

UCH-FC
MAG-Microb.
5643et
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *mceD*, *mceF* y *orfK*
SOBRE CEPAS PRODUCTORAS DE MICROCINA E492

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología

Por

Beatriz María González Muñoz

24 de agosto, 2011

Santiago-Chile

Director de Tesis: Dra. Rosalba Lagos Mónico
Co-director de Tesis: Dr Octavio Monasterio Opazo

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

BEATRIZ MARÍA GONZÁLEZ MUÑOZ

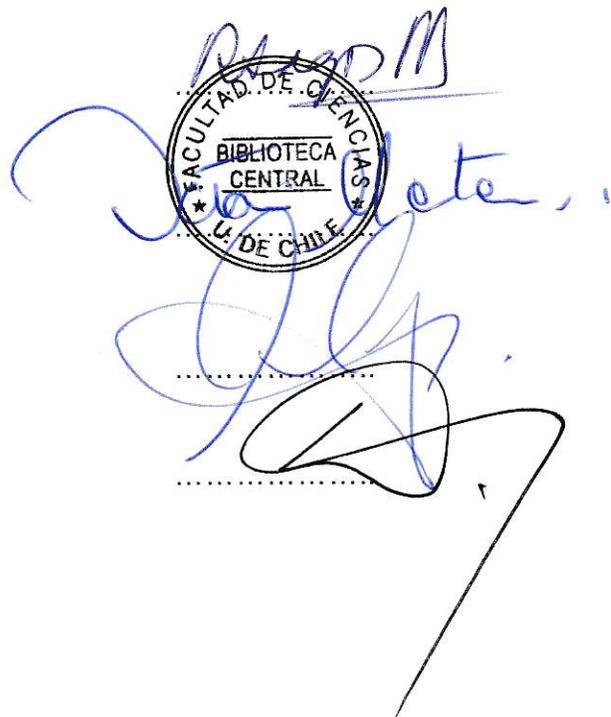
Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 17 de agosto de 2011.

Director de Tesis:
Dra. Rosalba Lagos M.

Co-director de Tesis:
Dr. Octavio Monasterio O.

Comisión de Evaluación de la Tesis:
Dr. Víctor Cifuentes

Dr. Nicolás Guiliani





Para mis papás, mis hermanos y la Canelita.



AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir agradeciendo a mi familia. A mis papás que me han apoyado desde que nací, que han aceptado mis loqueos y que nunca me pusieron 'peros' en mi camino en lo que se refiere a mi carrera escogida. Sé que nunca habían escuchado de su existencia hasta que les dije que iba a estudiar esto, así que de verdad gracias por haber apostado por mi vocación en lugar de obligarme a estudiar algo más tradicional. Sé que aún es complejo explicarle a la gente qué hago, así que gracias por aceptarme, apoyarme, auspicarme y quererme. Espero que estén orgullosos.

También debo agradecerles a mis hermanos la paciencia y el cariño. Sé que escucharme hablar es cansador (ustedes me lo han dicho), así que de verdad aprecio que se tomen el tiempo para escucharme de verdad, por tomar mi lado en varias discusiones, por haberme apoyado 'behind the scenes' varias veces y por seguir siendo honestos conmigo aún cuando no me guste escucharlos. Gracias a mis abuelos, a mi tío Osvaldo, a mis primas y a mi nana, Rosa Donoso, por todo el apoyo, preocupación y cariño.

Debo agradecer también a la Dra. Rosalba Lagos. No sólo le agradezco el ser mi tutora de esta tesis, sino que por haberme aceptado en su laboratorio hace tantos años ya. Sé que fue arriesgado y no todos lo hubieran hecho, y por eso siempre le estaré agradecida. Nunca sentí un trato especial, pero siempre sentí su guía, su apoyo y sobre todo una preocupación no sólo por mi trabajo en el lab, sino que por mi formación como científica.

Gracias al Dr. Octavio Monasterio por las opiniones que me entregó cada lunes en las reuniones al presentar mis resultados, y por hacerme ver todo no sólo como una microbióloga. Gracias a Jorge y Mario por haberme aceptado como Isaura, por contestar mis miles de 'dudas de la vida' y por haber tenido la paciencia de enseñarme desde cómo prender un mechero hasta como escribir una tesis. Gracias a la Gaby y a Sergio por haber sido mis ancestros llenos de conocimientos milenarios, sugerencias y discusiones de resultados. Gracias a la Roselyn por todo, no sólo por ser la mejor técnico de laboratorio EVER, sino que por todas las conversaciones, por todas las risas, por todos los ataques de orden, por todos los buenos momentos y por todo el apoyo. Gracias a Maca por estar siempre ahí cuando la necesité arreglando mis problemas, al igual que a Don Pedro. Gracias a la Chica por ser mi amiga desde el primer día como biotec y mi compañera diaria hasta este momento. Gracias al Gonzalo por ser mi compañero de puesto, por todas las risas y por las Coca lights de ½ compradas. Gracias a la Coté por el apoyo, por las conversaciones por msn aún cuando estamos a 2 metros y por el jugo, que es necesario en cada momento de la vida. Gracias a Marisol y a Cherie por el apoyo no solo en el lab, sino que en decisiones importantes de vida. Gracias a todos los microcinos y tubulinos no sólo por contestar mis dudas pavas, por enseñarme a usar máquinas o protocolos, sino que por haber hecho durante todos estos años el levantarme e ir al laboratorio.

Gracias a mis amigos, tanto científicos como 'civiles,' por tener siempre una palabra de apoyo cuando algo no me resultó, por el interés, por el cariño, por la preocupación y sobre todo por aguantarme cuando el loqueo comienza a alcanzar niveles preocupantes.

INDICE DE CONTENIDOS

AUTOBIOGRAFÍA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Bacteriocinas	1
1.2. La microcina E492.....	2
1.2.1. Propiedades de la microcina E492.....	2
1.2.2. Determinantes genéticos del sistema productor de la microcina E492.....	3
1.2.3. Mecanismo de acción de la microcina E492.....	7
1.2.4. El gen <i>mceD</i>	9
1.2.5. El gen <i>mceF</i>	10
1.2.6. El gen <i>orfK</i>	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Materiales	16

2.1.1. Reactivos.....	16
2.1.2. Cepas bacterianas	17
2.1.3. Plásmidos y vectores	17
2.1.4. Partidores	20
2.2. Métodos	20
2.2.1. Medios de Cultivo	20
2.2.2. Técnicas moleculares	22
2.2.3. Generación de las construcciones plasmidiales	22
2.2.5. Cuantificación de microcina E492	24
2.2.6. Detección y cuantificación de la actividad bactericida de la MccE492.....	24
2.2.6.1. Detección de la actividad bactericida	24
2.2.6.2. Cuantificación de la actividad bactericida mediante el método de la dilución crítica	25
2.2.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE)	25
2.2.8. Western Blot.....	26
2.2.8.1. Electrotransferencia y exposición a anticuerpos.....	26
2.2.8.2. Quimioluminiscencia	26
2.2.9. Curvas de crecimiento	27
2.2.10. Ensayos de inducción.....	28
2.2.10.1. Inducción y preparación de las muestras.....	28
2.2.10.2. Separación de las muestras en geles SDS PAGE	28
2.2.11. Ensayos de sobrevivencia sobre placas.....	28
RESULTADOS.....	30
3.1 Construcción del plásmido pMccE492.....	30
3.2 Caracterización de la cepa BW25113 pMccE492	33

3.2.1. Determinación de la actividad bactericida de BW25113 pMccE492	33
3.2.2. Purificación de microcina a partir de <i>E. coli</i> BW25113 pMccE492 y determinación del título de la actividad antibacteriana	35
3.2.3. Comparación de las curvas de crecimiento de los distintos sistemas productores de mceE492.....	35
3.3. Clonamiento de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> en el plásmido pBAD33.....	39
3.4. Caracterización de las cepas <i>E.coli</i> BW25113 transformadas con los vectores pBAD33-mceD, pBAD33-mceF y pBAD33-orfK	41
3.4.1. Determinación de la actividad bactericida de <i>E.coli</i> BW25113 con pBAD33- mceD, pBAD33-mceF y pBAD33-orfK en presencia de los distintos sistemas productores de mceE492.....	41
3.4.2. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> en la sobrevida de la cepa <i>E. coli</i> BW25113.....	43
3.4.3. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> sobre las curvas de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> BW25113.....	50
3.4.4. Efecto de la expresión residual de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> en curvas de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> BW25113 con distintos sistemas productores de mceE492.....	54
3.4.5. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> en curvas de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> BW25113 con distintos sistemas productores de mceE492.....	56
3.4.6. Análisis mediante PAGE de extractos bacterianos después de la sobre- expresión de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i>	62
3.5. Estudio de la sensibilidad a la mceE492 en distintas fases de crecimiento bacteriano de cepas de <i>E. coli</i> en presencia del plásmido pJI.....	65

DISCUSION	68
CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	78

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	18
Tabla 2. Plásmidos y vectores utilizados en este trabajo.	18
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo para las reacciones de PCR y secuenciación.	21
Tabla 4. Efecto de la sobre-expresión de <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> en cepas que contienen a los distintos sistemas productores sobre la producción de <i>mccE492</i>	44
Tabla 5. Sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que sobre-expresan <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i>	46
Tabla 6. Sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que contienen al sistema productor de <i>mccE492</i> pJEM15 y que sobre-expresan los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i>	47
Tabla 7. Sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que contienen al sistema productor de <i>mccE492</i> pJAM229 y que sobre-expresan los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i>	48
Tabla 8. Sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que contienen al sistema productor de <i>mccE492</i> pJAM434 y que sobre-expresan los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i>	49
Tabla 9. Sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que contienen al sistema productor de <i>mccE492</i> pMccE492 y que sobre-expresan los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i>	51
Tabla 10. Resumen de los ensayos de sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que contienen los distintos sistemas productores en presencia de las distintas construcciones.	52
Tabla 11. Sensibilidad a la <i>mccE492</i> exógena de cepas transformadas con pJI y pBAD33- <i>orfK</i>	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los determinantes genéticos del sistema productor de la microcina E492.	4
Figura 2. Mecanismos de producción, modificación, exportación y acción de la <i>mccE492</i>	8
Figura 3. Esquema de los determinantes genéticos de los distintos sistemas productores de microcina E492 existentes en el laboratorio.	13
Figura 4. Construcción del plásmido <i>pMccE492</i>	31
Figura 5. Patrones de digestión de los productos necesarios para reconstruir el cluster completo de la microcina E492.	32
Figura 6. Ensayo sobre un césped sensible a la <i>mccE492</i> para detectar la actividad bactericida de la <i>mccE492</i>	34
Figura 7: Western Blot de <i>mccE492</i> eluída con diferentes concentraciones de acetonitrilo purificada a partir del sistema <i>pMccE492</i>	36
Figura 8: Curvas de crecimiento de cepas productoras de <i>mccE492</i>	38
Figura 9. Patrones de digestión de los productos de PCR y del plásmido necesario para el clonamiento de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i>	40
Figura 10. Comparación de la actividad bactericida de cepas que contienen al sistema productor <i>pJEM15</i> y <i>pBAD33-mceD</i> , <i>pBAD33-mceF</i> o <i>pBAD33-orfK</i>	42
Figura 11. Curvas de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> BW25113 que lleva <i>pBAD33-mceD</i> , <i>pBAD33-mceF</i> , <i>pBAD33-orfK</i> y <i>pBAD33</i> en medio LB y en medio M9.	53
Figura 12. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> sobre las curvas de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> BW25113.	55
Figura 13. Efecto de la expresión residual de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> en los sistemas productores de <i>mccE492</i> <i>pJAM229</i> y <i>pJAM434</i>	57
Figura 14. Efecto de la expresión residual de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> sobre una cepa con el sistema productor <i>pMccE492</i>	58
Figura 15. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> en un huésped con el sistema <i>pJAM229</i>	60
Figura 16. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>mceD</i> , <i>mceF</i> y <i>orfK</i> en un huésped con el sistema <i>pMccE492</i>	61

Figura 17. SDS-PAGE y posterior tinción con Azul de Coomasie de las distintas construcciones sobre-expresadas.....	64
Figura 18: Comparación de la topología de MceF, MceF trunca y una prenil proteasa característica.....	70

ABREVIATURAS

ABC	ATP Binding Cassette
APS	Persulfato de amonio
Da	Dalton
DO₆₀₀	Densidad Optica medida a 600 nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GFP	Proteína Fluorescente Verde (siglas en inglés)
kb	Kilobases
Mcc	Microcina
nm	Nanometros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TEMED	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina

RESUMEN

La microcina E492 es una bacteriocina producida y secretada de forma natural por *Klebsiella pneumoniae* RYC492, que actúa sobre cepas de la familia *Enterobacteriaceae* a través de la formación de canales iónicos en la membrana interna, lo que lleva a la despolarización de la membrana citoplasmática de la célula blanco. Para su producción, procesamiento, exportación e inmunidad se necesita de un grupo de determinantes genéticos que se agrupan en un segmento de 13 kb del cromosoma de *K. pneumoniae*. Dentro de este grupo de genes se encuentran tres marcos de lectura abierto cuya función aún no ha sido determinada: *mceD*, que es homólogo a una salmoquelina esterasa y participaría en alguna etapa de la modificación post traduccional de la microcina E492; el gen *mceF*, que tiene identidad con proteínas de la familia de las prenil proteasas; y *orfK*, que codifica para una proteína que tiene identidad con el gen estructural de la microcina M y con su proteína de inmunidad.

Para poder dilucidar la función de estos genes se decidió clonarlos en el plásmido pBAD33, bajo el promotor pBAD inducible por arabinosa. De esta forma se pudo estudiar el efecto de la sobre-expresión de estos genes, para atribuir posibles funciones en la producción de microcina E492 activa. Debido a que no se disponía de un plásmido que tuviera todos los determinantes genéticos para la producción de microcina E492 tal como éste se encuentra en el cluster de genes en *K. pneumoniae*, fue necesario construir un nuevo plasmidio. Esta construcción se denominó pMccE492, y la microcina purificada a partir de él mostró tener una mayor actividad que la obtenida a partir de los demás sistemas.

La sobre-expresión de MceD no tuvo un efecto sobre el crecimiento de la cepa huésped en presencia o en ausencia de los distintos sistemas productores, sin importar el medio de cultivo en el que se realizara el ensayo.

La sobre-expresión de MceF produjo un efecto negativo en la sobrevivencia de la cepa huésped, en los distintos medios de cultivo utilizados y en presencia de los sistemas productores pJEM15, pJAM229 y pJAM434. Este efecto no se observó al utilizar el plásmido pMccE492 como productor de microcina. Se comparó la topología de la proteína MceF completa que se encuentra en el plásmido pMccE492, y la de la proteína MceF trunca que está presente en los sistemas pJEM15, pJAM229 y pJAM434. Se encontró que ambas son proteínas de membrana, pero la orientación de sus hélices transmembrana cambia. Este cambio afectaría la ubicación de los aminoácidos esenciales para la actividad proteasa putativa de la proteína, lo que sugiere que la MceF trunca tendría afectada esta actividad. Esta proteína podría tener dos posibles funciones: como proteasa que estimula una mejor exportación de la microcina; o indirectamente afectando algún factor que estimula la producción de la microcina activa.

La sobre-expresión de la proteína OrfK afecta severamente la sobrevivencia de la cepa huésped, en presencia o en ausencia de todos los sistemas productores de microcina. Paradójicamente se observó un efecto protector dado por la expresión residual de esta proteína en un huésped con el plásmido pJAM434. Esta expresión residual además le confiere inmunidad en la fase estacionaria de crecimiento a una cepa con el plásmido pJI. Sin embargo, células que expresan solo OrfK no son inmunes a la microcina, lo que sugiere que esta proteína estimula o aumenta la actividad de la inmunidad presente en la cepa pJI.

ABSTRACT

Microcin E492 is a bacteriocin produced and secreted naturally by *Klebsiella pneumoniae* RYC492, that acts in strains of the family *Enterobacteriaceae* through the formation of ion channels in the inner membrane, which leads to the depolarization of the cytoplasmic membrane of the target cell. For its production, processing, export and immunity microcin E492 needs a group of genetic determinants that are in a 13 kb segment of the chromosome of *K. pneumoniae*. Within this group we can find three open reading frames without an assigned function: *mceD*, which is homologous to a salmochelin esterase and it would participate in the post translational modification of microcin; *mceF*, which has an identity to proteins of the prenil protease family; and *orfK*, which encodes for a protein that has identity with the structural gene of microcin M and its immunity protein.

To elucidate the function of these genes we decided to clone them in the plasmid pBAD33 under the arabinose inducible promoter pBAD.. In this way we were able to study the effect of the overexpression of these genes to confer them possible roles in the production of active microcin. Because we didn't have a plasmid with the complete genetic determinants for the production of microcin E492 in its cluster as it can be found in *K. pneumoniae*, it was necessary to make a new plasmid. This new system was called pMccE492, and the microcin purified from this construction was more active than the microcin purified from the other systems.

The overexpression of MceD didn't have an effect in the growth of the host, with or without any producer system, in any medium used in these experiments.

The overexpression of MceF affected negatively the survival of the host cell, in every medium used and in presence of pJEM15, pJAM229 and pJAM434, producer systems of mceE492. This effect wasn't observed in presence of the new vector pMccE492. We also compared the topology of the complete version of MceF that we can find in pMccE492 and the truncated form of the protein present in pJEM15, pJAM229 and pJAM434. We found that both are membrane proteins, but the orientation of its transmembrana helixes is different. This change also affects the location of the essential amino acids for the putative protease activity of this protein, which suggest that this activity is affected on the incomplete MceF. This protein could have two possible functions: as a protease that stimulates the export of microcin; or indirectly as a factor that stimulates the expression of active microcin.

The overexpression of the OrfK protein severely affects the survival of the host cell, with or without any of the producer systems. However, the residual expression of this gene in presence of pJAM434 translated in some kind of protective effect. This residual expression was able to deliver protection to microcin E492 in presence of pJI during estacionary phase of growth. However, cells that only express OrfK aren't immune to the microcin, which suggests that this protein stimulates or increases the activity of the immunity present in the pJI strain.

INTRODUCCIÓN

1.1. Bacteriocinas

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

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas se clasifican de acuerdo a su masa molecular, y se pueden separar en dos grupos: las colicinas y las microcinas (Baquero y Moreno, 1984). Las colicinas poseen una masa mayor a 10 kDa, son producidas por cepas de *Escherichia coli*, los genes necesarios para su producción se encuentran en plásmidos y su expresión está regulada por el sistema SOS (Riley y Wetz, 2002). Las microcinas, por otra parte, son antibióticos producidos por miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Baquero y Moreno, 1984), con una masa molecular menor a 10 kDa, resistentes a condiciones extremas de pH o temperatura y a algunas proteasas, solubles en metanol, y no son inducibles por el sistema SOS (Kolter y Moreno, 1992). Las microcinas son exportadas al medio extracelular, a diferencia de las colicinas que son liberadas mediante la lisis de la célula productora (Braun y cols., 2002). Los genes implicados en la expresión de las microcinas se organizan en operones, que están constituidos al menos por tres tipos de genes: el gen estructural

de la microcina, el gen de la inmunidad a la microcina, y el gen o genes responsables de la salida de la microcina al medio extracelular (Kolter y Moreno, 1992). Las microcinas se sintetizan como precursores y la mayoría es modificada post traduccionalmente, por lo que además existen los llamados genes de la maduración (Kolter y Moreno, 1992).

