

UCH-FC  
Doc-Microb.  
= C 824  
C.1

# **REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA MICROCINA E492 Y SU INMUNIDAD**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
En cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Microbiología



Facultad de Ciencias

por

**GINO RUGGERIO CORSINI ACUÑA**

**Enero de 2005**

Director de Tesis: Dra. ROSALBA LAGOS M.

Co-Director de Tesis: Dr. OCTAVIO MONASTERIO O.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

## INFORME DE APROBACIÓN

### TESIS DE DOCTORADO

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

**GINO RUGGERIO CORSINI ACUÑA**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de Enero de 2005.

**Director de Tesis:**

Dra. Rosalba Lagos

**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

Dra. Margarita Carú

Dr. Claudio Vásquez

Dr. Víctor Cifuentes



*A la memoria de Mi Padre*



*Nothing in the world can take the place of PERSISTENCE. Talent will not; nothing is more common than unsuccessful men with talent... education will not; the world is full of educated derelicts... PERSISTENCE and determination alone are omnipotent. The slogan "press on" has solved, and always will solve, all problems*

*Calvin Coolidge*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Rosalba Lagos por su dirección, apoyo y estímulo entregado durante el desarrollo de esta tesis y por ser un ejemplo como científico.

A Octavio Monasterio quiero expresarle mi gratitud los consejos que fueron imprescindibles para realizar esta tesis.

A todos los integrantes del Grupo Microcina, Marcelo Baeza, José Antonio Castillo, Erwin Strahsburger, Gabriela Mercado, Mario Tello, Gonzalo Rojas, Verónica García, Roselyn Orellana y Claudia Estévez, gracias por su ayuda, tolerancia, compañerismo y de hacer del Laboratorio un lugar muy grato para trabajar.

Deseo agradecer también al resto de los amigos y compañeros del Laboratorio de Biología Estructural y Molecular especialmente a: Esteban Nova, Jae Yen Chin (Gloria), Maribel López, Rodrigo Díaz, Rodrigo Gallardo, César Díaz, José Jaime Albirdua y Carlos Medina.

Agradezco el apoyo que me brindaron mis padres y familia para poder realizar mis estudios de Doctorado.

A Pía, mi esposa, quiero agradecer la paciencia, apoyo y estímulo constante entregado estos años.

Agradezco a CONYCYT y en especial a la Fundación María Ghilardi Venegas por las becas otorgadas para financiar mis estudios de Doctorado.

Esta tesis fue financiada por los proyectos FONDECYT 1991017, 1020757 y 2000016



# INDICE DE MATERIAS

INDICE DE MATERIAS	v
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Bacteriocinas	1
1.2. Clasificación de las bacteriocinas	2
1.3. Microcinas	4
1.3. Organización genética de las microcinas	6
1.4. Regulación de la expresión de microcinas	6
1.5. Microcina E492	10
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
2.1. Materiales	19
2.1.1. Reactivos	19
2.1.2. Cepas bacterianas	21
2.1.3. Plasmidios y vectores	21
2.1.4. Partidores	21
2.2. Métodos	21
2.2.1. Medios de cultivo	21
2.2.2. Purificación de la microcina E492 extracelular	26
2.2.3. Purificación de la microcina E492 desde extractos celulares	27
2.2.4. Detección y cuantificación de la actividad de la microcina E492	28
2.2.5. Ensayo de sensibilidad a la microcina en placa	28
2.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para microcina E492	29
2.2.7. Marcación y preparación de la microcina E492 con fluorescamina para electroforesis en geles de poliacrilamida	29





2.2.8. Hibridación Western	30
2.2.9. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos	32
2.2.10. Electroforesis de ácidos nucleicos	33
2.2.11. Hibridación Northern	35
2.2.12. Digestión de DNA con enzimas de restricción	37
2.2.13. Desfosforilación de los extremos 5' de fragmentos de DNA	38
2.2.14. Ligación de fragmentos de DNA	38
2.2.15. Preparación de células electrocompetentes	39
2.2.16. Transformación por electroporación	39
2.2.17. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR	40
2.2.18. Transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR)	41
2.2.19. Secuenciación manual de DNA	42
2.2.20. Extensión del partidador ("primer extension")	43
2.2.21. Fusiones traduccionales	44
2.2.22. Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa	48
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>50</b>
3.1. Estudios de regulación a nivel transcripcional	50
3.1.1 Caracterización transcripcional del sistema productor de MccE492	50
3.1.2. Determinación de los sitios de inicio de la transcripción y regiones promotoras de las unidades transcripcionales	57
3.1.3. Expresión transcripcional de la MccE492 y su inmunidad	63
3.1.4. Expresión de los genes <i>mceC</i> , <i>D</i> , <i>E</i> , <i>F</i> , <i>G</i> , <i>H</i> , <i>I</i> y <i>J</i> en la cepa <i>E. coli</i> VCS257 pJAM434	65
3.1.5. Localización de la inserción del tranposón Tn5 en mutantes para la producción de MccE492 en la cepa <i>E. coli</i> VCS257pJAM434	70
3.1.6. Expresión transcripcional de los genes del sistema MccE492 en mutantes en los genes <i>mceC</i> , <i>mceD</i> y <i>mceFG</i>	72
3.2. Estudios de regulación a nivel traduccional	78
3.2.1. Construcción de fusiones traduccionales	78
3.2.2. Expresión traduccional de la microcina E492 y su inmunidad	80
3.2.3. Expresión traduccional de las proteínas de maduración MceC y Mcel	82
3.3. Efectos del hierro en la expresión de la microcina E492	90
3.3.1. Efecto del hierro en la expresión transcripcional de los genes de maduración y exportación de la microcina E492	90
3.3.2. Efecto del hierro en la expresión traduccional del gen de maduración <i>mceC</i>	91

3.3.3. Identificación en el sistema microcina E492 de regiones de unión de la proteína reguladora dependiente de hierro Fur, mediante ensayo de titulación de Fur (FurTA)	93
3.4. Estudios de la regulación de la expresión de la inmunidad	103
3.4.1. Estudio de la expresión transcripcional de los genes <i>mceA</i> y <i>mceB</i> en la cepa de <i>E. coli</i> VCS257pJl	104
3.4.2. Efecto de la MccE492 intracelular en la sensibilidad en fase estacionaria en cepas de <i>E. coli</i> que portan el plasmidio pJl	106
3.4.3. Factores que alteran la sensibilidad a la microcina en cepas de <i>E. coli</i> que portan el gen de inmunidad	109
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>114</b>
4.1. Características de la organización transcripcional de los genes involucrados en la producción de microcina E492	114
4.2. Regulación transcripcional de la expresión de la microcina E492	115
4.3. Papel de los genes de maduración ( <i>mceC</i> , <i>mceI</i> y <i>mceJ</i> ) en la producción de microcina activa	118
4.4. Papel del hierro en la expresión en la microcina E492	119
4.5. Modelo para la producción de microcina E492	122
4.6. Pérdida de inmunidad a la microcina durante la fase estacionaria de crecimiento	124
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>127</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>129</b>



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Cepas utilizadas en esta Tesis.	22
<b>Tabla 2.</b>	Plasmidios y vectores utilizados en esta Tesis.	22
<b>Tabla 3.</b>	Secuencias de los partidores empleados para amplificar mediante PCR o RT-PCR los genes sistema microcina E492.	25
<b>Tabla 4.</b>	Expresión de los genes del sistema microcina E492 mediante RT-PCR en distintos medios de cultivo y etapas de crecimiento.	66
<b>Tabla 5.</b>	Localización de la inserción del transposón Tn5 en los genes del sistema microcina E492 en mutantes no productores de Mcc E492 activa.	73
<b>Tabla 6.</b>	Fusiones traduccionales obtenidas entre los genes del sistema microcina E492 y el fago mini-Mu dII1681.	81
<b>Tabla 7.</b>	Sensibilidad a la microcina E492 de la cepa de <i>E. coli</i> VCS257 transformada con diferentes construcciones que portan genes del sistema productor de microcina.	107
<b>Tabla 8.</b>	Rol de MceA en la sensibilidad a la microcina E492 agregada exógenamente de <i>E. coli</i> VCS257(DE3) transformada con diferentes genes del sistema productor de microcina E492.	111





## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b>	Organización genética de las microcinas plasmidiales B17, C7, J25 y ColV y de las microcinas cromosomales H47 y M.	7
<b>Fig. 2.</b>	Esquema de los posibles marcos de lectura abierta (ORFs) implicados en la síntesis de la microcina E492 y su inmunidad en el plasmidio pJAM434.	13
<b>Fig. 3.</b>	Mapa físico del fago mini Mu dII1681 y representación esquemática de una fusión del gen X-MudII1681.	45
<b>Fig. 4.</b>	Construcción y selección de fusiones traduccionales en plasmidios empleando el fago mini-Mu dII1681	46
<b>Fig. 5.</b>	Transcripción de los genes <i>mceA</i> y <i>mceB</i> .	52
<b>Fig. 6.</b>	Transcripción de los genes <i>mceC</i> , <i>mceD</i> , <i>mceE</i> y <i>mceF</i> .	53
<b>Fig. 7.</b>	Acoplamiento transcripcional de los genes <i>mceGHIJ</i> determinado mediante RT-PCR.	55
<b>Fig. 8.</b>	Estudio del acoplamiento transcripcional de los genes <i>mceHI</i> en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, determinado mediante RT-PCR.	56
<b>Fig. 9.</b>	Caracterización del sitio de inicio de la transcripción de <i>mceBA</i> .	58
<b>Fig. 10.</b>	Caracterización del sitio de inicio de la transcripción de los genes <i>mceE</i> y <i>mceF</i> .	59
<b>Fig. 11.</b>	Sitio de inicio de la transcripción y región promotora de las unidades transcripcionales <i>mceC</i> , <i>mceD</i> , <i>mceJIHG</i> y <i>mceHG</i> .	61
<b>Fig. 12.</b>	Organización transcripcional de los genes implicados en la síntesis e inmunidad de la microcina E492 en el plasmidio pJAM434.	62
<b>Fig. 13.</b>	Expresión del operón <i>mceBA</i> en fase exponencial y estacionaria de crecimiento.	64
<b>Fig. 14.</b>	Estudio de la expresión transcripcional del gen <i>mceC</i> mediante RT-PCR.	67
<b>Fig. 15.</b>	Transcripción de los genes <i>mceC</i> , <i>mceI</i> y <i>mceJ</i> en fase exponencial y estacionaria de crecimiento.	69
<b>Fig. 16.</b>	Localización de la inserción del transposon Tn5 en el gen <i>mceC</i> .	71
<b>Fig. 17.</b>	Estudio de la expresión transcripcional de los genes del sistema de microcina E492 en la mutante np133 ( <i>mceC</i> ).	74
<b>Fig. 18.</b>	Estudio de la expresión transcripcional de los genes del sistema de microcina E492 en la mutante p527 ( <i>mceD</i> ).	76
<b>Fig. 19.</b>	Estudio de la expresión transcripcional de los genes del sistema de microcina E492 en la cepa JRS1 ( <i>mceF</i> <sup>-</sup> , <i>mceG</i> <sup>-</sup> ).	77

<b>Fig. 20.</b>	Expresión traduccional de la proteína MceA-LacZ y de la proteína MceB-LacZ.	83
<b>Fig. 21.</b>	Expresión traduccional de la proteína MceC-LacZ.	85
<b>Fig. 22.</b>	Estudio de la expresión transcripcional del gen <i>mceC</i> mediante hibridación Northern.	87
<b>Fig. 23.</b>	Expresión traduccional de la proteína MceI-LacZ.	89
<b>Fig. 24.</b>	Estudio del efecto del hierro en expresión de los genes <i>mceG</i> , <i>mceH</i> , <i>mceJ</i> , <i>mceI</i> y <i>mceC</i> mediante RT-PCR.	92
<b>Fig. 25.</b>	Efecto del hierro en la expresión traduccional de la proteína MceC-LacZ.	94
<b>Fig. 26.</b>	Detección de los genes del sistema microcina E492 que poseen zonas de unión de la proteína reguladora Fur mediante ensayo de titulación de Fur (FurTA).	96
<b>Fig. 27.</b>	Regiones de los genes <i>mceC</i> y <i>mceD</i> que posee las posibles cajas para la unión de la proteína Fur.	99
<b>Fig. 28.</b>	Regiones de los genes <i>mceE</i> y <i>mceF</i> que posee las posibles cajas para la unión de la proteína Fur.	100
<b>Fig. 29.</b>	Análisis de las posibles cajas de unión de la proteína Fur de los genes <i>mceC</i> , <i>mceD</i> , <i>mceE</i> y <i>mceF</i> mediante ensayo de titulación de Fur (FurTA).	102
<b>Fig. 30.</b>	Estudio de la expresión transcripcional de los genes <i>mceA</i> y <i>B</i> en la cepa de <i>E. coli</i> VCS257pJI.	105
<b>Fig. 31.</b>	Modelo de la síntesis de microcina E492.	123

## ABREVIATURAS

<b>BCIP</b>	: 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
<b>bp</b>	: pares de bases
<b>BSA</b>	: albúmina de suero bovino
<b>CIAP</b>	: fosfatasa alcalina de intestino de ternero
<b>DEPC</b>	: dietilpirocarbonato
<b>dNTPs</b>	: desoxinucleótidos trifosfato
<b>DMS</b>	: dimetilsulfóxido
<b>DTPA</b>	: ácido dietilentriaminopentaacético
<b>EDTA</b>	: ácido etilendiaminotetracético
<b>IPTG</b>	: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>kb</b>	: miles de pares de bases
<b>LB</b>	: medio de cultivo Luria
<b>Mcc</b>	: microcina
<b>MOPS</b>	: ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico
<b>M9</b>	: medio mínimo salino
<b>M9+G</b>	: medio mínimo salino suplementado con glucosa
<b>M9+G+C</b>	: medio mínimo salino suplementado con glucosa y citrato
<b>NBT</b>	: nitro blue tetrazolium
<b>DO</b>	: densidad óptica
<b>ONPG</b>	: o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>PAGE</b>	: electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PCR</b>	: reacción de polimerasa en cadena
<b>RT</b>	: transcripción reversa
<b>SDS</b>	: dodecil sulfato de sodio
<b>SSPE</b>	: solución de salina de fosfato de sodio y EDTA
<b>TCA</b>	: ácido tricloroacético
<b>TEMED</b>	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
<b>Tricina</b>	: N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
<b>Tris</b>	: tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>UV</b>	: ultravioleta
<b>X-gal</b>	: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido

## RESUMEN

La microcina E492 es un antibiótico peptídico de 7,9 kDa producido por *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Esta microcina actúa mediante la despolarización de la membrana citoplasmática de bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, mediante la formación de canales iónicos. Mediante estudios de clonamiento y expresión en *E. coli*, se estableció que los determinantes genéticos, implicados en la producción de microcina activa están contenidos en un segmento de DNA cromosomal de *Klebsiella pneumoniae* RYC492 de 13 kb. Una característica particular es que la microcina E492 activa se produce en fase exponencial de crecimiento a diferencia del resto de las microcinas que se producen en fase estacionaria. Además, la producción de microcina activa es inhibida por la presencia de enteroquelina producida por la falta de hierro en el medio.

Mediante el análisis de la secuencia de las posibles regiones promotoras de los genes necesarios para la producción de microcina se estableció que varios de ellos poseían la presencia de secuencias de consenso para la unión de la proteína Fur, lo cual podría indicar que estos genes estarían regulados por hierro.

La inmunidad en algunas mutantes por delección que presentan un fenotipo no productor de microcina activa sólo ocurre en fase exponencial de crecimiento.

La regulación de la microcina y su inmunidad parece ser bastante compleja, pues la producción de microcina activa dependería del producto de otros

genes, y posiblemente la regulación operaría simultáneamente en varios niveles: transcripcional, traduccional y post-traduccional.

En esta tesis se estudió la expresión a nivel transcripcional y traduccional de los genes implicados en la síntesis de microcina activa y de su inmunidad en diferentes condiciones de cultivo.

A partir de los estudios de regulación a nivel transcripcional se estableció que la organización del sistema productor de microcina E492 en el plasmidio pJAM434 está compuesto por 10 genes, que están organizados en 7 unidades transcripcionales (*mceBA*, *mceC*, *mceD*, *mceE*, *mceF*, *mceHG* y *mceJIHG*). Empleando la técnica de extensión del partidador se estableció cuales son las regiones promotoras funcionales de cada una de las unidades transcripcionales del sistema microcina E492. Se determinó que el operón que agrupa a los genes de la microcina y de la inmunidad se transcribe tanto en fase exponencial de crecimiento como en fase estacionaria, y que el mRNA de este operón se traduce en ambas fases de crecimiento.

Sólo los genes de maduración *mceI* y *mceJ* regulan la expresión de microcina activa en fase estacionaria pues presentaron una expresión diferencial clara no transcribiendo en fase estacionaria y por tanto bajando la producción de microcina activa. También se detectó que el gen de maduración *mceC* disminuye aproximadamente 3 veces sus niveles de expresión en fase estacionaria de crecimiento.

Se estableció que el hierro no tiene ningún efecto en la expresión de los mRNAs *mceAB*, *mceJIHG* ó *mceGH*, y sólo tiene efecto sobre la expresión de

*mceC*. Este efecto no sería a través del represor Fur, pues mediante ensayos *in vivo* de titulación de este regulador se encontró que *mceC* no posee una región funcional para la unión de este represor.

Se estableció que el fenotipo de sensibilidad a la microcina en fase estacionaria observado en cepas que poseen los genes *mceABCDE* no está asociado a una variación en la expresión del mRNA del gen de inmunidad en esta fase de crecimiento, sino más bien a la producción de microcina por la propia cepa, la cual, no puede exportarse por carecer de los genes de exportación y por otro lado a la presencia de alguna combinación de los genes *mceC*, *mceD* y *mceE*. La presencia de *MceF* acentuaría la pérdida de inmunidad pues la construcción *mceABCDEF* es sensible en ambas fases de crecimiento.

## ABSTRACT

The microcin E492 is a peptide antibiotic of 7.9 kDa produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492. This microcin acts by means of the depolarization of the cytoplasmic membrane of Gram-negative bacteria like *E. coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Klebsiella*, forming ionic channels. With studies involving cloning and expression in *E. coli*, it was established that the genetic determinants, involved in the active microcin production, are contained in a 13 kb chromosomal segment of DNA in *Klebsiella pneumoniae* RYC492.

The active microcin E492 is produced in exponential phase of growth unlike the rest of the microcins that are produced in stationary phase. In addition, the production of active microcin is inhibited by the presence of enterochelin. The enterochelin is produced by the lack of iron in culture media.

Analysing the possible promoter regions of the genes involved in microcin production, we established that several had consensus sequences of Fur protein binding sites, which could indicate that these genes would be regulated by iron. In some deletion mutants that present a nonproducing phenotype of active microcina, the immunity happens in exponential phase of growth.

The regulation of the microcin and its immunity seems to be quite complex, because the production of active microcin would depend on the product of other genes, and possibly the regulation would operate simultaneously in several levels: transcriptional, translational and post-translational.

In this thesis we studied the transcriptional and translational expression of genes involved in the synthesis of active microcin and its immunity in different culture conditions.

From the studies of transcriptional regulation we determined that the producing system of microcin E492 in the plasmid pJAM434 is made up of 10 genes, which are organized in 7 transcriptional units (*mceBA*, *mceC*, *mceD*, *mceE*, *mceF*, *mceHG* and *mceJIHG*). Using the primer extension technique we determined the functional promoter regions of each of these transcriptional units of the microcin E492 system.

We also determined that the operon that he groups the microcin and immunity genes is transcribed as much in exponential phase of growth like in stationary phase, and that mRNA of this operon is translated in both phases of growth.

Only the maturation genes *mceI* and *mceJ* regulates the expression of active microcin in stationary phase because they presented a clear differential expression not transcribing in stationary phase and therefore lowering the production of active microcin. Also we detected that the maturation gene *mceC* expression level diminishes approximately 3 fold stationary phase of growth.

It was determined that iron does not have any effect over the expression of mRNAs *mceAB*, *mceJIHG* or *mceGH*, and only does over the expression of *mceC*. This effect would not be mediated by Fur repressor, because we determined by *in vivo* test of Fur titulation that *mceC* gene does not have a Fur functional binding site.



The phenotype of sensibility to microcin observed in stationary phase in strains that have *mceABCDE* genes it is not associated to a variation in mRNA expression of immunity gene in this phase of growth. Instead, this phenotype is associated with the microcin produced by the own strain, which cannot be exported because of the lack of the exporter genes and to the presence of some combination of the genes *mceC*, *mceD* and *mceE*. The presence of *MceF* would accentuate the lost of immunity because the construction *mceABCDEF* is sensible to microcin in both phases of growth.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Bacteriocinas

Los microorganismos producen un extraordinario arsenal de sustancias químicas que son empleadas como sistemas de defensa y de adaptación al medioambiente. Este arsenal incluye a los antibióticos clásicos, fundamentales en la terapéutica médica, productos metabólicos como el ácido láctico producido por lactobacilos, agentes líticos como las lisozimas, numerosos tipos de exotoxinas proteicas y las bacteriocinas, proteínas con actividad biológica antibacteriana (Riley y Wertz, 2002).

Las bacteriocinas son proteínas o péptidos de síntesis ribosomal producidos por microorganismos pertenecientes principalmente al dominio Bacteria. Sólo se ha caracterizado hasta el momento un sólo tipo de bacteriocinas producidas por microorganismos del dominio Arquea, las halocinas (Riley y Wertz, 2002). Las bacteriocinas fueron detectadas por primera vez por André Gratia en 1925, quien observó la inhibición del crecimiento de algunas cepas de *E. coli* por la acción de un compuesto antibacteriano que denominó colicina V, el cual era liberado al medio extracelular por una cepa virulenta de *E. coli* (*E. coli* V) (Gratia, 1925; Oscáriz y Pisabarro, 2001). La producción de péptidos antibióticos es una estrategia de defensa contra las bacterias que no es exclusiva de los microorganismos sino también está presente en plantas y animales. Por ejemplo, los animales producen péptidos antimicrobianos como megaininas y defensinas (Zasloff, 1987; Lehrer y cols., 1993) y las plantas

secretan defensinas vegetales denominadas tioninas (Broekaert y cols., 1997). Si bien estos agentes antimicrobianos difieren significativamente a nivel de su estructura primaria, muchos de ellos poseen características comunes como estabilidad térmica, naturaleza hidrofóbica y catiónica y bajo peso molecular. Más aun, todos estos péptidos son codificados por genes estructurales y son traducidos empleando la maquinaria ribosomal.

## **1.2. Clasificación de las bacteriocinas**

Las bacteriocinas han sido agrupadas utilizando diversos criterios como el organismo que las produce, el tamaño molecular, la estructura química o el modo de acción. Estas diversas clasificaciones han dado lugar a diferentes denominaciones como microcina, colicina, lantibiótico, tiolantibiótico, cistibiótico, etc. En general podemos clasificar las bacteriocinas en dos grandes grupos: las producidas por bacterias Gram negativas y las producidas por bacterias Gram positivas.

Según el criterio que se desee emplear existen varias maneras de agrupar o clasificar las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas. Jack y cols. (1995) consideran la presencia de enlaces disulfuro y monosulfuro y el espectro de acción que posee, y en base a este criterio clasifican a las bacteriocinas producidas por los organismos Gram positivos en cuatro grupos: (1) **lantibióticos**, antibióticos que contienen aminoácidos modificados postraduccionalmente como deshidroalanina, deshidrobutirina, lantionina; (2) **cistibióticos**, antibióticos que contienen al menos un puente disulfuro esencial

para su actividad; (3) **tiolbióticos**, compuestos que presentan sólo un residuo -SH el cual debe estar en forma reducida para que el antibiótico sea activo y (4) antibióticos sin residuos cisteína. En cambio Klaenhammer (1993) emplea un criterio basado principalmente en las propiedades que presentan estos antibióticos como su masa molecular, termoestabilidad, sensibilidad enzimática, presencia de aminoácidos modificados postraduccionalmente y modo de acción. En base a este criterio podemos clasificar a las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram positivas en 4 grupos: (1) Bacteriocinas clase I, este grupo comprende a los lantibióticos y puede dividirse en dos subgrupos en base a la carga y estructura del compuesto. (2) Bacteriocinas clase II, que agrupa a los péptidos termoestables con masa molecular inferior a 10 kDa que no presentan aminoácidos modificados. (3) Bacteriocinas clase III, que está conformado por antibióticos proteicos termolábiles que poseen masas moleculares superiores a 30 kDa. y (4) Bacteriocinas clase IV conformado por glicoproteínas y lipoproteínas que poseen actividad bactericida.

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas, en tanto, se clasifican según la masa molecular que estas poseen. Podemos distinguir dos tipos de bacteriocinas en los microorganismos Gram negativos: las que poseen una masa superior a 10 kDa denominadas **colicinas** y las que poseen una masa inferior a 10 kDa llamadas **microcinas** (Baquero y Moreno, 1984).

Las colicinas fueron las primeras bacteriocinas descubiertas y las más exhaustivamente estudiadas corresponden a las producidas por cepas de *E. coli*, lo cual dió origen a su nombre (**colicinas**). Los genes para la producción

de estas colicinas se encuentran localizados en plasmidios y se caracterizan por presentar el gen de colicina, que codifica para la toxina; un gen de inmunidad, que codifica para la proteína que le confiere una protección específica a la célula productora al unir e inactivar específicamente a la toxina; y el gen de lisis, el cual codifica para una proteína involucrada en la liberación de la colicina a través de la lisis de la célula productora (Riley y Wertz, 2002). La producción de colicinas está regulada por el sistema SOS y por ende, son producidas bajo condiciones de estrés de la célula (Riley y Wertz, 2002).

### **1.3. Microcinas**

El término microcina fue empleado por primera vez por Asensio y cols. (1976) para diferenciar a un grupo de antibióticos de naturaleza proteica producidos por bacterias de origen fecal y que podían difundir a través de una membrana de celofán, de las bacteriocinas convencionales producidas por las bacterias gran negativas.

Las microcinas son una familia de sustancias antibióticas producidas principalmente por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas bacteriocinas presentan actividad bacteriostática o bactericida sobre especies estrechamente relacionadas con las bacterias que las producen, y a diferencia de la mayoría de las colicinas, las microcinas poseen bajo peso molecular (inferior a 10 kDa), son resistentes a condiciones extremas de pH y temperatura, son resistentes a algunas proteasas, son solubles en metanol y no son inducibles por el sistema SOS (Kolter y Moreno, 1992).

Casi todas las microcinas que se han descrito en la literatura son producidas por cepas de *Escherichia coli*, a excepción de la microcina E492 que es producida por *Klebsiella pneumoniae* (de Lorenzo, 1984) y la microcina SF608 producida por la cianobacteria *Microcystis sp.* (Banquer y Carmely, 1999).

