonB $\Delta$ 108-239) y la mutante puntual TonBS16L, compensan el fenotipo *imm<sup>-</sup>* de mutantes puntuales en MceB. Los ciclos mostrados por TonB dependen de su interacción con el receptor de membrana externa a través de su extremo C-terminal. Las mutantes truncas de TonB pierden la capacidad de interacción con un receptor debido a la falta del dominio carboxilo terminal, y junto con ello la transición entre isómeros de alta y baja energía. Lo anterior en cierto modo aumentaría la “disponibilidad” de TonB para interaccionar en forma eficiente con la mutante puntual de MceB. El mismo fenómeno ocurriría en el caso de la mutante puntual TonBS16L, ya que se ha descrito que esta mutación afecta la interacción de TonB con la proteína ExbB necesaria para las transiciones energéticas de TonB (Larsen y Postle, 2001), medidos por una disminución en la formación de

heterodímeros en esta mutante, en experimentos de entrecruzamiento químico. No obstante, no se puede descartar que esta mutación, independiente de la disminución descrita en la afinidad entre TonB y ExbB, aumente la afinidad entre TonB y MceB mutado, en el modo clásico de compensación de mutaciones puntuales. Si el aumento de la disponibilidad de TonB es el mecanismo de compensación de mutaciones puntuales en MceB, en las mutantes de TonB no se debiera afectar su interacción con MceB silvestre, ya que no ha variado mayormente la región de transmembrana involucrada en dicha interacción. Esto se comprobó en experimentos de compensación en los que se observó que células que portan mutantes de TonB y MceB silvestre son inmunes a altas concentraciones de microcina.

Existen dos posibles mecanismos por los cuales la proteína de inmunidad inhibiría la acción de la microcina a través de una interacción con TonB: i) la unión de MceB a TonB inhibiría la interacción de la microcina E492 con TonB impidiendo así que la microcina puede alcanzar la membrana citoplasmática; ii) MceB no impediría la interacción entre la microcina y TonB, sino que la unión con TonB únicamente le permitiría a la proteína de inmunidad posesionarse en el lugar adecuado para así poder interaccionar con la microcina y de esta forma impedir la formación del canal. El segundo mecanismo explicaría mejor porqué el cambio ala17→val (hélice N-terminal) posee un mayor efecto sobre el mecanismo protector de MceB que el cambio ala77→val (hélice C-terminal). Esta diferencia fenotípica indica que estas mutaciones estarían afectando distintas interacciones de MceB, las que podrían incluir por un lado la interacción con TonB y por otro con

la microcina E492. De este modo MceB se uniría a la microcina una vez que ésta se ha insertado en la membrana impidiendo la formación del canal, como se ha descrito en la inmunidad a la colicina E1 (Lindeberg y Cramer, 2001).

Las mutantes truncas de TonB presentaron sensibilidad a la microcina E492, aunque esta sensibilidad es significativamente menor a la observada con TonB silvestre. Este resultado en primer lugar nos sugiere que solo la región N-terminal de TonB es necesaria para que la acción tóxica de la microcina. La menor sensibilidad a microcina de estas mutantes de TonB, indicaría que la eficiencia de esta interacción en las mutantes de TonB sería menor. Una deficiencia en la translocación a través de la membrana externa es menos probable puesto que no se observó un efecto inhibitorio en experimentos de inhibición de la actividad de microcina con el pentapéptido sintético caja-TonB (Glu-Thr-Val-Ile-Val). Se ha demostrado que este pentapéptido inhibe procesos en los que están involucrados receptores TonB dependientes, como el importe de enteroquelina-férrica, infección con el fago  $\phi$ 80 y actividad de las colicinas la y B (Tuckman y Osburne, 1992).