1.2. La microcina E492

1.2.1. Propiedades de la microcina E492

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

La microcina E492 es producida en su forma activa solamente durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano (Orellana y Lagos, 1996; Corsini y cols., 2002), a diferencia de otras microcinas que son producidas durante la fase estacionaria principalmente (Kolter y Moreno, 1992). La forma no modificada de la mccE492 posee una masa molecular de 7886 Da, un pI de 3,8 (Lagos y cols., 1999), es resistente al tratamiento con tripsina, al pH ácido y a temperaturas sobre los 90°C (de Lorenzo, 1984). Además, la mccE492 tiene la capacidad de inducir la apoptosis en líneas celulares humanas (Hetz y cols., 2002), y de formar fibras tipo amiloide tanto *in vivo* como *in vitro* (Bieler y cols., 2006; Marin, 2006).

1.2.2. Determinantes genéticos del sistema productor de la microcina E492

Los determinantes genéticos necesarios para la producción, el procesamiento, la exportación y la inmunidad de la mceE492 se encuentran en un segmento de 13 kilobases (kb) del cromosoma de *K. pneumoniae*. Este segmento se clonó y expresó en *E. coli*, obteniéndose microcina con propiedades idénticas a la producida por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 (Wilkens y cols., 1997). Al analizar este segmento a través de un mapa de restricción, mutagénesis al azar usando el transposón Tn5, análisis bioinformático y secuenciación, fue posible identificar al menos 15 marcos de lectura abiertos denominados *mceA,B,C,D,E,J,I,H,G,F* y *orfK,L,S2,S3,X* (Lagos y cols., 2009). Los genes *mce* se ordenan en seis unidades transcripcionales (Figura 1) (Lagos y cols., 2001). Algunos de estos genes entre ellos *mceF* y *orfK* no son esenciales para la producción de mceE492 activa, sin embargo se decidió mantenerlos en el cluster de este sistema porque los sistemas de la microcina H47 y M poseen un homólogo de *mceF*, también de función desconocida, y porque *orfK* es parte de la unidad transcripcional que contiene los exportadores de la mceE492.

La primera unidad corresponde a los genes *mceA* y *mceB*. El gen *mceA* corresponde al gen estructural de la mceE492, y codifica para una pre-proteína que es procesada al momento de su exportación en el amino terminal, produciéndose una proteína de 84 aminoácidos (Lagos y cols., 2001). Existen dos aminoácidos que potencialmente podrían funcionar como inicio de la traducción en la pre-proteína: las metioninas en posición 1 y 5. Experimentos realizados en este laboratorio indican que cuando se reemplaza la metionina 5 por otro aminoácido no se observa producción de microcina, lo que sugiere fuertemente que esta metionina corresponde al inicio de la

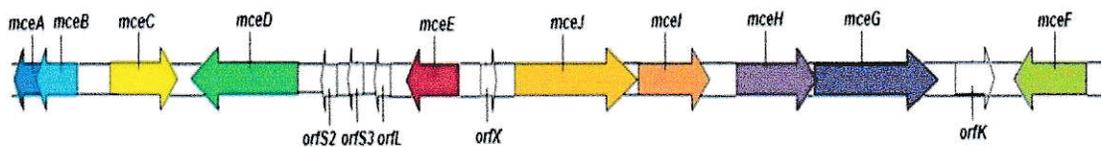


Figura 1. Esquema de los determinantes genéticos del sistema productor de la microcina E492.

Las flechas representan la orientación de los distintos marcos abiertos de lectura que se encuentran en el fragmento de 13 kb que contiene al sistema productor de la microcina E492. En color morado se presentan los genes involucrados en la exportación, mientras que en amarillo y naranja se muestran los relacionados con la maduración. En azul está el gen estructural y el gen de la inmunidad. En verde y rojo están los genes cuya función definitiva no ha sido aún asignada, y en blanco se muestran los marcos abiertos de lectura mencionados en el texto.

traducción (Leiva, 2008). El gen *mceB*, por su parte, codifica para una proteína integral de membrana (MceB) que confiere inmunidad ante la *mccE492* (Lagos y cols., 1999).

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

El gen *mceD* codifica para una proteína de 414 aminoácidos que es homóloga a una salmoquelina esterasa (Lagos y cols., 2009), mientras que el gen *mceE* codifica para una proteína de 114 aminoácidos sin función asignada, pero que presenta identidad con MchS4, una proteína del sistema de MccH47, que promueve la producción de enteroquelina (Lagos y cols., 2009).

Los genes *mceG* y *mceH* constituyen una unidad transcripcional y se encuentran involucrados en la exportación de la *mccE492*. El gen *mceG* codifica para una proteína de 698 aminoácidos que tiene alta identidad con los transportadores ABC del sistema exportador del tipo I. El gen *mceH* codifica para una proteína de 413 aminoácidos que correspondería a la proteína accesoria del sistema de exportación (Lagos y cols., 2001). El gen *orfK* se localizaría al final de esta unidad transcripcional.

El gen *mceF* es el último gen del sistema productor de la microcina y codifica para una proteína que posee un 75% de identidad con la proteína McM de los sistemas de las microcinas H47 y M (Lagos y cols., 2009). No se ha determinado aún experimentalmente una función para esta familia de proteínas debido a que no existe un fenotipo claro asociado a la falta de esta proteína. Sin embargo, se ha encontrado similitud de esta proteína con la familia de las prenil proteasas (Lagos y cols., 2009). Por otro lado, los experimentos de nuestro laboratorio han sido realizados con una versión trunca de MceF, por lo tanto el efecto observado (aumento de la actividad bactericida en una mutante por delección) debe ser confirmado.

En este sistema existen también otros marcos abiertos de lectura. *OrfK* codifica para una proteína de 136 aminoácidos que tiene similitud tanto con a McM, el gen estructural de McM, como con Mcml, su proteína de inmunidad. Se transcribe, pero no entrega inmunidad frente a McM ni tiene actividad antibacteriana (Lagos y cols., 2009). *OrfL* codifica para un péptido de 89 aminoácidos que tiene un motivo doble glicina en su amino terminal, lo cual es compatible con precursores que son clivados y exportados a través de exportadores ABC, y su extremo carboxilo terminal es rico en serinas y termina con el motivo glicina-serina, lo cual indica que este péptido potencialmente podría sufrir una modificación post traduccional por una molécula de salmoquelina. El C-terminal de OrfL presenta una alta identidad con los C-terminal de las microcinas E492, Mccl47, MccH47 y MccM (Lagos y cols., 2009). El alto grado de identidad de OrfL y OrfK con bacteriocinas del tipo mceE492 los hacen buenos candidatos a estudiar como posibles reguladores de la expresión de mceE492. *OrfS2* y *orfS3* codificarían para proteínas truncadas con una significativa identidad con MchS2 y MchS3, que son equivalentes a la Mccl47 y su inmunidad, respectivamente (Lagos y cols., 2009).

1.2.3. Mecanismo de acción de la microcina E492.

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

Una vez dentro del periplasma de la célula sensible, la *mccE492* necesita de la proteína TonB para ejercer su acción bactericida en la membrana interna (Pugsley y cols., 1986; Lagos y cols., 2001). TonB es una proteína de 239 aminoácidos cuya función es transducir la energía de la membrana interna a la membrana externa de la célula, y que participa en el transporte activo de diversos sideróforos, metales y otros nutrientes (Postle y Kadner, 2003). Esta transducción de energía involucraría el acoplamiento de TonB al gradiente de protones en la membrana interna de la célula, y al posterior cambio conformacional que se produciría en la proteína TonB y que haría posible la interacción de esta proteína con los receptores presentes en la membrana externa (Postle y Held, 2002).

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

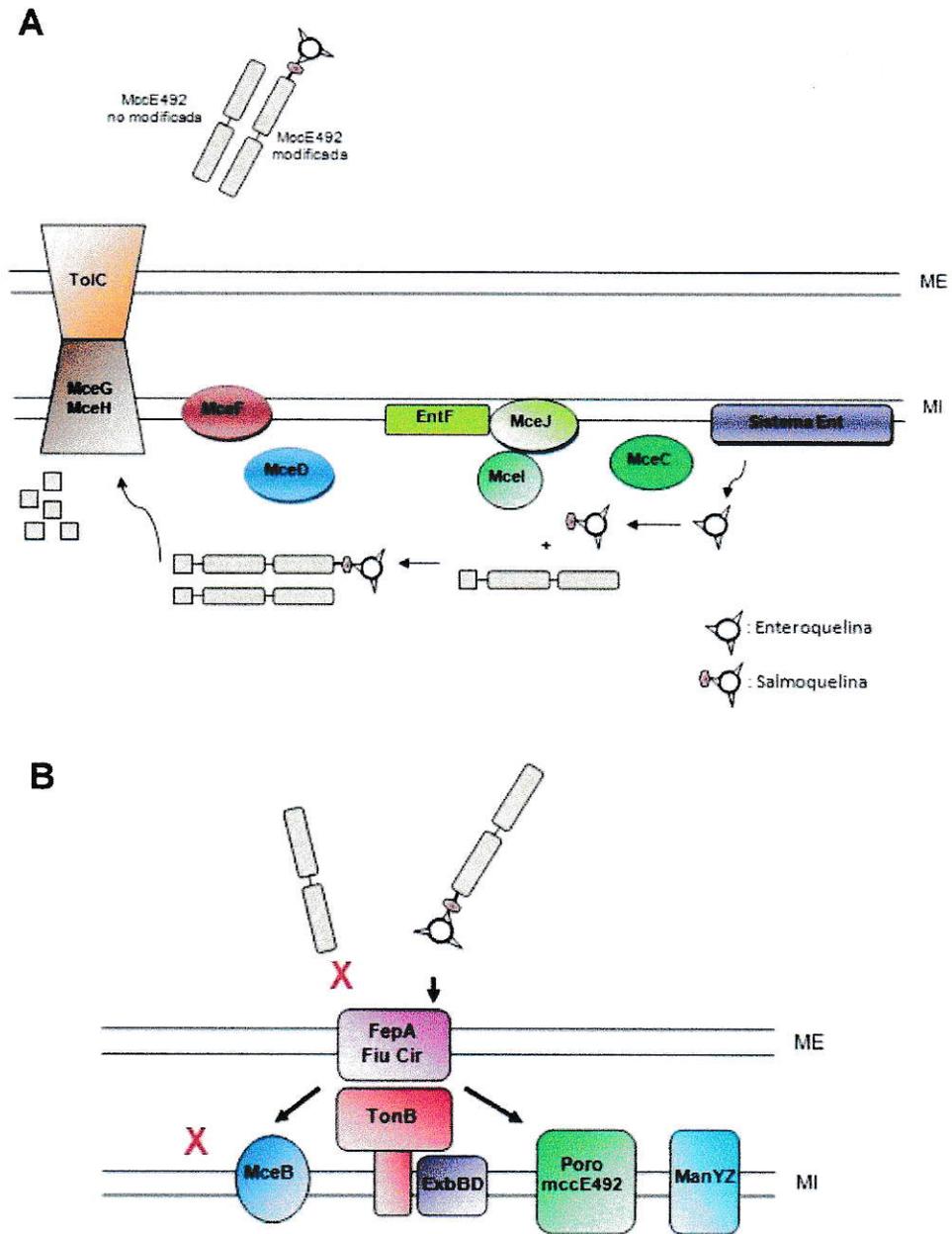


Figura 2. Mecanismos de producción, modificación, exportación y acción de la mceE492.

A) Modificado de Lagos y cols. (2009). Se muestra secuencialmente como la mceE492 es modificada post traduccionalmente con una molécula de salmoquelina, pierde su péptido líder y es exportada fuera de la célula productora. **B)** La mceE492 exportada en su forma modificada es reconocida por receptores de membrana externa presentes en la célula blanco, ingresa en el periplasma y forma el poro en la membrana interna de ésta. Si está presente la proteína MceB no puede formar el poro. MI: Membrana Interna; ME: Membrana Externa.

complejo. Lo cierto es que ExbB y ExbD son necesarias para que ocurra el transporte y contribuyen en la estabilidad de TonB (Ahmer y cols., 1995).

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

Cuando la *mccE492* se inserta en la membrana citoplasmática de la célula sensible, forma canales iónicos que llevan a la despolarización de la célula, a la pérdida de potencial de membrana y a una reducción drástica de los niveles de ATP (de Lorenzo y Pygsley, 1985; Lagos y cols., 1993; Baeza, 2003; Destomieux-Garzón y cols., 2003).

1.2.4. El gen *mceD*

Como se dijo antes, el gen *mceD* codifica para una proteína de 414 aminoácidos que es homóloga a una salmoquelina esterasa de *Salmonella enterica* (Lagos y cols., 2001). Esta proteína hidrolizaría la salmoquelina apo y férrica, participando de esta forma en alguna etapa de la modificación post traduccional de la *mccE492* (Lagos y cols., 2009), pero se desconoce su efecto sobre la actividad antibacteriana.

En nuestro laboratorio se realizaron una serie de experimentos utilizando la cepa *E. coli* VCS257 p527, que tiene al gen *mceD* interrumpido por el transposón Tn5 (Strahsburger, 2004). Al sembrar colonias de esta cepa sobre un césped sensible a la *mccE492* se observó la presencia de halos de inhibición de crecimiento. Sin embargo, tanto el sobrenadante obtenido a partir cultivo líquido de esta cepa como la microcina

purificada no presentan actividad bactericida. Además, la producción de microcina en ausencia de *mceD* pareciera ser nociva para la célula, ya que los cultivos celulares presentan un aspecto característico de lisis celular. Esto sugiere que MceD sería necesaria para favorecer la exportación de la mceE492, y que su ausencia podría traducirse en algún tipo de inestabilidad de membrana que llevaría a la lisis celular.

Programas de predicción de topología de proteínas como SOSUI (Mitaku e Hirokawa, 1999) indican que MceD es una proteína citoplasmática, con una hidrofobicidad promedio de -0,155. Por otra parte, al utilizar el programa PSIPRED (Jones, 1999; Bryson y cols., 2005) para predecir la estructura secundaria de la proteína se obtuvo que la proteína presenta hélices y hebras a lo largo de toda su secuencia. Las hélices son cortas, lo cual apoyaría la predicción de que esta proteína no tiene dominios transmembrana.

1.2.5. El gen *mceF*

Este gen codifica para MceF, una proteína de 230 aminoácidos que posee un 75% de identidad con la proteína McM de los sistemas de microcinas H47 y M (Lagos y cols., 2009). Como no existe un fenotipo asociado a la ausencia de esta proteína no ha sido posible determinar experimentalmente su función. Los experimentos realizados en nuestro laboratorio se hicieron con una versión trunca de MceF y por lo tanto los efectos observados deben confirmarse.

Al hacer un análisis de toda la secuencia de *mceF* no se encontró identidad significativa con otros genes. Sin embargo, al buscar dominios conservados en la secuencia de MceF se vio que presenta el dominio conservado Abi entre los aminoácidos 125 y 215. Esta superfamilia Abi está formada por proteínas que son

probablemente proteasas, específicamente CAAX prenil proteasas del tipo II. También se encontró identidad con proteasas al someter a la secuencia de la proteína a un PSI-BLAST (Position Specific Iterative BLAST) y a una búsqueda de proteínas ortólogas utilizando el programa COGNITOR (Tatusov y cols., 2000). Esta última búsqueda entregó como resultado que MceF pertenece a un grupo de proteínas cuya función predicha sería una proteasa de membrana. Programas de predicción de topología de proteínas indican que MceF es una proteína de membrana con 6 dominios transmembrana, con sus extremos amino y carboxilo hacia el periplasma de la célula.

1.2.6. El gen *orfK*

El gen *orfK* codifica para una proteína de 136 aminoácidos cuyos últimos 59 aminoácidos son similares a McmA, proteína estructural de McmM, y sus primeros 75 aminoácidos tienen similitud con McmI, su proteína de inmunidad. Esta proteína se sintetiza, pero no entrega inmunidad frente a McmA ni tiene actividad antibacteriana (Lagos y cols., 2009).

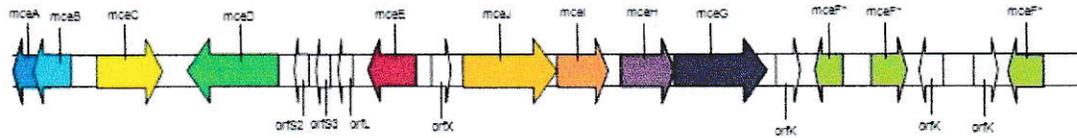
Los estudios de secuencia aminoacídica a través de programas de predicción de topología de proteínas sugieren que OrfK sería una proteína integral de membrana que tiene 3 hélices transmembrana, con su extremo amino terminal hacia el periplasma y el carboxilo hacia el citoplasma de la célula.

La sobre-expresión de genes puede utilizarse para dilucidar su función, ya que en ocasiones es posible relacionar la mayor cantidad de proteína a un fenotipo en la bacteria, y de esta forma encontrar su función. Un ejemplo reciente es el estudio del gen *ramA* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 (Bailey y cols., 2010). Esta estrategia fue utilizada en esta tesis para ver si los productos de los genes *mceD*,

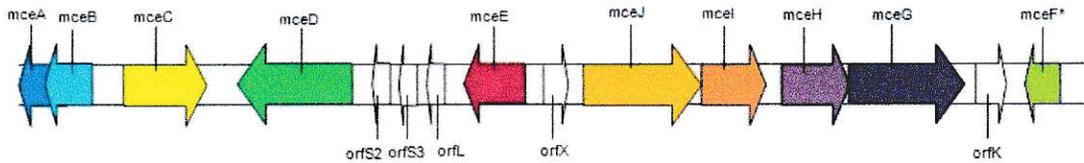
mceF y *orfK* están relacionados con la producción o regulación de la actividad de la microcina.

El estudio de la sobre-expresión se llevó a cabo sobre distintas cepas que producen *mccE492*. En nuestro laboratorio se trabaja con tres versiones del sistema productor de *mccE492*, que no corresponden al “cluster” tal como se encuentra en el genoma de *Klebsiella*. El sistema pJAM229 es un derivado de pJ que contiene todos los genes para la producción de *mccE492* activa, pero el gen *mceF* se encuentra incompleto. El sistema pJEM15 deriva de pJAM229, tiene triplicado el fragmento *Sall* que contiene los 5 últimos aminoácidos de *mceG* y a los genes *mceF* y *orfK*, y es muy buen productor de microcina; mientras que pJAM434 tiene un segmento invertido que deja a los genes *mceJIGH orfK* bajo el control de un promotor que es más débil que su promotor natural. Este sistema es un pobre productor de *mccE492* (Figura 3).