Todas la microcinas descritas hasta el momento se sintetizan en fase estacionaria de crecimiento, siendo la única excepción la microcina E492, la que se produce mayoritariamente en fase exponencial de crecimiento (de Lorenzo y cols., 1984).

Los genes implicados en la expresión de diversas microcinas están organizados en operones, constituídos al menos por tres tipos de genes: el gen de la microcina, el de la inmunidad y el gen responsable de la salida de la microcina al exterior de la célula (Kolter y Moreno, 1992). La localización de estos genes en muchas de las microcinas es plasmidial (MccC7, MccB17, MccD93, MccJ25, Col V, Mcc24), en tanto para la microcina H47 de *E. coli* (Gaggero y cols., 1993) y la microcina E492 de *K. pneumoniae* (de Lorenzo y Pugsley, 1985; Wilkens y cols., 1997) estos genes se encuentran localizados en el cromosoma bacteriano. También se han encontrado cepas de *E. coli* que producen varias microcinas y los genes para la producción de estas microcinas también se localizan en el cromosoma bacteriano. Este es el caso de la cepa de *E. coli* DSM6601 que produce microcina M y microcina H47 (Patzner y cols., 2003). Otro ejemplo es la cepa de *E. coli* LR05 que produce 4 microcinas: MccL, MccJ25, MccD93 y MccB17 (Sablé y cols., 2003).

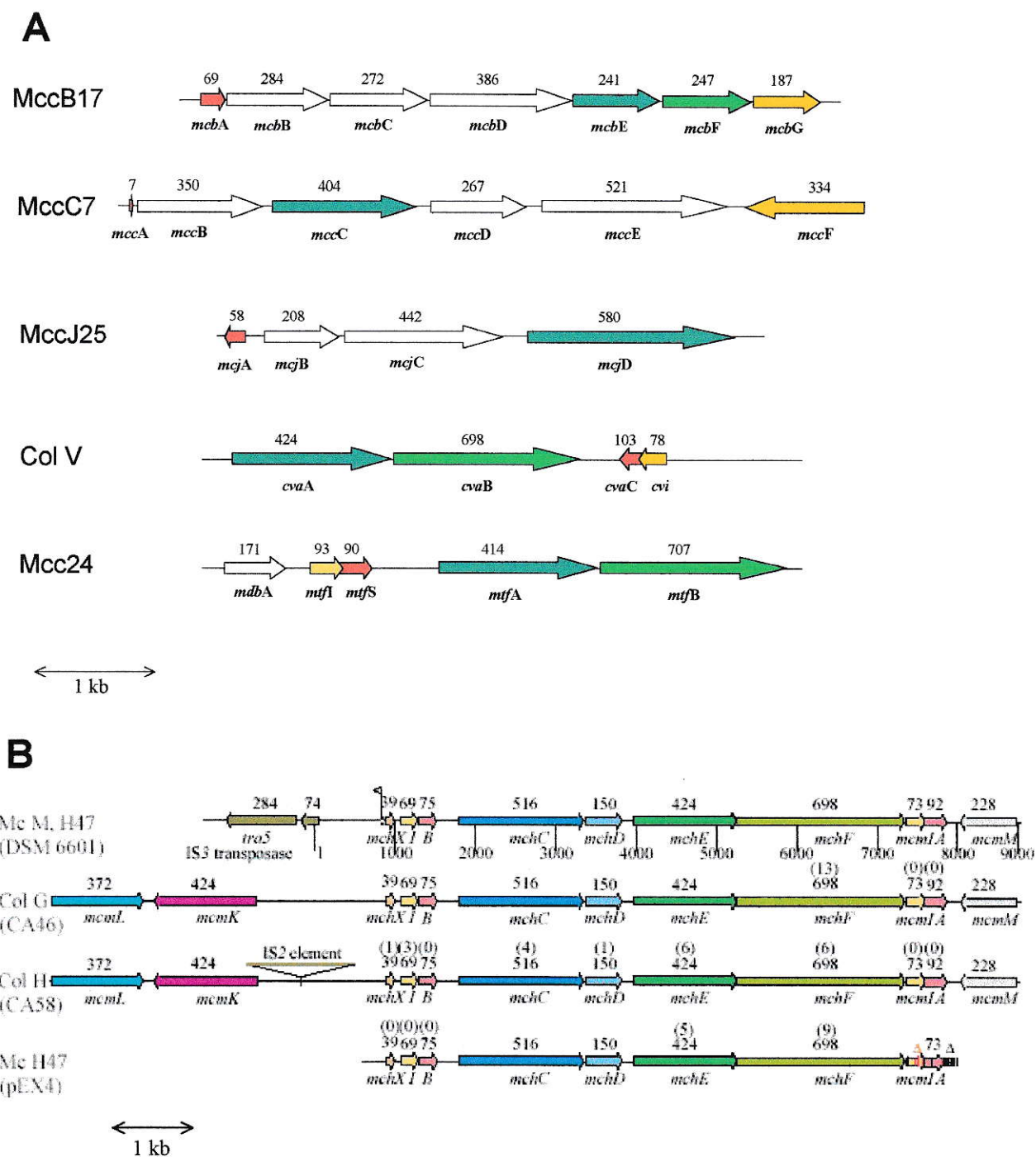
### **1.3. Organización genética de las microcinas**

La organización genética de las microcinas codificadas por plasmidios como las MccC7, MccB17, Mcc24 y colicina V es bastante compacta, agrupando hasta 7 genes en un fragmento de DNA de 6 kb (Kolter y Moreno, 1992). La colicina V presenta 4 genes organizados en 2 unidades transcripcionales (Fig. 1). La primera unidad agrupa a los genes que codifican para el sistema exportador y la segunda reúne los genes que codifican para la colicina V y para la proteína de inmunidad (Boyer y Tai, 1998). El sistema para la microcina 24 también posee 4 genes (Fig. 1): los 2 genes implicados en exportación, el gen que codifica para la microcina y el que codifica para la proteína de inmunidad.

Los determinantes genéticos de la microcina H47, que es de origen cromosomal, están localizados en una región de DNA de aproximadamente 10 kb, con una región silente interna de 3 kb que al parecer no está implicada en el sistema de producción (Gaggero y cols., 1993). En el fragmento de DNA de 10 kb, se ubican 6 genes para producción del antibiótico y uno para la producción de la inmunidad, con una compleja organización transcripcional (Gaggero y cols., 1993)(Fig. 1).

### **1.4. Regulación de la expresión de microcinas**

La regulación de la expresión de las microcinas es un fenómeno complejo. A modo de ejemplo podemos señalar la microcina B17, que se produce cuando las células terminan su crecimiento exponencial y entran en fase estacionaria.



**Fig. 1. Organización genética de las microcinas plasmidiales B17, C7, J25 y ColIV (A) y de las microcinas cromosomales H47 y M (B).** Los números indican la cantidad de residuos aminoacídicos codificada por cada gen. Los genes que codifican para la microcina están en color rojo. Los genes de inmunidad en color amarillo y los genes requeridos para la secreción de la microcina están en color verde.



Su sistema está constituido por 7 genes (*mcbABCDEFG*) (Moreno y cols., 1992). Para estudiar la regulación dependiente de la fase de crecimiento en este sistema se realizaron fusiones de los diferentes genes de la microcina con el gen *lacZ* y se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de estas fusiones a diferentes tiempos de crecimiento (Genilloud y cols., 1989). Los putativos promotores de los genes se determinaron empleando ensayos de protección a nucleasa S1 y extensión del partidor, encontrándose 3 promotores (Genilloud y cols., 1989). El promotor principal ( $P_{mcb}$ ) se localiza río arriba del gen *mcbA* y transcribe a todos los genes del sistema en una misma dirección, el segundo promotor ( $P_2$ ) se ubica en *mcbC* y es responsable de una expresión basal baja de *mcbD*, y el tercer promotor ( $P_3$ ) se ubica en *mcbD* en orientación divergente empezando en *mcbD* y extendiéndose a través de *mcbC*. La transcripción de los genes proximales (*mcbA-mcbC*) aumenta al aproximarse a la fase estacionaria de crecimiento, mientras que la transcripción de los otros genes se mantiene al mismo nivel (Genilloud y cols., 1989). La actividad de las fusiones *mcbA-lacZ* no sólo es regulada por la fase de crecimiento sino que también por la velocidad de crecimiento y la naturaleza del medio de cultivo (Moreno y cols., 1992). La determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones ha permitido establecer que el promotor  $P_{mcb}$  es muy activo en medio M63 y LB durante fase estacionaria (aproximadamente 800 a 1000 unidades Miller), pero su actividad durante fase exponencial es mucho menor en medio LB (10 a 20 unidades Miller) que en medio M63 (150 a 200 unidades Miller) (Moreno y

cols.,1992). Estos resultados indican que estos promotores son regulados en forma fina por diferentes factores fisiológicos. El promotor  $P_{mcb}$  también es regulado por activadores transcripcionales como OmpR que estimula tanto la transcripción a nivel basal durante la fase exponencial como la inducción durante la fase estacionaria de crecimiento (Kolter y Moreno, 1992) y el factor de integración del huésped (IHF) formado por el producto de los genes *himA* y *himD*, que actúa durante la fase estacionaria (Moreno y cols., 1992). No se ha detectado actividad de MccB17 en mutantes *himA* y *himD*. La regulación de la transcripción de  $P_{mcb}$  también es afectada por inhibidores como el producto del gen *mprA* que actúa como represor durante la fase exponencial de crecimiento (del Castillo y cols., 1990) y el producto del gen *bgIY*, una proteína similar a la histona H1 que regula la expresión de genes bacterianos involucrados en diferentes funciones (Moreno y cols., 1992).

Otro ejemplo de regulación de expresión de microcinas es el de la colicina V, la cual no es inducible por el sistema SOS y que está constituida por 4 genes *cvaABC* y *cvl*. La transcripción del sistema de ColV es inducida por la limitación de hierro en la fase estacionaria bajo el control de la proteína reguladora Fur (Kolter y Moreno, 1992). Los dos promotores existentes en este sistema se caracterizaron empleando ensayo de protección a nucleasa S1, extensión del partidor y fusiones transcripcionales (Boyer y Tai, 1998). El primer promotor está ubicado río arriba del gen *cvaA* y transcribe al operón *cvaAB* y el segundo promotor ubicado río arriba del gen *cvl* transcribe a los genes *cvl* y *cvaC*. Ambos promotores son transcripcionalmente regulados por hierro induciéndose

su transcripción al final de la fase logarítmica de crecimiento al ir desapareciendo este metal. La proteína Fur, un regulador transcripcional dependiente de hierro, actuaría como un represor de estos promotores, uniéndose a las cajas FB-A1 y FB-A2 ubicadas en la región promotora de *cvaA* y a la caja FB-1 ubicada en la región promotora del gen *cvi*, que poseen secuencias consenso de unión a la proteína Fur (Boyer y Tai, 1998). Fur estaría unido al promotor cuando existe hierro en el medio y se liberaría de él cuando este metal empieza a escasear.

### **1.5. Microcina E492**

La microcina E492 es producida por la cepa de *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Esta microcina es un polipéptido de 7.886 Da. (Lagos y cols., 2001), que presenta actividad bactericida sobre otras cepas Gram-negativas como *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Erwinia* (de Lorenzo, 1984).

La microcina E492 actúa sobre la célula blanco produciendo una despolarización de la membrana citoplasmática (de Lorenzo y Pugsley, 1985), la cual sería inducida por la formación de canales iónicos, ya que la microcina E492 es capaz de formar canales iónicos en bicapas lipídicas (Lagos y cols., 1993; Wilkens y cols., 1997). Para ejercer su acción la microcina E492 necesita internalizarse a través de un receptor ubicado en la membrana externa y un translocador ubicado en la membrana interna. Para este proceso serían necesarias las proteínas TonB y ExbB (Pugsley y cols., 1986), las cuales se

ubican en la membrana citoplasmática y participan en todos los sistemas de captación de hierro conocidos en *E. coli* (Silver y Walderhaug, 1992).

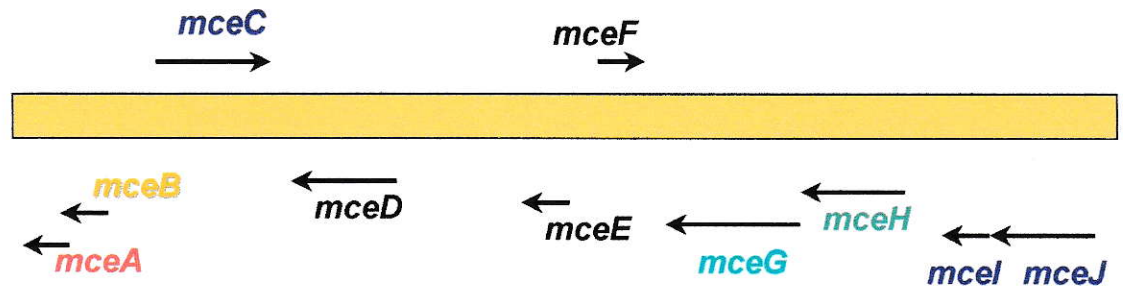
Como se mencionó anteriormente, la microcina E492 activa se produce mayoritariamente en fase exponencial de crecimiento (de Lorenzo y cols., 1984; Orellana y Lagos, 1996) a diferencia de las demás microcinas descritas hasta el momento, que se sintetizan en fase estacionaria de crecimiento (Kolter y Moreno, 1992).

La actividad de la microcina E492 está regulada por la presencia de un antagonista, la enteroquelina o enterobactina (Orellana y Lagos, 1996), que produce una disminución de la actividad de la microcina. La síntesis del antagonista es inducida en fase estacionaria, cuando las células son privadas de hierro (de Lorenzo y cols., 1984). También se ha descrito que diferentes condiciones de cultivo afectan la producción y actividad de la microcina E492 (de Lorenzo, 1984; de Lorenzo y cols., 1984; Orellana y Lagos, 1996).

Mediante estudios de clonamiento y expresión en *E. coli*, se estableció que los determinantes genéticos implicados en la síntesis, maduración, procesamiento, exportación e inmunidad de la microcina E492 están contenidos en un segmento de DNA cromosomal de 13 kb (Wilkins y cols., 1997). Las propiedades bioquímicas y electrofisiológicas de la microcina E492 producida en *E. coli* son indistinguibles de la microcina sintetizada en *K. pneumoniae* RYC492, siendo también producida su forma activa en fase exponencial de crecimiento (Wilkins y cols., 1997), de modo que es posible validar los experimentos realizados en ambos sistemas.

El segmento de DNA que contiene los determinantes genéticos necesarios para la producción de microcina E492 activa es el de mayor tamaño en comparación a otros sistemas descritos que producen microcinas (Patzner y cols., 2003). Mediante experimentos de mutagénesis por delección con enzimas de restricción, se estableció que gran parte de este fragmento de 13 kb de origen cromosomal es necesario para la producción de la microcina y su inmunidad (Wilkens y cols., 1997). Mediante mutagénesis al azar empleando el transposón Tn5 se ha podido identificar que el sistema de la microcina E492 está compuesto por entre 6 a 8 cistrones, además del gen estructural de la microcina, que son necesarios para producir microcina activa (Lagos y cols., 2001). Esto se correlaciona con el análisis de la secuencia del fragmento de 13 kb en la cual se detectó la existencia de 10 posibles marcos de lectura abierta (ORF) implicados en la expresión de la microcina E492 y su inmunidad y que se resumen en la Fig. 2.

El gen *mceA* corresponde al gen estructural de la microcina, el cual fue identificado mediante microsecuenciación del producto génico (Lagos y cols., 1999). El producto de este gen sería sintetizado como un precursor de 103 aminoácidos el cual sería procesado entre los residuos 19 y 20, en un motivo de tipo doble glicina originando una proteína madura de 7.886 Da que no posee modificaciones post-traduccionales (Lagos y cols., 2001).



**mceA**: microcina E492

**mceB**: inmunidad

**mceC**: homóloga a glicosil transferasa

**mceD**: homóloga enteroquelina esterasa

**mceE**: proteína 114 aa, sin homólogo

**mceF**: proteína de membrana

**mceG**: exportador tipo ABC

**mceH**: proteína accesoria de secreción

**mceI**: proteína 163 aa (aciltransferasa)

**mceJ**: proteína 524 aa, sin homólogo

Fig. 2. Esquema de los posibles marcos de lectura abierta (ORFs) implicados en la síntesis de la microcina E492 y su inmunidad en el plasmidio pJAM434. Las flechas negras indican la dirección de la transcripción de cada ORF y los diferentes niveles en que se ubican las flechas representan los diferentes marcos de lectura en que son traducidos a partir de la secuencia de DNA

El gen *mceB* codifica para una proteína de 95 aminoácidos que corresponde a la de inmunidad. Se demostró que este gen codifica para la inmunidad al obtener un fenotipo resistente a microcina cuando células sensibles fueron transformadas con un vector de expresión que lleva clonando exclusivamente el fragmento correspondiente a este gen (Lagos y cols., 1999).

El gen *mceC* codifica para una proteína de 370 aminoácidos que es homóloga (76% identidad, 85% similitud) a la proteína codificada por el gen *iroC* de *Salmonella enterica* serotipo Typhi (GenBank U62129), una glicosil transferasa, la cual fue identificada por homología a partir de una glicosil transferasa caracterizada experimentalmente que está involucrada en la síntesis de los antibióticos urdamicina A en *Streptomyces fradiae* (Faust y cols., 2000) y daunorubicina en *Streptomyces peucetius* (Otten y cols., 1995). La proteína MceC está involucrada en el proceso de maduración de la microcina, pues un mutante por transposición en el gen *mceC* con el transposón Tn5 produce microcina E492 que carece de actividad bactericida (Lagos y cols., 2001).

El gen *mceD* codifica para una proteína de 414 aminoácidos, homóloga (54% identidad, 67% similitud) a una enteroquelina esterasa (*iroD*) de *Salmonella enterica* serotipo Typhi (Baumler y cols., 1998). El producto del gen *mceD* podría tener un papel en la interacción de la enterobactina o moléculas similares con la microcina E492.

El gen *mceE* codifica para una proteína de 114 aminoácidos y no tiene homólogo identificable. Esta proteína puede tener algún papel regulatorio ya

que una región de la secuencia de esta proteína presenta un grado de similitud con proteínas regulatorias que se unen al DNA.

El gen *mceF*, cuyo producto es una proteína de 179 residuos, posee homología (44% identidad, 63% similitud) a una proteína hipotética de 24,3 kDa de función desconocida codificada por un plasmidio de la cepa de *E. coli* R1 (Bravo y cols., 1987). Un análisis del perfil de hidrofobicidad de la secuencia de MceF identifica a esta proteína como una proteína de membrana.

El gen *mceG* codifica para una proteína de 698 aminoácidos homóloga (87% identidad, 92% similitud) al producto del gen *cvaB*, un exportador del tipo ABC, que participa en la exportación de la colicina V (Gilson y cols., 1990). Este tipo de exportador requiere de una proteína accesoria para la secreción.

El gen *mceH* codifica para una proteína de 413 aminoácidos, homóloga al producto del gen *cvaA* (91% identidad, 94% similitud) que corresponde a la proteína accesoria necesaria para la secreción de la colicina V.

El gen *mceI* codifica para una proteína de 163 aminoácidos. El análisis de la secuencia de MceI indica que posee homología con aciltransferasas del sistema de citolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y del sistema de leucotoxina de *Pasteurella hemolítica* (Lagos y cols., 2001).

El gen *mceJ* codifica para una proteína de 524 residuos que no posee homólogos conocidos hasta el momento.

Se ha determinado que para la expresión de microcina activa se requiere de casi todos los determinantes genéticos codificados en el segmento de 13 kb descrito anteriormente (Wilkens y cols., 1997) y que sólo se sintetiza microcina



activa en fase exponencial de crecimiento (de Lorenzo y cols., 1984). El hecho que la microcina no se sintetiza en fase estacionaria, podría deberse ya sea a, que no se transcriba su gen o que no se traduzca su mensajero, o porque la microcina sintetizada en fase estacionaria no es madurada post-traduccionalmente por las otras proteínas del sistema, o bien porque la actividad de la microcina es inhibida durante esta fase de crecimiento.

Wilkins y cols. (1997) determinaron que la expresión de la inmunidad no es controlada por el factor sigma de fase estacionaria, RpoS. Además se determinó mediante espectrometría de masa que la microcina E492 no es modificada post-traduccionalmente (Lagos y cols., 2001). También se detectó que la microcina se produce en fase estacionaria de crecimiento pero es inactiva (Corsini y cols., 2002).

Por otra parte, un análisis de la secuencia de las posibles regiones promotoras de todos los genes que integran el sistema, revela la presencia de secuencias consenso para la unión de la proteína Fur en los genes *mceC*, *mceD*, *mceE*, *mceF*, *mceH* y *mceI*, sugiriendo que estos son buenos candidatos para una posible regulación por hierro en el medio dependiente de la proteína reguladora Fur. Otro antecedente a considerar en relación a la regulación por hierro es que la actividad de la microcina es regulada por la presencia de un antagonista, la enteroquelina o enterobactina, un quelante de Fe (III), el cual es secretado al medio extracelular por la misma cepa productora de microcina, principalmente en fase estacionaria (Orellana y Lagos, 1996).

En cuanto a la inmunidad ésta se expresa en ambas fases de crecimiento. Cepas de *E. coli* transformadas con el fragmento de 13 kb (JAM434) son inmunes tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, la cepa que portan el plasmidio pJI, es inmune a la microcina sólo en fase exponencial (Wilkins y cols., 1997). El plasmidio pJI carece de algunos de los genes de maduración y de los genes de exportación del sistema y no producen microcina activa. El fenotipo de sensibilidad a la microcina en fase estacionaria en la cepa que porta el plasmidio pJI podría ser consecuencia que no hay transcripción o traducción del gen de inmunidad, o porque la proteína de inmunidad se inactiva en fase estacionaria debido a la falta de algún gen del sistema en esta construcción.

Del análisis de estos antecedentes, se desprende que la regulación de la microcina E492 y su inmunidad es compleja y dicha regulación estaría ocurriendo simultáneamente a distintos niveles. Esto nos lleva a plantear como hipótesis de trabajo que la expresión de la microcina E492 activa es regulada a nivel: (1) transcripcional, de manera directa inhibiendo la expresión del gen *mceA* o indirecta inhibiendo la expresión de alguno o algunos de los otros genes del sistema. (2) traduccional, impidiendo que se traduzca la microcina u otras proteínas del sistema necesarias para la producción de microcina activa y su inmunidad. (3) post-traduccional, alterando el proceso de maduración de la microcina.

En este trabajo nos abocamos como objetivo general a determinar como es la regulación de la expresión de la microcina E492 activa y su inmunidad, cuales son los eventos que ocurren en los diferentes niveles de expresión y sus posibles moduladores, y cuales son los genes implicados en este fenómeno.

Si bien el presente estudio es específico para la expresión de la microcina E492, estudiar nuevos mecanismos de regulación de la expresión génica puede tener proyecciones sobre otros sistemas. Cabe recordar que el factor sigma S fue descubierto cuando se estudiaba la regulación de la expresión de la microcina B17 (Bohannon y cols, 1991).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIALES.

#### 2.1.1. Reactivos.

Enzimas de restricción, *Taq* DNA polimerasa, Elongasa, desoxinucleótidos, estándar de peso molecular  $\lambda$ *Hind*III, 1 kb DNA ladder, CIAP, kit CONCERT™ Rapid PCR Purification System, PCR dsDNA Cycle Sequencing System utilizados en esta Tesis se compraron en Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA.

T4 DNA ligasa se compró en Fermentas Inc., Hanover, M.D., USA.

Ribonucleasa A, fluorescamina, anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, bis-acrilamida, BSA, SDS, azida de sodio, fosfato di-ácido de potasio, azul brillante de Coomassie, estándar de bajo peso molecular para péptidos, glucosa, Tween 20, tricina, L-aminoácidos se compraron a Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

DNasa I se obtuvo de Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania.

Transcriptasa reversa M-MLV se compró en Promega Corporation Madison, WI, USA.

Membranas de nitrocelulosa para Western blot y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP se obtuvieron en Amersham Biotech Ltda UK.

Membranas de nitrocelulosa VSWP02500 para microdialisis de ácidos nucleicos se obtuvieron en Millipore, USA.

Acilamida, persulfato de amonio, TEMED y cubetas de electroporación se obtuvieron en BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA.

Azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, carbonato ácido de sodio, PNPP, TCA, cloruro de calcio, se obtuvieron de Merck, Darmstadt, Alemania.

Cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio hexahidratado, dimetilformamida, cloruro de guanidinio, TRIS, glicina, glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, BSA, MOPS, DEPC, formamida,  $\beta$ -mercaptoetanol, citrato de sodio, marcador de proteína preteñido, 100 bp DNA ladder, se adquirieron en Winkler, Santiago, Chile.

Cloruro de potasio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio se adquirieron en Fluka Chemie AG, Messerschmittstr, Suiza.

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

Triptona y extracto de levadura se adquirieron en DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

Hidróxido de sodio se obtuvo en J. T. Baker, México.

BCIP y NBT se adquirieron en Aplichem Damstadt, Alemania.

Película instantánea 667 se adquirió en Polaroid.

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

Cloranfenicol se adquirió en Flamingo Pharmaceuticals y tetraciclina en el Laboratorio Benguerel, Ltda, Chile.

Ampicilina se adquirió en Lyka Lab, Limited y el Tritón X-100 compró a Boehringer Mannheim Corp. Indianapolis, USA.

### 2.1.2. Cepas bacterianas.

En la Tabla 1 se detallan las cepas utilizadas en este estudio.

### 2.1.3. Plasmidios y vectores.

En la Tabla 2 se detallan los plasmidios y vectores utilizados en esta Tesis.