#### 4.3. La microcina E492, primer prión bacteriano.

En el presente trabajo se demuestra la producción de dos formas de la microcina E492 que difieren en su capacidad para actuar como toxina. Ambas formas de la microcina ( $Mcc^a$  y  $Mcc^{ia}$ ) poseen idéntica secuencia primaria, pero diferente estructura secundaria.  $Mcc^{ia}$  posee un alto contenido de hélice- $\alpha$  mientras que la forma activa cambia a estructura hoja- $\beta$ , lo que se asemeja fuertemente a las diferencias conformacionales encontradas en los priones.  $Mcc^a$

posee propiedades infecciosas parecidas al prión tal como se demostró en ensayos de conversión *in vitro*, en los cuales Mcc<sup>ia</sup> fue transformada a Mcc<sup>a</sup> después de incubación con pequeñas cantidades de Mcc<sup>a</sup>. La ganancia de actividad estuvo acompañada por un aumento en el contenido de estructura hoja-  
□ en la proteína convertida. La proteína activada *in vitro* fue a su vez capaz de propagar esta propiedad induciendo la conversión de mas Mcc<sup>ia</sup> a Mcc<sup>a</sup>.

En el caso de priones de mamíferos una conversión eficiente *in vitro* es obtenida solo cuando se utilizan extractos celulares, siendo mucho menos eficiente cuando se utilizan ambas proteínas con un alto grado de pureza (Saborio *et al*, 2001). Este hecho ha dificultado la discusión en cuanto a la existencia de otros factores anexos que serían responsables del fenómeno de conversión priónica. Nuestros resultados demuestran que el proceso de conversión implica la transmisión directa de conformación proteica de una molécula a otra y se descarta la posibilidad de que otros factores presentes en la preparación de Mcc<sup>a</sup> sean los verdaderos responsables de la activación de Mcc<sup>ia</sup>. Lo anterior es apoyado por el hecho que en los ensayos de conversión las preparaciones de microcina utilizadas presentaron un alto grado de pureza, ya que no se detectaron otras proteínas por tinción de plata en PAGE-SDS, ni por espectrometría de masas. Solo una pequeña proporción de Mcc<sup>a</sup> es necesaria para observar una conversión significativa ( $[Mcc^a] < [Mcc^{ia}]$ , 50-60 veces), conversión que puede ser cíclicamente propagada mediante ciclos de conversión en los cuales la cantidad del inóculo original de Mcc<sup>a</sup> está mucho mas diluido.

Mediante comparación de secuencia se encontró una similitud significativa entre un fragmento hidrofóbico interno de Mcc (residuos 16-38) y la región

PrP111-121 (57% de identidad, 74% similitud). Este fragmento es altamente conservado en los priones de todas las especies descritas (Prusiner, 1998) y muchos estudios han demostrado que esta secuencia de PrP es la que le confiere sus propiedades. La delección de los residuos 114-121 de PrP resulta en una proteína que no es convertible a PrP<sup>Sc</sup> y la proteína modificada inhibe la conversión de PrP<sup>C</sup> (Holscher *et al*, 1998). Además, el péptido sintético correspondiente al fragmento PrP109-141 de PrP se une a PrP<sup>C</sup> induciendo algunas propiedades bioquímicas de PrP<sup>Sc</sup> (Kaneko *et al.*, 1995). En los experimentos de conversión *in vivo* realizados sobre un césped celular sensible a microcina utilizando cepas productoras de Mcc<sup>ia</sup> y Mcc(1-43), se observó la producción de un halo de inhibición alrededor de las colonias solo cuando ambas cepas fueron sembradas juntas o muy cercanas una de otra. Una posible explicación a este resultado es que la región de Mcc16-38 corresponde al dominio prionico que le confiere a la microcina la propiedad de inducir el cambio conformacional.