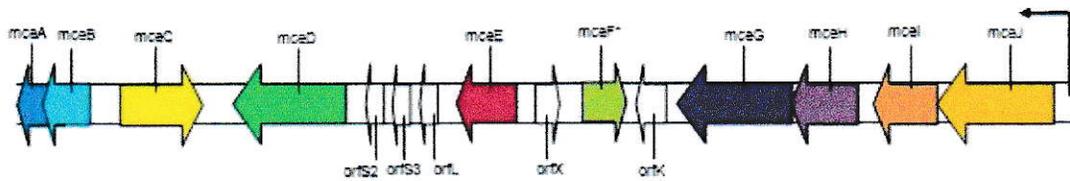
Se requiere por lo tanto de un sistema que tenga todos los determinantes genéticos para la producción de *mccE492* tal como este se encuentra en *Klebsiella pneumoniae*. El plásmido parental pJ los posee, pero trabajar con este plásmido presenta muchos problemas: los cultivos líquidos no crecen en una dilución mayor a 1:10, y las densidades ópticas que alcanza son bajas al compararlas con los demás sistemas productores; y por otro lado el inserto clonado es de aproximadamente 40 Kb, lo que dificulta su manipulación genética.



pJEM15



pJAM229



pJAM434

Figura 3. Esquema de los determinantes genéticos de los distintos sistemas productores de microcina E492 existentes en el laboratorio.

Las flechas representan la orientación de los distintos marcos abiertos de lectura tal como se encuentran en los distintos sistemas productores de microcina E492. El asterisco que se observa en el gen *mceF* indica que se trata de la versión incompleta del gen.

HIPÓTESIS

A partir de estos antecedentes bibliográficos se puede postular que los productos de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* podrían afectar la producción de microcina E492 activa. Por lo tanto, el clonamiento de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* en el plásmido pBAD33, que es un vector que permite la sobre-expresión de estos genes entregará información que permitirá inferir si estas proteínas interactúan con el sistema de la producción de *mccE492* activa, y de esta manera obtener información acerca de su función en la producción de microcina.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar experimentalmente el efecto de la sobre-expresión de los genes *mceF*, *mceD* y *orfK* sobre cepas productoras de microcina E492.

Objetivos Específicos.

1. Construcción de un plásmido con todos los determinantes genéticos del sistema de la microcina E492 que contenga el gen *mceF* completo, para efectuar las comparaciones en un sistema equivalente al que se encuentra en *Klebsiella*.
2. Clonamiento de *mceD*, *mceF* y *orfK* en el plásmido pBAD33.
3. Determinar el efecto de la sobre-expresión de *mceD*, *mceF* y *orfK* sobre el crecimiento y viabilidad de cepas productoras de mceE492.
4. Determinar el efecto de la sobre-expresión de *mceD*, *mceF* y *orfK* sobre la producción de mceE492 activa.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La ampicilina se compró en US Biological, Swampscott, MA, USA.

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

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

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

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

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

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

2.1.2. Cepas bacterianas

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

2.1.3. Plásmidos y vectores

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

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

Cepa	Genotipo	Fuente
BW25113	<i>rrmB</i> DE <i>lacZ</i> 4787 <i>HsdR</i> 514 DE(<i>araBAD</i>)567 DE(<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph</i> -1	Colección Keio
BL21 (DE3)	F- <i>ompT</i> <i>rB</i> <i>mB</i>	Novagen
VCS257	DP50, <i>sup</i> F[<i>supE</i> 44, <i>supF</i> 58, <i>hsd53</i> (<i>rB</i> <i>mB</i>), <i>dapD</i> 8, <i>lacY</i> 1, <i>glnV</i> 44, D(<i>gal-uvrB</i>)47, <i>tyrT</i> 58, <i>gyrA</i> 29, <i>TonA</i> 53D(<i>thyA</i> 57)]	Stratagene

Tabla 2. Plásmidos y vectores utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Características relevantes	Fuente o referencia
pBAD33	Plásmido derivado de pACYC184 que permite modular la expresión transcripcional de genes. <i>Cm^r</i> .	Guzmán y cols., 1995
pJEM15	Derivado de pJAM229, posee la triplicación de un fragmento interno <i>SalI</i> de 2,5 Kb (doble copia de <i>mceF</i>). Es un sobre-productor de <i>MccE492</i> activa. <i>Amp^r</i> .	Wilkins y cols., 1997
pJAM229	Derivado de pJ digerido con <i>XhoI</i> . Contiene los genes para la producción de <i>MccE492</i> activa. <i>Amp^r</i> .	Wilkins y cols., 1997
pJAM434	Derivado de pJ, posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido con respecto a pJAM229. Es un pobre productor de la <i>MccE492</i> activa. <i>Amp^r</i>	Wilkins y cols., 1997
pJ	Plásmido que tiene los genes para la producción de microcina activa. Construido en el cosmidio pHCT9 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> . <i>Amp^r</i>	Wilkins y cols., 1997
pJRS1	Derivado de pJAM229. Contiene una delección del gen <i>mceF</i> y de algunos aminoácidos de <i>mceG</i> . <i>Amp^r</i>	Wilkins y cols., 1997

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pBAD33-mceD	Derivado de pBAD33. Lleva entre los sitios de restricción <i>Sall</i> e <i>HindIII</i> un fragmento de 1450 pb que corresponde al gen <i>mceD</i> . Cm ^r .	Este trabajo
pBAD33-mceF	Derivado de pBAD33. Lleva entre los sitios de restricción <i>Sall</i> e <i>HindIII</i> un fragmento de 998 pb que corresponde al gen <i>mceF</i> . Cm ^r .	Este trabajo
pBAD33-orfK	Derivado de pBAD33. Lleva entre los sitios de restricción <i>Sall</i> e <i>HindIII</i> un fragmento de 679 pb que corresponde al gen <i>orfK</i> . Cm ^r .	Este trabajo
pMccE492	Derivado de pJRS1. Lleva en el sitio <i>Sall</i> un fragmento de 1640 pb que corresponde a los 5 últimos aminoácidos de <i>mceG</i> , y a los genes <i>orfK</i> y <i>mceF</i> . Contiene todos los genes del cluster de la microcina y produce microcina activa. Amp ^r .	Este trabajo
pJI	Derivado de pJAM229. Contiene una deleción con <i>BstVI</i> de 6,8 kb. Contiene los genes <i>mceABCDE</i> . Amp ^r .	Wilkens y cols., 1997

2.1.4. Partidores

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

2.2. Métodos

2.2.1. Medios de Cultivo

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

Medio Mínimo M9: Na₂HPO₄ 6 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH₄Cl 1 g/L.

Medio M9 suplementado: El medio M9 se suplementó con CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄·7H₂O 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1 g/ml, casaminoácidos 1 mg/ml y glucosa 0,2% p/v.

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

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

Placas de césped: Sobre placas de agar se esparcieron 4 mL de agar blando fundido en el que se incluyó 100 µL de un cultivo bacteriano crecido hasta fase estacionaria.

Las cepas bacterianas que portan plásmidos recombinantes y/o transposones con resistencia a antibióticos se crecieron en medio líquido o en placas suplementadas con los antibióticos correspondientes, que se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 50 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL, estreptomina 10 µg/mL y el ácido nalidíxico a 10 µg/mL. Éstos fueron preparados según lo descrito por Sambrook y cols. (1989).

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

Partidor	Secuencia 5'→3'
mceG_sal	ATGAGGCTACCAGTTCACCTCG
mceF_salR	CGTCTTGAAGG TCGAC GAATTCAGGACAATTTCAGAAGG
mceF_salF	CCCGGGCACTA <u>AAGCTT</u> TTCAGTTGCCGGGAGCAGG
mceD_salF	CATATTCAGAG TCGAC ACCAGCGGTATGTAAACGGG
mce_hindR	TAACTTCTCTA <u>AAGCTT</u> GAAGGACATTACTGAGTGGG
orfk_hindR	TGCTCCCCCA <u>AAGCTT</u> CCACAGAAAACCTTGAAGATCC
pBAD33 F	CGGCAGAAAAGTCCACATTGA
pBAD33 R	AAAATCTTCTCTCATCCGCCA
pJ1	GCCAGGGCCAGTTATATTCATGAT
pJ2	GCCGATCTAACGAACATATACCT

Subrayados se encuentran los sitios de restricción para *Hind*III, y en negrita para *Sal*I

2.2.2. Técnicas moleculares

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

2.2.3. Generación de las construcciones plasmidiales

En el caso de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK*, se utilizó el plásmido pBAD33 para hacer a las construcciones compatibles con los plásmidos que contienen a los sistemas productores de mceE492, y para poder controlar la expresión de los genes al agregar arabinosa o glucosa al medio de cultivo. El gen *mceD* fue clonado utilizando como templado el plásmido pJ y los partidores *mceD_sal F* y *mceD_hindR*. El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII*, y se ligó en estos mismos sitios presentes en el plásmido pBAD33, dando como resultado la construcción pBAD33-*mceD*. De igual manera se clonaron los genes *mceF* (partidores *mceF_salF* y *mceF_salR*) y *orfK* (partidores *mceG_sal* y *orfk_hindR*) en el plásmido pBAD33, obteniéndose de esta forma las construcciones pBAD33-*mceF* y pBAD33-*orfK*, respectivamente.

En el caso de la construcción para reconstituir el sistema completo de la microcina E492 en el plásmido pJRS1, se utilizó como templado el plásmido pJ y los partidores *mceG_sal* y *mceF_salR*. El producto de PCR se digirió con la enzima de

restricción *SaI* y se clonó en el sitio *SaI* del plásmido pJRS1, dando como resultado el plásmido pMccE492.

Todas las construcciones mencionadas fueron completamente secuenciadas. Las construcciones en el plásmido pBAD33 se secuenciaron con los partidores pBAD33 F y pBAD33 R, mientras que pMccE492 se secuenció con pJ1 y pJ2.

2.2.4. Purificación de microcina E492

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

2.2.5. Cuantificación de microcina E492

La concentración de la mceE492 utilizada en este trabajo se determinó utilizando el kit Micro BSA Protein Assay Reagent (Pierce) siguiendo las indicaciones del fabricante y usando como estándar la BSA del mismo kit. Se construyó una curva de calibración con la proteína BSA en el rango de concentración de 0 a 10 µg/mL. Las muestras de microcina se concentraron para evaporar el acetonitrilo, y posteriormente se hicieron varias diluciones de la muestra concentrada (2, 4, 10, 20 y 100 veces). Se adicionaron 500 µL del reactivo de Bradford a 500 µL de muestra para obtener un volumen final de 1 mL. Se midió la absorbancia de la mezcla a 596 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A. A partir de la ecuación de la curva de calibración se interpoló el valor de la concentración de las muestras de microcina.

2.2.6. Detección y cuantificación de la actividad bactericida de la MccE492

2.2.6.1. Detección de la actividad bactericida

La detección de la actividad bactericida se realizó sembrando las colonias provenientes de los clones que se deseaban analizar sobre una placa de agar LB con un césped sensible de *E. coli* BL21 (DE3) crecido en medio LB hasta fase exponencial con los antibióticos correspondientes. Luego de incubar las placas a 37° C durante 14-16 h, la actividad bactericida se visualizó por la aparición de halos de inhibición de crecimiento sobre el césped sensible.

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

Para cuantificar la actividad bactericida de la microcina se realizaron diluciones seriadas de las muestras en base 2 en agua nanopura estéril. Se tomaron alícuotas de 5 μ L de cada una de las diluciones y se depositaron sobre placas de agar LB con un césped sensible de *E. coli* BL21 (DE3), que se formó con 4 mL de agar blando fundido y 200 μ L de un cultivo en medio LB crecido hasta fase exponencial con los antibióticos correspondientes. Las placas se incubaron a 37° C durante 14-16 h, y el título de la muestra se expresó como el recíproco de la potencia en base 2 de la última dilución que presentó un halo de inhibición del crecimiento sobre el césped indicador.

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

Los geles se prepararon con tres fases: separadora, espaciadora y concentradora. El gel separador consistió en 16,5% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1% y glicerol al 10%. El gel espaciador se preparó con 10% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1%. El gel concentrador contenía 3% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5; SDS 0,1%. A cada una de estas soluciones se les agregó 0,033% de APS y 2,2 mM de TEMED. La solución de corrida para el cátodo fue Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1% y para el ánodo Tris-HCl 0,2 M pH 8,9.

2.2.8. Western Blot

2.2.8.1. Electrotransferencia y exposición a anticuerpos

Las proteínas del gel del SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 90 minutos a 100 V, 500 mA y -20°C utilizando amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20%). La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, Tween 0,1%) durante 1 hora con agitación. Luego se incubó con el anticuerpo primario policlonal de conejo contra el fragmento C-terminal de la microcina [SGSGYNSATSSSGSGS] en una dilución 1:1000 durante 1 hora, seguido por 3 lavados con amortiguador TBS. A continuación se incubó por 1 hora con el anticuerpo secundario anticonejo preparado en cabra y conjugado a peroxidasa (dilución 1:2.000). La membrana se reveló mediante quimioluminiscencia. Como marcador de peso molecular se utilizó una muestra de microcina purificada a partir del sistema productor pJEM15.

2.2.8.2. Quimioluminiscencia

La membrana se reveló en 10 mL de Tris-HCl 100 mM pH 8,5, con 50 µL de luminol 250 mM (preparado en DMSO) y 22 µL de ácido p-cumárico 90 mM (preparado en DMSO). La reacción de quimioluminiscencia se inició agregando 5 µL de peróxido de hidrógeno al 30%. La membrana se expuso con los films autoradiográficos entre 20 segundos y 1 minuto, dependiendo de intensidad de la señal obtenida.

2.2.9. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento fueron construidas de dos formas. El primer caso corresponde a cultivos crecidos a 37°C y 200 rpm en 50 mL de LB o medio M9 suplementado, con una dilución inicial de 1:100 y 1:20 a partir de un cultivo "over night", respectivamente. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 1 mL de cultivo para medir su DO_{600} en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A.

Las curvas de crecimiento también fueron construidas utilizando placas de cultivo, en donde se crecieron cultivos a 37°C y 900 rpm en un agitador de placas Heidolph Titramax 101 (Merck). En este caso, 1 mL de un cultivo de noche fue centrifugado y resuspendido en glicerol 100% hasta quedar 50%. Esta preparación se usó para inocular con una dilución 1:100, en los tiempos indicados, los 300 μ L de LB que fueron utilizados en cada pocillo de la placa de cultivo. La lectura de las placas se llevó a cabo al final del experimento, transfiriendo 100 μ L del cultivo a placas de ELISA Pure Grade (Brand) y midiendo la DO_{600} en el lector de ELISA Epoch (Biotek).

En este trabajo todos los gráficos muestran la misma escala de densidad óptica medida a 600 nm, y que pertenece a la medida con el lector de ELISA. Para poder hacer esto, se hicieron curvas de crecimiento de tres cepas distintas por triplicado en placas de cultivo y en matraces al mismo tiempo. Con estos datos se buscó la relación entre los distintos grupos de datos obtenidos, y se llegó a la relación entre las mediciones en el espectrofotómetro y en el lector de ELISA: las medidas en el espectrofotómetro son $7,39 \pm 1,48$ veces más altas que las medidas en el lector de ELISA. Se utilizó este número para transformar todos los datos a la misma escala, para de esta forma poder compararlos.

2.2.10. Ensayos de inducción.

2.2.10.1. Inducción y preparación de las muestras

Se crecieron por duplicado cultivos de las cepas a estudiar en 30 mL de LB con los antibióticos correspondientes a 200 rpm y 37°C hasta que alcanzaron una DO_{600} de 0,6-0,7. En este momento se agregó arabinosa hasta quedar 0,2% final a uno de los cultivos duplicados, y los cultivos se dejaron crecer en las mismas condiciones por 4 horas. Transcurrido este tiempo, se midió la DO_{600} de nuevo y esta información se utilizó para tomar muestras de los cultivos celulares de forma normalizada de acuerdo a los valores medidos. Estas muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a máxima velocidad a 4°C. El precipitado obtenido fue resuspendido en 100 μ L de amortiguador de carga 1X. La mezcla fue incubada a 95°C por 7 minutos.

2.2.10.2. Separación de las muestras en geles SDS PAGE

Para la separación de las proteínas se utilizaron geles SDS-PAGE con dos fases: separadora y concentradora. El gel separador consistió en 12,5% de acrilamida, Tris HCl 1M pH 8,8, SDS 0,4% y glicerol al 1,25%. El gel concentrador contenía acrilamida al 5,07%, Tris HCl 1M pH 6,8, SDS 0,4%. La solución de corrida fue Tris 0,25 M, glicina 1,918 M y SDS 1%. Como marcador de peso molecular se utilizó PageRuler Plus Prestained Protein Ladder de Fermentas. Las proteínas fueron visualizadas a través de tinción de plata y tinción con azul de coomasie.

2.2.11. Ensayos de sobrevivencia sobre placas

En este ensayo se utilizaron cuatro tipos de placas: LB arabinosa 0,2%, LB glucosa 0,1%, M9 arabinosa 0,2% y M9 glucosa 0,1%. Se crecieron cultivos de las

cepas a estudiar en medio LB con los antibióticos correspondientes a 37°C hasta que alcanzaron una DO_{600} de 0,4-0,5. Con estos cultivos se hicieron diluciones en base 10 y se depositaron alícuotas de 5 μ L de cada dilución por triplicado en distintos tipos de placas. Estas placas se incubaron a 37°C por toda la noche, y luego se contaron colonias para obtener las unidades formadoras de colonia correspondientes a cada caso.

RESULTADOS

3.1 Construcción del plásmido pMccE492.

Para reconstituir el sistema completo de la microcina E492 se utilizó como base el plásmido pJRS1, al cual se le adicionó el fragmento de DNA faltante (Figura 4A). Este fragmento fue obtenido por amplificación con PCR, usando como templado el plásmido pJ, y utilizando los partidores *mceG_sal* y *mceF_salR* (Figura 4B). Luego de optimizar la reacción se obtuvo un producto de PCR de 1640 pb, que corresponde a los 5 últimos aminoácidos de *mceG* y a los genes *mceF* y *orfK*. Este producto de PCR se digirió con la enzima de restricción *SalI*, obteniéndose un fragmento de DNA del tamaño esperado (Figura 5A). El plásmido pJRS1 también se digirió con la enzima de restricción *SalI*, cuyo único sitio de restricción corresponde a la zona del gen *mceG* que se encuentra truncado en esta construcción. Como se esperaba, esta digestión linealizó al plásmido, lo cual fue observado en un gel de agarosa 1% (Figura 5B).

Se realizó una reacción de ligación entre el plásmido pJRS1 digerido con *SalI* y el producto de PCR digerido con la misma enzima. Esta ligación se diseñó para dar como resultado al “cluster” completo de la microcina E492. El producto de ligación se concentró antes de ser utilizado para transformar la cepa de *E. coli* BW25113. Las transformantes fueron incubadas en placas de agar LB suplementadas con ampicilina, para seleccionar a las que habían incorporado el plásmido. En la sección 3.2 se describe cómo se seleccionó un clon que posteriormente fue enviado a secuenciar para comprobar que se había logrado la construcción correcta.