### 2.1.4. Partidores.

En la Tabla 3 se detallan los partidores utilizados en los experimentos de PCR y RT-PCR de esta Tesis

## 2.2. MÉTODOS.

### 2.2.1. Medios de cultivo.

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

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

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

**Medio mínimo (M9).** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1 g/L. Se suplementó con CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v,

**Tabla 1.** Cepas utilizadas en esta Tesis.

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>E. coli</i> VCS257	DP50, <i>sup</i> F[ <i>sup</i> E44, <i>sup</i> F58, <i>hsd</i> 53( <i>r</i> <sub>B</sub> <i>m</i> <sub>B</sub> ), <i>dap</i> D8, <i>lac</i> Y1, <i>gln</i> V44, $\Delta$ ( <i>gal-uvr</i> B)47, <i>tyr</i> T58, <i>gyr</i> A29, <i>Ton</i> A53 $\Delta$ ( <i>thy</i> A57)]	Stratagene
<i>E. coli</i> MC4100	F <sup>-</sup> <i>ara</i> D139, $\Delta$ <i>lac</i> U169, <i>rps</i> L, <i>rel</i> A, <i>thi</i> A, <i>Mot</i> <sup>-</sup>	R. Kolter
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>omp</i> T, <i>r</i> <sub>B</sub> <i>m</i> <sub>B</sub>	Novagen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>rec</i> A, <i>end</i> A1, <i>gyr</i> A96, <i>thi</i> 1, <i>hsd</i> R-17, <i>sup</i> E44, <i>rel</i> A1, <i>lac</i> [F' <i>pro</i> AB, <i>lac</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, Tn10]	Stratagene
<i>E. coli</i> PO11681	F <sup>-</sup> , <i>ara</i> D139 $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 $\Delta$ ( <i>pro</i> AB- <i>arg</i> F- <i>lac</i> IPOZYA) XIII <i>rps</i> L Mu d11681(Km <sup>r</sup> ) <i>ara</i> ::(Mu <i>cts</i> )3 <i>ara</i> D <sup>-</sup> <i>leu</i> <sup>+</sup> <i>lac</i> <sup>+</sup> <i>pro</i> <sup>+</sup>	Castilho y cols., 1984
<i>E. coli</i> pop3001.6	MC4100 Mu <i>cts</i>	F. Moreno
<i>E. coli</i> H1717	derivada de MC4100 pero <i>aro</i> B <i>fhu</i> A:: $\lambda$ placMu	Hanke, 1987
<i>K. pneumoniae</i> RYC492	Km <sup>r</sup> Mcc <sup>+</sup> Inm <sup>-</sup>	de Lorenzo y cols., 1984

**Tabla 2.** Plasmidios y vectores utilizados en esta Tesis.

Plasmidio	Caraterísticas relevantes	Fuente o referencia
pBluescript SK	Plasmidio de propósito general. Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pHC79	Cosmidio de propósito general. Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Hohn y Collins, 1980
pACYC184	Plasmidio de propósito general. Cm <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Chang y Cohen, 1978
pSC101	Plasmidio de número bajo de copias. Tet <sup>r</sup>	Cohen y cols., 1973

Plasmidio	Caraterísticas relevantes	Fuente o referencia
pBAD33	Plasmidio derivado de pACYC184 que permite modular la expresión transcripcional de genes. Cm <sup>r</sup>	Guzman y cols., 1995
pJAM434	Plasmidio 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> . Amp <sup>r</sup>	Wilkins y cols., 1997
pJAM229	Plasmidio derivado de pJAM434. Posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido respecto a pJAM434. Produce microcina activa. Amp <sup>r</sup>	Wilkins y cols., 1997
pJRS1	Derivado de pJAM229. Contiene una deleción en el gen <i>mceF</i> y <i>mceG</i> . Amp <sup>r</sup>	Wilkins y cols., 1997
p4S-12	Derivado de pJAM434. Posee los genes <i>mceABCDEF</i> . Amp <sup>r</sup>	Lagos y cols., 2001
pJEM15	Derivado de pJAM229. Posee doble copia del gen <i>mceF</i> . Amp <sup>r</sup>	Wilkins y cols., 1997
p157	Derivado de pT7-7 que lleva el gen <i>mceB</i> en un fragmento <i>NdeI-EcoRI</i> de 0.3 kb Amp <sup>r</sup>	Lagos y cols., 1999
np220	pJAM434 <i>mceA</i> ::Tn5. Amp <sup>r</sup> Kn <sup>r</sup>	Lagos y cols., 2001
np108	pJAM434 <i>mceG</i> ::Tn5. Amp <sup>r</sup> Kn <sup>r</sup>	Lagos y cols., 2001
np203	pJAM434 <i>mceH</i> ::Tn5. Amp <sup>r</sup> Kn <sup>r</sup>	Lagos y cols., 2001
pMCA	Derivado de p4S-12. Lleva los genes <i>mceBCDEF</i> . Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pMCA-ΔF	Derivado de pMCA. Lleva los genes <i>mceBCDE</i> . Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pIBC	Derivado de pACYC184. Lleva clonado en el sitio <i>EcoRV</i> un fragmento amplificado por PCR que contiene el gen <i>mceB</i> bajo el promotor T7. Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pMAH34	Derivado de pACYC184. Lleva en el sitio <i>BamHI</i> un fragmento amplificado por PCR que contiene los genes <i>mceB</i> y <i>mceA</i> con una tag de His en el extremo 3'. Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pMceAB	Derivado de pACYC184. Lleva en el sitio <i>BamHI</i> un fragmento amplificado por PCR que contiene los genes <i>mceB</i> y <i>mceA</i> . Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pB40	Derivado de p4S-12. Lleva los genes <i>mceABCDEIJ</i> . Amp <sup>r</sup>	Castillo, 2003
p6-18	Derivado de pBAD33 Lleva clonado en el sitio <i>SmaI</i> el gen <i>mceF</i> con su promotor. Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pA40	Derivado de pJAM229, proviene de la religación de un fragmento de 16 kb digerido con <i>EcoRI</i> , posee los genes <i>mceF</i> y parte del gen <i>mceG</i> . Amp <sup>r</sup>	Wilkins y cols., 1997
pJl	Derivado de pJAM434. Contiene una deleción con <i>BstVI</i> de 6,8 Kb. Contiene los genes <i>mceABCDE</i> . Amp <sup>r</sup>	Wilkins y cols., 1997



Plasmidio	Caraterísticas relevantes	Fuente o referencia
pJII	Derivado de pJI digerido con <i>Bst</i> VI y <i>Sal</i> I. Contiene los genes <i>mceABCDE</i> . Amp <sup>r</sup>	Wilkens y cols., 1997
pJIE291	Derivado de pJAM434. Formado por la religación de 3 fragmentos <i>Eco</i> RI. Contiene los genes <i>mceCDE</i> . Amp <sup>r</sup>	Wilkens y cols., 1997
pGHIJ12	Derivado de pACYC184. Lleva clonado en el sitio <i>Eco</i> RV un fragmento amplificado por PCR que contiene los genes <i>mceGHIJ</i> . Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pGHIJ13	Derivado de pACYC184. Lleva clonado en el sitio <i>Eco</i> RV un fragmento amplificado por PCR que contiene los genes <i>mceGHIJ</i> . Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pJIC4	Derivado de pJAM434. Contiene los genes <i>mceDE</i> . Amp <sup>r</sup>	Wilkens y cols., 1997
pBSC47	Derivado de pBluescript SK. Lleva un fragmento Cla I de 3Kb de pJAM434. Contiene los gene <i>mceABC</i> . Amp <sup>r</sup>	Lagos y cols., 1999
pLOL3	Derivado de pACYC184. Lleva en el sitio <i>Eco</i> RV un fragmento amplificado por PCR que contiene el gen <i>mceE</i> bajo el promotor T7. Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pFurC2	Derivado de pACYC184. Lleva en el sitio <i>Eco</i> RV un fragmento de 347 bp de la región promotora de <i>mceC</i> . Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pFurD22	Derivado de pACYC184. Lleva en el sitio <i>Eco</i> RV un fragmento de 267 bp de la región promotora de <i>mceD</i> . Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pFurE1	Derivado de pACYC184. Lleva en el sitio <i>Eco</i> RV un fragmento de 357 bp de la región promotora de <i>mceE</i> . Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pFurE2-45	Derivado de pACYC184. Lleva en el sitio <i>Eco</i> RV un fragmento de 239 bp de la región promotora de <i>mceE</i> . Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pFurF-A	Derivado de pACYC184. Lleva en el sitio <i>Eco</i> RV un fragmento de 258 bp de la región promotora de <i>mceF</i> . Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pMuME12	pMAH34 <i>mceA</i> ::Mu dII1681	Este trabajo
pMuME132	pMAH34 <i>mceB</i> ::Mu dII1681	Este trabajo
pMUG21	pJAM434 <i>mceC</i> ::Mu dII1681	Este trabajo
pMUG43	pJAM434 <i>mceI</i> ::Mu dII1681	Este trabajo

Amp<sup>r</sup> ampicilina, Kn<sup>r</sup> kanamicina, Cm<sup>r</sup> cloramfenicol, Tet<sup>r</sup> tetraciclina

**Tabla 3.** Secuencias de los partidores empleados para amplificar mediante PCR o RT-PCR los genes sistema microcina E492.

<i>Partidor</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Ubicación</i> #
RL3	5'-GAA ATT TTC AGG CAG AAT TCT GGT GCA GTT GCA-3'	116-148
RL1	5'-CGG ATA AAA CAT ATG ACA TTA CTT TCA TTT GG-3'	809-840
RL2	5'-AAA GCA AGA ATT CAG TCC TTT TGA CTA ATT CT-3'	517-548
C1	5'-ATT TTC ATA TGC GTA TTC TCT TTA TTG GCC CT-3'	1298-1329
C2	5'-TTT CAG CAA GCT TAT ACA ATT ATT GCC AGA TG-3'	2406-2437
D1	5'-CTA CAA CAT ATG CCA TTT ATG AGG AAT CAT C-3'	3819-3850
D2	5'-ATT ACT CTG CAG TAT CTG CTC ACG ATT ACA-3'	2571-2600
E1	5'-TGA TGG GAG ACT CAT ATG AAT GGC AAC AAA-3'	5701-5730
E2	5'-GGC AGA AAG CTT CTG CTT TTT TGT TAT AGG-3'	5348-5377
F1	5'-CTT CTT GCC CAT ATG TTA TTC ATC CTC GAA-3'	6025-6054
F2	5'-TCC AGA GCG AAG CTT ATT ATG GAC TAT TGA-3'	6570-6600
G1	5'-AGG GCC GAC ATA TGA GTA ACG GGA ATG T-3'	9307-9334
G2	5'-TCC TCC AAG CTT CAC TAA AAC CTC CTT AC-3'	7169-7197
H1	5'-TAG AAA ACA GAC ATA TGA AAT GGC GGG GA-3'	10543-10571
H2	5'-CGC ATA TCA AGC TTA TTT ATC ATT CGT CTG-3'	9277-9306
H3	5'-GTT GAC TCT CTG AGT GTC AC-3'	9770-9789
I1	5'-TAA GGC ATA TGA CAA TGA TGT CGC ATA TAC-3'	11186-11214
I2	5'-GGT ACA TAT CGA TTC CGG TAT TCA AAG TTC-3'	10695-10724
J1	5'-TCA GCA TAT GGT AAC GGA GAA ATA CAG TCA-3'	12772-12801
J2	5'-TTG TCA GGA TCC TTA TAT TTT ACA CCG CAA-3'	11201-11230
J3	5'-GCT GTC CAG ATA CAG CCT GT-3'	11619-11638
amb30	5'-GTT TCG CGT TCT CTA CGG ATA GAA TTT ACT-3'	730-759
PEC	5'-CTT CAT GTC CGT TCA CAC GA-3'	1377-1390
PED	5'-TGT GGA CAA CTG TGC ACA TAT-3'	3761-3781
PEE	5'-GGA ATA GAG GAG AGT GAG GA-3'	5589-5609
PEF	5'-CCA ATG CCA AGC CCA TCT CT-3'	6097-6116
PEG	5'-CAC ACT CCG AGG TCT CCG TCT GAT GAA-3'	9227-9253
PEH	5'-CTA TAA CGA ACG TCA GAA ATG CCG TGA TA-3'	10455-10483
PEI	5'-TAT GAA GCA TGC AAC TGA CTG CAA AAC CA-3'	11111-11139
PEJ	5'-TTC AGC ACA CCA AAT CAA CGA AGA GGT TAT-3'	12678-12707
FURC	5'-CCT GTG TCA AGG CAT AAT AT-3'	1058-1078
FURD	5'-GGG CTA CGC GGC TCT GCT-3'	2401-2419
FURE1	5'-GCA AAC ACC ATT TCA CTT ACC T-3'	5484-5506
FURE2	5'-CCA ATG TGC TCA CTC AGC ATA-3'	5606-5627
FURF	5'-GAC TTC GTG TGT CTA ATA TGT CA-3'	5847-5870
T7-Primer	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	-
HCrev	5'-ATC GAT GAT AAG CTT GGG CT-3'	-
AMP1	5'-GAG TAT GAG TAT TCA ACA TTT CCG T-3'	-
AMP2	5'-ACC AAT GCT TAA TCA GTG AGG CA-3'	-

# utilizando de referencia la secuencia publicada en GenBank (código de acceso AF063590)

tiamina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , casaminoácidos 1  $\text{mg}/\text{mL}$ , como fuente de carbono glucosa 0,2% p/v. Las cepas que portan el plásmido pBAD33 se cultivaron en medio mínimo suplementado al que se agregó además 5 aminoácidos que no son aportados por los casaminoácidos: triptófano, cisteína, glutamina, asparagina y tirosina a una concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para inducir la expresión del promotor  $P_{\text{BAD}}$  se utilizó arabinosa (0,2% p/v) y no se adicionó glucosa al medio.

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

**Placas de césped.** Sobre placas de agar LB se esparcieron 3 a 5 mL de agar LB al 0,7% en que se incluyó 300  $\mu\text{L}$  de un cultivo bacteriano crecido toda la noche.

Las células bacterianas que portan plásmidos recombinantes se crecieron en placas o en medio líquido suplementado con antibióticos, cuya concentración final es la siguiente: ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , cloranfenicol 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , tetraciclina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estos antibióticos fueron preparados como describe Sambrock y cols. (1989)

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

A un litro de medio de cultivo mínimo se agregó 3-5 mL de un cultivo crecido toda la noche y se incubó a 37°C con una agitación de 80-100 rpm, hasta una OD a 600 nm de 0,7. El cultivo se centrifugó a 8.000 rpm por 30 min en un rotor GSA. El sobrenadante, sometido a una presión negativa, se pasó a través de

una columna de extracción en fase sólida Sep Pak C<sub>18</sub>, activada previamente con 3 mL de metanol al 95% y 3 mL de agua destilada. En la matriz de la columna quedó retenida la microcina y algunos contaminantes. La columna se lavó con 3 mL de metanol al 60% para retirar los contaminantes que tienen una pigmentación de color amarillo, y posteriormente la microcina se eluyó con 3 mL de metanol al 95%.

**2.2.3. Purificación de la microcina E492 desde extractos celulares.** La preparación de microcina a partir de extractos celulares (intracelular) es el enriquecimiento de la fracción celular obtenida en el procedimiento para detectar la actividad intracelular de microcina empleando columnas Sep-Pak. Las cepas se cultivaron en un litro de medio mínimo y las células se cosecharon a una DO<sub>600nm</sub> de 0,7. Después de centrifugar el cultivo, el precipitado de células se resuspendió en un amortiguador (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y MgCl<sub>2</sub> 10 mM) y se dejó en baño maría a ebullición por 20 min. La suspensión se agitó vigorosamente en un vortex, cada 5 min., durante el calentamiento. Luego, la suspensión se centrifugó a 20.000 x g para descartar la mayor parte de los restos celulares, y a continuación se tomó solamente el sobrenadante. Este sobrenadante se paso a través de una columna Sep-Pak C<sub>18</sub> previamente activada con agua y metanol. El procedimiento de elución de la microcina de extractos celulares se realizó de la misma forma que para la purificación de la microcina extracelular.

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

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

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

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

### **2.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para microcina E492.**

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

Se empleó un marcador de peso molecular preteñido con rojo fenol y posee fragmentos de los siguientes pesos moleculares aparentes: 175, 83, 62, 47, 32, 25, 16,5 y 6,5 kDa.

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

Se empleó el método de marcación de péptidos con fluorescamina descrito por

Rangland y cols. (1974). Para ello se concentró por evaporación al vacío 300  $\mu$ L del eluido de la columna Sep Pak o 1 mL de microcina de extractos celulares hasta un volumen de 10  $\mu$ L. Al concentrado se agregó 4  $\mu$ L de solución borato (0,4 M pH 9,0), 8  $\mu$ L de fluorescamina (2 mg/mL en DMSO) y 7  $\mu$ L de amortiguador de carga 4X (glicerol 40%; Tris-HCl 50 mM pH 7,6; SDS 10%;  $\beta$ -mercaptoetanol 20%; azul de bromofenol 0,04% (p/v)). La mezcla se calentó a baño maría por 3 min y las proteínas se separaron mediante SDS PAGE.

Como marcador de peso molecular se utilizó Sigma MW-SDS, que contiene mioglobina de 16.950 Da y fragmentos de mioglobina de 14.440, 8.160, 6.210, 3.460 y 2.210 Da. Estas proteínas se marcaron con fluorescamina de la misma manera que las muestras. Las bandas de proteínas se visualizaron en un transiluminador UV. Inmediatamente después, se tomaron fotografías con película instantánea Polaroid 667.

## **2.2.8. Hibridación Western.**

### **2.2.8.1. Electrotransferencia.**

Después de realizar un SDS-PAGE, se retiró el gel de los vidrios y se montó la transferencia colocando el gel sobre una esponja y 3 papeles filtro. Luego se colocó sobre el gel una membrana de nitrocelulosa, tres papeles filtro y otra esponja. Antes de montar la transferencia las hojas de papel filtro y las esponjas se humedecieron en amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%). La membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham)

se humedeció en agua y posteriormente en amortiguador de transferencia. El sistema se montó en la cámara respectiva y la transferencia se realizó durante 2 h a 100 V a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  empleando el amortiguador de transferencia enfriado previamente.

#### **2.2.8.2. Desarrollo inmunológico.**

La membrana se bloqueó con BSA 3% en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se traspasó a una solución de BSA 1% en PBS que contiene el anticuerpo primario. La membrana se incubó con el anticuerpo primario antimicrocina durante 2 h con agitación a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con amortiguador TS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM) y la membrana se incubó por 2 h en BSA 1% en TS con el anticuerpo secundario el cual esta conjugado a la enzima fosfatasa alcalina. Se empleó una dilución 1:1.000 del anticuerpo policlonal antimicrocina y una dilución 1:30.000 del anticuerpo secundario de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El revelado se realizó colocando la membrana en 10 mL de amortiguador para fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM;  $\text{MgCl}_2$  5 mM), y se adicionó 33  $\mu\text{L}$  de BCIP (0,5 g del reactivo disuelto en 10 mL de dimetilformamida 100%) y 66  $\mu\text{L}$  de NBT (0,5 g del reactivo disuelto en 10 mL de dimetilformamida 70%). La membrana se incubó hasta la aparición del color en la banda y la reacción se detuvo lavando la membrana con abundante agua destilada.



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

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

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

### **2.2.9.2. RNA bacteriano.**

El RNA bacteriano se aisló a partir de cultivos crecidos toda la noche o hasta  $DO_{600}=0,4$  ó  $DO_{600}=0,7$ . El cultivo se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y las bacterias se suspendieron en solución Z6 (clorhidrato de guanidina 8 M; Tris-HCl 50 mM pH 7,0; EDTA 20 mM) complementada con  $\beta$ -mercaptoetanol frío (al 10%). A la mezcla se agregó fenol:cloroformo saturado en agua y después de agitar fuertemente en un vortex se dejó en hielo durante 20 min. Las proteínas y el DNA se separaron centrifugando la solución a 13.000 rpm durante 30 min en una microcentrífuga. La fase acuosa se trasladó a un tubo nuevo y se agregó 1/20 del volumen de ácido acético 1 M (en agua DEPC) y 0,7 volúmenes de etanol al 95% frío. Se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 15 a 20 min. El RNA se sedimentó por centrifugación a 13.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  y se lavó con etanol frío al 70% (con agua DEPC). Luego de secarlo al aire se disolvió en agua tratada con DEPC y se calentó a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Inmediatamente después se enfrió en hielo.

### **2.2.10. Electroforesis de ácidos nucleicos.**

#### **2.2.10.1. Separación de DNA.**

Los ácidos desoxirribonucleicos, como el DNA genómico, el DNA plasmidial, fragmentos de restricción, productos de PCR y productos de RT-PCR, se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Esta electroforesis se llevó a cabo en una cámara horizontal, usando el amortiguador TEA (Tris-HCl

40 mM pH 8,1; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 2 mM). La concentración de agarosa fluctuó entre 1,0 y 2,0% dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. Para la preparación de la muestra se empleó el amortiguador de carga (glicerol 50%, EDTA 50 mM, xilén cianol 1 mg/mL, azul de bromofenol 1,5 mg/mL) antes de su incorporación a los pocillos del gel. La electroforesis se realizó con una diferencia de potencial de 80-100 V. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (10 µg/mL) y se puso sobre un transiluminador UV para observar las bandas de DNA.

#### **2.2.10.2. Separación de RNA.**

El RNA bacteriano se separó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa-formaldehído, utilizando amortiguador MOPS (ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico 20mM, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10mM pH 8,0 y formaldehído 2,2 M). Se disolvió 1 g de agarosa en 90 mL de agua DEPC y se agregó 10 mL de MOPS 10X. La preparación de la muestra consistió en resuspender el RNA en formamida desionizada (12,5 µL ), MOPS 10X (2,5 µL) y agua DEPC (10 µL). Las muestras se calentaron a 65°C durante 10 min. y se agregó amortiguador de carga (2,5 µL de glicerol al 50%, EDTA 50 mM, xilén cianol 1 mg/mL, azul de bromofenol 1,5 mg/mL). Se utilizó MOPS 1X como amortiguador de corrida. La electroforesis se realizó a 100 V durante 1 h y luego se tiñó el RNA con bromuro de etidio. Los geles se observaron en un transiluminador UV.

## **2.2.11. Hibridación Northern.**

### **2.2.11.1 Transferencia**

La transferencia Northern consistió en una hibridación de RNA con una sonda de DNA con el fin de detectar la presencia de transcritos específicos de los genes del sistema microcina. Para ello se utilizaron muestras de RNA total separadas mediante geles de agarosa con formaldehído.

La transferencia del RNA del gel a una membrana de nylon se realizó de la siguiente forma:

Se cortó un trozo de membrana de nylon cargada positivamente del tamaño del gel y se hidrató incubándola en el amortiguador SSPE 20X durante 10 min. Posteriormente se colocó un trozo de papel filtro en la cámara de transferencia empapado con amortiguador SSPE 20X. Sobre este papel filtro se colocaron 3 láminas más de papel filtro humedecidas en el amortiguador SSPE 20X pero del tamaño del gel. Luego se colocó el gel sobre las láminas de papel humedecido evitando que se produjeran burbujas y se colocaron alrededor de los contornos del gel trozos de papel PARAFILM®. Sobre el gel se colocó la membrana de nylon previamente humedecida y sobre ésta se colocaron 3 trozos de papel filtro seco, del tamaño del gel. Sobre los papeles filtros secos se colocó una torre de 5 cm se servilletas (secas) y una cubierta de vidrio de 20 x 20 cm sobre la cual se puso un matraz aforado de 500 mL lleno de agua y sujeto a un soporte universal mediante una pinza de soporte.

Se dejó transfiriendo el RNA a la membrana mediante este sistema durante 12 h. Posteriormente se desmontó el sistema y se fijó el RNA a la membrana mediante un entrecruzamiento con luz UV colocando la membrana directamente sobre el transiluminador UV durante 2-5 min.

#### **2.2.11.2. Marcación de la sonda.**

Los genes empleados como sondas se amplificaron mediante PCR empleando el partidor antisentido marcado radiactivamente con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y  $T_4$  polinucleótido quinasa Gibco BRL. La incorporación del  $^{32}\text{P}$  radiactivo se realizó según el protocolo descrito por el fabricante incubando 5 pmoles del partidor con 25  $\mu\text{Ci}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y 10 U de la  $T_4$  polinucleótido quinasa en el amortiguador comercial proporcionado por el fabricante que contiene Tris-HCl 70 mM (pH 7,6),  $\text{MgCl}_2$  10 mM, KCl 100 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM. La reacción de amplificación se realizó mezclando 100 ng de DNA plasmidial con 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador comercial de PCR (Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM). A esta mezcla se agregó  $\text{MgCl}_2$  1 mM, dNTPs 10 mM, 10 pmoles del partidor sentido, 5 pmol del partidor antisentido marcado radiactivamente con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y 2,5 U de *Taq* DNA polimerasa. Las condiciones estándares de la reacción fueron: 30 a 33 ciclos de 45 s a 94°C para la desnaturalización, 30 s a 55°C para el “annealing”, y 90 s a 72°C para la elongación, seguidas por una elongación final a 72°C durante 10 min.

### **2.2.11.3. Hibridación.**

La membrana de nylon con el RNA se prehibridó a 60 °C durante 2 h con la solución de prehibridación/hibridación que contenía solución de Denhardt 5X, SSPE 5X, SDS 0,5% y 200 mg/mL DNA de timo de ternera desnaturado, empleando una agitación suave. Posteriormente se agregó la sonda de DNA marcada radiactivamente y se incubó a 60 °C durante 12 horas con agitación suave. Finalizada la hibridación se removió la solución de prehibridación/hibridación que contenía la sonda y se lavó la membrana 3 veces con una solución que contenía SSPE 5X y SDS 0,1% durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana dos veces con una solución que contenía SSPE 5X y SDS 0,1% durante 2 min a 40 °C. La membrana se secó a aire y se expuso en un casete con una placa intensificadora utilizando una película rápida XAR-5 de KODAK.

### **2.2.12. Digestión de DNA con enzimas de restricción.**

La digestión de DNA plasmidial fue realizada diluyendo el amortiguador comercial de la enzima correspondiente a una concentración 1X y agregando de 5-10 U de la enzima de restricción, en un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L. Las reacciones se incubaron a la temperatura óptima para cada enzima durante 2 h (o 14 h para el caso de *Xho*I). La reacción se detuvo calentando a 65°C durante 15 min.

### **2.2.13. Desfosforilación de los extremos 5' de fragmentos de DNA.**

Para evitar el religamiento de un vector cortado con sólo una enzima de restricción, se procedió a desfosforilar los extremos 5' de éste. La reacción de desfosforilación consistió en incubar a 37°C durante 2 a 12 h una mezcla constituida por amortiguador de desfosforilación (Tris-HCl 50 mM pH 8,5; EDTA 0,1 mM), el DNA a desfosforilar (1 pmol) y la enzima CIAP (fosfatasa alcalina de intestino de ternera) diluida (7 U) en el amortiguador de dilución (Tris-HCl 25 mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM y glicerol al 50%) provisto por el fabricante.