La capacidad de la microcina para ser convertida de una forma no tóxica a una forma tóxica utilizando muestras altamente purificadas apoya fuertemente la hipótesis de “solo proteína” en la propagación del prión. La conversión de Mcc<sup>ia</sup> se logra usando una baja proporción de la forma activa (1:50-1:60) acorde con la noción de un proceso catalítico. Además, la capacidad de Mcc<sup>a</sup> recientemente convertida para inducir la conversión de nueva Mcc<sup>ia</sup> es otro resultado a favor de la hipótesis de prión. La función biológica la Mcc sería su toxicidad frente a un amplio espectro de bacterias, otorgando ventajas competitivas a la célula que la porta. En este caso el proceso de conversión resulta en la replicación de una

actividad biológica de la microcina y no en la propagación de un efecto tóxico colateral como en el caso de PrP, sugiriendo que la actividad prión de la microcina es favorable en la vida bacteriana. En un comienzo el fenómeno prión fue exclusivamente descrito en mamíferos (Prusiner 1982), una década después en levaduras y hongos (Wickner, 1994; Uptain y Lindquist 2002), y ahora de acuerdo con nuestros resultados, este fenómeno también estaría presente en bacterias. Lo anterior sugiere que este proceso de propagación conformacional estaría íntimamente asociado con la vida y correspondería a un fenómeno mas ampliamente distribuido de lo que se pensaba en un comienzo.



## 5. CONCLUSIONES.

- La microcina E492 requiere de un proceso de maduración a cargo de los productos génicos MceC, I y J para ser producida en forma activa,
- El proceso de maduración de la microcina E492 implica cambios en la conformación/oligomerización que son necesarios para que ésta pueda reconocer un receptor en la superficie de la célula blanco.
- La capacidad que posee la microcina E492 para adoptar 2 conformaciones estables y para propagar información conformacional de proteína a proteína, la convierten en la primera proteína con comportamiento priónico descrita en bacterias.
- En el mecanismo de acción de la microcina E492, la región N-terminal de la proteína TonB es necesaria para su inserción en la membrana interna de la célula blanco.
- La proteína de inmunidad a la microcina E492 ejerce su acción protectora a través de una interacción con la región N-terminal de la proteína TonB.

## REFERENCIAS.

- Adamian, L. y J. Liang. 2001.** Helix-Helix Packing and Interfacial Pairwise Interactions of Residues in Membrane Proteins. *J. Mol. Biol.* **311**: 891-907.
- Anderson, R. P. y J. R. Roth. 1978.** Tandem chromosomal duplications on *Salmonella typhimurium*: fusion of histidine genes to novel promoters. *J. Mol. Biol.* **119**: 147-166.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, y K. Struhl. 1992.** Short protocols in molecular biology, 2nd ed. Greene Publishing Associates, New York, N.Y.
- Baquero, F. y F. Moreno. 1984.** The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 117-124.
- Baranov, P., V., O. L. Gurvich, O. F. Fayet, M. F. Prère, W. A. Miller, R. F. Gesteland, J. F. Atkins y M. C. Giddings. 2001.** RECODE: a database of framesifting, bypassing and codon redefinition utilized for gene expression. *Nuc. Ac. Res.* **29**: 264-267.
- Barry, J. K. y W. A. Miller. 2002.** A -1 ribosomal frameshift element that requires base pairing across four kilobases suggests a mechanism of regulating ribosome and replicase traffic on a viral RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **99**: 11133-11138.
- Brandbeer, C. 1993.** The proton motive force drives de outer membrane transport of cobalamine in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 3146-3150.

- Brickman, E. y J. Beckwith. 1975.** Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions y  $\phi 80$  transducing phages. J. Mol. Biol. **96**: 307-316.
- Caughey, B. W., A. Dong, K. S. Bhat, D. Ernst, S. F. Hayes y W. S. Caughey. 1991.** Biochemistry. **30**: 7672–7680.
- Claros, M. G. y G. von Heijne. 1994.** TopPred II: An improved software for membrane protein structure predictions. Comput. Appl. Biosci. **10**: 685-686.
- Cohen, F. E. y Prusiner S. B. 1998.** Pathologic conformations of prion proteins. Annu. Rev. Biochem. **67**: 793-819.
- Corsini, G., M. Baeza, O. Monasterio y R. Lagos. 2002.** The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. Biochemie. **84**: 539-544.
- Cramer, W. A., L. B. Heymann, S. L. Schendel, B. N. Deriy, F. S. Cohen, P. A. Elkins y C. V. Stauffacher. 1995.** Structure-function of the channel-forming colicins. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **24**: 611-641.
- Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne y A. Elofsson. 1997.** Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: The dense alignment surface method. Protein Eng. **10**: 673-676.
- de Lorenzo, V. 1984.** Isolation y characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. Arch. Microbiol. **139**: 72-75
- de Lorenzo, V. y A. Pugsley. 1985.** Microcin E492, a low-molecular weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. Antimicrob. Agents Chemother. **27**: 666-669.