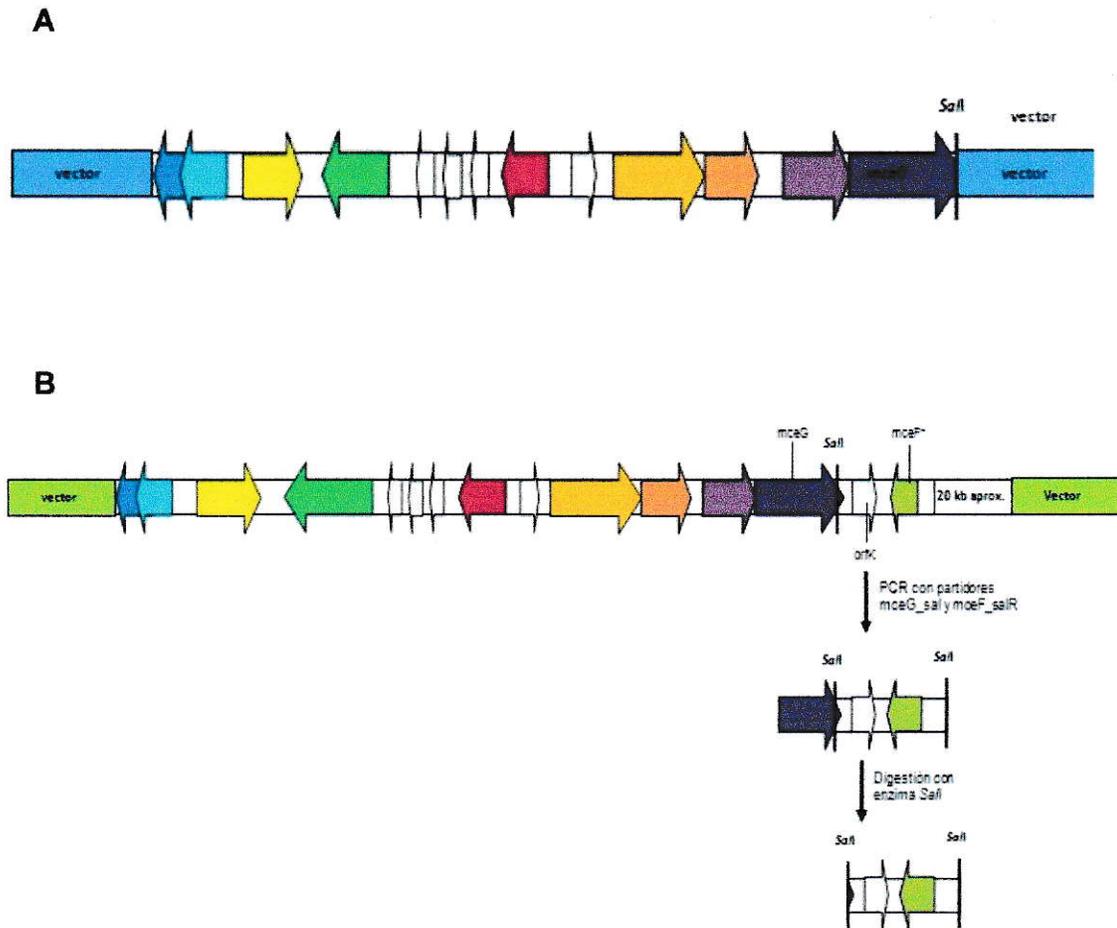


Figura 4. Construcción del plásmido pMccE492

Para la reconstrucción del sistema completo de la microcina E492 se utilizó pJRS1 como base, al cual se le adicionó el fragmento de DNA faltante, el cual fue obtenido por amplificación por PCR a partir de pJ. **A)** Plásmido pJRS1. **B)** Plásmido pJ, a partir del cual se obtuvo el fragmento de 1640 pb que corresponde a parte del gen *mceG*, a *orfK* y *mceF* completos. Este producto PCR fue digerido con la enzima de restricción *SalI*, al igual que el plásmido pJRS1, lo que permitió realizar una reacción de ligación entre el plásmido digerido y el producto de PCR digerido con la misma enzima.

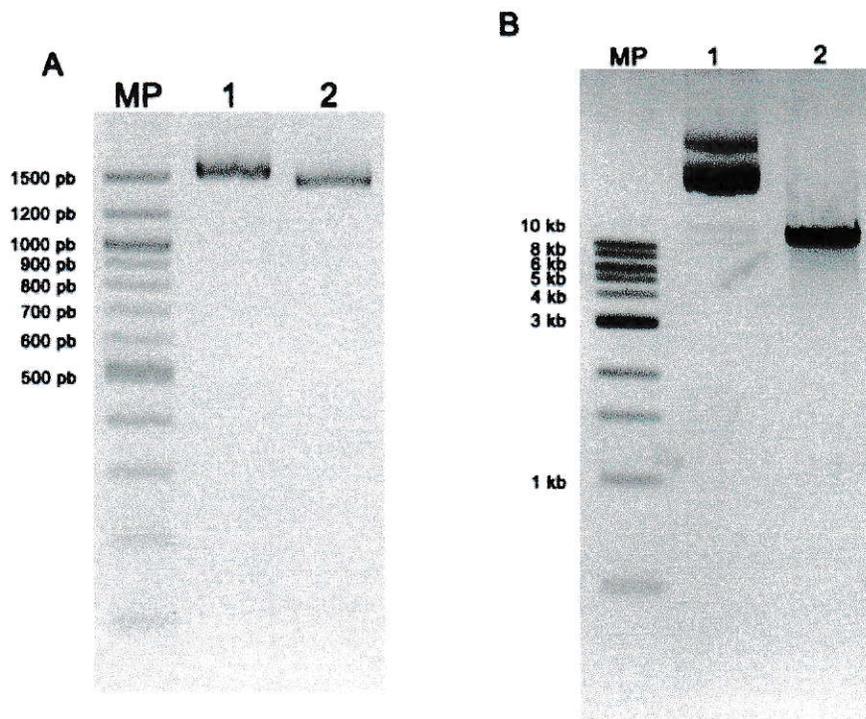


Figura 5. Patrones de digestión de los productos necesarios para reconstruir el cluster completo de la microcina E492.

A) Patrón de digestión obtenido al tratar el producto de PCR amplificado con los primarios *mceG_sal* y *mceF_salR* con la enzima de restricción *SalI*, y posterior electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. Carril 1: MceGKF sin digerir. Carril 2: MceGKF digerido con *SalI*. Marcador de peso molecular escalera de 100 pb. **B)** Patrón de digestión obtenido al digerir el plásmido pJRS1 con la enzima de restricción *SalI*, resuelto con un gel de agarosa al 1%. Carril 1: Plásmido pJRS1 sin digerir. Carril 2: Plásmido pJRS1 digerido con la enzima de restricción *SalI*. Marcador de peso molecular escalera de 1 kb.

3.2 Caracterización de la cepa BW25113 pMccE492

3.2.1. Determinación de la actividad bactericida de BW25113 pMccE492

Los transformantes obtenidos en 3.1 fueron sembrados en placas de agar LB suplementado con ampicilina para seleccionar de esta forma a los que habían incorporado el plásmido. Sin embargo, podía darse el caso de que las células hubieran incorporado sólo pJRS1, puesto que presenta resistencia a ampicilina, por lo que se debió realizar otro ensayo para comprobar que se había incorporado además el fragmento amplificado por PCR.

Como ya se mencionó, el sistema con pJRS1 no produce microcina activa, pues aunque se produce el precursor éste no se puede procesar y exportar al medio extracelular debido a que tiene el gen *mceG* trunco en el extremo carboxilo terminal. MceG corresponde al transportador de tipo ABC que utiliza la microcina para llegar al medio extracelular. La construcción deseada, denominada pMccE492, tiene el sistema de la microcina completo, por lo que las células transformadas con este plásmido son capaces de producir y exportar *mccE492* (Figura 6). Por lo tanto, para seleccionar clones que produzcan *mccE492*, los transformantes obtenidos fueron sembrados sobre un césped de BL21 (DE3) sensible a la acción de la *mccE492*, y se observó que de 200 clones analizados, sólo 3 clones fueron capaces de producir un halo de inhibición de crecimiento. Estos fueron los clones considerados para la secuenciación.

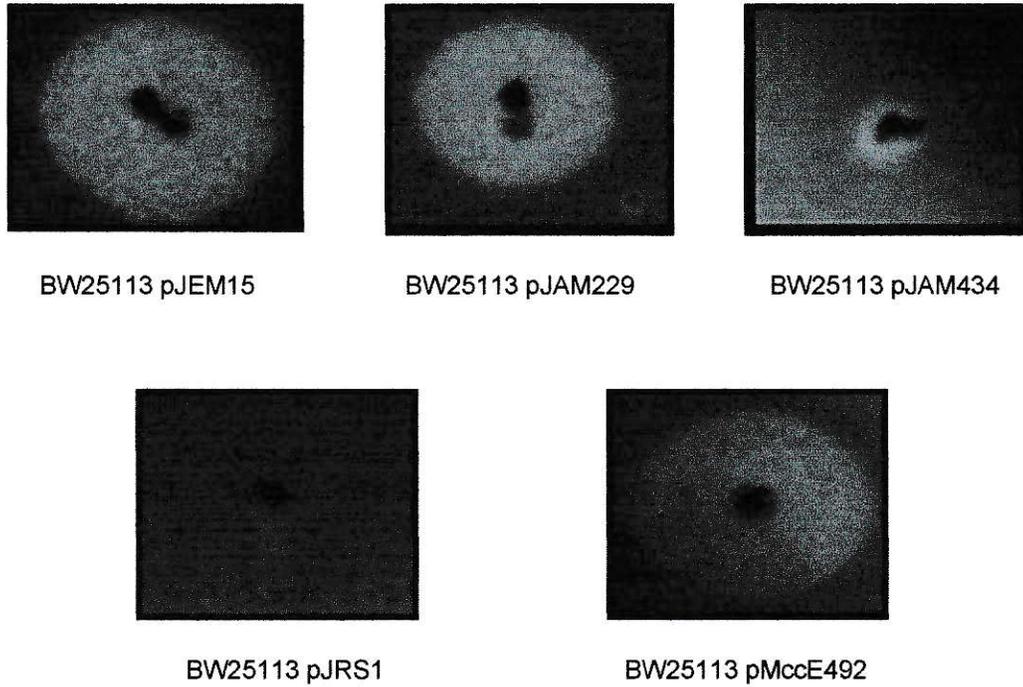


Figura 6. Ensayo sobre un césped sensible a la *mccE492* para detectar la actividad bactericida de la *mccE492*.

Colonias de las cepas indicadas fueron sembradas sobre un césped de la cepa sensible a la *mccE492* BL21 (DE3). Se utilizaron como controles células transformadas con los sistemas productores de *mccE492* ya existentes en el laboratorio: pJEM15, pJAM229 y pJAM434. Las colonias acá mostradas son representativas del total estudiado.

3.2.2. Purificación de microcina a partir de *E. coli* BW25113 pMccE492 y determinación del título de la actividad antibacteriana

Se purificó microcina a partir del sobrenadante de la cepa BW25113 pMccE492 utilizando el procedimiento descrito en Métodos. Las muestras obtenidas eluidas a diferentes concentraciones de acetonitrilo desde una matriz de C-18 fueron sometidas a electroforesis e inmunoblot (Figura 7). El procedimiento utilizado es el habitual para purificar mceE492 a partir de los distintos sistemas productores de mceE492.

Para determinar la actividad bactericida de la purificación se utilizó el ensayo de dilución crítica sobre la cepa sensible *E. coli* BL21 (DE3). Se observó actividad bactericida sobre este césped en todas las eluciones entre 40% y 100% de acetonitrilo. La elución con acetonitrilo al 50% fue la que tuvo mayor actividad, hasta una dilución de 512 veces. Se midió además la concentración de la microcina presente en las distintas eluciones obtenidas durante el proceso de purificación y los resultados obtenidos fueron coherentes con los títulos de actividad bactericida observados, es decir, las eluciones con mayor título de actividad bactericida también fueron las que presentaron las mayores concentraciones de mceE492.

3.2.3. Comparación de las curvas de crecimiento de los distintos sistemas productores de mceE492.

Para proseguir con la caracterización de este nuevo plásmido productor de mceE492 se realizaron curvas de crecimiento para esta cepa en medio LB. Éstas se compararon con las obtenidas para cepas transformadas con los demás sistemas productores de mceE492 (pJEM15, pJAM229, pJAM434) y con el plásmido pJRS1,

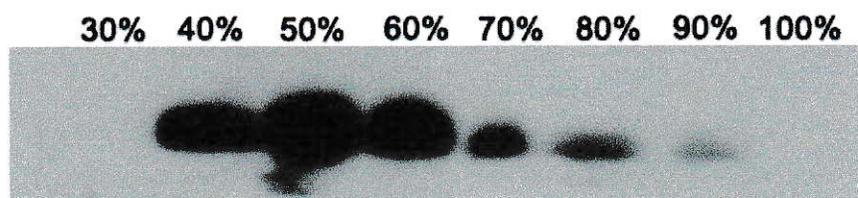


Figura 7: Western Blot de mceE492 eluida con diferentes concentraciones de acetonitrilo purificada a partir del sistema pMccE492

La purificación de la mceE492 se realizó utilizando la matriz hidrofóbica C-18, y posterior elución con distintas concentraciones de acetonitrilo. Se realizó una electroforesis de la mceE492 eluida, y las proteínas separadas por este SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. El revelado se hizo por electroquimioluminiscencia como se describe en Métodos. En la figura se indican las muestras analizadas a partir de eluciones con distintas concentraciones de acetonitrilo.

además de la curva de la cepa huésped BW25113 (Figura 8). Estas curvas de crecimiento se realizaron tal como se explicó en la sección de Métodos, midiendo la DO_{600} de los cultivos en el lector de ELISA Epoch.

Tal como se esperaba a partir de resultados previos, las curvas de crecimiento de las cepas con los sistemas productores pJEM15 y pJAM229 muestran un crecimiento similar al de la cepa huésped (sin ningún plásmido). Lo mismo ocurre con la cepa que fue transformada con el plásmido pMccE492. Sin embargo, este comportamiento no se observa en las cepas transformadas con los plásmidos pJAM434 y pJRS1. El sistema pJRS1 no tiene completo el gen que codifica para el transportador utilizado para la exportación de la microcina, lo que implica que la mceE492 se acumularía en el interior de la célula, y esto podría afectar su crecimiento. El comportamiento de la cepa que porta el plásmido pJAM434 podría tener una explicación similar, pues el cambio en la disposición del fragmento que contiene a los genes *mceJHKGK* se encuentran bajo el control de un promotor más débil que su promotor natural. Esto lleva a un cambio en la tasa de transcripción de estos genes, que incluyen a *mceGH* que son los de exportación, por lo que la producción de la microcina puede ser mayor que la exportación de esta misma, con una acumulación que le resultaría tóxica, y por lo tanto con una disminución de la velocidad de crecimiento. Sin embargo, al final de las curvas obtenidas para las cepas con pJRS1 y con pJAM434 se ve una recuperación en el crecimiento. Esto podría deberse a la selección de un mutante capaz de exportar microcina o de resistir a su acumulación en el interior de la célula, o a algún fenómeno de adaptación fisiológica a este stress.

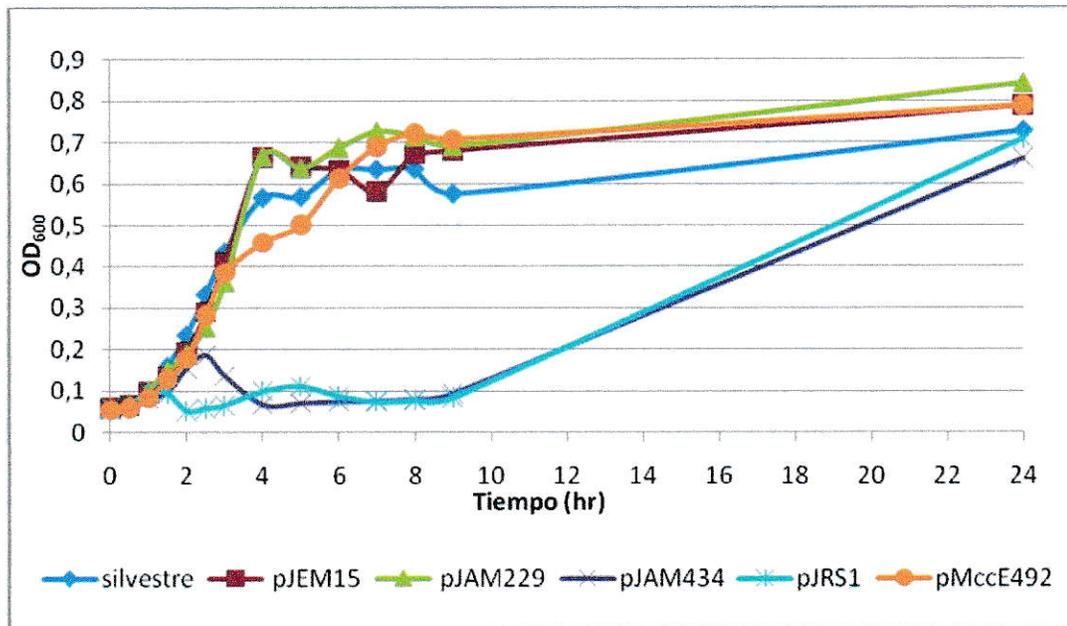


Figura 8: Curvas de crecimiento de cepas productoras de mceE492.

Los cultivos se realizaron en medio LB a partir de una dilución 1:100 de un cultivo de noche en todos los casos. Las curvas de crecimiento fueron realizadas por triplicado, y se graficaron los valores correspondientes al promedio de las tres mediciones obtenidas para cada caso. Las mediciones se realizaron utilizando un lector de ELISA Epoch (Biotek).

3.3. Clonamiento de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* en el plásmido pBAD33.

Para estudiar el efecto de la expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* sobre las cepas productoras de *mccE492*, estos genes fueron clonados en el plásmido pBAD33. Este plasmidio se escogió porque es compatible con los sistemas productores de *mccE492* existentes en el laboratorio, y porque es posible controlar la expresión génica a través del uso de arabinosa y glucosa. Este vector posee el promotor *ara*, que permite inducir la expresión del gen al crecer las células transformadas en presencia de arabinosa, y reprimirla completamente cuando hay glucosa en el medio de cultivo.

El gen *mceD* fue clonado utilizando al vector pJ como templado de PCR, y con los partidores *mceD_salF* y *mceD_hindR*. El producto de PCR obtenido luego de la optimización de la reacción fue de 1450 pb, que corresponde al gen completo. Para clonar los genes *mceF* y *orfK* también se usó pJ como templado, junto a las parejas de partidores *mceF_salF* y *mceF_salR* y *mceG_sal* y *orfk_hindR*, respectivamente. En estos casos se obtuvieron productos de PCR de 990 pb para *mceF* y de 679 pb para *orfK*. Todos estos productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII*, y los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa al 2,5% (Figuras 9A, 9B, 9C). El plásmido pBAD33 también fue digerido con las mismas enzimas de restricción y analizado en un gel de agarosa al 1% (Figura 9D).

Se realizó una reacción de ligación entre el plásmido pBAD33 digerido con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII*, y los distintos productos de PCR obtenidos previamente que estaban digeridos con las mismas enzimas. De esta forma se obtuvieron los vectores pBAD33-*mceD*, pBAD3-*mceF* y pBAD33-*orfK*.