### **2.2.14. Ligación de fragmentos de DNA.**

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

### **2.2.15. Preparación de células electrocompetentes.**

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un cultivo de crecimiento exponencial, para ello se inoculó 100 mL de medio LB con 1 mL de un cultivo crecido hasta fase estacionaria. Las células se colectaron a una  $OD_{550}$  de 0,75 ( $3-6 \times 10^8$  cel/mL) en tubos de centrifuga fríos y se centrifugó durante 10 min a 4.000 rpm. El precipitado bacteriano obtenido se resuspendió en 40 mL de glicerol frío 10% y se centrifugó durante 10 min a 4.000 rpm. Este procedimiento se repitió dos veces más. Después de los lavados, las células se resuspendieron en el glicerol 10% remanente que quedó en el tubo después de la última centrifugación. Se midió el volumen de la suspensión celular y se determinó la  $OD_{550}$  diluyendo una pequeña porción de ella en glicerol al 10%. Se ajustó el volumen del precipitado celular con glicerol al 10% para llegar a una  $OD_{550}$  final de 200-250/mL. Las células se alicuotaron y se usaron directamente para la electroporación o se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.16. Transformación por electroporación.**

Se utilizó un equipo BioRad Gene Pulser acoplado a un controlador de pulso, para realizar la transformación de las células competentes. El aparato se configuró colocando el voltaje a 2.500 V, la resistencia de  $200 \Omega$  y una capacitancia de  $25 \mu\text{F}$ . Las células, las cubetas y el portacubetas se colocaron en hielo antes de proceder a la transformación. Se mezclaron  $25 \mu\text{L}$  de células electrocompetentes con  $1-2 \mu\text{L}$  de DNA plasmidial en un tubo y se electroporó



la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2 cm de separación entre los electrodos. Inmediatamente después se resuspendieron las células en 1 mL de medio SOC estéril y se las incubó a temperatura apropiada durante 1 h. Las células transformadas se sembraron en placas LB con los antibióticos apropiados y se incubaron durante 12 h a la temperatura apropiada.

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

### **2.2.17.1. PCR de DNA plasmidial.**

La reacción de amplificación se realizó mezclando DNA plasmidial (0,1-10 ng) con 2,5 ó 5,0  $\mu\text{L}$  de amortiguador de PCR (Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM), 0,5-1,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 1,0  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 1,0-2,0  $\mu\text{L}$  de cada partidor a una concentración de 25 pmol/ $\mu\text{L}$  y 2,5 U de *Taq* DNA polimerasa para un volumen final de 25 ó 50  $\mu\text{L}$ . Las condiciones estándares de la reacción fueron: 30 a 33 ciclos de 45 s a 94°C para la desnaturación, 30 s a 55°C para el apareamiento y 90 s a 72°C para la elongación, seguidas por una elongación final a 72°C durante 10 min. Los fragmentos más largos de 3 Kb se amplificaron usando el kit *Elongase Amplification System* de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con 30 ciclos (94°C durante 30 s, 55-60°C durante 30-35 s y 68°C durante 1 min por cada kb del tamaño del fragmento que se amplificó). Los partidores empleados para la amplificación de los distintos segmentos están detallados en la Tabla 3. Los productos de amplificación se purificaron utilizando el kit *CONCERT Rapid PCR Purification System*, para realizar

posteriormente las reacciones de ligación.

#### **2.2.17.2. PCR de colonia.**

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

#### **2.2.18. Transcripción Reversa acoplada a PCR (RT-PCR).**

Se realizó un tratamiento con DNAsa I (libre de RNAsa) para retirar completamente todo el DNA que pudo haber sido co-purificado mediante el procedimiento de purificación de RNA total. Varias alícuotas de RNA se trataron con 10 U de DNAsa I en una solución de MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM durante 30 min a 25°C. La reacción se detuvo por calentamiento a 65 °C durante 15 min. La mezcla resultante se incubó con él o los partidores antisentido durante 5 min a 75°C y luego se realizó la transcripción reversa empleando 200 U de transcriptasa reversa M-MLV de Promega y dNTPs 400 µM durante 1 h a 42 °C. La reacción se calentó 10 min a 65 °C para desnaturar la enzima. La etapa de PCR se

realizó empleando como templado una alícuota de 5  $\mu$ L de la reacción de transcripción reversa,  $MgCl_2$  1 mM, dNTPs 200  $\mu$ M, amortiguador de PCR 1X, 25 pmoles de cada partidor, 2,5 U de *Taq* DNA polimerasa utilizando el siguiente programa: un ciclo de 94°C durante 6 min, 55°C durante 2 min y 72°C durante 30 min, seguido de 25 ciclos rápidos de 94°C durante 45 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 90 s y una extensión final de 10 min a 72 °C.

### **2.2.19. Secuenciación manual de DNA.**

El DNA templado se obtuvo purificando productos de amplificación por PCR con partidores correspondientes al gen a analizar y al transposón (Tn1) empleando el kit CONCERT™ Rapid PCR Purification System, según el protocolo descrito por el fabricante. Para secuenciar el producto amplificado y purificado se empleó el kit PCR dsDNA Cycle Sequencing System. El método de incorporación de marca radiactiva a la reacción de secuencia se realizó empleando el partidor Tn1 marcado con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y  $T_4$  polinucleótido quinasa. Las reacciones de secuencia fueron almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso o analizadas inmediatamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bis-acrilamida = 38%:2%) que contenía urea 8M. Las muestras fueron calentadas a 82°C durante 2 min y una alícuota fue colocada inmediatamente en el gel precalentado a 50°C. La electroforesis fue desarrollada en amortiguador 1X TBE (10,8 g/L de Trizma base, 5,5 g/L de ácido bórico y 5 mL de EDTA 0,5 M) a una potencia entre 50-60 Watts,

procurando mantener el gel a 50°C durante toda la electroforesis. Cuando el colorante azul de bromofenol se encontraba en el tercio final del gel, se agregó acetato de sodio 1M (pH 8,8) al compartimiento anódico de la cámara, con el fin de lograr una contracorriente de iones y agua hacia el polo negativo, comprimiendo las bandas cerca de los oligonucleótidos partidores, logrando bandas menos difusas y extendiendo la secuencia alejada de los partidores. Los geles fueron secados a 80°C durante 1 h al vacío y expuestos en contacto con un film rápido X-OMAT AR-5 de Kodax a -80°C durante toda la noche.

#### **2.2.20. Extensión del partidor (primer extension)**

Para estos experimentos se empleó 30-40 µg de RNA total de la cepa de *E. coli* VCSpJAM434, los que fueron incubados a 75° C durante 5 min con 5 pmoles de partidor marcado con <sup>32</sup>P, empleando T4 kinasa Gibco BRL de manera similar a la descrita en el punto 2.2.11.2. Luego se realizó la reacción de transcripción reversa empleando 200 U de M-MLV transcriptasa reversa Gibco BRL y dNTPs 400 µM durante 1 h a 42 °C. La reacción se calentó 10 min a 65°C para desnaturar la enzima. Las reacciones de extensión del partidor fueron almacenadas a -20°C hasta su uso o analizadas inmediatamente junto con reacciones de secuenciación manual realizadas con el mismo partidor mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bis-acrilamida=38%:2%) que contenía urea 8M como se describe en el punto 2.2.19.

### 2.2.21. Fusiones traduccionales.

Se empleó el bacteriófago mini-Mu dII1681 (Castilho y cols., 1984) que es un fago defectivo que porta en su genoma el gen de resistencia a kanamicina proveniente de transposón Tn5 y el operón lactosa sin las señales de iniciación de la transcripción y traducción y sin los primeros codones del gen *lacZ* (Fig. 3A). Además este bacteriófago mini-Mu defectivo porta una mutación en el gen C que codifica para el represor de la transposición. Este bacteriofago mini-Mu cuando se encuentra en una cepa hospedera que porta un fago helper que posee una copia del gen C pero con una mutación termosensible (*cts*), es capaz de transponer a una elevada frecuencia sólo cuando se crece a una temperatura restrictiva de 42°C, insertándose al azar en diferentes genes. En una orientación adecuada, la inserción del fago Mu dII1681 origina fusiones génicas entre el gen donde se insertó y el gen *lacZ*. La obtención del gen híbrido requiere que el sentido de transcripción, así como la fase de lectura de ambos genes coincidan. Así la expresión del gen híbrido está bajo el control transcripcional y traduccional del gen en el que se encuentra la inserción y la proteína híbrida formada tiene actividad  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 3B). Las fusiones traduccionales se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Castilho y cols. (1984) que se resume en la Fig. 4 y que consta de las etapas que se describirán a continuación.

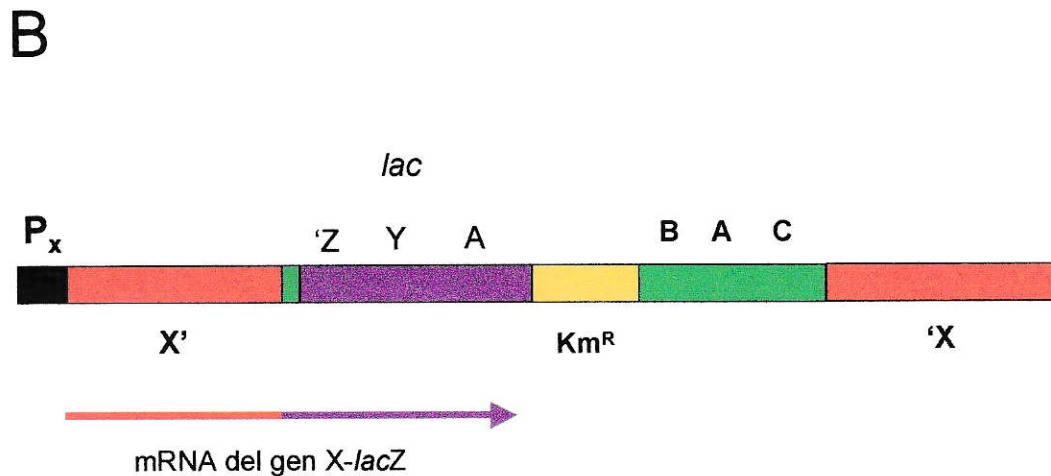
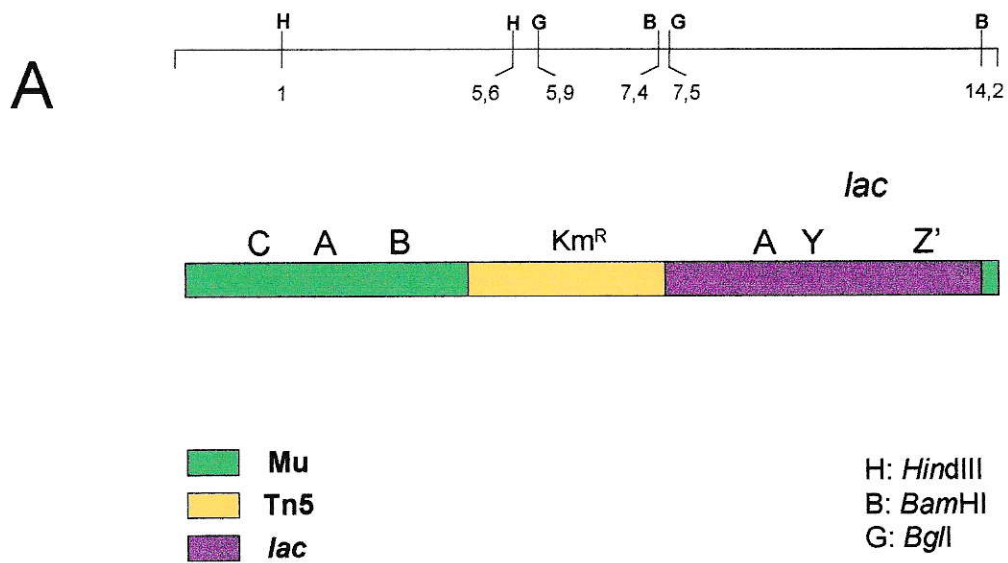


Fig. 3. Mapa físico del fago mini Mu dII1681 (A) y representación esquemática de una fusión del gen X-MudII1681 (B). P<sub>x</sub> corresponde al promotor de un gen hipotético X, donde se insertó el fago mini Mu dII1681. La orientación de mini Mu dII1681 en la parte B de la figura tiene una orientación inversa que en la parte A de la figura.

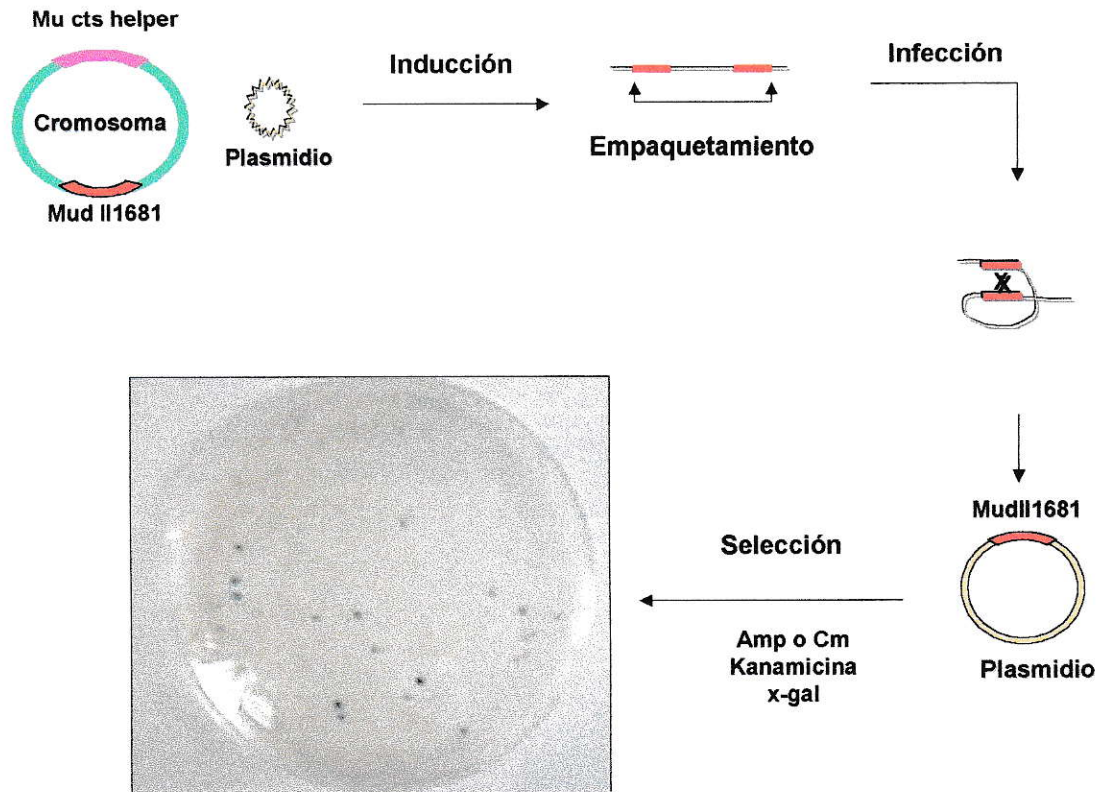


Fig. 4. **Construcción y selección de fusiones traducciónales en plasmidios empleando el fago mini-Mu dII1681** (Castilho y cols., 1984). Un plasmidio es introducido por transformación dentro de una célula que contiene el profago defectuoso mini-Mu dII1681 y el profago "helper" Mu cts. El profago mini-Mu se replica y transpone y se inserta en el plasmidio. El DNA del mini-Mu que lleva al plasmidio es empaquetado empleando las proteínas producidas por el profago "helper". Las partículas virales son empleadas para infectar una cepa bacteriana rec A+ y que no permita la expresión de los genes contenidos en el fago Mu (posee un represor Mu en un fago lisógeno defectuoso). En esta cepa ocurre un evento de recombinación homóloga entre los segmentos duplicados del mini Mu formando un plasmidio con una inserción de mini-Mu. La selección de los clones con las inserciones funcionales se realizan en placas de agar conteniendo X-gal como sustrato para la enzima  $\beta$ -galactosidasa y los antibióticos adecuados.

### **2.2.21.1. Transformación de la cepa portadora.**

La cepa de *E. coli* PO11681 portadora de los dos fagos, el helper (Mu cts) y el defectivo (Mu d11681) se transformó mediante electroporación con el plasmidio de interés (pJAM434 o pMAH) según lo descrito en la sección 2.2.14.

### **2.2.21.2. Producción de lisado de fago Mu d11681-plasmidio.**

La cepa transformada con el plasmidio de interés se creció en medio líquido LB a 30°C, hasta que el cultivo alcanzó una OD<sub>600</sub> de 0,2 (10<sup>8</sup> células/mL). A continuación se mantuvo el cultivo durante 30 min a 42-44°C. Después se incubó con agitación fuerte a 37°C, hasta que se consiguió la lisis celular (45 a 60 min). Se añadió unas gotas de cloroformo y se continuó la incubación durante 15 min. El cultivo lisado se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C y se colectó el sobrenadante. Éste contenía una suspensión de fago Mu cts/Mu d11-plasmidio. Se almacenaron los lisados a 4 °C.

### **2.2.21.3. Muducción.**

La cepa receptora *E. coli* pop3001.6, lisógena para Mu cts, se creció hasta el principio de fase estacionaria en medio líquido LB. Se mezcló 0,1 mL de estas células con 0,1 mL de los lisados de Mu d11681-plasmidio sin diluir. Se añadió a cada mezcla 5 µL de MgSO<sub>4</sub> 0,1 M y 4 µL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Tras permitir la adsorción del fago a la bacteria durante 20 min a 30 °C sin agitación, se diluyó la mezcla con 1 mL de LB y se incubó 75 min a 30°C con agitación, plaqueándose después las alícuotas en medio selectivo e incubándose a 30 °C durante 12 a 14 h.



### **2.2.22. Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa.**

Para efectuar la valoración cuantitativa de la expresión de las fusiones de proteínas construídas se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa según el método descrito por Miller (1992). Este método calorimétrico se basa en la hidrólisis del compuesto incoloro ONPG (o-nitro- $\beta$ -D-galactósido) por la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La hidrólisis da como producto galactósido y o-nitrofenol, que es de color amarillo. La concentración de o-nitrofenol se puede determinar midiendo la absorbancia de la muestra a 420 nm. Tal concentración es proporcional a la cantidad de  $\beta$ -galactosidasa presente en el medio de reacción y al tiempo de reacción, siempre que no haya condiciones limitantes del compuesto en el medio de reacción.

Las cepas portadoras de la fusiones cuya expresión se deseaba determinar se incubaron durante toda la noche en medio M9 suplementado con glucosa y citrato. Se hicieron diluciones 1/20 en el mismo medio de cultivo y se prosiguió la incubación tomando alícuotas a diferentes tiempos del ciclo de crecimiento.

En los tubos de reacción se mezclaron 0,5 mL de amortiguador Z con 0,5 mL de cultivo. Se agregó 20  $\mu$ L de cloroformo y 20  $\mu$ L de SDS 0,1%, agitando durante 30 s para lisar las células. La mezcla se preincubó durante 5 min a 30 °C, y a continuación se agregó 0,2 mL de ONPG (4 mg/mL) para iniciar la reacción. Cuando las muestras tomaron un color amarillo la reacción se detuvo agregando 0,5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. Se determinó la absorbancia de la muestra a 450 y 550 nm. Las unidades de  $\beta$ -galactosidasa se determinaron como

actividad específica utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{(DO_{420} - 1,75 * DO_{550}) * 1000}{DO_{600} * V * t}$$

Donde:  $OD_{600}$  representa la densidad óptica del cultivo a 600 nm,  $V$  el volumen utilizado en la mezcla de reacción,  $t$  el tiempo y  $DO_{420}$  y  $DO_{550}$  la absorbancia de la mezcla a 420 y 550 nm respectivamente.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. ESTUDIOS DE REGULACIÓN A NIVEL TRANSCRIPCIONAL

Como se mencionó anteriormente la microcina E492 activa se produce en fase exponencial de crecimiento (de Lorenzo y cols., 1984; Wilkens y cols., 1997) y su producción y actividad son afectadas por diferentes condiciones de cultivo (de Lorenzo, 1984; Orellana y Lagos, 1996). Para establecer cuales son los determinantes genéticos que determinan la producción de microcina activa en esta fase de crecimiento, el estudio de la regulación de la expresión de esta microcina se abordó en primer término desde un punto de vista transcripcional, estudiando si los genes implicados en la producción de la microcina E492 activa sufren algún tipo de regulación a este nivel.

##### **3.1.1 Caracterización transcripcional del sistema productor de MccE492.**

Como paso previo para el estudio de la expresión a nivel transcripcional de los genes involucrados en la síntesis, maduración y exportación de la microcina y su inmunidad, los experimentos se centraron en la determinación de las unidades transcripcionales en las que se agrupan dichos genes. Para ello, se utilizó la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción de polimerasa en cadena (RT-PCR).

Los primeros genes candidatos a formar una unidad transcripcional son el gen *mceB* que codifica para la proteína de inmunidad y el gen estructural de la microcina E492 (*mceA*) ya que se superponen en 26 bp (Fig. 5). Para comprobar si estos genes estaban acoplados transcripcionalmente se realizó la etapa de transcripción reversa usando un partidador ubicado río abajo del gen *mceA* (partidor RL3). El DNA obtenido se utilizó como templado para la etapa de PCR donde se empleó una pareja de partidores que amplifica ambos genes (RL1-RL3) y una pareja de partidores que amplifica sólo al gen *mceB*. Los resultados obtenidos empleando RNA total aislado de cepas de *E. coli* que producen microcina recombinante (Fig. 5A) y de *K. pneumoniae* RYC492 (Fig. 5B), indican que ambos genes se transcriben juntos formando una unidad transcripcional bicistrónica la que se denominó *mceBA*.

Empleando una estrategia similar se analizó la expresión transcripcional de los ORFs *mceC*, *mceD*, *mceE*, y *mceF* determinándose que estos cuatro ORFs se transcriben como unidades independientes o monocistrónicas que denominamos *mceC*, *mceD*, *mceE*, y *mceF* respectivamente (Fig. 6).

Al analizar la secuencia nucleotídica de 13 kb donde se encuentran los determinantes genéticos para la producción de microcina E492 activa, encontramos que los ORFs *mceH* y *mceG* se superponen en 7 bp, que los ORFs *mceJ* y *mceI* están separados por 12 bp y que la distancia entre el ORF *mceI* y *mceH* es de 161 bp. Este análisis hace pensar que estos ORFs podrían estar formando una o más unidades transcripcionales. Para dilucidar como se transcriben estos ORFs se diseñaron partidores que amplifican las regiones

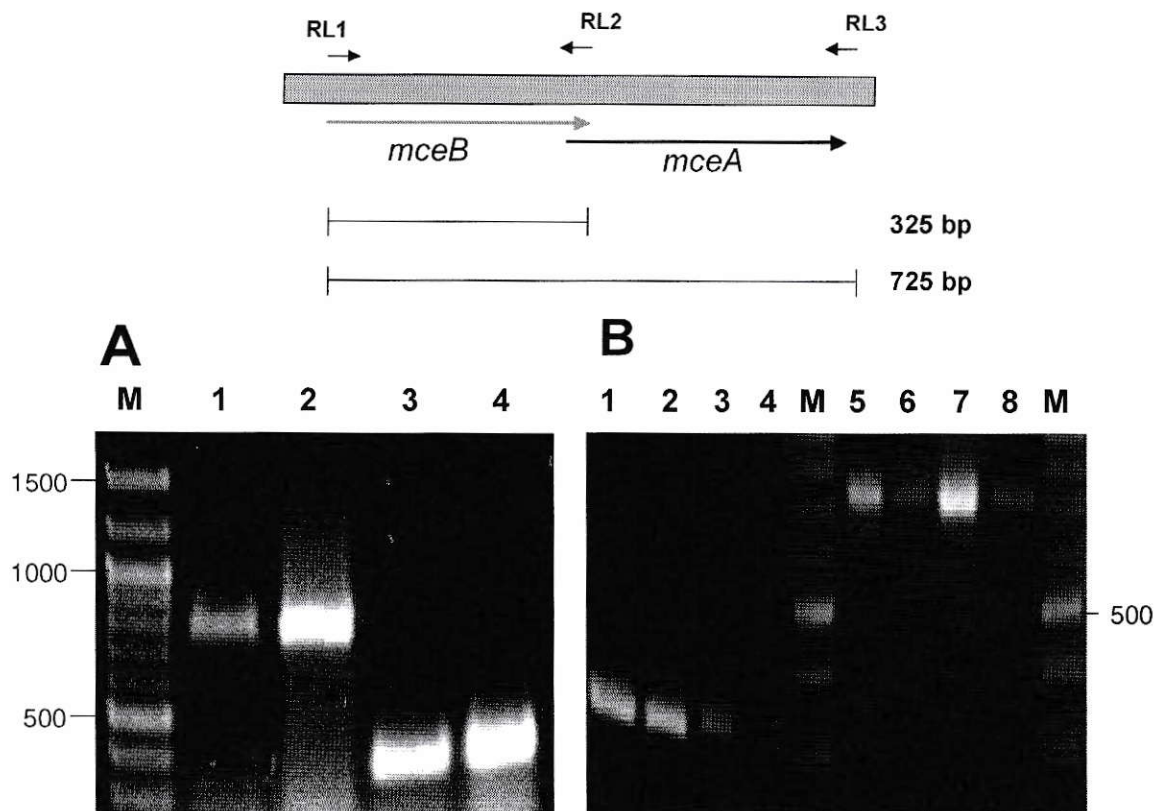


Fig. 5. **Transcripción de los genes *mceA* y *mceB*.** (A) RT-PCR empleando RNA total de *E. coli* VCS257pJEM15 (carriles 1 y 3) y *E. coli* VCS257pJAM434 (carriles 2 y 4). (B) RT-PCR empleando RNA total de *K. pneumoniae* RYC492. En todos los casos se empleó el partidor RL3 para realizar la transcripción reversa (RT). Para la etapa de PCR se emplearon las parejas de partidores RL1-RL3 (carriles 1A, 2A, 5B, 6B, 7B y 8B) o RL1-RL2 (carriles 3A, 4A, 1B, 2B, 3B y 4B). El carril M corresponde al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder.