- de Lorenzo, V., J. L. Martinez y C. Asencio. 1984.** Microcin-mediated interactions between *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. J. Gen. Microbiol. **130**: 391- 400.
- Duché D., L. Letellier, V. Géli, H. Bénédétti y D. Baty. 1995.** J. Bacteriol. **177**: 4935-4939.
- Eilers M., S. C. Shekar, T. Shieh, S. O. Smith y P. J. Fleming. 2000.** Internal packing of helical membrane proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **97**: 5796-5801.
- Eilers,M., A. B. Patel, W. Liu y S. O. Smith. 2002.** Comparison of Helix Interactions in Membrane and Soluble  $\alpha$ -Bundle Proteins. Biophysical Journal **82**: 2720–2736
- Fleming, K., G., y D. M. Engelman. 2001.** Specificity in transmembrane helix–helix interactions can define a hierarchy of stability for sequence variants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **98**: 14340-14344.
- Geli, V. y J. Lazdunski. 1992 .** A  $\alpha$ -helical hydrophobic hairpin as a determinant in protein-protein interaction occurring in *E. coli* colicin A and B immunity system. J. Bacteriol. **174**: 6432-6437.
- Géli, V., D. Baty, and C. Lazdunski. 1988.** Use of a foreign epitope as a "tag" for the localization of minor proteins within a cell: The case of the immunity protein to colicin A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**: 689-693.
- Géli, V., D. Baty, D. Crozel, J. Morlon, R. Lloubès, F. Pattus and C. Lazdunski. 1986.** Mol. Gen. Genet. **202**: 455-460.

- Goaux, E. 1997.** The long and short of colicin action: the molecular basis for the biological activity of channel-forming colicins. *Structure* **5**: 313-317.
- Guarente, L. y J. Beckwith. 1978.** Mutant RNA polymerase of *Escherichia coli* terminates transcription in strains making defective rho factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:294–297.
- Guerinot, M. L. 1994.** Microbiol iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 743-772.
- Hashimoto, T. y M. Sekiguchi. 1976.** Isolation of temperature sensitive mutants of R plasmid by *in vitro* mutagenesis with hydroxylamine. *J. Bacteriol.* **127**: 1561-1563.
- Heppner, F. L., y A. Aguzzi. 2001.** Prions. *Progr. Brain Res.* **132**: 737-750.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. y Mitaku, S. (1998).** SOSUI: Classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**, 378-379.
- Hofmann, K. y W. Stoffel. 1993.** Tmbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **347**: 166.
- Holscher, C., H. Delius y A. Burkle. 1998.** Overexpression of nonconvertible PrPc delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation. *J. Virol.* **72**: 1153-1159.
- Kaneko, K., D. Peretz, K. M. Pan, T. C. Blochberger, H. Wille, R. Gabizon, O. H. Griffith, F. E. Cohen, M. A. Baldwin y S. B. Prusiner. 1995.** Prion protein (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 11160-11164.
- Karlsson, M., K. Hannavy and C. F. Higgins. 1993.** *Mol. Microbiol.* **8**: 379-388.