El producto de ligación se concentró y se usó para transformar la cepa de *E. coli* BW25113. Estas transformantes se incubaron en placas de agar LB suplementado con

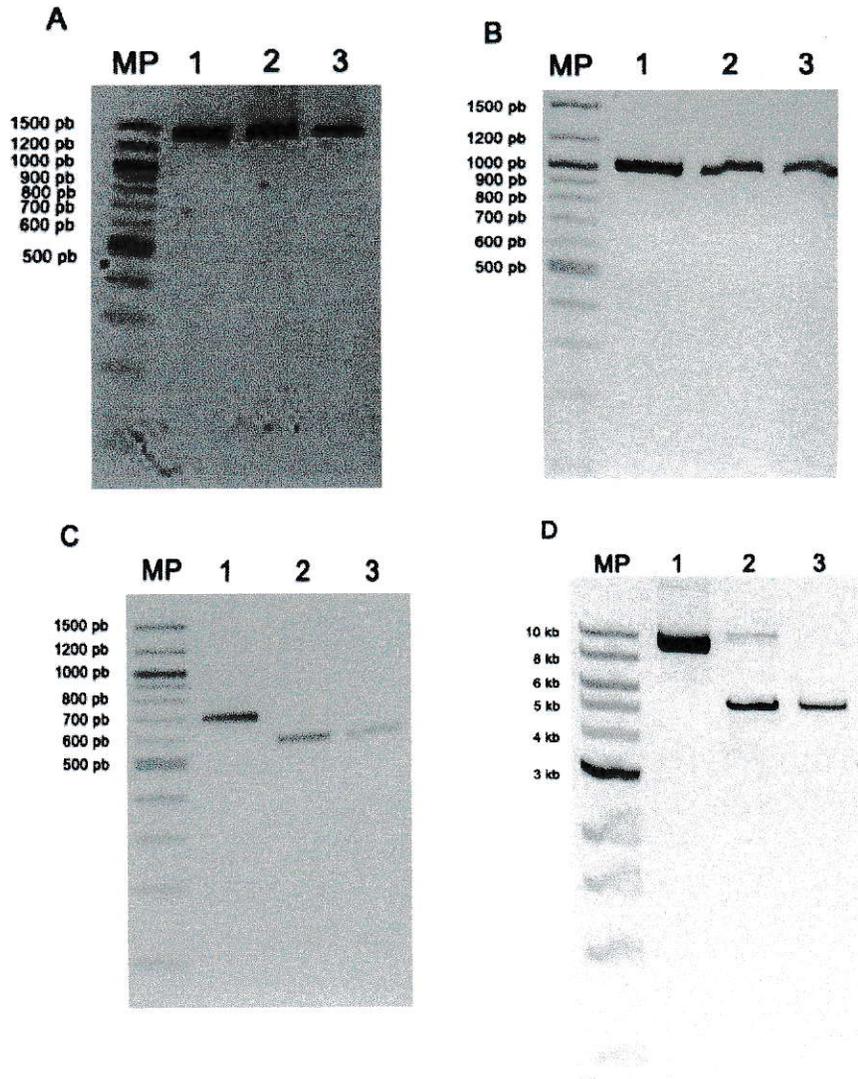


Figura 9. Patrones de digestión de los productos de PCR y del plásmido necesario para el clonamiento de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK*.

A) Patrón de digestión del producto de PCR con el gen *mceD* tratado con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII*, y posterior electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. Carril 1: Producto de PCR sin digerir. Carril 2: Producto de PCR digerido con *SalI*. Carril 3: Producto de PCR digerido con *SalI* y *HindIII*. **B)** Patrón de digestión obtenido al tratar el producto de PCR con el gen *mceF* con *SalI* y *HindIII*, y resultado con gel de agarosa al 2,5%. Carril 1: Producto de PCR sin digerir. Carril 2: Producto de PCR digerido con *SalI*. Carril 3: Producto de PCR digerido con *SalI* y *HindIII*. **C)** Patrón de digestión obtenido al tratar el producto de PCR con el gen *orfK* con *SalI* y *HindIII*, y posterior electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. Carril 1: Producto de PCR sin digerir. Carril 2: Producto de PCR digerido con *SalI*. Carril 3: Producto de PCR digerido con *SalI* y *HindIII*. Marcador de peso molecular escalera de 100 pb. **D)** Patrón de digestión obtenido al digerir el plásmido pBAD33 con *SalI* y *HindIII*, resuelto con un gel de agarosa al 1%. Carril 1: Plásmido pBAD33 sin digerir. Carril 2: Plásmido pBAD33 digerido con *SalI*. Carril 3: Plásmido pBAD33 digerido con *SalI* y *HindIII*. Marcador de peso molecular escalera de 1 kb.

cloramfenicol para seleccionar a las células que habían incorporado el plásmido. Posteriormente se realizaron digestiones con enzimas de restricción y reacciones de PCR para comprobar la presencia del plásmido con el gen deseado en los clones seleccionados. Se secuenció el DNA plasmidial de los clones que dieron positivo para todas estas pruebas. Se comprobó que en los tres casos se obtuvieron construcciones correctas.

3.4. Caracterización de las cepas *E.coli* BW25113 transformadas con los vectores pBAD33-mceD, pBAD33-mceF y pBAD33-orfK

3.4.1. Determinación de la actividad bactericida de *E.coli* BW25113 con pBAD33-mceD, pBAD33-mceF y pBAD33-orfK en presencia de los distintos sistemas productores de mceE492

Los transformantes obtenidos fueron sembrados sobre un césped sensible a la acción de la mceE492 para comprobar que estas células no producían una actividad inhibitoria del crecimiento. Esto se hizo en presencia de glucosa y de arabinosa, y en ningún caso se vio halo de inhibición de crecimiento alrededor de la colonia picada.

Posteriormente, estas células fueron transformadas con los distintos sistemas productores de la microcina que se utilizan en este laboratorio: pJEM15, pJAM229, pJAM434 y el nuevo plásmido pMccE492. Se hicieron céspedes de la cepa sensible *E.coli* BL12 (DE3) en placas de agar LB y de agar M9 con ampicilina y cloramfenicol, y suplementados con arabinosa o con glucosa. Sobre este césped se picaron colonias y se dejaron incubando por 16 horas a 37°C. En la figura 10 se muestra un experimento en que se utilizó el sistema pJEM15 como huésped.

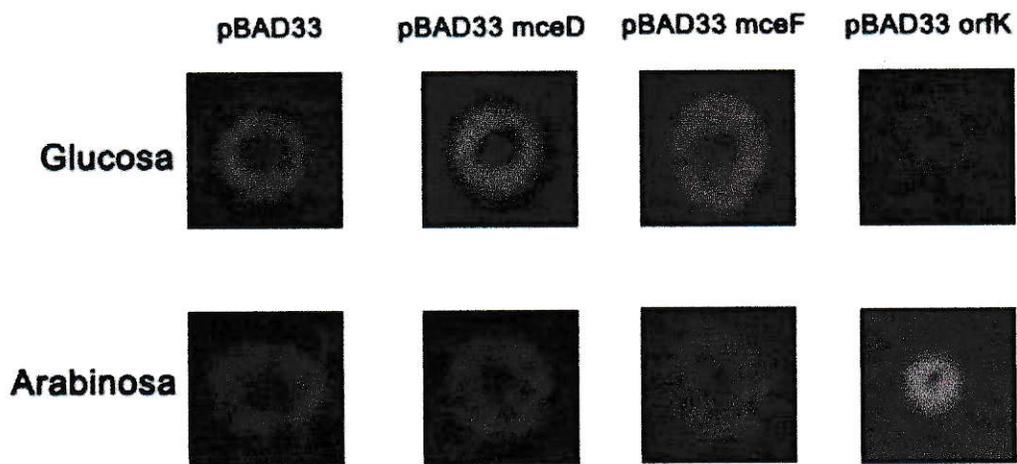


Figura 10. Comparación de la actividad bactericida de cepas que contienen al sistema productor pJEM15 y pBAD33-mceD, pBAD33-mceF o pBAD33-orfK.

Se picaron colonias de cepas con los distintos sistemas productores de microcina y las construcciones pJEM15 y pBAD33-mceD, pBAD33-mceF o pBAD33-orfK sobre un césped sensible en placas de agar LB con glucosa 0,1% o arabinosa 0,2%. En esta figura se muestra lo obtenido con el sistema productor pJEM15 como fondo genético, pero se observó un comportamiento similar cuando se integraron los demás sistemas productores como fondo genético.

No se observó una diferencia significativa en los halos de inhibición de crecimiento en las placas en presencia de glucosa o arabinosa para las construcciones con el gen *mceD* (Tabla 4). Sin embargo, se observa que *mceF* afecta positivamente la producción de *mccE492* tanto cuando está siendo sobre-expresado como cuando su expresión es residual. El gen *orfK* se comporta de igual forma que *mceF* cuando se encuentra en presencia de pJAM229, pJAM434 y pMccE492. Después de la transformación sobre el huésped pJEM15 se observa que un 10% de las colonias produce un halo de inhibición de crecimiento pequeño. Dado que este comportamiento fue minoritario y claramente distinto, no se utilizó para realizar los cálculos de área del halo de inhibición.

3.4.2. Efecto de la sobre-expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* en la sobrevida de la cepa *E. coli* BW25113

Para estudiar el efecto de la sobre-expresión de estos genes en la sobrevida de la cepa *E. coli* BW25113 se tomaron cultivos celulares crecidos durante toda la noche y se utilizaron para inocular en una dilución de 1:100 (medio LB) y 1:50 (M9 con glicerol) cultivos que fueron crecidos a 37°C con agitación hasta una DO₆₀₀ de 0,4-0,5. Estos cultivos fueron titulados en placas con agar LB y con agar M9 suplementadas con arabinosa y con glucosa tal como se explica en la sección de Métodos. Se consideró como 100% de sobrevida al título obtenido en la placa con glucosa.

Los primeros cultivos en los cuales se estudió la sobre-expresión de los genes fueron los que contenían sólo las construcciones en el vector pBAD33. Se vio que la sobre-expresión del gen *mceD* no afecta de forma importante la sobrevida de los cultivos celulares, ya que los porcentajes de sobrevida obtenidos fueron similares a los

Tabla 4. Efecto de la sobre-expresión de *mceD*, *mceF* y *orfK* en cepas que contienen a los distintos sistemas productores sobre la producción de *mccE492*.

Cepa	% halo LB + arabinosa	% halo LB + glucosa
pMccE492 pBAD33-mceD	72,7 ± 2,8	112,2 ± 1,7
pJEM15 pBAD33-mceD	92,8 ± 0,7	72 ± 1
pJAM229 pBAD33-mceD	83,3 ± 0,9	93,3 ± 1,2
pJAM434 pBAD33-mceD	84,7 ± 1,6	75 ± 0,9
pMccE492 pBAD33-mceF	83,3 ± 3,4	174,8 ± 2,1
pJEM15 pBAD33-mceF	136,5 ± 1,6	141,8 ± 0,9
pJAM229 pBAD33-mceF	149 ± 1,1	132,5 ± 0,7
pJAM434 pBAD33-mceF	164 ± 1,2	117,2 ± 1,4
pMccE492 pBAD33-orfK	68,9 ± 2,9	184,2 ± 2,3
pJEM15 pBAD33-orfK*	123,1 ± 0,6	134,3 ± 0,5
pJAM229 pBAD33-orfK	163,1 ± 1,1	143,4 ± 0,9
pJAM434 pBAD33-orfK	146,9 ± 1,6	125,8 ± 1,2

Todos los experimentos se realizaron utilizando como césped sensible la cepa *E. coli* BL21 (DE3). Como huésped para cada sistema se usó la cepa *E. coli* BW25113. Se picaron diez colonias en cada caso, y el porcentaje acá mostrado corresponde a una comparación de las áreas del halo de inhibición de crecimiento obtenidas, tomando como el 100% el área obtenida para cada sistema transformado con el plásmido vector pBAD33.

* En este caso se observó que después de la transformación con pBAD33-orfK un 10% de las colonias producen un halo pequeño (23,42 mm²). El carácter halo grande o halo pequeño se transmite de manera estable en las sucesivas generaciones.

obtenidos con el plásmido vector pBAD33 (Tabla 5). Sin embargo, la sobre-expresión de *mceF* y *orfK* afecta la sobrevivida tanto en agar LB como en agar M9. El título celular se redujo en 3 órdenes de magnitud para el caso de la sobre-expresión del gen *mceF*, en tanto que cuando el gen sobre-expresado fue *orfK* se observó que esta disminución llegó a los 5 órdenes de magnitud en agar M9.

Se evaluó la sobrevivida en estas condiciones de las cepas que contenían los distintos sistemas productores de *mccE492* con pBAD33, pBAD33-*mceD*, pBAD33-*mceF* y pBAD33-*orfK*. La sobrevivida de células crecidas en medio mínimo que contenían pJEM15 no se afectó con la sobre-expresión de *mceD* (Tabla 6). Curiosamente, en este mismo medio la sobre-expresión de *mceF* no tuvo un efecto tan importante (27% sobrevivida) si se le compara con el 0,5% observado en ausencia del sistema productor de *mccE492* (Tabla 5). El efecto observado en la sobre-expresión de estos dos genes resultó ser medio dependiente, pues cuando el medio utilizado fue LB, la sobrevivida observada fue superior a la del control no inducido. La sobre-expresión de *orfK*, por otra parte, produce una disminución del título celular de 3 órdenes de magnitud cuando se plaquea en agar M9 y de 5 órdenes de magnitud en el caso de agar LB (Tabla 6).

Un comportamiento similar se observa cuando el sistema productor es pJAM229 (Tabla 7) y pJAM434 (Tabla 8). La sobre-expresión de *mceD* no tiene efecto en la sobrevivida de las células, mientras que la sobre-expresión de *mceF* produce una disminución de 2 órdenes de magnitud en el título celular. El gen *orfK* es el que muestra el efecto más pronunciado sobre las células al ser sobre-expresado, llegando incluso a no encontrarse células al plaquear en agar M9 suplementado con arabinosa. En las placas con agar LB encontramos una disminución de 7 órdenes de magnitud en el título celular al comparar las placas con glucosa respecto de con arabinosa. Esta

Tabla 5. Sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que sobre-expresan *mceD*, *mceF* y *orfK*.

Cepa	% sobrevida M9 + Arabinosa	% sobrevida LB + Arabinosa
pBAD33	168,29 ± 0,72	350,54 ± 1,23
pBAD33-mceD	107,13 ± 1,28	431,08 ± 1,69
pBAD33-mceF	0,53 ± 0,011	21,19 ± 0,17
pBAD33-orfK	1,76 ± 0,0083	0,0011 ± 1,0x10 ⁻⁵

Todos estos experimentos se realizaron utilizando a la cepa *E. coli* BW25113. Los porcentajes son representativos de tres ensayos independientes. Los conteos de colonias y los porcentajes de sobrevida fueron obtenidos de un triplicado, y se consideró como 100% al título celular obtenido para la placa suplementada con glucosa en cada caso.

Tabla 6. Sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que contienen al sistema productor de *mccE492* pJEM15 y que sobre-expresan los genes *mceD*, *mceF* y *orfK*.

Cepa	% sobrevida M9 + Arabinosa	% sobrevida LB + Arabinosa
pJEM15 pBAD33	100,92 ± 0,44	164,07 ± 1,19
pJEM15 pBAD33- <i>mceD</i>	97,25 ± 7,0	408,73 ± 6,81
pJEM15 pBAD33- <i>mceF</i>	27,13 ± 0,13	151,97 ± 1,68
pJEM15 pBAD33- <i>orfK</i>	0,06 ± 0,008	6,49 ± 0,39 × 10 ⁻⁴

Todos estos experimentos se realizaron utilizando a la cepa *E. coli* BW25113. Los porcentajes son representativos de tres ensayos independientes. Los conteos de colonias y los porcentajes de sobrevida fueron obtenidos de un triplicado, y se consideró como 100% al título celular obtenido para la placa suplementada con glucosa en cada caso.

Tabla 7. Sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que contienen al sistema productor de mceE492 pJAM229 y que sobre-expresan los genes *mceD*, *mceF* y *orfK*.

Cepa	% sobrevida M9 + Arabinosa	% sobrevida LB + Arabinosa
pJAM229 pBAD33	191,01 ± 1,58	183,09 ± 16,2
pJAM229 pBAD33-mceD	72,89 ± 1,01	70 ± 6,0
pJAM229 pBAD33-mceF	4,8 ± 0,043	16,23 ± 0,16
pJAM229 pBAD33-orfK	< 10 ⁻³	8,34 ± 0,33 x 10 ⁻⁶

Todos estos experimentos se realizaron utilizando a la cepa *E. coli* BW25113. Los porcentajes son representativos de tres ensayos independientes. Los conteos de colonias y los porcentajes de sobrevida fueron obtenidos de un triplicado, y se consideró como 100% al título celular obtenido para la placa suplementada con glucosa en cada caso.

Tabla 8. Sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que contienen al sistema productor de *mccE492* pJAM434 y que sobre-expresan los genes *mceD*, *mceF* y *orfK*.

Cepa	% sobrevida M9 + Arabinosa	% sobrevida LB + Arabinosa
pJAM434 pBAD33	84,15 ± 1,09	136,03 ± 1,92
pJAM434 pBAD33- <i>mceD</i>	86,04 ± 4,5	238 ± 2,01
pJAM434 pBAD33- <i>mceF</i>	0,91 ± 0,023	100 ± 1,62
pJAM434 pBAD33- <i>orfK</i>	< 10 ⁻³	4,65 ± 0,059 x 10 ⁻⁶

Todos estos experimentos se realizaron utilizando a la cepa *E. coli* BW25113. Los porcentajes son representativos de tres ensayos independientes. Los conteos de colonias y los porcentajes de sobrevida fueron obtenidos de un triplicado, y se consideró como 100% al título celular obtenido para la placa suplementada con glucosa en cada caso.

diferencia es consistente con la falta de colonias en las placas de agar M9, ya que en éstas siempre se obtuvo un menor número de colonias que en las placas de agar LB.

Las células que llevan el sistema pMccE492 (Tabla 9) tienen un comportamiento un poco diferente. No se ve un efecto importante en la sobrevivencia en placas LB al sobre-expresar los distintos genes, en tanto que al plaquear en agar M9 sólo hay un efecto notorio en las células que sobre-expresan *orfK*. Hay una disminución de 6 órdenes de magnitud en el título celular, pero esto no se observa en las placas LB. Esto sugiere fuertemente que hay un efecto medio-dependiente al sobre-expresar *orfK*. En la Tabla 10 se resume el efecto de la sobre-expresión de los distintos genes sobre las cepas productoras de mceE492.

3.4.3. Efecto de la sobre-expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* sobre las curvas de crecimiento de la cepa *E. coli* BW25113.

Se complementó el estudio anterior analizando el efecto de la sobre-expresión de *mceD*, *mceF* y *orfK* en *E. coli* BW25113 sobre las curvas de crecimiento obtenidas en presencia de arabinosa o de glucosa. Se observó que las construcciones crecidas en LB y no inducidas con arabinosa no afectan el crecimiento de la cepa huésped (Figura 11A). Lo mismo se observó al realizar las curvas de crecimiento en medio M9 con glicerol 0,4% como fuente de carbono (Figura 11B). Las curvas en medio LB además sirvieron para determinar que los cultivos celulares alcanzaban la DO₆₀₀ recomendada para la inducción (Guzman y cols., 1995), alrededor de las 2 horas de crecimiento después de la dilución.