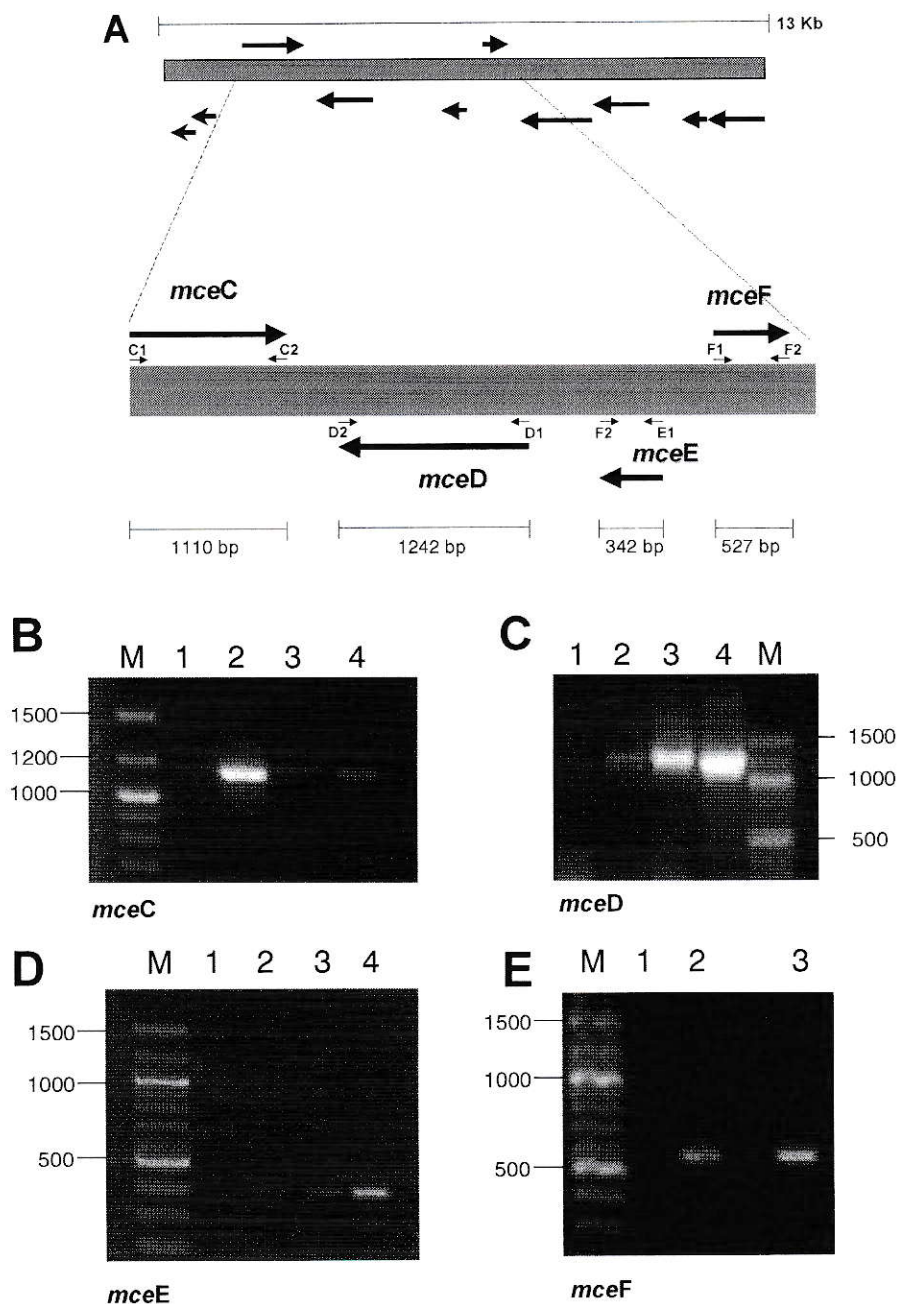


Fig. 6. **Transcripción de los genes *mceC*, *mceD*, *mceE* y *mceF*.** (A) Esquema de la localización de los ORFs *mceC*, *D*, *E* y *F* en el fragmento de DNA de 13 kb que codifica para los determinantes genéticos involucrados en la producción de microcina E492 activa. (B) RT-PCR para el gen *mceC* empleando los partidores C1 y C2. (C) RT-PCR para el gen *mceD* empleando los partidores D1 y D2. (D) RT-PCR para el gen *mceE* empleando los partidores E1 y E2. (E) RT-PCR para el gen *mceF* empleando los partidores F1 y F2. En cada experimento se empleó cantidades crecientes de RNA total de *E. coli* VCS257pJAM434 extraído de fase exponencial (2  $\mu$ g carril 2, 4  $\mu$ g carril 3 y 8  $\mu$ g carril 4). El carril 1 corresponde al control en que la muestra de RNA se trató con DNasa I y se utilizó para realizar directamente un PCR. El carril M corresponde al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder.

intergénicas JI, HG e IH como se muestra en esquema de la Fig. 7. Los resultados de los experimentos de RT-PCR empleando RNA total extraído de *E. coli* VCS257pJAM434 cultivada hasta fase exponencial de crecimiento, muestran que se amplifican las regiones intergénicas JI, HG e IH (Fig. 7). Esto indica que los genes involucrados en la maduración (*mceI* y *mceJ*) y exportación de la microcina (*mceG* y *mceH*) se transcriben en un mRNA policistrónico (*mceJIHG*).

Se quiso establecer si los genes *mceG*, H, I y J se expresaban en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, pues como se explicó en la introducción la expresión de estos genes puede ser un punto de regulación para la expresión de la microcina E492 activa en fase exponencial de crecimiento. Experimentos iniciales de expresión mediante RT-PCR indicaron que los genes *mceG* y *mceH* se transcriben tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento, en cambio los genes *mceI* y *mceJ* se transcriben en fase exponencial de crecimiento. Esto llevó a estudiar que ocurre con el acoplamiento transcripcional entre *mceI* y *mceH* en fase estacionaria de crecimiento. Para ello se amplificó la región intergénica IH mediante RT-PCR, empleando RNA total extraído de *E. coli* VCS257pJAM434 cultivada tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento. Los resultados de los experimentos de RT-PCR de la Fig. 8 indican que no se amplifica la región intergénica IH en fase estacionaria, lo cual indica que existe una unidad bicistrónica (*mceHG*) que agrupa a los genes que codifican para las proteínas

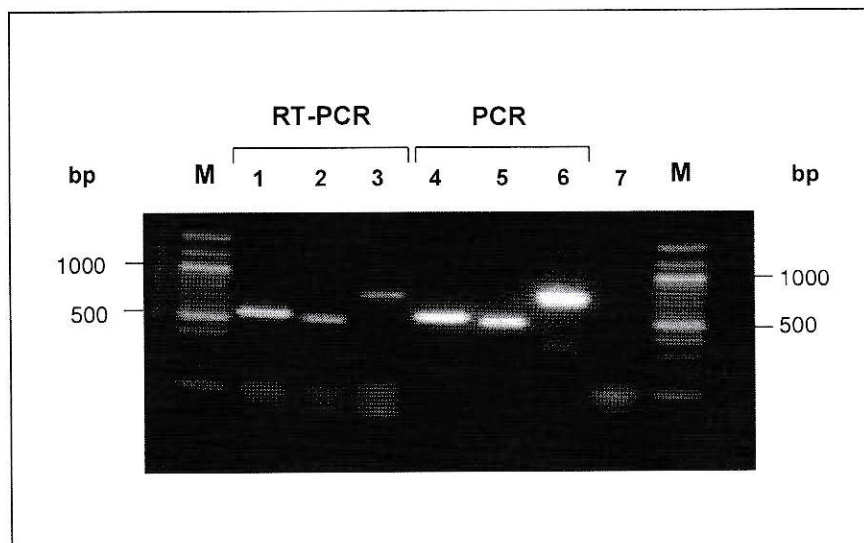
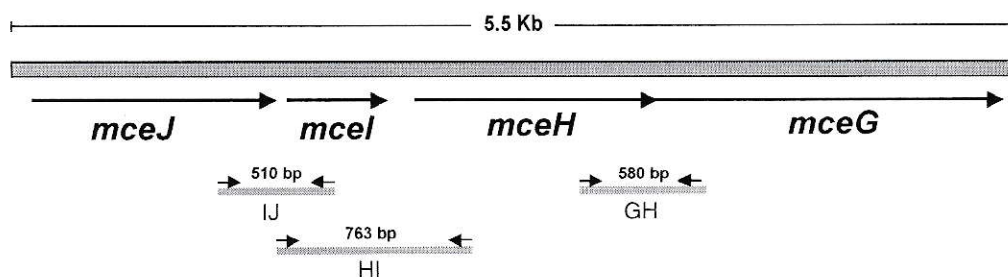


Fig. 7. **Acoplamiento transcripcional de los genes *mceGHIJ* determinado mediante RT-PCR.** Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a reacciones de RT-PCR en las que se empleó RNA total aislado de fase exponencial de crecimiento de la cepa de *E. coli* VCS257pJAM434. Los carriles 4, 5 y 6 corresponden a reacciones de PCR empleadas como control en las que se usó como templado el plasmidio pJAM434. El carril 7 corresponde a un control en que la muestra se trató con DNaseI y se sometió directamente a una reacción de PCR sin realizar el paso de RT. M corresponde al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder. En los carriles 1 y 4 se amplificó la región GH con los partidores PEG y H3. En los carriles 2 y 5 se amplificó la región IJ empleando los partidores PEI y J3. En los carriles 3 y 6 se amplificó la región HI mediante los partidores PEH y I1. La Tabla 3 muestra la secuencia y la ubicación de cada uno de los partidores empleados. Las bandas tenues de aproximadamente 100 bp que se observan en algunos carriles corresponden a dímeros de partidores.



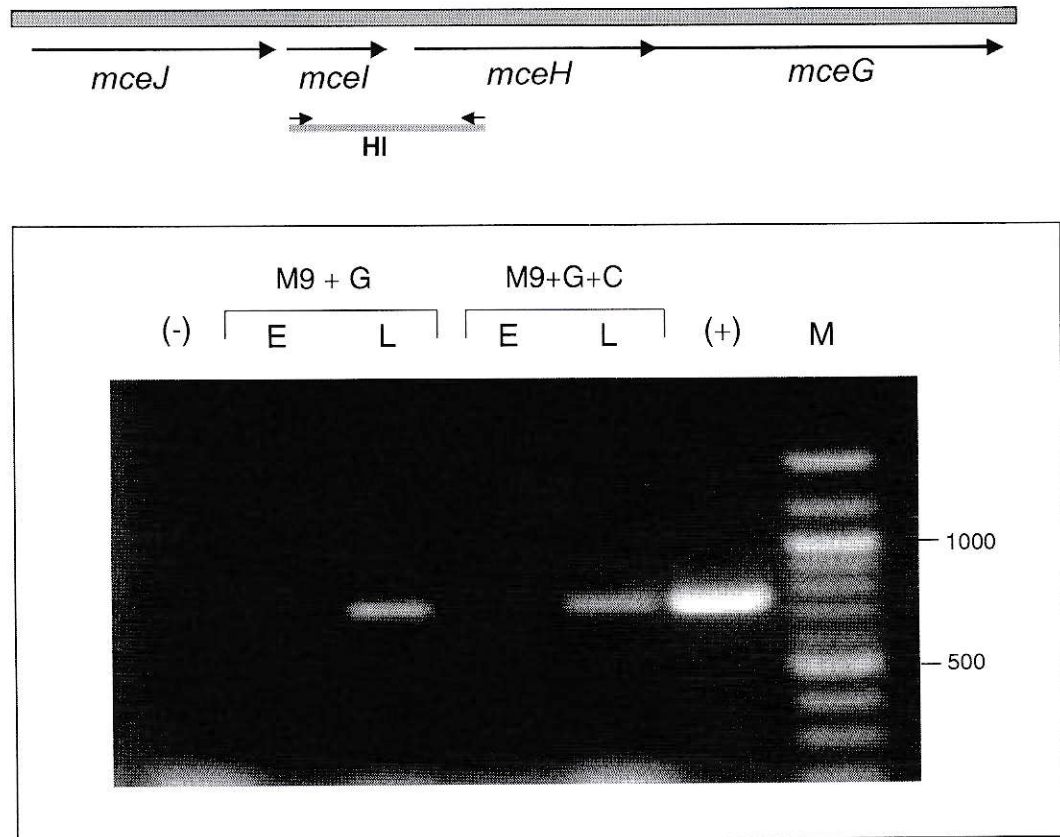


Fig. 8. Estudio del acoplamiento transcripcional de los genes *mceHI* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, determinado mediante RT-PCR. Se empleó como templado RNA total de *E. coli* VCS257pJAM434 aislado a partir de un cultivo en fase estacionaria (E) y fase exponencial (L) de medio mínimo suplementado con glucosa (M9 + G) y medio mínimo suplementado con glucosa y citrato (M9 +G +C). El carril (+) corresponde a la reacción de PCR empleada como control positivo en la que se usó como templado el plasmidio pJAM434. El carril (-) corresponde a un control de contaminación de la muestra de RNA con DNA. La muestra se trató con DNasaI y se sometió directamente a una reacción de PCR sin realizar el paso de RT. M corresponde al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder. La región HI se amplificó empleando los partidores PEH e I1 (Tabla 3).

del aparato exportador de la microcina, la que se transcribe en fase estacionaria de crecimiento.

### **3.1.2. Determinación de los sitios de inicio de la transcripción y regiones promotoras de las unidades transcripcionales.**

Como segundo paso de la caracterización de la expresión génica del sistema microcina E492, se determinaron los sitios de inicio de la transcripción y se establecieron las regiones promotoras funcionales de las 7 unidades transcripcionales descritas anteriormente. La determinación del inicio de la transcripción de cada uno de los diferentes mRNAs se realizó empleando la técnica de extensión del partidador o “primer extension”.

La unidad transcripcional *mceBA* posee dos sitios contiguos de inicio de la transcripción una T y G que se ubican 34 y 33 bp respectivamente río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *mceB* (Fig. 9). Río arriba de este doble sitio de inicio se encuentra la caja -10 y la caja -35 que se ajustan al consenso para el reconocimiento de la RNA polimerasa- $\sigma^{70}$ .

El gen *mceE* se transcribe como una unidad independiente y su sitio de inicio de la transcripción corresponde a una T que se ubica 23 bp río arriba de su codón de inicio de la traducción (Fig. 10A). La región promotora de este gen se ajusta al consenso para el reconocimiento de la RNA polimerasa- $\sigma^{70}$ . El gen *mceF* también se transcribe como una unidad monocistrónica y su sitio de inicio de la transcripción corresponde a una G que se ubica 38 bp río arriba del codón

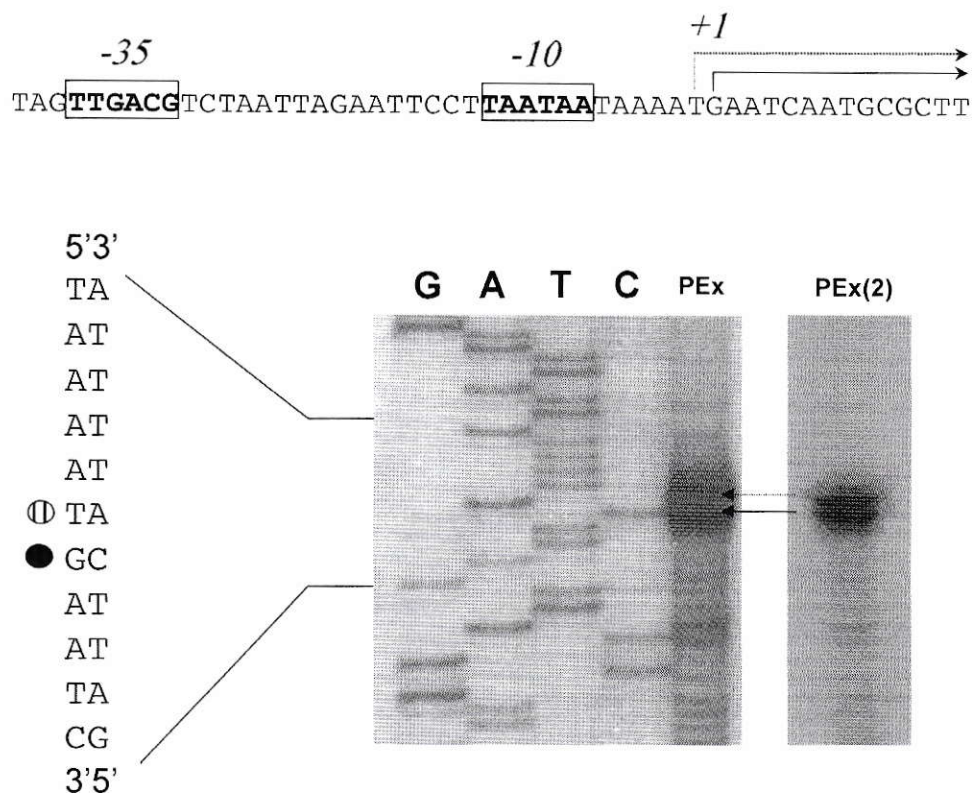


Fig. 9. **Caracterización del sitio de inicio de la transcripción de *mceBA*.** Se empleó para la reacción de transcripción reversa (RT) RNA extraído de *E. coli* VCS257pJAM434 y el partidor amb30 que hibrida en el gen *mceB* (~100 bp río abajo del sitio de inicio). Los carriles G, A, T, y C corresponden a la reacción de secuenciación de DNA del plasmidio pJAM434 con el mismo primer. El carril PEx corresponde a la reacción de extensión del partidor y el carril PEx(2) corresponde a la misma reacción de extensión del partidor pero con menor tiempo de exposición. Las flechas en la autorradiografía indican los sitios de inicio de la transcripción

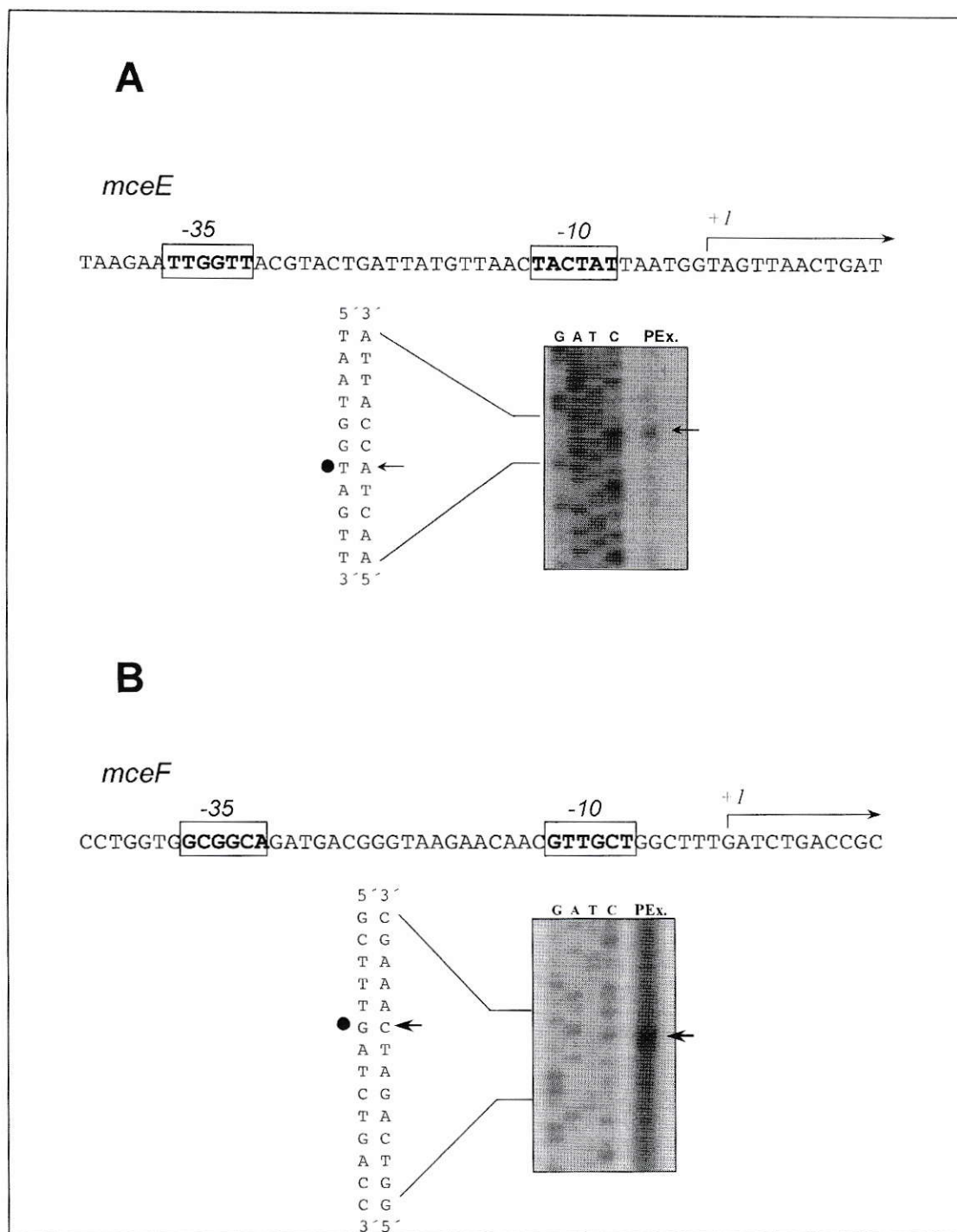


Fig. 10. **Caracterización del sitio de inicio de la transcripción de los genes *mceE* y *mceF*.** Se empleó para la reacción de transcripción reversa (RT) RNA extraído de *E. coli* VCS257pJAM434 y el partidor PEE que hibrida en el gen *mceE* (A) o el partidor PEF que hibrida en el gen *mceF* (B). Los carriles G, A, T, y C corresponden a la reacción de secuenciación de DNA del plasmidio pJAM434 con el mismo partidor. El carril PEx corresponde a la reacción de extensión del partidor.

de inicio de la traducción de este mRNA (Fig. 10B). La región promotora de *mceF* no se ajusta al consenso para el reconocimiento por la RNA polimerasa- $\sigma^{70}$ .

El sitio de inicio de la transcripción para las otras dos unidades transcripcionales monocistrónicas *mceC* y *mceD* corresponde a un C y G respectivamente (Fig. 11). Estas se ubican a 23 bp río arriba de su codón de inicio de la traducción de *mceC* y a 52 bp río arriba de su codón de inicio de la traducción de *mceD*. En ambos casos tampoco las regiones promotoras se ajusta al consenso para el reconocimiento por la RNA polimerasa- $\sigma^{70}$ .

Para las unidades policistrónicas *mceJIHG* y *mceHG* se determinó que el sitio de inicio de la transcripción en ambos casos corresponde a una G (Fig. 11). Para la unidad *mceJIHG* el sitio de inicio está ubicado a 55 bp río arriba del codón de inicio de la traducción de *mceJ*. En cambio para la unidad *mceHG* el sitio de inicio está ubicado a 103 o 102 bp río arriba del codón de inicio de la traducción de *mceH*, ya que esta unidad al igual que *mceBA* también posee dos sitios contiguos de inicio que corresponde a dos G (Fig. 11). Con respecto a las regiones promotoras de estas unidades policistrónicas, la secuencia de las cajas -10 y -35 no se ajustan al consenso para el reconocimiento por el factor  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa.

La Fig. 12 resume los resultados obtenidos indicando las 7 unidades transcripcionales que componen al sistema de la microcina E492 y los 7 promotores identificados.

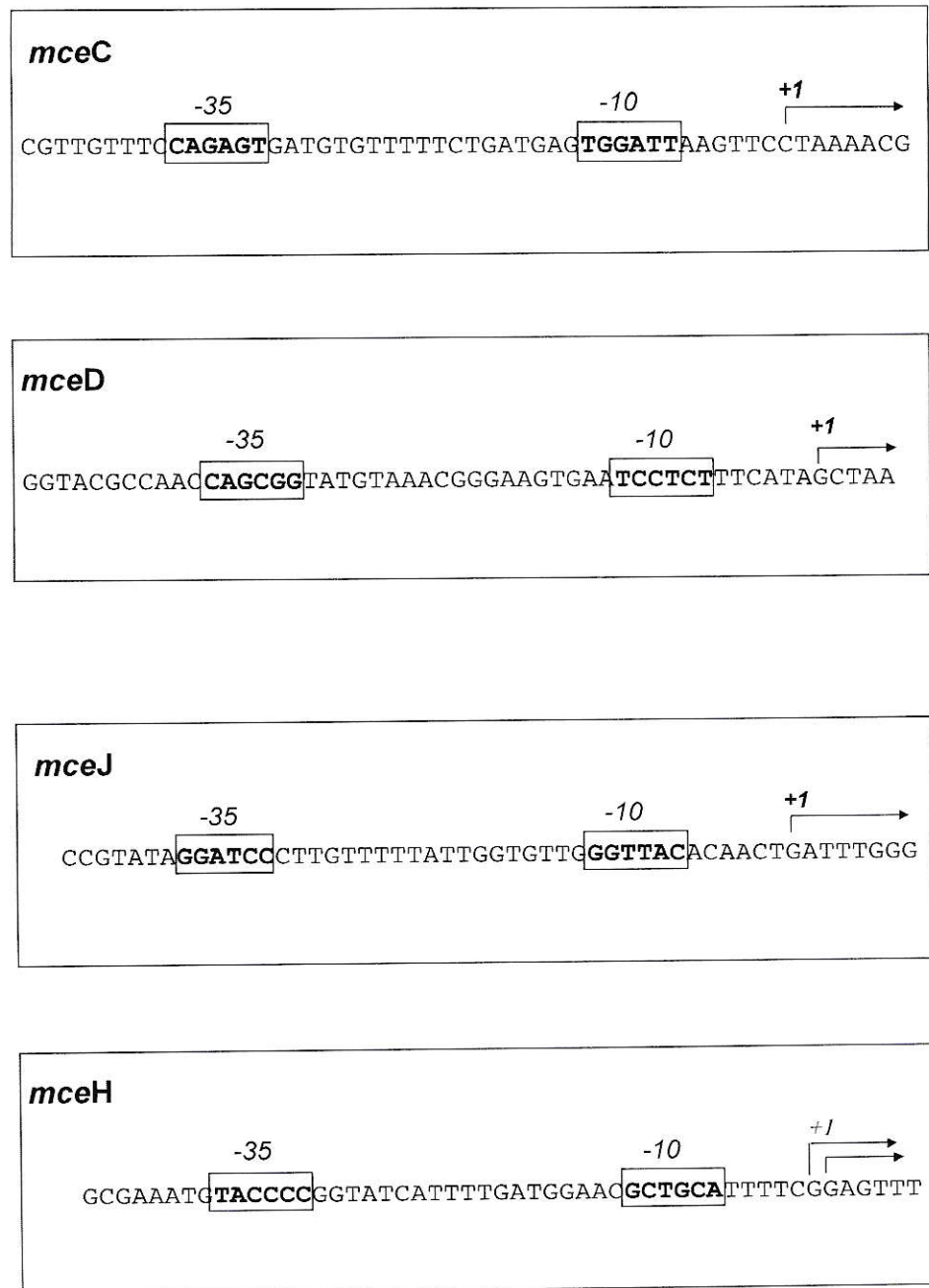


Fig. 11. Sitio de inicio de la transcripción y región promotora de las unidades transcripcionales *mceC*, *mceD*, *mceJHG* y *mceHG*. El inicio de la transcripción se determinó mediante experimentos de extensión del partidor. Las flechas indican el inicio y sentido de la transcripción.