- Kolter, R., F. Moreno. 1992.** Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 141 - 163.
- Konisky, J. 1982.** Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**: 125- 144.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne y E. L. L. Sonnhammer. 2001.** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**: 567-580.
- Kurepina, N. E. y I. A. Khumel. 1986.** Microcins: Their nature and genetic determination. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* **4**: 3-9.
- Lagos, R., J. E. Villanueva y O. Monasterio. 1999.** Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein *J. Bacteriol.* **181**: 212-217.
- Lagos, R., M. Baeza, G. Corsini, C. Hetz, E. Strahsburger, J. A. Castillo, C. Vergara y O, Monasterio. 2001.** Structure, organization, and characterization of the cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**: 229-243.
- Lagos, R., M. Wilkens, C. Vergara, X. Cecchi y O. Monasterio. 1993.** Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**: 145-148.
- Larsen R. A. y K. Postle. 2001.** Conserved Residues Ser16 and His20 and Their Relative Positioning Are Essential for TonB Activity, Cross-linking of TonB with ExbB, and the Ability of TonB to Respond to Proton Motive Force. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **276**: 8111–8117.

- Larsen R. A., M. G. Thomas, G. E. Wood y K. Postle. 1994.** Mol. Microbiol. **13**: 627-640.
- Larsen, R. A., M. G. Thomas y K. Postle. 1999.** Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. Mol. Microbiol. **31**:1809–1824.
- Lazdunski, J., E. Bouveret, A. Rigal, L. Journet, R. Lloubès y H. Bénédicti. 1998.** Colicin import into *Escherichia coli* cells. J. Bacteriol. **180**: 4993-50502
- Letain, T. E. y K. Postle. 1997.** TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **24**: 271-283.
- Li Y. M., J. C. Milne, L. L. Madison, R. Kolter y C. T. Walsh. 1996.** From peptide precursor to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics. Microcin B17 synthase. Science. **274**: 1188 - 1193.
- Lindeberg, M. L., y W. A. Cramer. 2001.** Identification of Specific Residues in Colicin E1 Involved in Immunity Protein Recognition. J. Bacteriol. **183**: 2132-2136.
- Lindquist, S. 1997. **Mad cows meet psi-chotic yeast: the expansion of the prion hypothesis.** Cell. 89: 495–498.
- Lo, R. Y., C. A. Strathdee y P. E. Shewen. 1987.** Infect. Immun. **55**, 1987-1990
- Madison L., E. I. Vivas Y. M. Li, C. T. Walsh y R. Kolter. 1997.** The leader peptide is essential for the post-translational modification of the DNA-gyrase inhibitor microcin B17. Mol. Microbiol. **23**: 161-168
- Manoil C. y J. Beckwith. 1986.** A genetic approach to analyzing membrane protein topology. Science. **233**: 1403-1408.

- Manoil C. y J. Beckwith. 1985.** *TnphoA*: A transposon probe for protein export signals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**: 8129-8133.
- Mayr-Harting, A., A. Hedges y C. Berkeley. 1972.** Meth. Microbiol. **7A**, 315-422
- Miller, J. H. 1972.** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Moeck G. S. y J. W. Coulton. 1998.** TonB-dependent iron acquisition: mechanism of siderophore-mediated active transport. Mol Microbiol. **28**: 675-681.
- Moeck G. S. y L. Letellier. 2001.** Characterization of in vitro interactions between truncated TonB protein from *Escherichia coli* and the outer membrane receptors FhuA and FepA. J. Bacteriol. **183**: 2755-2764.
- Moeck G. S., J. W. Coulton y K. Postle. 1997.** Cell envelope signaling in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **272**: 28391-29398.
- Orellana, C. y R. Lagos. 1996.** The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcin antagonist. FEMS Microbiol. Lett. **136**: 297-303.
- Pilsl, H., D. Smajs y V. Braun. 1998.** Strong function-related homology between the pore-forming colicins K and 5. J. Bacteriol. **180**: 4111 - 4115.
- Postle, K. 1990.** TonB and Gram-negative dilemma. Mol. Microbiol. **4**: 2019-2025.
- Provencher S.W. 1982a.** CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. Comput. Phys. Commun. **27**, 229-242 .
- Provencher S.W.1982b.** A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. Comput. Phys. Commun. **27**: 213-227.