Se realizó la inducción de los cultivos agregando arabinosa a partir de la hora 2 de crecimiento en una concentración final de 0,2%, y como contraparte se agregó

Tabla 9. Sobrevida sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que contienen al sistema productor de *mccE492* pMccE492 y que sobre-expresan los genes *mceD*, *mceF* y *orfK*.

Cepa	% sobrevida M9 + Arabinosa	% sobrevida LB + Arabinosa
pMccE492 pBAD33	81,55 ± 1,47	96,91 ± 1,81
pMccE492 pBAD33- <i>mceD</i>	107,44 ± 2,25	63,18 ± 8,5
pMccE492 pBAD33- <i>mceF</i>	6,24 ± 0,13	16,2 ± 0,14
pMccE492 pBAD33- <i>orfK</i>	2,21 ± 0,030 x 10 ⁻⁴	15,05 ± 0,58

Todos estos experimentos se realizaron utilizando a la cepa *E. coli* BW25113. Los porcentajes son representativos de tres ensayos independientes. Los conteos de colonias y los porcentajes de sobrevida fueron obtenidos de un triplicado, y se consideró como 100% al título celular obtenido para la placa suplementada con glucosa en cada caso.

Tabla 10. Resumen de los ensayos de sobrevivencia sobre placas de agar M9 y de agar LB de las cepas que contienen los distintos sistemas productores en presencia de las distintas construcciones.

	BW25113	pBAD33	pBAD3-mceD	pBAD3-mceF	pBAD3-orfK
M9 Arabinosa	Cepa huésped	=	=	↓↓	↓↓
	+ pJEM15	=	=	=	↓↓
	+ pJAM229	=	=	↓	↓↓
	+ pJAM434	=	=	↓	↓↓↓
	+ pMcceE492	=	=	=	↓↓
LB Arabinosa	Cepa huésped	=	=	↓	↓↓
	+ pJEM15	=	=	=	↓↓
	+ pJAM229	=	=	↓	↓↓
	+ pJAM434	=	=	↓	↓↓
	+ pMcceE92	=	=	=	=

Para expresar el efecto de la sobre-expresión de los distintos genes sobre los sistemas productores de mceE492, se designó como sin efecto (=) a los títulos celulares que se mantenían en el mismo orden de magnitud que la placa control con glucosa, mientras que el efecto negativo sobre el título celular se expresó de tres maneras: con (↓) cuando la disminución en el título era menor o igual a 2 órdenes de magnitud, (↓↓) cuando era entre 3 a 7 órdenes de magnitud y (↓↓↓) cuando no se encontraron colonias en la placa de cultivo.

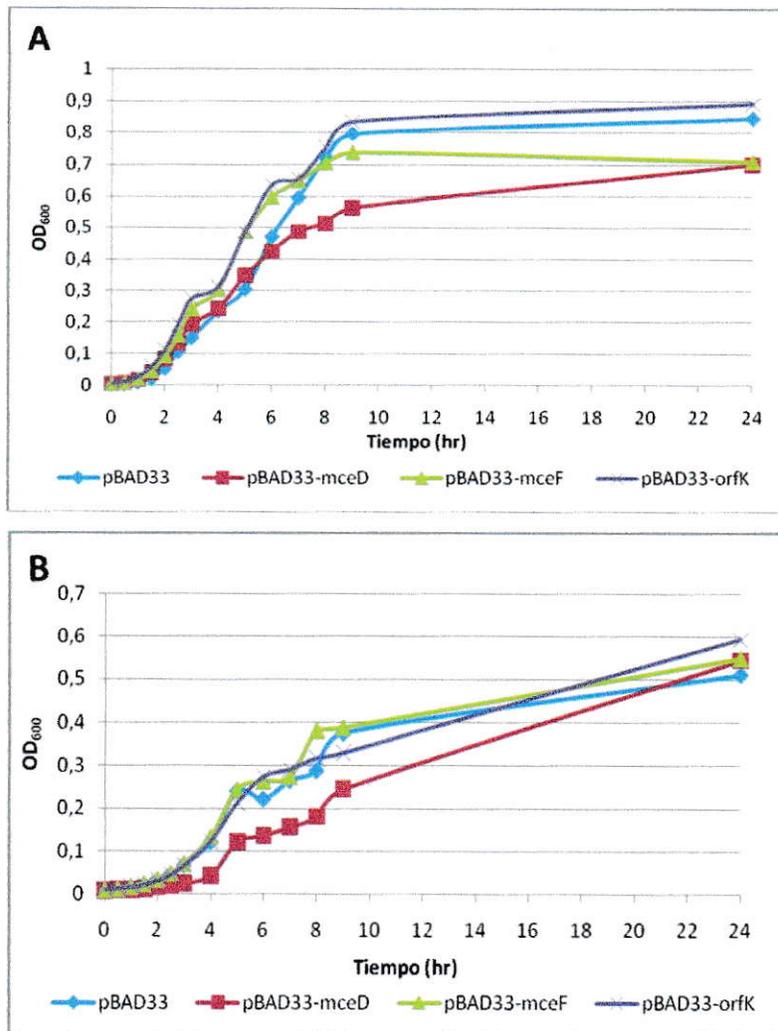


Figura 11. Curvas de crecimiento de la cepa *E. coli* BW25113 que lleva pBAD33-mceD, pBAD33-mceF, pBAD33-orfK y pBAD33 en medio LB y en medio M9.

Las curvas de crecimiento se hicieron por triplicado en ambos medios de cultivo, y se graficaron los valores correspondientes al promedio de las tres mediciones. Estos cultivos se crecieron en ausencia de arabinosa. **A)** Curva obtenida al crecer las distintas cepas en medio LB. **B)** Curva obtenida al crecer las distintas cepas en medio M9 con glicerol 0,4% como fuente de carbono. Tal como se indica en la leyenda de los gráficos, la línea azul corresponde a la cepa transformada con el plásmido pBAD33, la roja a la construcción pBAD33-mceD, la verde a pBAD33-mceF y la línea morada a pBAD33-orfK.

glucosa al 0,1%. Las curvas de crecimiento se realizaron en medio LB suplementado con cloramfenicol, como se explica en la sección de Métodos. Tal como se esperaba a partir de los resultados de los ensayos de sobrevivencia, las cepas transformadas con el plásmido pBAD33 (Figura 12A) y con pBAD33-mceD (Figura 10B) no presentan cambios significativos en la forma de sus curvas de crecimiento una vez que se agrega arabinosa o glucosa al medio de cultivo. Para las cepas que llevan pBAD33-mceF (Figura 12C) y pBAD33-orfK (Figura 12D) en cambio, la presencia de arabinosa retarda el crecimiento de las células. Este efecto es evidente no sólo al compararla con la curva obtenida en presencia de glucosa, sino que también con la obtenida sólo con medio LB.

Este comportamiento también se observó en las curvas realizadas en medio M9 con glicerol 0,4% como fuente de carbono. En este caso la diferencia entre las curvas fue mayor, lo que se puede deber a la presencia de glucosa en el medio, la cual no sólo estaría reprimiendo totalmente la expresión del plásmido pBAD33, sino que como nueva de carbono sería más fácil de metabolizar.

3.4.4. Efecto de la expresión residual de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* en curvas de crecimiento de la cepa *E. coli* BW25113 con distintos sistemas productores de *mccE492*.

Se estudió el efecto de la expresión residual, es decir en condiciones de no inducción, de los distintos genes sobre los sistemas productores de *mccE492* pJAM229, pJAM434 y pMccE492, en medio LB y en medio M9.

Todas las curvas de las distintas construcciones en cepas que portan el sistema productor pJAM229 presentan un comportamiento similar. Sin embargo, la curva de la

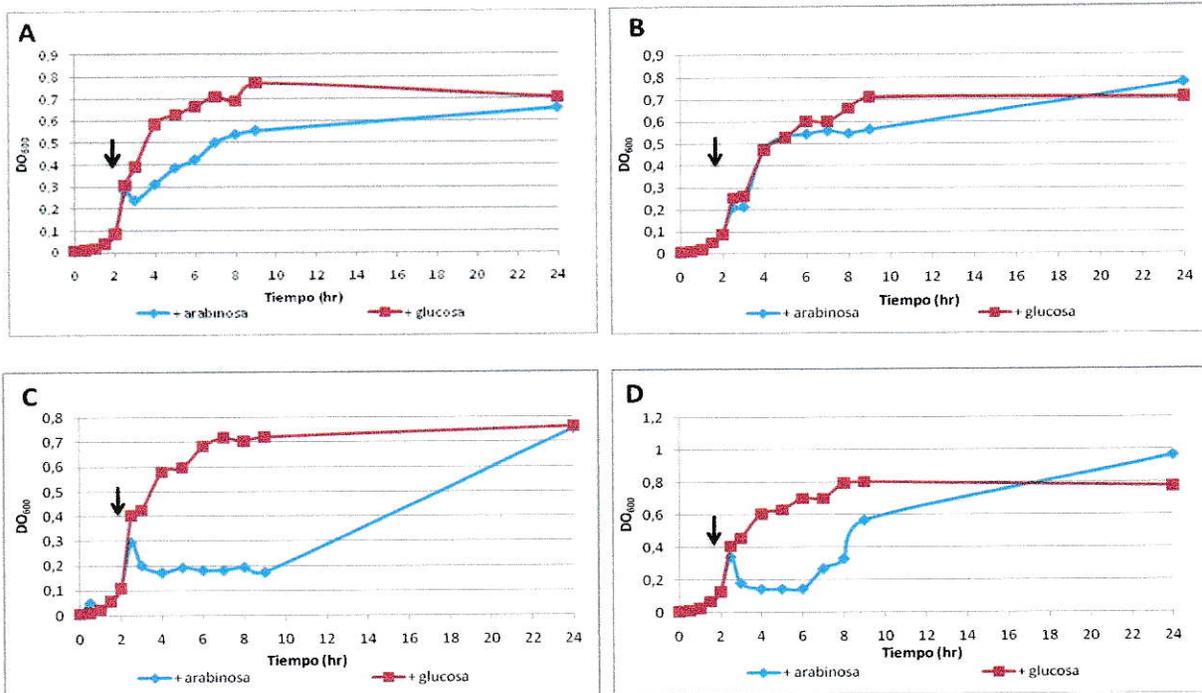


Figura 12. Efecto de la sobre-expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* sobre las curvas de crecimiento de la cepa *E. coli* BW25113.

Las curvas de crecimiento fueron realizadas por triplicado en medio LB, y se graficaron los valores correspondientes al promedio de las tres mediciones. En esta figura se muestran las curvas obtenidas para *E. coli* BW25113 transformada con las distintas construcciones hechas en el vector pBAD33. **A)** Cepa transformada con pBAD33. **B)** Cepa transformada con pBAD33-*mceD*. **C)** Cepa transformada con pBAD33-*mceF*. **D)** Cepa transformada con pBAD33-*orfK*. Tal como lo indica la leyenda, en azul se muestra el comportamiento del cultivo en presencia de arabinosa, mientras que en rojo, de glucosa. La flecha negra indica el momento en el que se agregó el suplemento al cultivo (2 horas).

cepa con la construcción pBAD33-*orfK* alcanzó el plateau más rápidamente (Figura 13A). Los tiempos generacionales de los cultivos de las cepas con pBAD33, pBAD33-*mceD* y pBAD33-*orfK* son de alrededor de media hora, mientras que para pBAD33-*mceF* se llegó al valor de 55 minutos.

Cuando este análisis se realizó en el sistema productor pJAM434 el efecto “protector” entregado por la expresión residual de *orfK* fue mucho más evidente (Figura 13B). Al comparar las curvas de crecimiento se ve que la cepa que tiene la construcción pBAD33-*orfK* es la única que presenta una curva de crecimiento normal. Las demás presentan una disminución notoria de la densidad óptica a partir de las tres horas de crecimiento, la que se recuperan hacia el final de la curva, pero no llegan a los valores medidos para la cepa transformada con pBAD33-*orfK*.

Cuando las células llevan el sistema pMccE492, no se observa ningún efecto de *orfK*. Todas las cepas presentan el mismo comportamiento a lo largo de la curva de crecimiento, que es el mismo para una curva de crecimiento de la cepa huésped en medio de cultivo LB (Figura 14).

3.4.5. Efecto de la sobre-expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* en curvas de crecimiento de la cepa *E. coli* BW25113 con distintos sistemas productores de *mccE492*.

Luego de estudiar el efecto de la expresión residual de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* sobre las curvas de crecimiento de los distintos sistemas productores de *mccE492*, se analizó el efecto de su sobre-expresión. Para esto, se crecieron cultivos en presencia de arabinosa o glucosa, y se construyeron curvas de crecimiento tal como

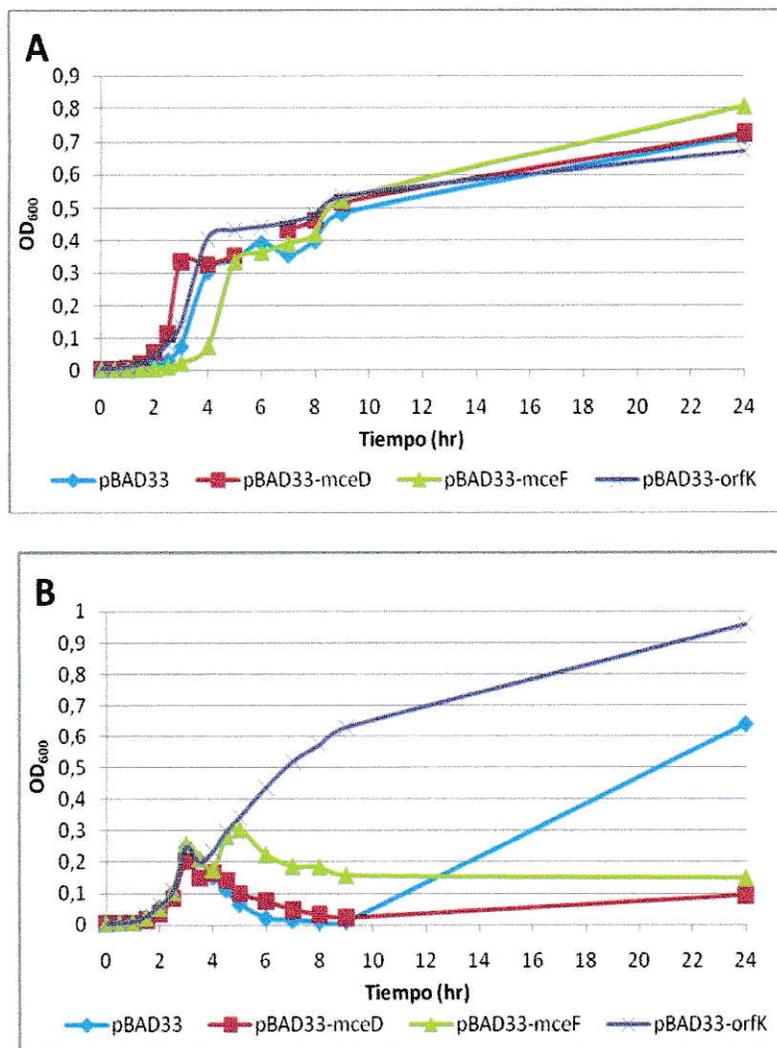


Figura 13. Efecto de la expresión residual de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* en los sistemas productores de *mccE492* pJAM229 y pJAM434.

Las curvas de crecimiento se hicieron por triplicado y se graficaron los valores correspondientes al promedio de las tres mediciones. En esta figura se muestra el efecto de la expresión residual de los distintos genes a estudiar en sistemas productores de *mccE492* en la cepa *E. coli* BW25113. **A)** Curvas obtenidas en presencia del sistema pJAM229 en medio LB. **B)** Curvas obtenidas en presencia del sistema pJAM434 en medio LB. La línea azul corresponde a la cepa transformada con el plásmido pBAD33, la línea roja a la construcción pBAD33-*mceD*, la línea verde a pBAD33-*mceF* y la línea morada a pBAD33-*orfK*.

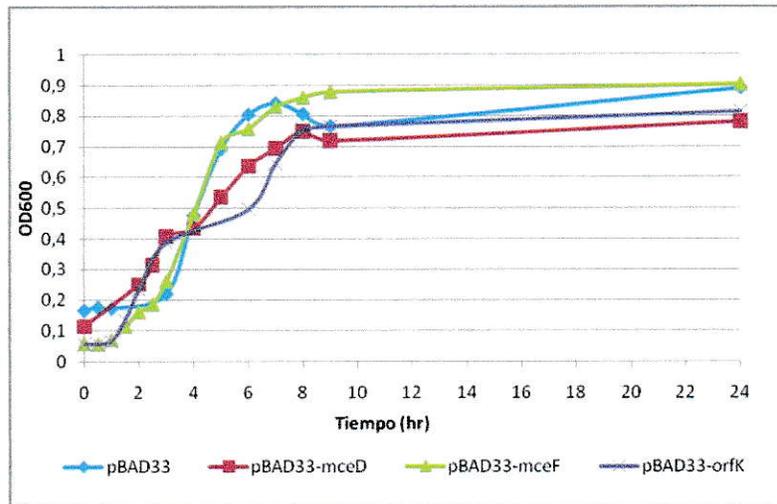


Figura 14. Efecto de la expresión residual de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* sobre una cepa con el sistema productor pMccE492

Las curvas de crecimiento se hicieron por triplicado y se graficaron los valores correspondientes al promedio de las tres mediciones. En esta figura se muestra el efecto de la expresión residual de los distintos genes a estudiar sobre el sistema productor pMccE492 transformado en la cepa *E. coli* BW25113. La línea azul muestra a la cepa transformada con el plásmido pBAD33, la línea roja a la cepa con la construcción pBAD33-mceD, la línea verde a pBAD33-mceF y la línea morada a pBAD33-orfK.

se explica en la sección de Métodos. De acuerdo a las curvas obtenidas para los sistemas productores pJAM229 y pMccE492, se agregó el suplemento indicado luego de 2,5 horas de crecimiento a 37°C, ya que en ese momento el cultivo alcanzaba la densidad óptica adecuada para la inducción.

Al analizar la cepa que lleva el sistema pJAM229 se observó una concordancia con los resultados de porcentajes de sobrevivencia. Así, la sobre-expresión de la proteína MceD no presenta ningún efecto sobre el crecimiento de las células (Figura 15B), mientras que la sobre-expresión de MceF y Ork en presencia de este sistema productor afecta de manera importante su crecimiento (Figura 15C y 15D, respectivamente), a tal punto que la inducción de pBAD33-orfK impidió el crecimiento bacteriano, analizado hasta las 24 horas.

Sin embargo, la cepa con el plásmido pBAD33 presentó un comportamiento no esperado. Cuando se estudió el efecto de la sobre-expresión o represión del plásmido vector en la sobrevivencia de las células no se vio ningún efecto. Tampoco se observó nada importante en el caso de su expresión residual en presencia de pJAM229. Sin embargo, la sobre-expresión de este plásmido en presencia de pJAM229 tiene un efecto inhibitorio sobre la curva de crecimiento de estas células, y lo hace de manera similar a la sobre-expresión de la proteína MceF (Figura 15A).