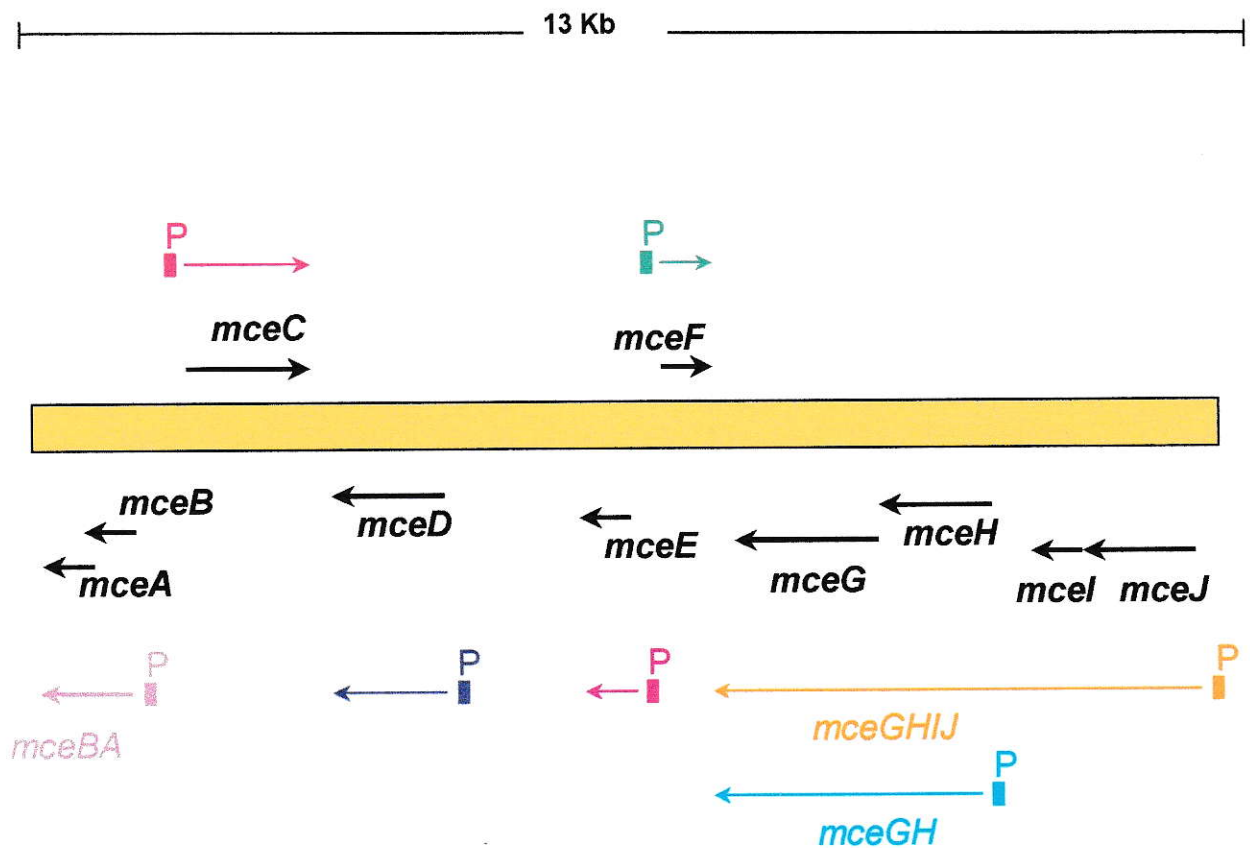


Fig. 12. Organización transcripcional de los genes implicados en la síntesis e inmunidad de la microcina E492 en el plasmidio pJAM434. Las flechas negras indican la región codificante (ORF) de cada gen y las flechas de colores las unidades transcripcionales. La letra P señala la localización de la región promotora. Esta figura fue construida a partir de la información obtenida de la Fig. 5 a la Fig. 11.

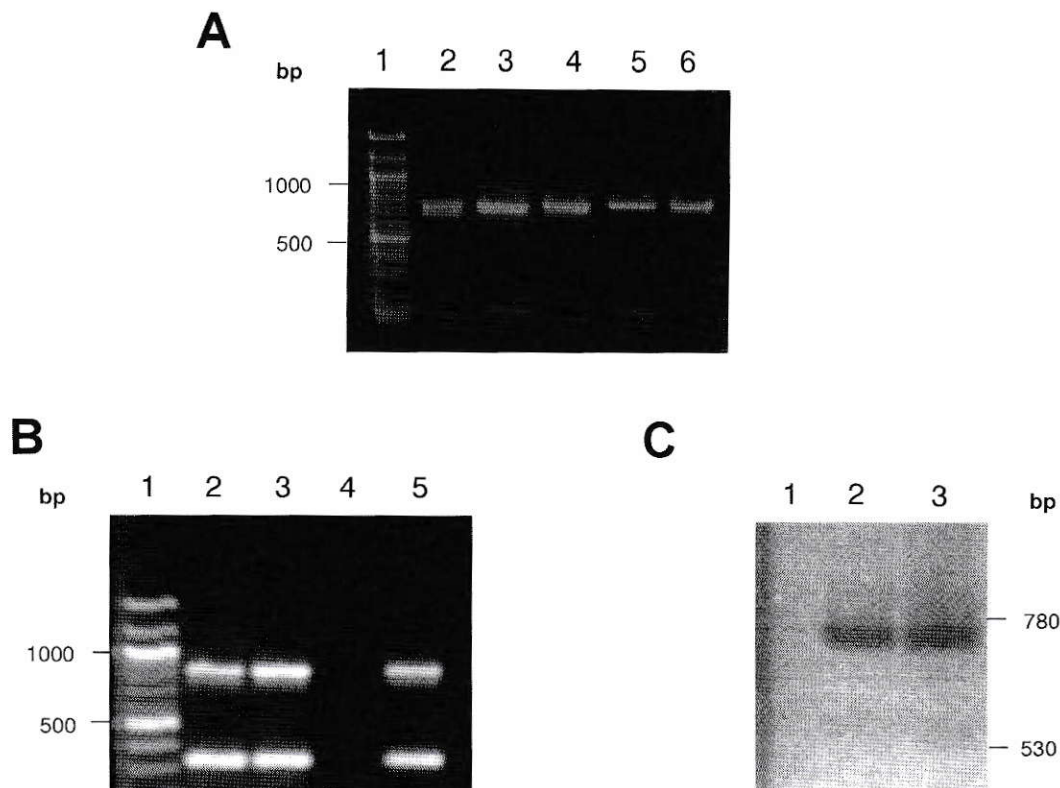
### 3.1.3. Expresión transcripcional de la MccE492 y su inmunidad

Como se indicó anteriormente el gen que codifica para la microcina (*mceA*) y el gen que codifica para la proteína de inmunidad (*mceB*) están formando la unidad transcripcional *mceBA*. Mediante experimentos de RT-PCR se determinó que este mRNA se transcribe tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento tanto en la cepa *E. coli* VCS257pJAM434 como en la cepa *E. coli* VCS257pJAM229 (Fig. 13 A).

Para determinar con mayor precisión los niveles de expresión de este operón, se utilizó un estándar interno, el gen de  $\beta$ -lactamasa presente en el plasmidio pJAM434, para comparar las reacciones RT-PCR realizadas con RNA extraído de cultivos crecidos hasta fase exponencial y fase estacionaria (Fig. 13 B), corroborándose que *mceBA* se transcribe en ambas fases de crecimiento.

Paralelamente, se realizó una hibridación Northern con RNA total aislado de cultivos de la cepa *E. coli* VCS257pJAM434 tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento y empleando como sonda DNA del gen *mceB* marcado con T4 kinasa y [ $^{32}$ P] $\gamma$ ATP (Fig. 13 C). El resultado de la hibridación Northern confirma que los genes que codifican para microcina E492 y la proteína de inmunidad de transcriben en ambas fases de crecimiento.





**Fig 13. Expresión del operón *mceBA* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento.** (A) RT-PCR a partir de RNA total de *E. coli* VCS257pJAM434 (carriles 2 y 3) y *E. coli* VCS257pJAM229 (carriles 4 y 5), purificado de un cultivo en fase exponencial (carriles 2 y 4) o en fase estacionaria de crecimiento (carriles 3 y 5). Para las reacciones de RT-PCR, así como para el control positivo con DNA (carril 6) se emplearon los partidores RL1 y RL3 (Tabla 3). (B) RT-PCR empleando RNA total de *E. coli* VCS257pJAM434 purificado de un cultivo en fase exponencial (carril 2) o en fase estacionaria de crecimiento (carril 3). El producto de amplificación de 850 bp que aparece en todos los carriles, corresponde al mensajero de  $\beta$ -lactamasa empleado como control interno. El carril 4 corresponde al control de tratamiento con DNasa I y el carril 5 corresponde al control positivo usando DNA de pJAM434. Para la etapa de RT se empleó el partidador RL3 para obtener el cDNA monohebra del operón *mceBA* y para la etapa de PCR se emplearon los partidores RL1 y RL2. (C) Northern blot de RNA total de *E. coli* VCS257pJAM434 en fase exponencial (carril 2) y fase estacionaria (carril 3) de crecimiento. El carril 1 corresponde a un control negativo sin RNA. Se empleó como sonda el gen *mceB* amplificado por PCR y marcado en el extremo 5' con T4 kinasa y  $\gamma$ [ $^{32}$ P]ATP.

### 3.1.4. Expresión de los genes *mceC*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I* y *J* en la cepa *E. coli* VCS257 pJAM434.

Estudios previos de Orellana y Lagos (1996) determinaron que hay diferencias en la producción de microcina E492 activa dependiendo el medio de cultivo empleado para crecer la cepa productora. La actividad microcina E492 recuperada de sobrenadantes de medio rico (LB) y medio salino mínimo suplementado con glucosa (M9+G) es muy baja, en cambio se recupera una mayor actividad al crecer la cepa productora en medio salino mínimo suplementado con glucosa y citrato (M9+G+C).

Debido a esta diferencia en la producción de microcina activa se estudiaron los niveles de expresión transcripcional de los genes *mceC*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I* y *J* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento en los tres medios de cultivo antes descritos (LB, M9+G y M9+G+C). Para estos estudios se empleó la técnica de transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR).

Los genes involucrados en la exportación de la microcina (*mceG* y *mceH*) así como los genes *mceD*, *mceE* y *mceF* se transcriben tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento en los tres tipos de medios de cultivos ensayados (LB, M9+G y M9+G+C). En cambio los genes *mceC*, *mceJ* y *mceI*, que están involucrados en la producción de microcina activa, presentan variaciones en su expresión (Tabla 4). Por ejemplo el gen *mceC* se transcribe en ambas fases de crecimiento, pero el fragmento amplificado en fase estacionaria aparece con menor intensidad (Fig. 14).

**Tabla 4.** Expresión de los genes del sistema microcina E492 mediante RT-PCR en distintos medios de cultivo y etapas de crecimiento.

Gen	LB		M9+G		M9+G+C	
	L	E	L	E	L	E
<i>mceC</i>	+	+	+	+/-	+	+/-
<i>mceD</i>	+	+	+	+	+	+
<i>mceE</i>	+	+	+	+	+	+
<i>mceF</i>	+	+	+	+	+	+
<i>mceG</i>	+	+	+	+	+	+
<i>mceH</i>	+	+	+	+	+	+
<i>mceI</i>	+	+/-	+	-	+	-
<i>mceJ</i>	+	+/-	+	-	+	-

+ : amplificación.

+/- : poca amplificación.

- : no amplificación.

L : fase exponencial de crecimiento.

E : fase estacionaria de crecimiento.

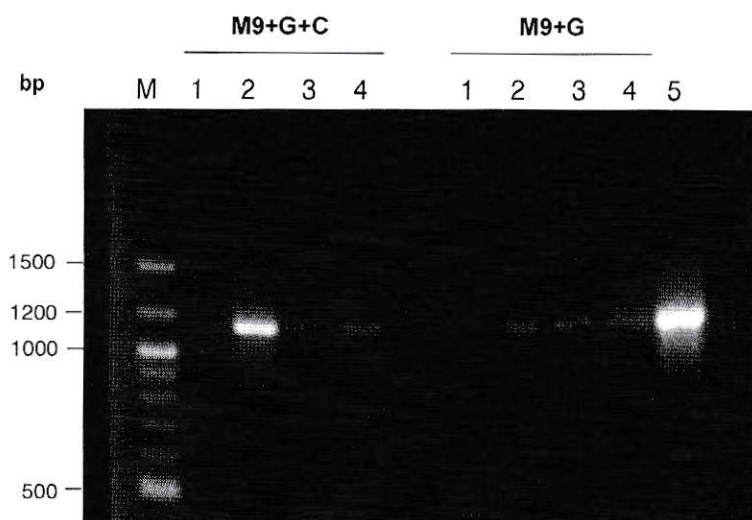


Fig. 14. **Estudio de la expresión transcripcional del gen *mceC* mediante RT-PCR.** Se empleó como templado RNA total de *E. coli* VCS257pJAM434 aislado a partir de un cultivo en fase fase exponencial (carril 2) estacionaria (carril 3) y estacionaria tardía (carril 4) crecido en medio mínimo suplementado con glucosa (M9+G) y en medio mínimo suplementado con glucosa y citrato (M9+G+C). M corresponde al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder. El carril 1 corresponde a un control en el que la muestra se trató con Dnasa I y se sometió directamente a una reacción de PCR sin realizar el paso de RT. El carril 5 corresponde a una reacción de PCR empleada como control positivo en las que se usó como templado DNA del plasmidio pJAM434. Para este experimento se utilizaron los partidores C1 y C2 (Tabla 3).

Para determinar con mayor precisión los niveles de mRNA de estos genes, se realizó experimentos de RT-PCR semicuantitativo utilizando el gen de  $\beta$ -lactamasa como estándar interno, lo que permitió establecer los niveles de expresión de estos genes en fase exponencial y estacionaria con respecto a un patrón de comparación. Se escogió el gen que codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa, debido a que se encuentra en el mismo número de copias que los genes a estudiar y se expresa tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento.

Para los experimentos de expresión del gen *mceC* mediante RT-PCR se empleó partidores para el gen de  $\beta$ -lactamasa (AMP1 y AMP2) que amplifican un fragmento de 850 bp y los partidores C3 y C2 del gen *mceC* que amplifican un fragmento de 650 bp. Mediante estos experimentos se estableció que el gen *mceC* se expresa tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento (Fig. 15).

Los genes *mceI* y *mceJ* se co-transcriben en una unidad policistrónica, por lo cual se diseñaron partidores que amplifican una región de 500 bp que abarca parte de los dos genes (J3 y PEI). Los resultados de expresión mediante RT-PCR indican que estos genes se transcriben sólo en fase exponencial de crecimiento, no detectándose mRNA de estos genes en fase estacionaria (Fig. 15).

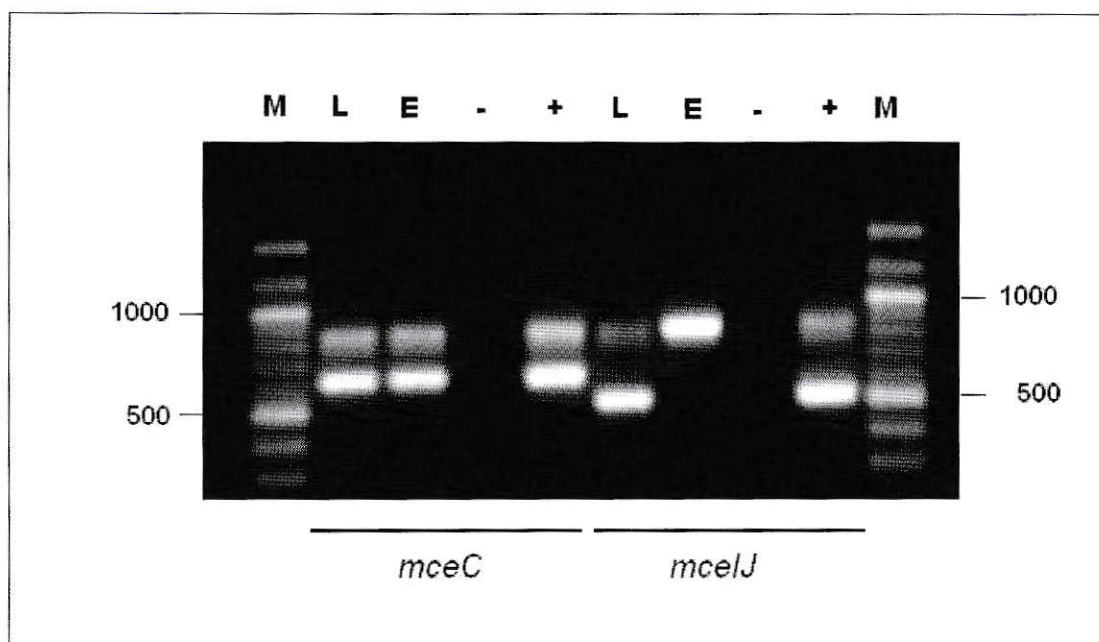


Fig. 15 . Transcripción de los genes *mceC*, *mceI* y *mceJ* en fase **exponencial (L)** y **estacionaria (E)** de crecimiento. Los experimentos de RT-PCR se realizaron empleando RNA total de *E. coli* VCS257pJAM434. El producto de amplificación de 850 bp que aparece en todos los carriles, corresponde al mensajero de  $\beta$ -lactamasa empleado como control interno. Los carriles (-) corresponden a control de tratamiento con DNasa I. Los carriles (+) corresponden a control positivo usando como templado DNA del plasmidio pJAM434. Los carriles M corresponden al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder.

### **3.1.5. Localización de la inserción del transposón Tn5 en mutantes para la producción de MccE492 en la cepa *E. coli* VCS257pJAM434.**

Nuestro laboratorio posee una colección de más de 200 mutantes en la producción de microcina E492 que fueron obtenidas por mutagénesis al azar usando el transposón Tn5 y el plasmidio pJAM434 en el cual están clonados los determinantes genéticos de la producción e inmunidad de la microcina E492 (Wilkins y cols., 1997; Lagos y cols., 2001).

Mediante análisis con enzimas de restricción, PCR y secuenciación se localizó la inserción del transposón Tn5 en distintas mutantes en la producción de microcina E492.

Empleando diferentes enzimas de restricción, se ubicó la región del DNA en la cual estaba inserto el transposón en los distintos mutantes. Se localizó específicamente el gen donde se insertó el transposón mediante PCR, empleando un partidador específico que hibrida en la región IR de Tn5 (partidor Tn1) y partidores que hibridan en la región 5' o 3' de los diferentes genes (a modo de ejemplo ver Fig. 16). Se determinó la inserción del transposón en la secuencia nucleotídica mediante la secuenciación del DNA de los mutantes que presentaban una sola inserción de Tn5 y se dedujo la inserción a nivel de secuencia primaria mediante análisis computacional. La Tabla 5 resume el resultado obtenido de localización de los sitios de inserción del transposón Tn5 en los genes del sistema de microcina E492 para los mutantes np220, np133, np125, p527, p312, np234, p411, np201, np108, np109, np203, np205, np218, np237, np229, np221.

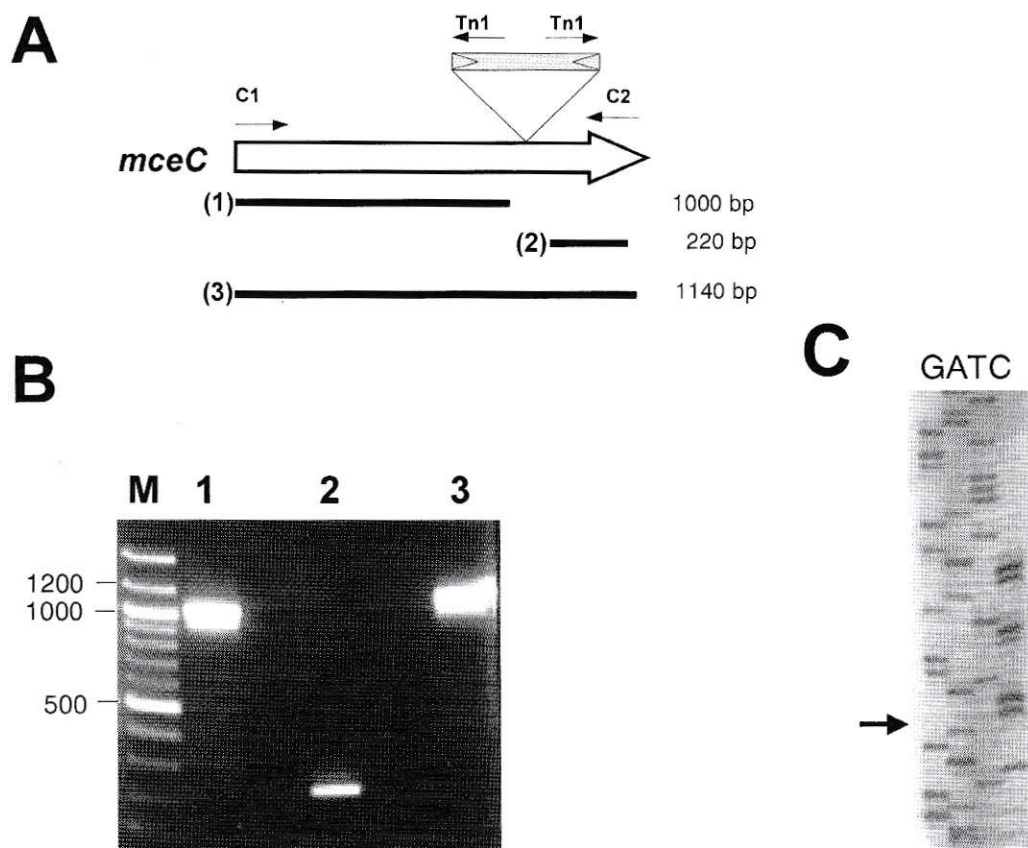


Fig. 16. **Localización de la inserción del transposón Tn5 en el gen *mceC*.** (A) Esquema de los partidores empleados para determinar la localización de la inserción de Tn5. Las líneas negras representan los fragmentos amplificados mediante PCR con cada pareja de partidores. (B) Localización de la inserción de Tn5 mediante PCR. Para estos experimentos se empleó DNA del plasmidio np133. El carril 1 corresponde a una reacción de PCR en la que se empleó los partidores C1 y Tn1. El carril 2 corresponde a una reacción de PCR en la que se empleó los partidores C2 y Tn1. El carril 3 corresponde a una reacción de PCR en la que se empleó los partidores C1 y C2 y DNA del plasmidio pJAM434 como templado. El carril M corresponde al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder. (C) Localización de la inserción de Tn5 mediante secuenciación del DNA. Se purificó el fragmento amplificado mediante PCR con los partidores C1 y Tn1 y se secuenció este fragmento empleando el partidor Tn1. Los carriles G, A, T, y C corresponden a la reacción de secuenciación de DNA. La flecha indica la inserción de la secuencia del transposón Tn5 en la secuencia del gen *mceC*.



### 3.1.6. Expresión transcripcional de los genes del sistema MccE492 en mutantes en los genes *mceC*, *mceD* y *mceFG*.

Para determinar si la ausencia de alguno de los productos génicos tiene algún efecto sobre la transcripción de los restantes genes del sistema, se estudió la expresión transcripcional de los genes del sistema de la MccE492 en los mutantes np133, p527 y JRS1. Se crecieron estos mutantes en medio M9 suplementado con glucosa y citrato. Se aisló RNA total de estos mutantes de cultivos crecidos hasta fase exponencial y estacionaria y se analizó la expresión de los diferentes genes mediante RT-PCR. Para estos experimentos se empleó primarios que hibridan en el extremo 5' y 3' de la región codificante en los genes *mceC*, *mceD*, *mceE*, *mceF* y primarios que amplifican una región intragénica para analizar la expresión de los genes *mceAB*, *mceGH* y *mceIJ*.

La mutante np133 presenta una inserción única del transposón Tn5 en el gen *mceC* (Tabla 5). El producto de este gen está involucrado en la maduración de la microcina ya que esta mutante posee un fenotipo de producción de microcina inactiva (Lagos y cols., 2001). Se determinó en esta mutante que los genes *mceA*, B, D, E, F, G y H se transcriben en fase exponencial y estacionaria de crecimiento (Fig. 17) y que los genes *mceI* y *mceJ* se transcriben sólo en fase exponencial (Fig. 17) al igual que en la cepa silvestre. El producto de amplificación de 850 bp que aparece en todos los carriles de la Fig. 17 corresponde al mensajero de  $\beta$ -lactamasa empleado como control interno.

**Tabla 5.** Localización de la inserción del transposón Tn5 en los genes del sistema microcina E492 en mutantes no productores de Mcc E492 activa.

Gen	Tamaño de la Proteína (aa)	Mutante	Localización inserción Tn5	
			Secuencia nucleotídica # (bp)	Secuencia aminoacídica (aa)
<i>mceA</i>	103	np220	437	43
<i>mceB</i>	95	-		
<i>mceC</i>	370	np133 np125	2263 1973	320 223
<i>mceD</i>	414	p527 p312	3156 3903	229 promotor
<i>mceF</i>	179	np234 p411	6553 6551	173 173
<i>mceG</i>	698	np108 np201	8422 8977	351 116
<i>mceH</i>	413	np109 np203	9959 9937	200 207
<i>mceI</i>	163	np205	10958	89
<i>mceJ</i>	524	np218 np237 np229 np221	11365 11366 11367 12119	476 476-477 477 225-226

# Se usó como referencia la secuencia del fragmento de DNA 13 kb que contiene los determinantes genéticos del sistema microcina E492 contenido en el plasmidio pJAM434 publicada en el GenBank (código de acceso AF063590).