- Prusiner, S. B. 1998.** Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**: 13363–13383.
- Pugsley, A. y P. Reeves. 1976.** Iron uptake in colicin B-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **127**: 218 - 228
- Pugsley, A., F. Moreno y V. de Lorenzo. 1986.** Microcin-E492-insensitive mutants of *E. coli* K12. J. Gen. Microbiol. **132**: 3253 - 3259.
- Riley, A. M. 1993.** Molecular mechanism of colicin evolution. Mol. Biol. Evol. **10**: 1380-1395.
- Riley, M., A., y J. E. Wertz. 2002.** Bacteriocins: Evolutions, Ecology and applications. Annu. Rev. Microbiol. **56**: 117-137.
- Roof, S. K., J. D. Allard, K. P. Bertrand y K. Postle. 1991.** Analysis of *Escherichia coli* TonB membrane topology by use of PhoA fusions. J. Bacteriol. **173**:5554–5557.
- Saborio, G., B. Permanne y C. Soto. 2001.** Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature **411**: 810-813.
- Sambrook, J., E. Fritch y T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning. A laboratory manual . 2nd edn. Cold Spring Harbor, N. Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press..
- Schögger, H., y G. von Jagow. 1987.** Anal. Biochem. **166**: 368 - 379.
- Sinha R., P. J. Belhsaw y C. T. Walsh. 1998.** Mutational analysis of posttranslational heterocycle biosynthesis in the gyrase inhibitor microcin B17: distance dependence from propeptide aand tolerance for substitution in a GSCG cyclizable sequence. Biochemistry **37**: 4125 - 4136.

- Song, H. y W. Cramer. 1991.** Membrane topography of ColE1 gene product: the hydrophobic anchor of the colicin E1 channel is a helical hairpin. *J. Bacteriol.* **173**: 2935 - 2943.
- Song, H. Y., Cohen, F. S. y Cramer, W. A. 1991.** Membrane topography of ColE1 Membrane topography of ColE1 gene products: The hydrophobic anchor of the colicin E1 channel is a helical hairpin. *J. Bacteriol.* **173**: 2927-2934.
- Soto, C. 2001.** Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Letters.* **498**: 204-207.
- Sparrer, H., E., A. Santoso, F. C. Szoka Jr. y J. S. Weissman. 2000.** Evidence for the Prion Hypothesis: Induction of the Yeast [*PSI*1] Factor by in Vitro-Converted Sup35 Protein. *Science.* **289**: 595-599.
- Tabor, S. y C. C. Richardson. 1985.** A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **82**: 1074-1078.
- Traub, I., S. Gaisser y V. Braun. 1993.** Activity domains of the TonB protein. *Mol. Microbiol.* **8**: 409-423.
- Tuckman M., y M. S. Osburne. 1992.** In vivo inhibition of TonB-dependent processes by a TonB box consensus pentapeptide. *J. Bacteriol.* **174**: 320 - 323.
- Tusnady, G. E. e I. Simon. 1998. **Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins : application to topology prediction.** *J.Mol. Biol.* **283**: 489-506.
- Uptain, S. M. L. y S. Lindquist. 2002.** Prions as protein-based genetic elements. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 703-741.

- White S. H. y W. C. Wimley. 1999.** Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**:319–65
- Wickner R. B. 1994. [ **URE3**] as an altered **URE2** protein: Evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264: **566–569**.
- Wiener, M., D. Freymann, P. Ghosh y R. M. Stroud. 1997.** Crystal structure of colicin Ia. *Nature* **385**: 461-464.
- Wilkens, M. 1996.** Caracterización bioquímica y genética de la microcina E492 producida por *Klebsiella pneumoniae*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Wilkens, M., J. E. Villanueva, J. Cofré, J. Chnaiderman y R. Lagos. 1997.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4789 - 4794.