Cuando este análisis se realizó con las células con el sistema productor pMccE492 se observó que no hay efecto al sobre-expresar el plásmido pBAD33 (inducción) comparado con la curva obtenida al agregar glucosa al medio de cultivo (Figura 16A). Cuando se sobre-expresa la construcción pBAD33-mceD se ve que si bien las curvas son muy similares en lo que se refiere a la forma y los valores obtenidos para las distintas mediciones, durante la fase estacionaria tardía de crecimiento el cultivo que creció en presencia de arabinosa disminuye su densidad

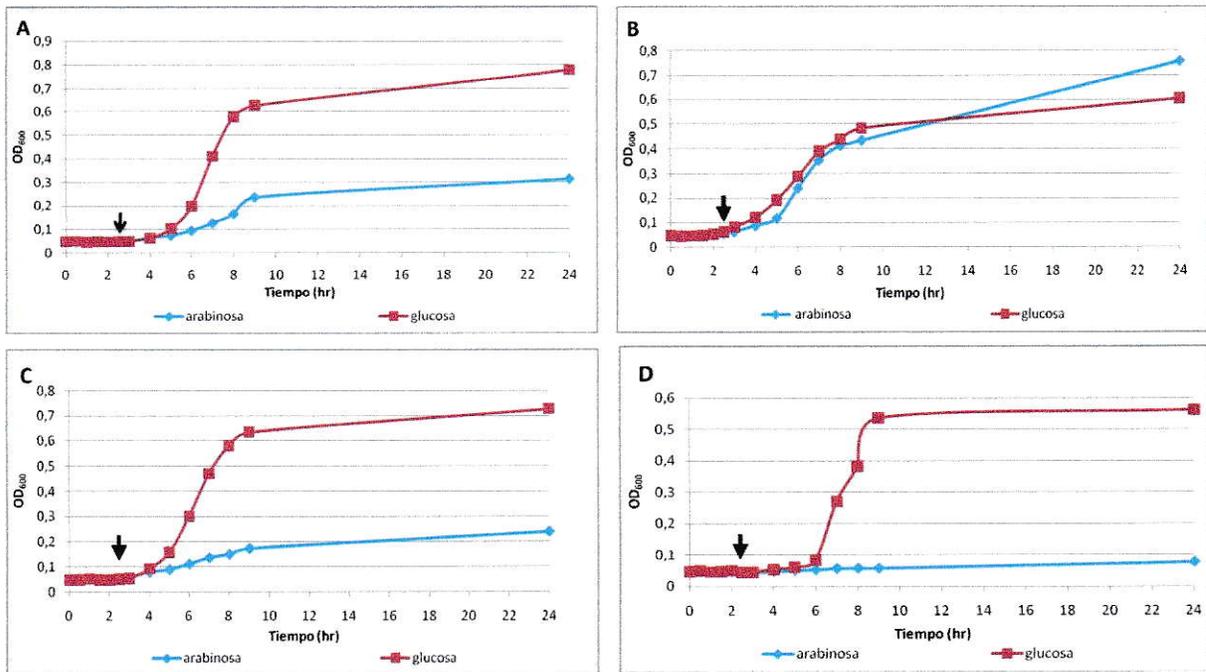


Figura 15. Efecto de la sobre-expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* en un huésped con el sistema pJAM229.

Las curvas de crecimiento fueron realizadas por triplicado en medio LB, y se graficaron los valores correspondientes al promedio de las tres mediciones. En esta figura se muestran las curvas obtenidas para *E. coli* BW25113 que presenta pJAM229 y fue transformada con las distintas construcciones hechas en el vector pBAD33. **A)** Cepa transformada con pBAD33. **B)** Cepa transformada con pBAD33-*mceD*. **C)** Cepa transformada con pBAD33-*mceF*. **D)** Cepa transformada con pBAD33-*orfK*. En azul se muestra el comportamiento del cultivo en presencia de arabinosa, mientras que en rojo, de glucosa. La flecha negra indica el momento en el que se agregó el suplemento al cultivo (2,5 horas).

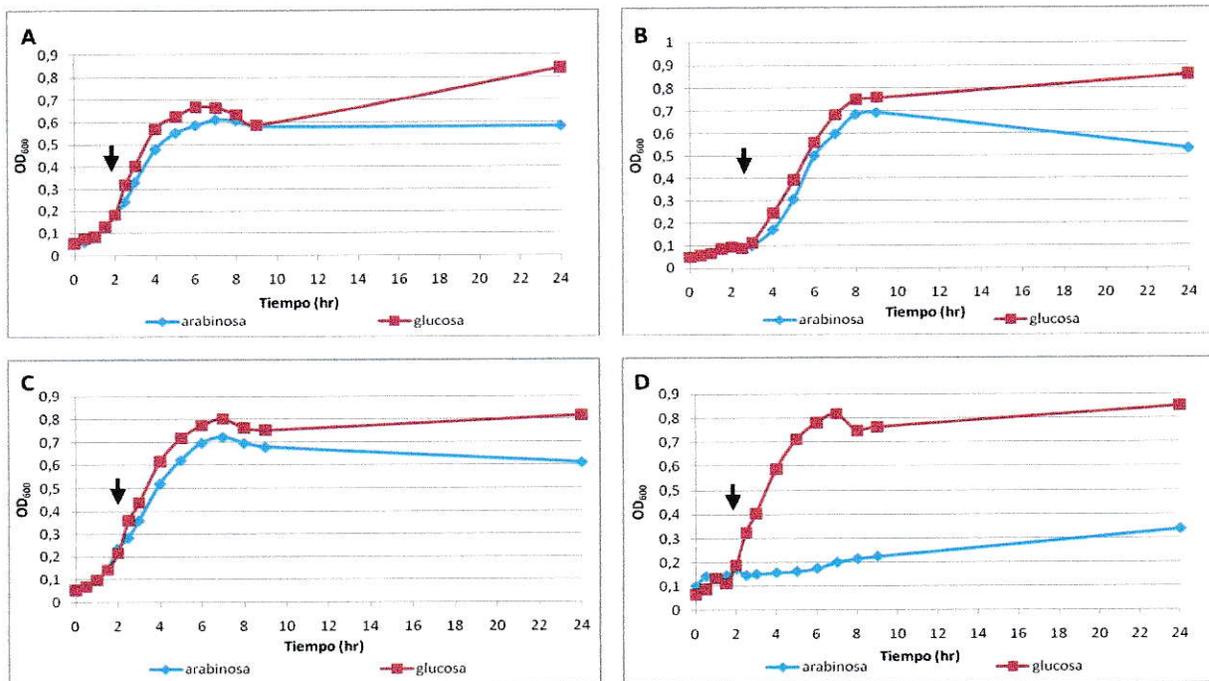


Figura 16. Efecto de la sobre-expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* en un huésped con el sistema pMccE492.

Las curvas de crecimiento fueron realizadas por triplicado en medio LB, y se graficaron los valores correspondientes al promedio de las tres mediciones. En esta figura se muestran las curvas obtenidas para *E. coli* BW25113 que presenta pMccE492 y fue transformada con las distintas construcciones hechas en el vector pBAD33. **A)** Cepa transformada con pBAD33. **B)** Cepa transformada con pBAD33-*mceD*. **C)** Cepa transformada con pBAD33-*mceF*. **D)** Cepa transformada con pBAD33-*orfK*. En azul se muestra el comportamiento del cultivo en presencia de arabinosa, mientras que en rojo, de glucosa. La flecha negra indica el momento en el que se agregó el suplemento al cultivo (2,5 horas).

óptica (Figura 16B). Esto es consistente con los resultados que se obtuvieron para los ensayos de sobrevivencia de esta cepa, en donde se vio una disminución del título que no se observa en ningún otro caso. La cepa que presenta el plásmido pBAD33-mceF se comporta como la cepa con el plásmido vector pBAD33 (Figura 15C). Se puede observar el efecto de la sobre-expresión de MceF en el tramo final de la curva de crecimiento, ya que hasta la hora 9 de medición la curva en presencia de arabinosa y de glucosa son muy similares.

Las células con la construcción pBAD33-orfK muestran, tal como se esperaba, una gran diferencia entre la curva obtenida en presencia de arabinosa y la obtenida en presencia de glucosa (Figura 15D). La curva obtenida al agregar arabinosa al medio de cultivo se ve muy afectada por la sobre-expresión de esta proteína de membrana, mucho más de lo que se podía hacer esperado a partir de los resultados de sobrevivencia y la expresión residual de ésta.

3.4.6. Análisis mediante PAGE de extractos bacterianos después de la sobre-expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK*.

Se analizó la sobre-expresión de los genes presentes en las construcciones en pBAD33 mediante SDS-PAGE. Para esto, se crecieron cultivos de las cepas que presentaban las distintas construcciones en medio LB y se les agregó glucosa o arabinosa luego de 2 horas de crecimiento. Se dejaron crecer por 5 horas en este medio inducido y se tomaron muestras de estos cultivos. Las muestras obtenidas se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12,5% de acrilamida para poder separarlas, y las proteínas se visualizaron a través de tinción con Azul de Coomassie. Se realizó también tinción de plata del gel luego de la electroforesis, pero aún cuando se realizaron

diluciones de 1:10 y 1:100 de las muestras no se pudo obtener un gel lo suficientemente claro como para identificar las proteínas deseadas. Por lo tanto, se siguió trabajando con la tinción de Azul de Coomasie hasta encontrar el mejor protocolo de trabajo.

Las masas teóricas para las distintas proteínas son de 45.762 Da para MceD, 26.984 Da para la proteína MceF y 15.416 para OrfK. Esta información fue considerada para escoger el porcentaje de acrilamida del gel y el marcador de peso molecular.

Se compararon los patrones de proteínas obtenidos para las construcciones en presencia de arabinosa y de glucosa, y también se compararon con las obtenidas para el plásmido pBAD33 en ambas condiciones. De esta manera se logró identificar dos bandas que están presentes en los carriles correspondientes a la sobre-expresión de las proteínas MceD y MceF, y que no se encuentran en ningún otro carril (Figura 17). Estas bandas se encuentran aproximadamente a la altura de la banda que corresponde a 36 kDa en el marcador de proteínas PagerRuler Plus preteñido, lo cual estaría cerca de las masas teóricas de las proteínas MceD y MceF. No se pudo identificar una banda correspondiente a OrfK a pesar de realizar distintos geles y utilizar varios tipos de tinciones. Esto podría deberse a un eventual clivaje y secreción de esta proteína por su identidad con McM_A, proteína que es clivada y exportada al medio extracelular por un exportador tipo ABC en el sistema de la microcina M. Si este fuera el caso, a partir de OrfK se producirían dos proteínas de difícil detección: una correspondiente a la inmunidad y se localizaría en la membrana, y otra a la microcina, que sería exportada.

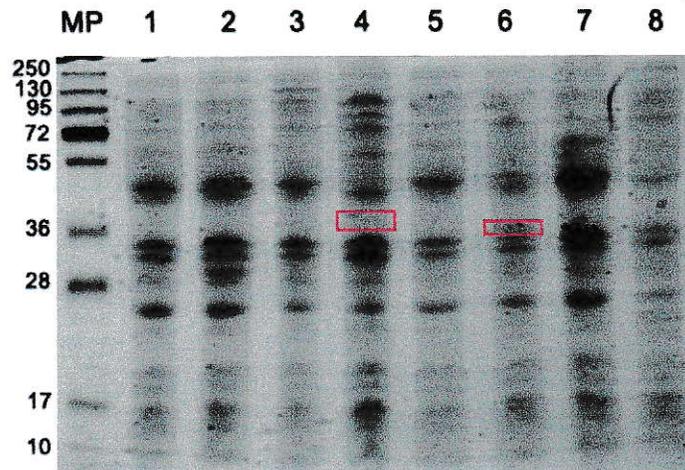


Figura 17. SDS-PAGE y posterior tinción con Azul de Coomasie de las distintas construcciones sobre-expresadas.

Se crecieron cultivos de las distintas cepas en presencia de arabinosa o de glucosa, se tomaron muestras de estos cultivos y las proteínas presentes en los extractos celulares obtenidos se separaron por SDS-PAGE. Los geles fueron teñidos con tinción de Azul de Coomasie. El cuadro rojo muestra la banda que correspondería a la proteína MceD (carril 4) y a MceF (carril 6). Carril 1: Cepa transformada con pBAD33 en presencia de glucosa. Carril 2: Cepa transformada con pBAD33 en presencia de arabinosa. Carril 3: Cepa transformada con pBAD33-mceD en presencia de glucosa. Carril 4: Cepa transformada con pBAD33-mceD en presencia de arabinosa. Carril 5: Cepa transformada con pBAD33-mceF en presencia de glucosa. Carril 6: Cepa transformada con pBAD33-mceF en presencia de arabinosa. Carril 7: Cepa transformada con pBAD33-orfK en presencia de glucosa. Carril 8: Cepa transformada con pBAD33-orfK en presencia de arabinosa. MP: marcador de peso molecular, PageRuler Plus preteñido. Los valores de las distintas bandas están en kDa.

3.5. Estudio de la sensibilidad a la *mccE492* en distintas fases de crecimiento bacteriano de cepas de *E. coli* en presencia del plásmido pJI.

Estudios previos realizados en el laboratorio determinaron un fenotipo denominado “pérdida de inmunidad en fase estacionaria”. Este fenotipo se producía en la cepa de *E. coli* VCS257 que porta al plásmido pJI, y no era debido a la pérdida de la transcripción del gen de la inmunidad (*mceB*) en la fase estacionaria, sino que a un efecto propio de la *mccE492* que se sintetiza y se acumula intracelularmente, debido mayormente a la ausencia de las proteínas de exportación. El plásmido pJI es un derivado del sistema pJAM229 que contiene sólo los genes *mceABCDE*, es decir carece de los genes de exportación y maduración. Los ensayos de pérdida de inmunidad se realizaron en céspedes de las cepas a estudiar cuando éstas están en fase exponencial y en fase estacionaria de crecimiento. Sobre estos céspedes se depositan alícuotas de *mccE492* en distintas diluciones en base dos, tal como en los ensayos de dilución crítica antes explicados. Si el césped utilizado corresponde a las células estaban en fase exponencial de crecimiento, éstas son inmunes a la acción de la *mccE492* exógena, pero que si el césped es a partir de células crecidas hasta fase estacionaria éste es sensible a la acción de esta *mccE492* agregada. Este fenotipo de “pérdida de inmunidad en fase estacionaria” se revierte con una mayor cantidad de proteína de inmunidad (incorporando un plásmido con *mceB*), en cuyo caso las células resultaban ser inmunes a la *mccE492* tanto en fase exponencial como en estacionaria de crecimiento.

Se decidió probar si el efecto “protector” de la expresión residual del gen *orfK* (Figura 12) observado en una cepa con el sistema pJAM434 estaba relacionado con un aumento de inmunidad. Para hacer esto se transformaron células de *E. coli* VCS257

que tenía al plásmido pJI con la construcción pBAD33-orfK, y se realizó el ensayo descrito más arriba. Se vió que los céspedes realizados tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento eran inmunes a la acción de la *mccE492*. Se realizó también un ensayo control sólo con el plásmido pBAD33-orfK, y en este caso los céspedes resultaron ser sensibles en ambas fases de crecimiento. Estos resultados, junto a los demás controles realizados, se muestran en la Tabla 11.

Este resultado indica que la proteína OrfK por sí sola no es capaz de entregar inmunidad frente a la *mccE492*. Una explicación probable es que interactúa con la proteína de la inmunidad MceB potenciando su efecto. Esta hipótesis es probable pues OrfK presenta identidad con la proteína de inmunidad del sistema McmM. Una explicación alternativa es que sea un efector positivo que estimula la expresión de *mceB*.

Tabla 11. Sensibilidad a la *mccE492* exógena de cepas transformadas con pJI y pBAD33-*orfK*.

<i>E. coli</i> VCS 257 transformada con:	Genes	Sensibilidad en fase exponencial	Sensibilidad en fase estacionaria
-	-	S	S
pJI	<i>mceABCDE</i>	I	S
pBAD33	-	S	S
pBAD33- <i>orfK</i>	<i>orfK</i>	S	S
pJI pBAD33- <i>orfK</i>	<i>mceABCDE + orfK</i>	I	i

Estos experimentos se realizaron por triplicado en cada caso, utilizando la microcina purificada a partir de pMccE492. Para expresar la sensibilidad a la *mccE492* se tomó como sensible (s) a los céspedes en donde se obtuvo halo de inhibición de crecimiento al depositar una alícuota de *mccE492* purificada, mientras que inmune (i) corresponde a las cepas en cuyos céspedes no se encontró halo de inhibición.

DISCUSION

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar el efecto de la sobre-expresión de los genes *mceD*, *mce F* y *orfK* sobre la producción de la *mccE492*, y para ello fue necesario construir un plásmido que tuviera todo el sistema productor de la microcina completo, y compararlo con los otros sistemas productores. Este sistema se llamó *pMccE492*, debido a que corresponde a los determinantes genéticos necesarios para la producción de la microcina E492 tal como se encuentra en *K. pneumoniae* RYC492.

La comparación con los sistemas ya existentes se realizó a través de curvas de crecimiento, utilizando la cepa de *E. coli* BW25113 como huésped. En estos experimentos se vio que las curvas de crecimiento de la cepa transformada con *pMccE492* tienen comportamientos similares al que se observa para la cepa que contiene a *pJEM15* o *pJAM229*, y que dichas curvas también son similares a la del huésped sin plásmido. Estos tres sistemas productores poseen todos los componentes necesarios para la eficiente producción y exportación de la *mccE492*, lo cual impediría la acumulación intracelular de la microcina que producen. Sin embargo, las cepas transformadas con el sistema *pJAM434* y con *pJRS1* tienen un comportamiento diferente, con un marcado retraso en el crecimiento (Figura 8). Esto se debería a que *pJRS1* no tiene completo al gen que codifica para el transportador utilizado para la exportación de la *mccE492*, lo que significa que la microcina se acumularía al interior de la célula, afectando de esta manera su sobrevivencia. Por otro lado, *pJAM434*, tiene un cambio en la disposición del fragmento que contiene a los genes *mceJIHGF*, que quedan bajo el control de un promotor que es más débil que su promotor natural. Este cambio produce una disminución en la expresión de estos genes, lo cual llevaría a que

la producción de la microcina sea mayor que su exportación, y esto afectaría el crecimiento a lo largo de toda la curva. Por otra parte, también se ve disminuida la expresión de los genes que participan en la modificación post-traducciona l de la microcina, lo que se manifiesta en una mayor proporción de *mccE492* no modificada. Esto explicaría también por qué este sistema no es un buen productor de microcina activa.

Se comparó la actividad de estas cepas a través de los halos de inhibición de crecimiento que se obtienen al sembrar colonias de cepas con los distintos sistemas productores de microcina sobre un césped sensible. Se observó que el halo de inhibición de crecimiento que se obtuvo para la cepa con *pMccE492* es de tamaño similar e incluso un poco mayor que el halo que se obtuvo con *pJEM15* (Figura 6).

Esta tendencia se mantuvo al estudiar la actividad bactericida de la microcina purificada a partir de *pMccE492*. Al hacer el ensayo de dilución crítica se observó halo de inhibición de crecimiento hasta una dilución de 512 veces, mientras que para una microcina purificada a partir de *pJEM15* se obtuvo halo hasta la dilución de 128 veces.