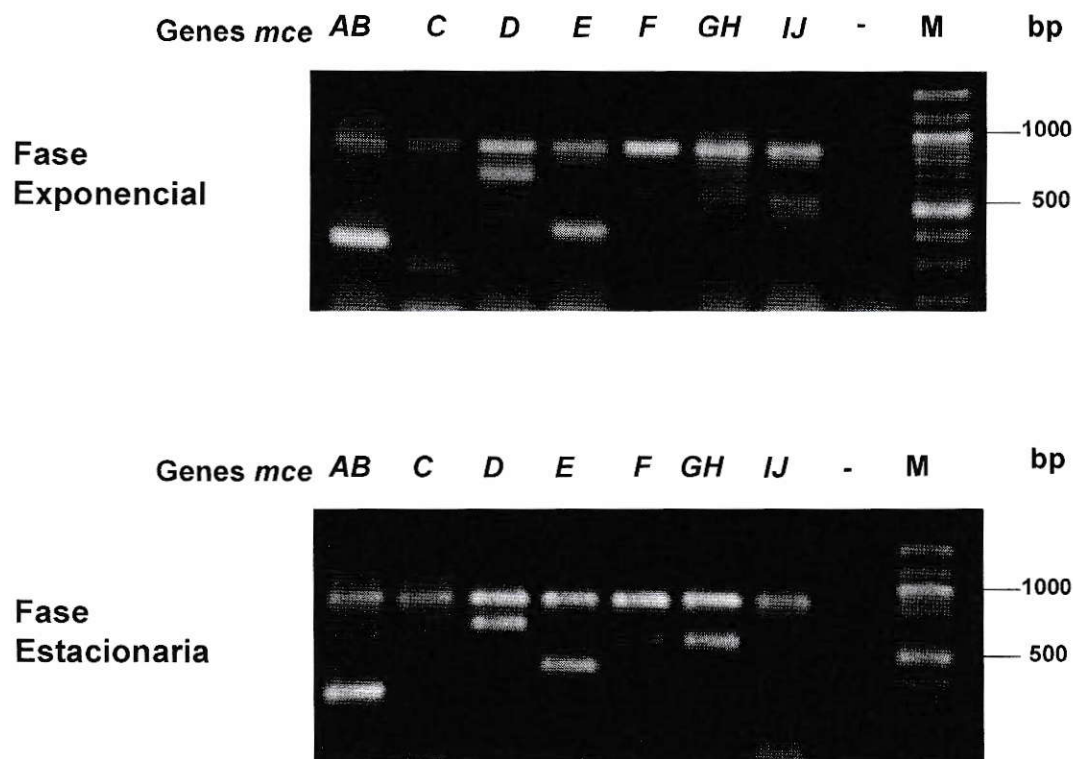


Fig. 17. Estudio de la expresión transcripcional de los genes del sistema de microcina E492 en la mutante *np133 (mceC<sup>-</sup>)*. El producto de amplificación de 850 bp que aparece en todos los carriles, corresponde al mensajero de  $\beta$ -lactamasa empleado como control interno. El carril - corresponde al control en que de la muestra de RNA se trató con DNaseI y se sometió directamente a una reacción de PCR sin realizar el paso de RT. El carril M corresponden al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder.

Como se esperaba en estos experimentos no se detectó mRNA para el gen *mceC*, pero se amplificó en fase exponencial una banda de 300 bp cuyo origen no pudimos determinar.

Un resultado similar al obtenido para la mutante np133 se obtuvo con la mutante p527 (Fig. 18) que presenta una inserción del transposón Tn5 en el gen *mceD* (Tabla 5). El producto de este gen posee homología con una enteroquelina esterasa (*IroD*) de *Salmonella enterica* serotipo Typhi. La Fig. 18 muestra que los genes *mceJI* se expresan solo en fase exponencial de crecimiento, en cambio el resto de los genes se expresan en ambas fases de crecimiento.

La mutante JRS1 es una mutante por delección que carece de un fragmento *Sall* y que posee un fenotipo no productor de microcina (Wilkins y cols., 1997). Al sacar el fragmento *Sall* se pierde el gen *mceF* y 6 pb del extremo 3' del gen *mceG*, lo que produce un cambio en el marco de lectura en *MceG* generando una proteína con un extremo C- terminal alterado, donde la secuencia normal VDRTISI es reemplazada por VDRCP en la mutante JRS1. Estas alteraciones en la composición y tamaño de la proteína hacen que el transportador sea incapaz de exportar la MccE492 al espacio extracelular. El perfil de expresión transcripcional en esta mutante doble muestra que al igual que en la cepa silvestre los genes *mceI* y *mceJ* se expresan sólo en fase exponencial (Fig. 19). En cambio, los genes *mceA*, B, C, D, E, G y H se expresan en ambas fases de crecimiento. En estos experimentos se detecta la expresión de *mceG* debido a que se empleó un partidador que amplifica una región intragénica de *mceGH*.

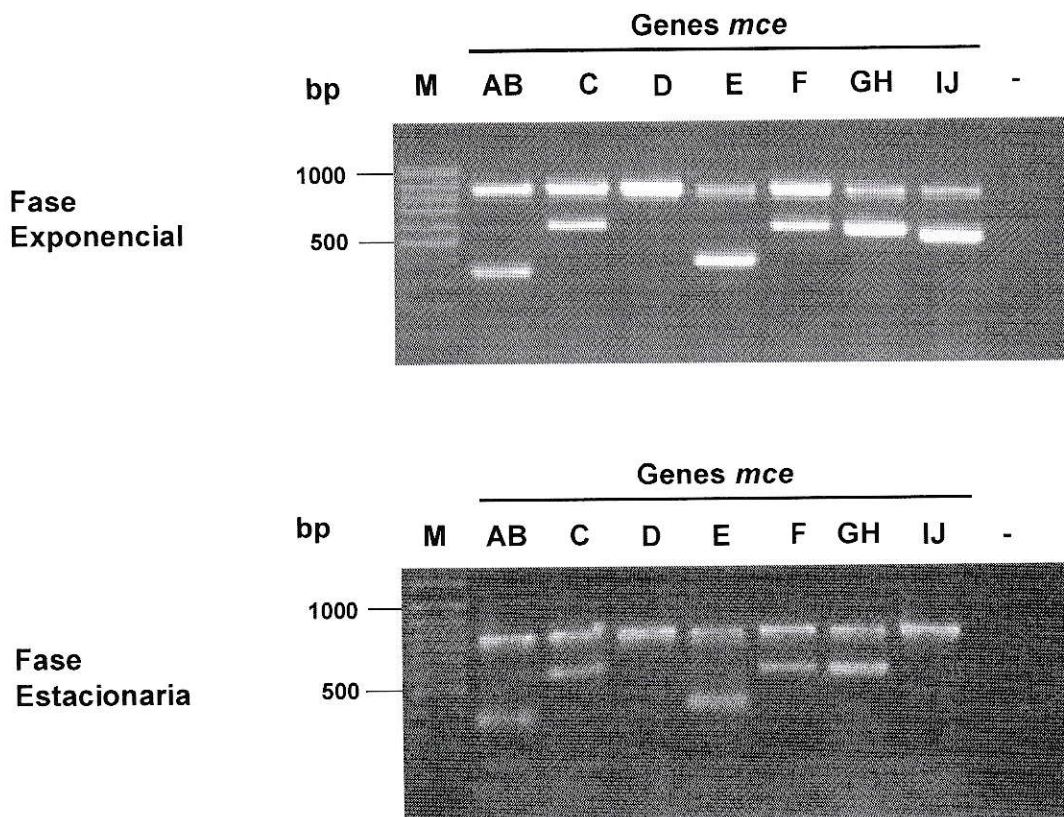


Fig. 18. Estudio de la expresión transcripcional de los genes del sistema de microcina E492 en la mutante p527 (*mceD*<sup>-</sup>). El producto de amplificación de 850 bp que aparece en todos los carriles, corresponde al mensajero de  $\beta$ -lactamasa empleado como control interno. El carril - corresponde al control en que la muestra de RNA se trató con DNAsal y se sometió directamente a una reacción de PCR sin realizar el paso de RT. El carril M corresponden al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder.

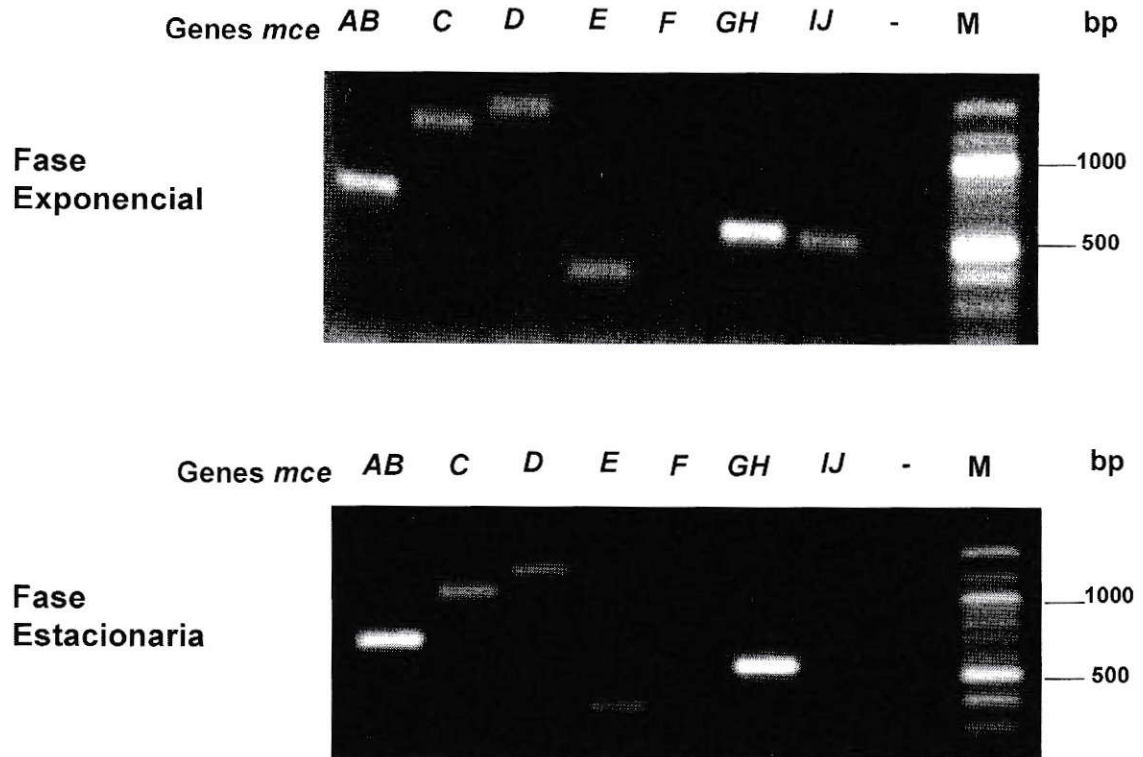


Fig. 19. Estudio de la expresión transcripcional de los genes del sistema de microcina E492 en la cepa JRS1 (*mceF*<sup>-</sup>, *mceG*<sup>-</sup>). Los experimentos de RT-PCR se realizaron empleando RNA total aislado en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. El carriles - corresponde al control en que la muestra de RNA se trató con Dnasa I y se sometió directamente a una reacción de PCR sin realizar el paso de RT. El carril M corresponde al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder.

### 3.2. ESTUDIOS DE REGULACIÓN A NIVEL TRADUCCIONAL

La microcina E492 es producida principalmente en fase exponencial de crecimiento (de Lorenzo y cols., 1984; Wilkens y cols., 1997). Sin embargo, como se señaló anteriormente en esta Tesis, los genes que codifican para la microcina (*mceA*) y para la proteína de inmunidad (*mceB*) se transcriben tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento. Resultados en nuestro laboratorio muestran que es posible aislar microcina desde el sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria, pero es inactiva. Mediante cultivos en fase estacionaria de la cepa de *E. coli* productora de microcina, a la que se reemplazó el medio de cultivo gastado por medio fresco y se incubó varias horas, se determinó que esta cepa de *E. coli* produce microcina durante la fase estacionaria, pero la microcina recuperada no presenta actividad cuando se ensaya sobre un césped de células sensibles (Corsini y cols., 2002).

Como paso siguiente en el estudio de la regulación de la expresión de microcina E492 se abordó este estudio desde un punto de vista traduccional, caracterizando la producción de la microcina E492, la proteína de inmunidad y las proteínas involucradas en la maduración (*MceC* y *MceI*) durante las etapas del crecimiento bacteriano.

#### 3.2.1. Construcción de fusiones traduccionales.

Para determinar como ocurre la expresión traduccional de las proteínas del sistema microcina E492 durante el crecimiento bacteriano, se realizaron

fusiones al azar de estas proteínas con la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Para ello se empleó el bacteriófago mini-Mu dII1681 (Castilho y cols., 1984), que es un fago defectivo que porta en su genoma el gen de resistencia a kanamicina del transposón Tn5 y el operón lactosa sin las señales de iniciación de la transcripción y traducción y sin los primeros codones del gen *lacZ* (Fig. 3A). La obtención de proteínas híbridas requirió que el sentido de la transcripción así como la fase de lectura de ambos genes coincidieran y que la proteína híbrida formada tuviera actividad  $\beta$ -galactosidasa, quedando la expresión del gen híbrido bajo el control transcripcional y traduccional del gen en el que se insertó el fago mini-Mu (Fig. 3B). Las fusiones traduccionales se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Castilho y cols. (1984), que se resume en la Fig. 4. Se empleó la cepa de *E. coli* POII1681 que porta en el cromosoma los fagos Mu cts (helper) y Mu dII1681 (defectivo). Esta cepa se transformó con el plasmidio pJAM434 ( $Amp^r$ ) o con el plasmidio pMAH ( $Cm^r$ ). La cepa transformada se creció a temperatura restrictiva y al aumentar la temperatura se indujo la transposición al azar del fago Mu dII1681 desde el cromosoma bacteriano al plasmidio. Se prepararon lisados de Mu y se infectó la cepa receptora *E. coli* pop3001.6 ( $recA^+$ ) para seleccionar los muductantes portadores del plasmidio con inserción del mini-Mu. Para la selección se emplearon placas de medio LB con antibióticos (Amp o Cm y Km) y X-gal para discriminar aquellos muductantes que llevaban el plasmidio con el fago mini-Mu y cuya fusión quedaba en fase con alguno de los genes. Los muductantes que



presentaron color azul se repicaron a placas con antibióticos y X-gal varias veces para analizar la estabilidad de la inserción y los clones estables se almacenaron.

Mediante este procedimiento se obtuvo una colección de 289 muductantes entre el plasmidio pJAM434 y Mu dII1681, y una colección de 35 muductantes entre el plasmidio pMAH y este fago mini-Mu. Se aisló DNA plasmidial de estos muductantes y posteriormente se localizó la región del DNA donde se insertó el fago mini-Mu mediante análisis de restricción empleando la enzima *EcoRI* y se localizó específicamente el gen donde se insertó mediante PCR empleando un partidor antisentido ubicado en el gen *lacZ* de fago mini-Mu y partidores directos o “sense” ubicados en la región 5' de los genes del sistema microcina. Se obtuvo fusiones del mini-Mu con los genes *mceA*, *mceB*, *mceC*, *mceG*, *mceH*, *mceI* y *mceJ* como se muestra en la Tabla 6.

### **3.2.2. Expresión traduccional de la microcina E492 y su inmunidad.**

Para estudiar la expresión traduccional de la microcina E492 y su inmunidad se emplearon los muductantes MuME132 y MuME12, respectivamente (Tabla 6). En la construcción pMuME132 el fago mini-Mu dII1681 se insertó en el aminoácido 73 de la MccE492 dando origen a una fusión MceA-LacZ y en la construcción pMuME12 el fago se insertó en el residuo 57 de la proteína de inmunidad produciéndose la fusión MceB-LacZ. Se determinó la expresión traduccional de los productos génicos *mceA-lacZ* y *mceB-lacZ* en estos

**Tabla 6.** Fusiones traduccionales obtenidas entre los genes del sistema microcina E492 y el fago mini-Mu dll1681

<b>Gen</b>	<b>Plasmidio</b>	<b>Fusión (gen-Mini Mu)</b>	<b>Nombre Construcción</b>
<i>mceA</i>	pMAH	MceA-LacZ	pMuME132
<i>mceB</i>	pMAH	MceB-LacZ	pMuME12
<i>mceC</i>	pJAM434	MceC-LacZ	pMUG21
<i>mceG</i>	pJAM434	MceG-LacZ	pMUG13 pMUG14 pMUG24 pMUG41 pMUG128 pMUG133 pMUG195
<i>mceH</i>	pJAM434	MceH-LacZ	pMUG12 pMUG131
<i>mceI</i>	pJAM434	MceI-LacZ	pMUG43 pMUG132
<i>mceJ</i>	pJAM434	MceJ-LacZ	pMUG33

muductantes, midiendo a actividad  $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento celular usando de huésped *E. coli* pop3001.6 (Fig. 20).

La cinética de crecimiento que presentan ambos muductantes es similar, llegando a fase estacionaria de crecimiento a los 400 min, aproximadamente.

La proteína de fusión MceA-LacZ (pMuME132) se expresó mayoritariamente al comienzo de la fase exponencial y decayó al llegar a la fase estacionaria, manteniendo constante los bajos niveles de actividad durante la fase estacionaria (Fig. 20). Los valores de actividad máxima y mínima para MceA-LacZ son aproximadamente 53 y 16 Unidades Miller (UM) respectivamente. En cambio MceB-LacZ (pMuME12) presentó un perfil de expresión similar al anterior pero con niveles de actividad mucho mayores con un valor máximo de alrededor de 100 UM y un valor mínimo que bordea las 40 UM (Fig. 20). Por lo tanto, existe aparentemente una diferencia en los niveles de expresión traduccional de los productos génicos de *mceA* y *mceB*, pese a que provienen de un mismo mRNA.

### **3.2.3. Expresión traduccional de las proteínas de maduración MceC y Mcel.**

A las proteínas MceC y Mcel se les ha asignado una función en la maduración de la microcina E492 ya que mutantes en los genes *mceC* y *mcel* producen una microcina inactiva (Lagos y cols., 2001).

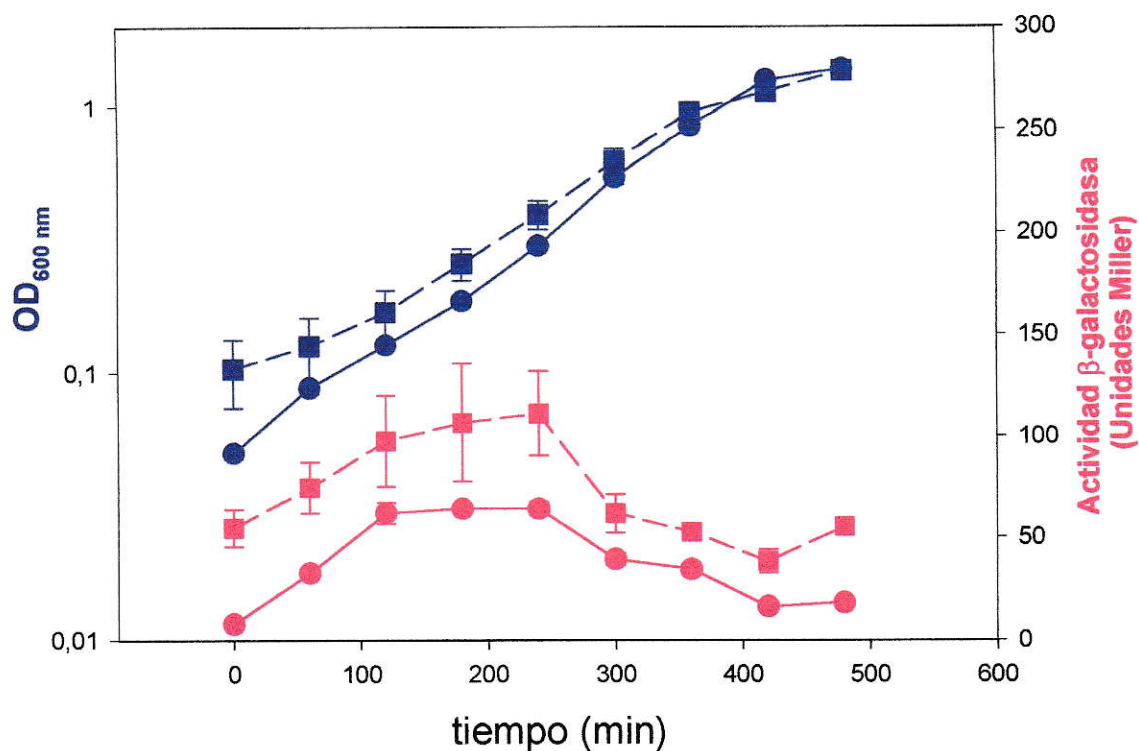


Fig. 20. Expresión traduccional de la proteína MceA-LacZ en *E. coli* pop3001.6pMuME132 y de la proteína MceB-LacZ en *E. coli* pop3001.6pMuME12. Las curvas en azul corresponden a la cinética de crecimiento bacteriana ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) de *E. coli* pop3001.6pMuME132 (●) y de *E. coli* pop3001.6pMuME12 (■). Las curvas en rojo corresponden a la actividad β-galactosidasa que presentan las fusiones MceA-LacZ (●) y MceB-LacZ (■) expresada en unidades Miller.

Para comprender el papel que pueden estar cumpliendo estas proteínas se estudió su expresión traduccional empleando los muductantes MUG21 y MUG43 (Tabla 6). En el muductante MUG21 el fago mini-Mu dII1681 se insertó en el plasmidio pJAM434 en el aminoácido 26 de la proteína MceC dando origen a una proteína de fusión MceC-LacZ y en el muductante MUG43 el fago se insertó en el aminoácido 108 de la proteína Mcel produciéndose la proteína de fusión Mcel-LacZ. La expresión traduccional en estos muductantes se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento celular usando de huésped la cepa de *E. coli* pop3001.6 (*lacZ*).

La fusión MceC-LacZ presentó una menor expresión al comienzo de la fase exponencial de crecimiento pero luego aumentó su expresión hasta llegar a fase estacionaria, donde disminuyó levemente a niveles alrededor de 200 UM (Fig. 21) . Esta disminución se hace más evidente cuando las mediciones se realizan a tiempos más prolongados durante la fase estacionaria, como se mostrará más adelante. El valor de 200 UM es similar al obtenido a tiempo cero, el cual nos indica el estado de expresión que poseen las células bacterianas empleadas para la inoculación del cultivo y que provienen de un cultivo que se encuentra en fase estacionaria. En general el nivel de actividad  $\beta$ -galactosidasa de esta fusión es mucho mayor que el de las demás fusiones, con valores máximos y mínimos de 300 y 100 UM respectivamente.

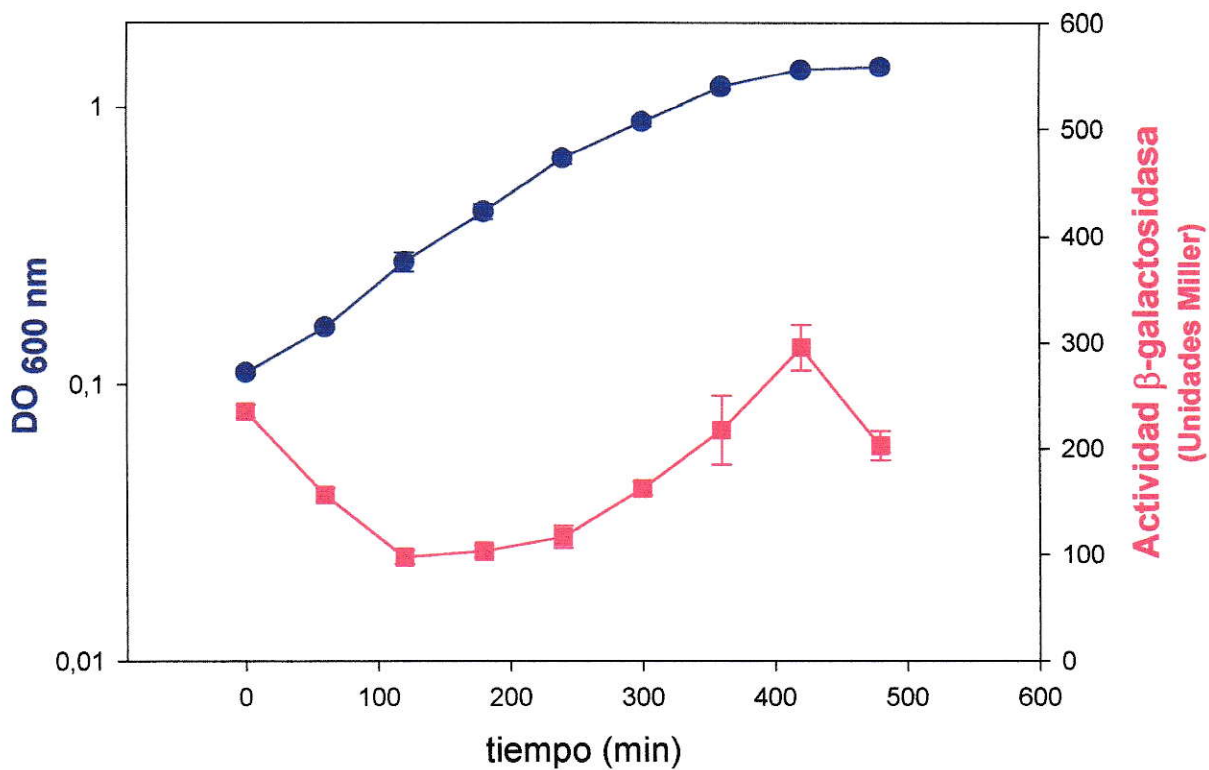


Fig. 21. **Expresión traduccional de la proteína MceC-LacZ en *E. coli* pop3001.6pMUG21.** La curva en azul corresponde a la cinética de crecimiento bacteriana (DO<sub>600 nm</sub>) de *E. coli* pop3001.6pMUG21. La curva en rojo corresponde a la actividad β-galactosidasa que presentan las fusiones MceC-LacZ expresada en unidades Miller.

La disminución en la expresión de proteína MceC detectada en fase estacionaria no se observó cuando se midió la expresión transcripcional mediante RT-PCR (Fig 15), pero si se hizo evidente en los resultados obtenidos mediante hibridación Northern (Fig. 22).

En estos experimentos no se detectó presencia mRNA del gen *mceC* en fase estacionaria de crecimiento cuando se empleó RNA total extraído de un cultivo de la cepa de *E. coli* VCS257pJAM434 crecida durante 840 min. La discrepancia entre los resultados de expresión de los mRNA mediante RT-PCR y Northern blot podría explicarse por la diferencia de sensibilidad de ambos métodos. Por ejemplo, si suponemos que hay 100 copias de mRNA de un gen en una etapa *versus* 300 copias del mismo gen en otra etapa del crecimiento, la cantidad de copias del amplificado que se genera después de 25 ciclos en una reacción de PCR es de  $3,4 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  respectivamente. Si suponemos que para un fragmento de DNA de 1.000 bp,  $9,1 \times 10^{11}$  moléculas equivalen a 1,52 pmoles y que 1 pmol equivale a 0,66  $\mu\text{g}$  entonces las  $3,4 \times 10^9$  moléculas sintetizadas equivalen a 3,6 ng y las  $1 \times 10^{10}$  moléculas equivalen a 11 ng. Esta diferencia no es detectada por PCR debido a la gran sensibilidad que posee esta técnica, por tal motivo con la metodología de RT-PCR aplicada en este trabajo no es posible apreciar una diferencia o disminución de 3 veces en la cantidad mRNA.