Como ya se mencionó, la diferencia más notoria entre los sistemas productores previos es el gen *mceF* trunco, con una secuencia de 179 aminoácidos en lugar de 230 aminoácidos. Los aminoácidos faltantes se encuentran ubicados en el extremo amino terminal de la secuencia. Estudios de predicción de topología de *MceF* indican que esta proteína tiene 6 hélices transmembrana, con su extremo amino y carboxilo hacia el periplasma de la célula. El segmento faltante en la versión trunca de *MceF* correspondería a la primera hélice transmembrana de la proteína, cuya carencia le daría una orientación diferente a cada hélice transmembrana (Figuras 18A y 18B). Así, para proteína *MceF* trunca el nuevo extremo amino terminal queda hacia el periplasma de la célula, mientras que el extremo carboxilo terminal está ubicado en el citoplasma

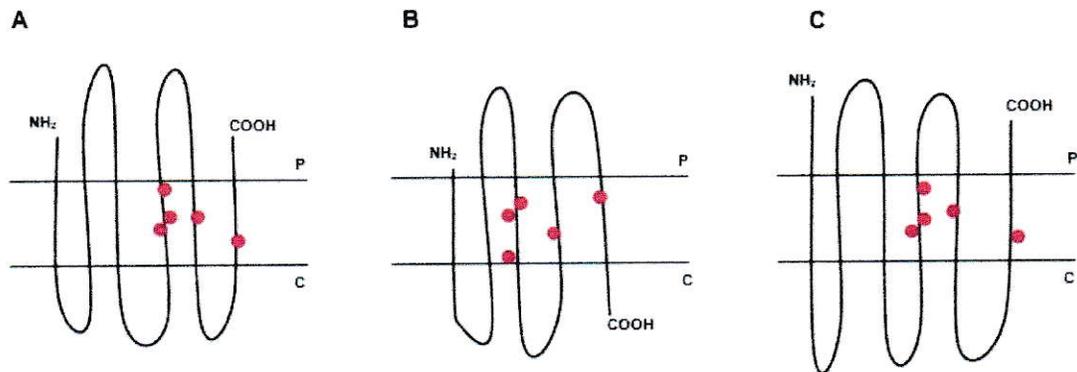


Figura 18: Comparación de la topología de MceF, MceF trunca y una prenil proteasa característica.

Utilizando los programas de predicción de topología de proteínas de membrana SOSUI y TMPred se obtuvieron las topologías para la proteína MceF completa (A), para la versión trunca en el amino terminal (B), y para una prenil proteasa de la familia CAAX [Swissprot, número de acceso IPR001915] (C). En rojo se muestran las ubicaciones de los aminoácidos esenciales para la actividad proteasa, y su localización en las dos versiones la proteína MceF existentes. P: periplasma, C: citoplasma.

de la célula. Este cambio también afecta la orientación de los segmentos transmembrana, y la ubicación relativa de los aminoácidos que las forman.

Como se mencionó en la Introducción, MceF tiene un dominio conservado Abi. Esta superfamilia está formada por proteínas que serían proteasas de membrana, y la presencia de este dominio en MceF fue confirmada al someter a la secuencia de la proteína a un PSI-BLAST y a una búsqueda de proteínas ortólogas con el programa COGNITOR. Este dominio conservado se encuentra entre los aminoácidos 125 y 215 de la secuencia de MceF, los cuáles también se encuentran en la versión incompleta de la misma.

Se comparó la topología de una de estas proteasas con la obtenida para ambas versiones de MceF, y se observó que la versión completa de la proteína concuerda con las proteasas (Figura 18C). Al analizar la ubicación de los 5 aminoácidos esenciales para la actividad prenil proteasa (Pei y Grishin, 2001) con ambas versiones de la proteína MceF, se encontró que sólo en la versión completa de MceF se mantienen en la disposición esperada. Esto podría significar que la proteína MceF es capaz de llevar a cabo su actividad proteasa putativa, mientras que en la versión incompleta presente en los sistemas productores de microcina pJEM15, pJAM229 y pJAM434 dicha actividad estaría afectada.

Una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* tiene 4 genes que entregarían inmunidad frente a la bacteriocina: *plnP*, *plnI*, *plnT* y *plnU* (Diep y cols., 1996). Al analizar los motivos presentes en estas proteínas se encontró que corresponderían a proteasas involucradas en la maduración y transporte de las bacteriocinas (Pei y Grishin, 2001), de manera similar a la cistein-proteasa asociada a PlnG, el transportador ABC presente en el mismo operón (Diep y cols., 1996). Este transportador está formado por 716 aminoácidos y tiene cuatro dominios conservados:

un dominio con actividad cistein-proteasa, un dominio transportador ABC, un dominio que corresponde a la región transmembrana del transportador y un dominio con actividad nucleótido trifosfato hidrolasa. Se sabe que las cistein-proteasas de la familia presente en este transportador clivan el péptido líder en el motivo doble glicina de varias bacteriocinas, y que este motivo se encuentra presente en la *mccE492*.

Tomando en consideración estos antecedentes, podrían existir dos posibles funciones para *MceF*: podría participar en el proceso de secreción de la *mccE492* estimulando el clivaje del péptido líder que es llevado a cabo por el exportador de la microcina, o podría participar en algún tipo de inmunidad a través de su actividad proteolítica (Kjos y cols., 2010). Al estudiar el efecto de la sobre-expresión de los genes sobre la producción de *mccE492* activa a través de halos de inhibición de crecimiento obtenidos sobre un césped sensible se vio que *mceF* afecta de forma positiva la producción de *mccE492*. Esto es consistente la posible participación de *MceF* en el proceso de secreción de la *mccE492*. En forma alternativa, este producto génico podría actuar indirectamente como un factor que afecta la producción de *mccE492* activa.

Una explicación a la disminución del título celular al sobre-expresar *MceF* es que esta proteína, al ser una proteína con 6 segmentos transmembrana desestabilizaría la membrana interna de la célula, con la consiguiente muerte y disminución de la densidad óptica (Figura 15).

Una explicación similar sería válida al sobre-expresar *OrfK*. Esta proteína también es de membrana, por lo que su sobre-expresión también tendría la capacidad de desestabilizar a la membrana de la célula huésped. Sin embargo, para esta proteína los efectos observados son mucho más drásticos tanto en la disminución del título celular como la ausencia de crecimiento (Figuras 15 y 16; Tablas 5 y 6).

La causa de este efecto podría deberse a que dentro de la secuencia de esta proteína se encuentran zonas con similitud al gen estructural de la McmM (últimos 59 aminoácidos) y a su proteína de inmunidad (los primeros 75 aminoácidos) (Lagos y cols., 2009). Si bien esta proteína no entrega inmunidad frente a la McmM ni a la *mccE492* (esta tesis), y tampoco tiene actividad antibacteriana por sí sola, se desconoce si es capaz de interactuar de alguna manera con alguna proteína del “cluster” de la *mccE492*. Los resultados presentados en esta tesis sugieren fuertemente una interacción con el sistema de la microcina E492.

Al estudiar el efecto de OrfK sobre la producción de *mccE492* activa de colonias sembradas sobre un césped sensible se observó que la afecta de forma positiva en el caso de los sistemas pJAM229 y pJAM434. Para el sistema pJEM15, por otro lado, se puede observar la presencia de dos fenotipos tanto en presencia de arabinosa como glucosa: colonias con halo de inhibición grande y colonias con halo de inhibición muy pequeño. Estos fenotipos no segregan, es decir, las colonias con halo grande mantienen este tamaño, y lo mismo ocurre con las colonias con halo pequeño. Por lo tanto, esta segregación ocurre al momento de la transformación y no varía posteriormente. Se realizaron distintas pruebas para tratar de explicar este fenómeno, y se descartó la ocurrencia de una recombinación entre los plásmidos, a la pérdida del gen *orfK*, o a una contaminación con otro sistema productor. Queda por dilucidar aún si este fenotipo se debe a un cambio en la cepa huésped o a algún cambio puntual en el DNA plasmidial, detectable sólo por secuenciación.

El efecto “protector” de OrfK en presencia del sistema productor pJAM434 llevó a estudiar la capacidad de reforzar la inmunidad frente a la *mccE492* utilizando una cepa con el plásmido pJI, que pierde la inmunidad en fase estacionaria. La expresión residual de OrfK es capaz de otorgar inmunidad en fase estacionaria frente a la

microcina agregada de forma exógena a una cepa con el plásmido pJI, pero es claro que OrfK por sí solo no da inmunidad a la *mccE492*. La protección observada podría ser por una potenciación de la inmunidad a través de una interacción entre OrfK y la proteína de inmunidad MceB, ya que la topología de la proteína OrfK en la membrana interna es muy similar a la de MceB.

La sobre-expresión del gen *orfK* en presencia o en ausencia de los sistemas productores de *mccE492* afecta severamente la viabilidad celular. Esto significaría que el efecto tóxico que esta sobre-expresión produce sobre la célula no puede ser contrarrestado por la interacción de OrfK con la proteína de inmunidad MceB.

Como se dijo en la Introducción, OrfK tiene similitud con la proteína estructural de McmM en sus 59 últimos aminoácidos y con su proteína de inmunidad en los primeros 75 aminoácidos. En las microcinas es común que la proteína estructural y la proteína de inmunidad se organicen en un solo operón, para de esta forma asegurarse que la célula productora será inmune a la microcina que está produciendo. Por lo tanto, OrfK podría verse como el resultado de la fusión entre el gen que codifica para la proteína estructural y el que codifica para la proteína de inmunidad de McmM. Evolutivamente, esta fusión pudo entrar en el "cluster" de la *mccE492* por transferencia horizontal desde el sistema de la McmM, y se ha mantenido debido a la ventaja evolutiva que significa tener esta proteína, que en bajas cantidades es capaz de potenciar la función de la proteína de la inmunidad de la *mccE492*.

El sistema pJAM434 es el único sistema productor y exportador de microcina en donde se observa el efecto protector de esta proteína. En este sistema, tal como se dijo antes, los genes encargados de la maduración y de la exportación de la *mccE492* (*mceJIHG orfK*) se encuentran bajo el control de un promotor que es más débil que su promotor natural. Adicionalmente, el gen *mceF* se encuentra en su forma incompleta,

posiblemente no funcional. La baja expresión de este operón se traduce en una menor producción de microcina modificada y también en una baja tasa de exportación de la microcina, lo cual explicaría la baja actividad bactericida de su microcina y la forma de sus curvas de crecimiento, y como *orfK* está codificado en este operón también estaría poco expresado.

Los experimentos realizados durante el desarrollo de esta tesis no entregaron nueva información sobre el posible efecto de la sobre-expresión de *mceD* en presencia de los sistemas productores de *mccE492*. Se sabe que MceD es una proteína citoplasmática con actividad salmoquelina esterasa, pero aparentemente su sobre-expresión no se traduce en un aumento significativo de la actividad bactericida, lo cual indicaría que en los sistemas estudiados ésta no se expresa en forma limitante.

Se trató de visualizar la sobre-expresión de las proteínas MceD, MceF y OrfK a través de geles de poliacrilamida. Como se explicó en la sección de Resultados, no se logró observar una banda que correspondiera a la proteína OrfK sobre-expresada, pesar de utilizar distintos tipos de tinción sobre los geles. Esto podría deberse a un eventual clivaje y secreción de parte de esta proteína. OrfK presenta identidad con McaA (microcina A) la cual es clivada y exportada al medio extracelular por un exportador tipo ABC, muy similar al de la *mccE492*. Si este fuera el caso, a partir de OrfK deberían producirse dos proteínas, una que correspondería a la inmunidad y estaría localizada en la membrana, y otra a la microcina la cual sería exportada. En ambos casos se trataría de proteínas pequeñas (136 y 44 aminoácidos) de difícil detección.

CONCLUSIONES

- Se construyó el plásmido pMccE492, que cuenta con todos los determinantes genéticos del sistema de la mceE492. Los sistemas que se tenían en el laboratorio contenían el gen *mceF* trunco (pJAM229), además de la repetición (pJEM15) o la inversión de un segmento (pJAM434) del “cluster”.
- La microcina purificada a partir del sistema presente en pMccE492 presenta mejor actividad bactericida sobre cepas sensibles que la obtenida a partir de los demás sistemas productores.
- La sobre-expresión de *mceD* no tiene un efecto dramático en la sobrevivencia de la cepa huésped, tenga ésta o no algún sistema productor de mceE492. Su sobre-expresión tampoco afecta de forma ostensible la actividad de la mceE492 producida.
- La sobre-expresión del gen *mceF* afecta la sobrevivencia de la cepa huésped, tanto en medio LB como en medio mínimo. Este efecto se reproduce cuando el huésped porta pJEM15, pJAM229 o pJAM434 como sistema productor de microcina. Sin embargo, este efecto es parcialmente medio-dependiente, pues es menos pronunciado en medio LB que en medio mínimo. Este efecto no se observa cuando el sistema lleva el gen completo, lo cual nos lleva a pensar que la interacción entre MceF trunca y completa sería lo tóxico.

- MceF presenta un dominio Abi, con una putativa actividad prenil proteasa. El análisis de la topología en la membrana interna de la proteína MceF completa y de la versión trunca, revela que sus orientaciones son diferentes, como así la ubicación de los aminoácidos esenciales para la función proteasa, lo cual sugiere que la versión trunca de MceF tendría afectada esta actividad.
- La sobre-expresión de *orfK* afecta severamente la viabilidad celular, tanto en presencia como en ausencia del sistema productor de *mccE492*, y este efecto tóxico es independiente del medio de cultivo.
- La expresión residual del gen *orfK* junto al sistema productor pJAM434 permite su mejor crecimiento bacteriano. Lo mismo ocurre en presencia del plásmido pJI, en donde revierte el fenotipo de pérdida de inmunidad en fase estacionaria. Aparentemente, cuando la *mccE492* se acumula en el interior de la célula y la proteína OrfK se encuentra en pequeñas cantidades, tendría un efecto sinérgico estimulando la actividad de la proteína de inmunidad MceB.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmer, B. M. G. Thomas, R.A. Larsen y K. Postle. (1995). Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB y ExbD in TonB function and stability. *J. Bacteriol.* **177**: 4742-4747.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (1992) Short protocols in molecular biology, 2nd ed. Greene Publishing Associates, New York, N. Y.
- Baeza, M. (2003). Mecanismo de inmunidad, de traslocación y de conversión tipo prión de la *mccE492*. Tesis Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Bailey, A., Ivens, A., Kingsley, R., Cottell, J., Wain, J., Piddock, L. (2010) RamA, a Member of the AraC/XylS Family, Influences Both Virulence and Efflux in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **192**: 1607-1616.
- Baquero, F. y Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 117-124.
- Bellomio, A., Vicent, P., Aruri, B., Farías, R., Morero, R. (2007). Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *J. Bacteriol.* **189**: 4180-4186.
- Bieler, S., Silva, F., Soto, C., Belin, D. (2006) Bactericidal Activity of both Secreted and Nonsecreted Microcin E492 Requires the Mannose Permease. *J. Bacteriol.* **188**: 7049-7061.
- Braun, V., Patzer, S.I. y Hantke, K. (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie.* **84**:365-380.
- Bryson K., McGuffin L.J., Marsden R.L., Ward J.J., Sodhi J.S., Jones D.T. (2005) Protein structure prediction servers at University College London. *Nucl. Acids Res.* **33** (Web Server issue): 36-38.
- Cascales, E., Buchanan, S., Duché D., Kleanthous, C., Lloubés, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., Cavard, D. (2007). Colicin Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 158-229.
- Corsini, G., Baeza, M., Monasterio, O., Lagos, R. (2002) The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochimie.* **84**: 539-544.
- Corsini, G (2005) Regulación de la expresión de la microcina E492 y su inmunidad. Tesis Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- de Lorenzo, V. (1984) Isolation and characterization of microcin E 492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Microbiol.* **139**: 72 – 75.
- de Lorenzo, V., Pugsley, A.P. (1985) Microcin E492, a low molecular weight peptide antibiotic which causes depolarization of *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob Agents Chemoter.* **27**:666-669.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S., Nes I.F. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* **178**: 4472–4483.
- Guzmán, L.M., Belin, D., Carson, M.J. y Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 4121-4130.
- Hetz, C., M. Bono, L. Barros y R. Lagos (2002). Microcin E492, a channel forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**: 2696-2701.
- Jones DT. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**: 195-202.
- Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I.F., Diep, D.B. (2010) The Abi Proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *J.Bacteriol.* **192**: 2068-2076.
- Kolter, R. y Moreno, F. (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 141-163.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X., Monasterio, O. (1993) Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**: 145–148.
- Lagos, R., Villanueva, J.E. y Monasterio O. (1999) Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J.Bacteriol.* **181**:212- 217.
- Lagos R., Baeza M., Corsini G., Hetz C., Strahsburger E., Castillo J.A., Vergara C., Monasterio O. (2001) Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol Microbiol.* **42**: 229-243.
- Lagos, R., Tello, M., Mercado, G., García, V. y Monasterio, O. (2009) Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**: 74-85.
- Larsen, R., Thomas, M., Postle, K. (1999). Protonmotive force, ExbB and ligandbound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* **31**: 1809-1824.

- Leiva, M. (2008) Importancia de la Serina-84 y el motivo Glicina-83 Serina-84 de la microcina E492 en la modificación post-traduccional y en la actividad antibacteriana. Seminario de Título para optar al título de Ingeriero en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Marín, M. (2006) La sobreproducción de los genes de la maduración de la MccE492 aumenta la actividad bactericida y retarda la formación de agregados de tipo amiloide. Seminario de título para optar al título de Ingeniera en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Mitaku S. y Hirokawa T (1999) Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Eng.* **11**: 953-957.
- Orellana, C. y Lagos, R. (1996) The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcin antagonist. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**: 297- 303.
- Pei, J. y Grishin, N. (2001) Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloproteases. *TRENDS in Biochemical Sciences.* **26**: 275-277.
- Postle, K. y Held, K.G. (2002). ExbB and ExbD Do Not Function Independently in TonB-Dependent Energy Transduction. *J. Bacteriol.* **184**: 5170-5173.
- Postle, K. y Kadner, R. J. (2003). Microrevisión. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**: 869-882.
- Pugsley A.P., Moreno F., de Lorenzo V. (1986) Microcin E492 insensitive mutant of *E.coli* K-12. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3253-3259.
- Reeves, P. (1965) The Bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **29**: 24-45.
- Riley, M. y Wertz, J. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 117-137.
- Riley, M.A. y Chavan, M.A. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria. *Bacteriocins. Ecology and Evolution.* Springer-Verlag.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Strahsburger E. (2004) Estudio de la regulación intracelular y extracelular de la actividad antibiótica de la microcina E492 por enterobactina y sus productos de hidrólisis. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV. (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* **28**: 33-36.

- Tello, M. (2006) La especificidad, exportación y procesamiento de la microcina E492 y colicina V dependen del dominio ABC de sus transportadores. Tesis Doctorado en Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Toba, M., Masaki, H., Ohta, T. (1988). Colicin E8, a DNase which indicates an evolutionary relationship between colicins E2 and E3. *J. Bacteriol.* **170**: 3237-3242.
- Wilkens, M., Villanueva, J.E., Cofre, J., Chnaiderman, J.S., Lagos, R. (1997) Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Genetics Determinants for Production of and Immunity to Microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4789-4794.