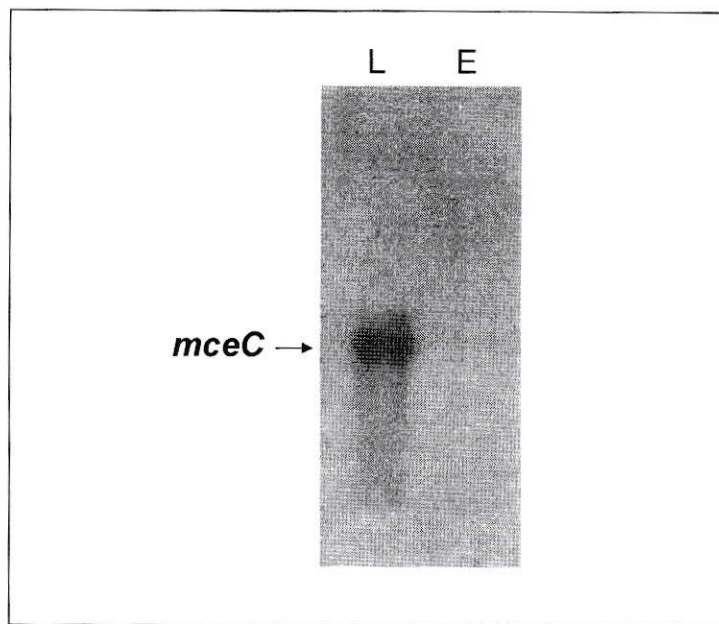


Fig. 22. **Estudio de la expresión transcripcional del gen *mceC* mediante hibridación Northern.** Se empleó RNA total de *E. coli* VCS257pJAM434 aislado a partir de un cultivo en fase exponencial (L) crecido durante 5 horas (300 min) y un cultivo en fase estacionaria (E) crecido durante 14 horas (840 min) usando medio mínimo M9 suplementado con glucosa y citrato. Se empleó como sonda el gen *mceC* amplificado por PCR y marcado en el extremo 5' con T4 kinasa y  $\gamma$ [ $^{32}$ P]ATP.



Mcel-LacZ se expresó muy pobremente al comienzo de la fase exponencial (8 UM), pero su expresión aumentó durante la fase exponencial (50 UM) y al llegar a fase estacionaria cayó drásticamente (25 UM) hasta alcanzar niveles más bajos, los que se mantuvieron durante la fase estacionaria (Fig. 23).

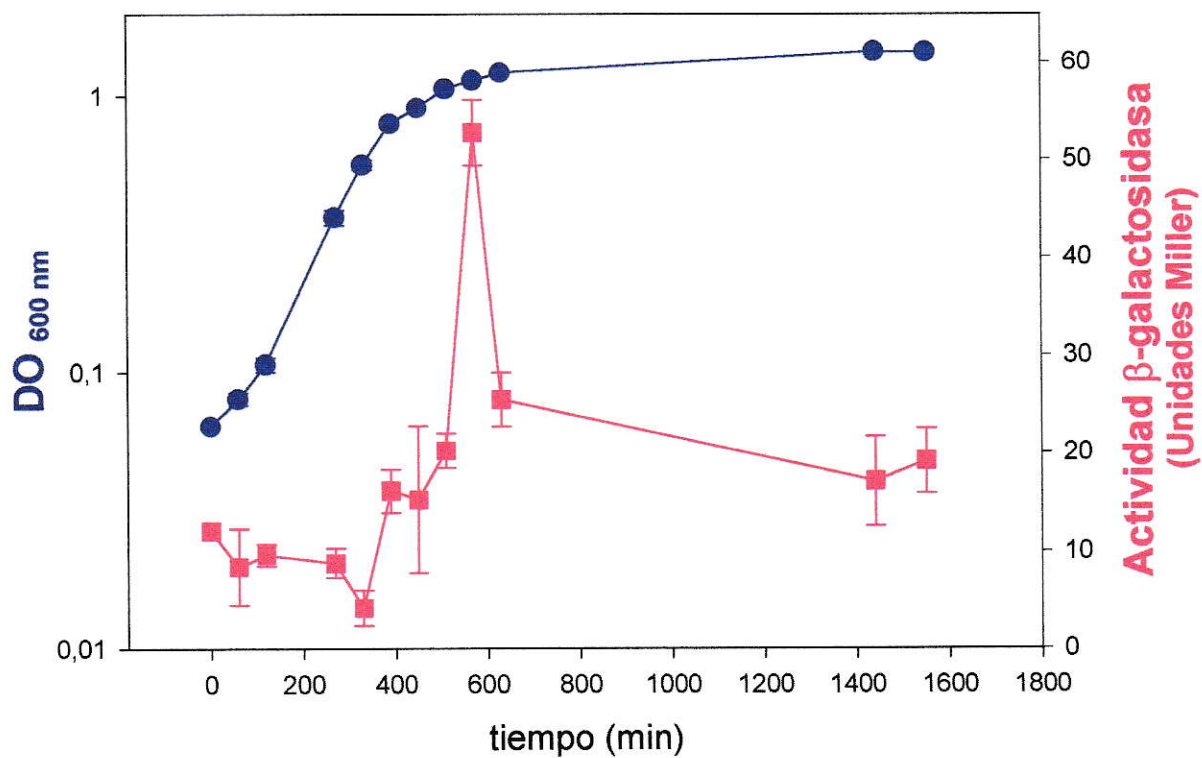


Fig. 23. **Expresión traduccional de la proteína Mcel-LacZ en *E. coli* pop3001.6pMUG43.** La curva en azul corresponde a la cinética de crecimiento bacteriana ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) de *E. coli* pop3001.6pMUG43. La curva en rojo corresponde a la actividad  $\beta$ -galactosidasa que presentan las fusiones Mcel-LacZ expresada en unidades Miller.

### **3.3. EFECTOS DEL HIERRO EN LA EXPRESIÓN DE LA MICROCINA E492.**

La actividad de la microcina en el medio extracelular es regulada por la presencia de un antagonista (de Lorenzo y cols.,1984). Este antagonista corresponde a un trímero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoilserina denominado enteroquelina (Orellana y Lagos, 1996). La enteroquelina o enterobactina es un quelante de Fe (III), el cual es secretado al medio extracelular por la célula cuando la bacteria necesita incorporar hierro debido a la disminución de la concentración de este metal a nivel citoplasmático. La carencia de hierro en el medio de cultivo de un cepa bacteriana productora de microcina E492 produce una disminución de la actividad microcina, posiblemente por la producción de enteroquelina y su acción inhibitoria sobre ésta (Orellana y Lagos, 1996). No se ha establecido si la carencia de hierro tiene un efecto directo sobre la expresión de la microcina E492.

#### **3.3.1. Efecto del hierro en la expresión transcripcional de los genes de maduración y exportación de la microcina.**

Se analizó el efecto del hierro en la expresión transcripcional de los genes de maduración *mceC*, I y J y en los genes de exportación *mceG* y H mediante RT-PCR. Para ello se aisló RNA total de *E. coli* VCS257pJAM434 crecida hasta fase exponencial o estacionaria en medio M9 suplementado con glucosa y citrato, en presencia o ausencia de Fe<sup>3+</sup>. Para la condición de ausencia de hierro se agregó al medio de cultivo el quelante DTPA a una concentración final

de 12  $\mu\text{M}$  y para la condición de presencia de hierro no se agregó DTPA al medio de cultivo. En la Fig. 24 se resumen los resultados obtenidos en estos experimentos. Para todos los genes analizados no se encontró diferencias en la amplificación mediante RT-PCR de los mRNA, ya sea de cultivos tratados con DTPA (Fig. 24, carriles 2 y 4) o no tratados con el quelante (Fig. 24, carriles 1 y 3). Se puede entonces inferir que, la ausencia o presencia de hierro no produce un efecto notorio en la expresión de los mRNAs de los genes *mceC*, J, I, G y H.

### **3.3.2. Efecto del hierro en la expresión traduccional del gen de maduración *mceC*.**

Se estudió el efecto del hierro en la expresión traduccional del gen de maduración *mceC* midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento celular del muductante MUG21 (Tabla 6), usando de huésped la cepa de *E. coli* pop3001.6 (*lacZ*) crecida en medio M9 suplementado con glucosa y citrato, en presencia o ausencia de  $\text{Fe}^{3+}$ . Para la condición de presencia y ausencia de hierro se agregó el quelante DTPA al medio de cultivo a una concentración final de 0, 5 y 12  $\mu\text{M}$ .

La fusión MceC-LacZ presentó una menor expresión a comienzos de la fase exponencial de crecimiento en todos los cultivos, la que se mantuvo constante cuando se adicionó DTPA (Fig. 25). En cambio el cultivo al que no se adicionó DTPA, aumentó la expresión de MceC-LacZ hasta llegar a fase estacionaria de

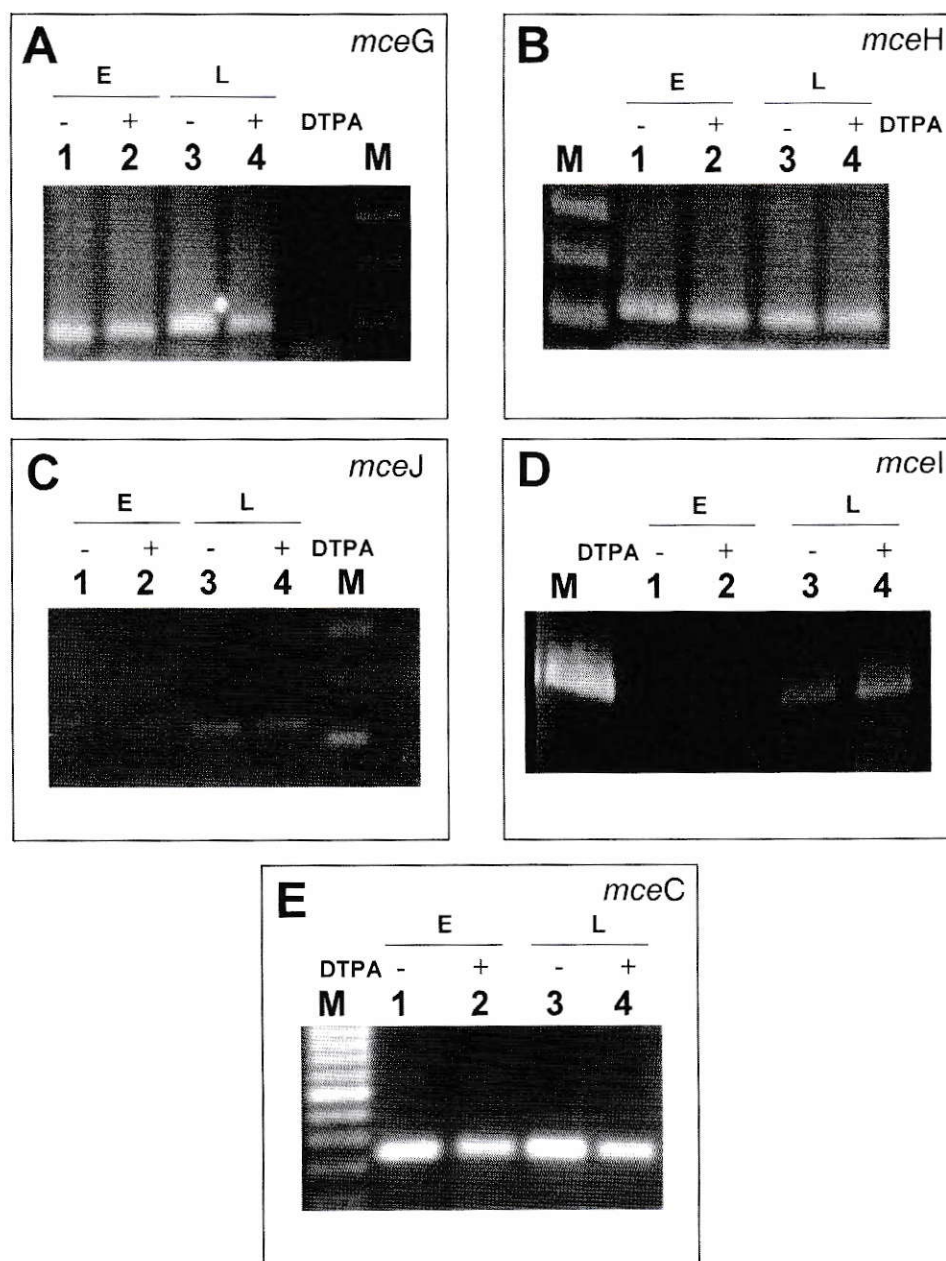


Fig. 24. Estudio del efecto del hierro en expresión de los genes *mceG* (A), *mceH* (B), *mceJ* (C), *mceI* (D) y *mceC* (E) mediante RT-PCR. Se empleó como templado RNA total de *E. coli* VCS257pJAM434 aislado a partir de un cultivo en fase estacionaria (E) (Carriles 1 y 2) o fase exponencial (L) (carriles 3 y 4), no tratado (carriles 1 y 3) o tratado con el quelante de hierro DTPA (carriles 2 y 4). M corresponde al estándar de tamaño molecular 100 bp DNA ladder. Los experimentos se realizaron usando los partidores G1 y PEG (A), H1 y PEH (B), J1 y PEJ (C), I1 y PEI (D) y C1 PEC, los que se muestran en la Tabla 3.

crecimiento y posteriormente disminuyó alcanzando los niveles de expresión de los cultivos deprivados de hierro (Fig. 25).

### **3.3.3. Identificación en el sistema microcina E492 de regiones de unión de la proteína reguladora dependiente de hierro Fur, mediante ensayo de titulación de Fur (FurTA)**

Los resultados mostrados parecen indicar que la expresión de los genes *mceA*, B, G, H, I y J no está regulada por la presencia o ausencia de hierro. Sin embargo, el análisis de la secuencia nucleotídica de las regiones ubicadas río arriba del inicio de la traducción de todos los ORFs que integran el sistema indica la presencia de secuencias consenso para la unión de la proteína reguladora Fur en los genes *mceC*, *mceD*, *mceE*, *mceF*, *mceH* y *mceI*. Por ello se decidió estudiar en forma específica una posible regulación por hierro mediada por Fur.

Para determinar si estas posibles secuencias consenso para la unión de la proteína reguladora Fur son funcionales se empleó un sistema de detección *in vivo* denominado ensayo de titulación de Fur (FurTA) (Stojiljkovic y cols., 1994). Para estos experimentos se usó la cepa reportera de *E. coli* H1717 que posee en su cromosoma una fusión entre el promotor de *fhuF* y el gen *lacZ* (Stojiljkovic y cols., 1994). Esta construcción es reprimida por la proteína reguladora Fur ya que el promotor de *fhuF* posee una caja para la unión de la proteína Fur. Cuando esta cepa es transformada con un plasmidio multicopia que posee una región o caja reconocida por esta proteína reguladora, la proteína Fur unida al

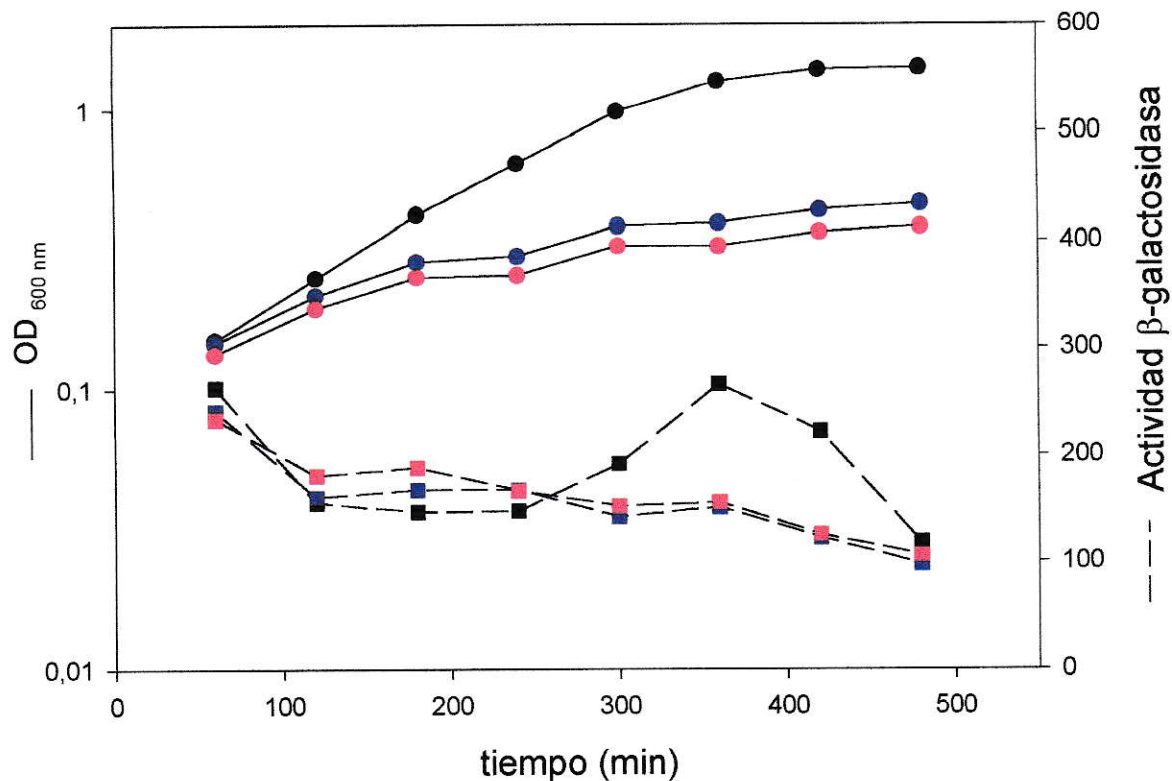


Fig. 25. **Efecto del hierro en la expresión traduccional de la proteína MceC-LacZ.** Las curvas en línea continua y círculos corresponden a la cinética de crecimiento bacteriana ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) de *E. coli* pop3001.6pMUG21 en cultivos a los que se adicionó 0  $\mu\text{M}$  de DTPA (●), 5  $\mu\text{M}$  de DTPA (◐) y 10  $\mu\text{M}$  de DTPA (◑). Las curvas en línea discontinua y cuadrados corresponden a la actividad  $\beta$ -galactosidasa que presenta la fusión MceC-LacZ en cultivos a los que se adicionó 0  $\mu\text{M}$  de DTPA (■), 5  $\mu\text{M}$  de DTPA (◓) y 10  $\mu\text{M}$  de DTPA (◔), expresada en unidades Miller.

promotor de *fhuF* en el cromosoma es titulada por la secuencia presente en el plasmidio y se expresa el gen *lacZ* empleado como reportero, obteniéndose colonias rojas al crecer los transformantes en placas de agar MacConkey suplementadas con hierro. Si la cepa de *E. coli* H1717 es transformada con un plasmidio que no posee una secuencia para la unión de la proteína Fur, el regulador no es titulado, el gen reportero *lacZ* permanece reprimido y se obtienen colonias blancas al crecer los transformantes en placas de agar MacConkey suplementadas con hierro. Las placas de agar MacConkey empleadas en estos experimentos siempre son suplementadas con hierro a una concentración de 60  $\mu$ M para evitar la aparición de falsos positivos, ya que si la célula carece de hierro la proteína Fur no es capaz de unirse al DNA y se activa la expresión del gen reportero *lacZ*.

La cepa de *E. coli* H1717 se transformó con plasmidios que llevan los genes del sistema microcina E492 como pJAM434 o pJAM229. Estos transformantes al ser crecidos en placas de agar MacConkey suplementadas con hierro dan una coloración roja a la colonia (Fig. 26A), lo que indica que el plasmidio tituló a la proteína Fur que se une al sistema reportero y se desreprimió la expresión del gen *lacZ*. En cambio, al transformar la cepa de *E. coli* H1717 con el vector pHC79 empleado para clonar los genes del sistema microcina E492 las colonias obtenidas son de color blanco (Fig. 26A). Cuando se transformó la cepa reportera con el plasmidio pB40 que posee los genes *mceABCDEIJ* o con el plasmidio pJI que posee los genes *mceABCDE* se obtuvieron colonias rojas



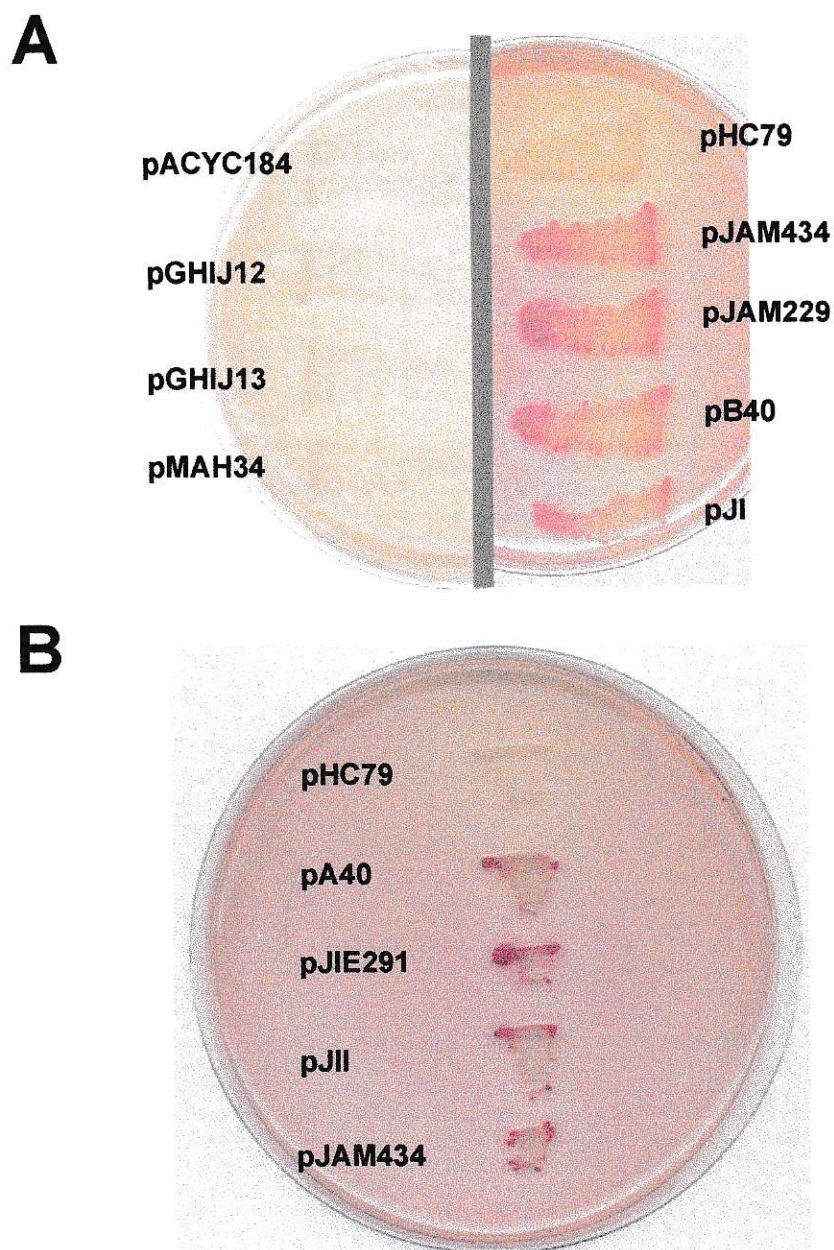


Fig. 26. Detección de los genes del sistema microcina E492 que poseen zonas de unión de la proteína reguladora Fur mediante ensayo de titulación de Fur (FurTA). Para estos experimentos se empleó la cepa de *E. coli* H1717. Cuando esta cepa es transformada con un plasmidio multicopia que posee una región a la cual se une la proteína Fur, la cepa expresa el gen *lacZ*, y las colonias transformantes son visualizadas de color rojo al crecer en placas de agar MacConkey suplementadas con hierro.

(Fig. 26A) lo cual indica que algunos o todos los genes clonados en estos plasmidios poseen secuencias para la unión de la proteína Fur. En cambio, cuando se transformó *E. coli* H1717 con plasmidios que contenían los genes *mceGHIJ* (pGHIJ12 y pGHIJ13) se obtuvo colonias blancas (Fig. 26A), lo que indica que el gen *lacZ* se mantuvo reprimido y que los genes *mceGHIJ* clonados en el plasmidio no posee secuencias para titular a la proteína Fur que se une al sistema reportero. Para establecer si los genes *mceAB* posee una caja Fur (determinada mediante análisis bioinformático), se transformó *E. coli* H1717 con el plasmidio pMAH34, que lleva clonado en su sitio *Bam*HI un fragmento PCR que contiene los genes antes mencionados y su promotor. Al crecer estos transformantes en placas de agar MacConkey suplementadas con hierro las colonias dieron una coloración blanca (Fig. 26A).

De acuerdo a estos resultados los genes candidatos para poseer secuencias de unión para la proteína Fur son: *mceC*, *mceD*, *mceE* y *mceF*. Esto se confirmó al obtener colonias rojas provenientes de la cepa indicadora transformada con el plasmidio pJIE291 que portan un fragmento de DNA con los genes *mceC*, D y E (Fig. 26B).

Los plasmidios pJAM434, pJAM229, pJI, y pJIE291 poseen una región del cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492 que no está involucrada en la producción de microcina E492 (Wilkens y cols., 1997). Para analizar la presencia de cajas Fur en esa región, se transformó *E. coli* H1717 con el plasmidio pA40 que contiene la región del cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492 no involucrada en la producción de la microcina E492, además del gen

*mceF* y parte del gen *mceG*. Con este plasmidio se obtuvieron colonias rojas al plaquear los transformantes en placas de agar MacConkey suplementadas con hierro (Fig. 26B). No obstante, cuando se transformó *E. coli* H1717 con el plasmidio pJII también se obtuvieron colonias rojas (Fig. 26B). Este plasmidio sin embargo, carece de la región del cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492 que no está involucrada en la producción de la microcina E492, lo que confirma que los resultados obtenidos mediante el sistema FurTA se deben a secuencias presentes en algunos, varios o todos genes candidatos (*mceC*, *mceD*, *mceE* y *mceF*).

Para determinar cuáles de los cuatro genes poseen regiones capaces de titular a la proteína Fur mediante análisis del tipo FurTA, se clonó las regiones promotoras de estos genes que incluyen las posibles cajas de unión a Fur. Para ello se amplificó mediante PCR los fragmentos delimitados por los partidores que se muestran en la Fig. 27 y Fig. 28. Para *mceC* se amplificó un fragmento de 347 bp empleando los partidores FurC y PEC. Para *mceD* se amplificó un fragmento de 267 bp y se emplearon los partidores FurD y PED. Para *mceF* se amplificó un fragmento de 258 bp con los partidores FurF y PEF. En cambio para *mceE* se amplificaron dos fragmentos, uno de 357 bp empleando los partidores FurE1 y PEE que incluye las dos posibles cajas Fur presentes en esta región y otro fragmento de 239 bp usando los partidores FurE2 y PEE que posee solo una de las cajas Fur (Fig. 28). Estos fragmentos se sintetizaron empleando *Pfu* DNA polimerasa y se clonaron en el sitio *EcoRV* del vector pACYC184. Los transformantes obtenidos para cada una de las construcciones

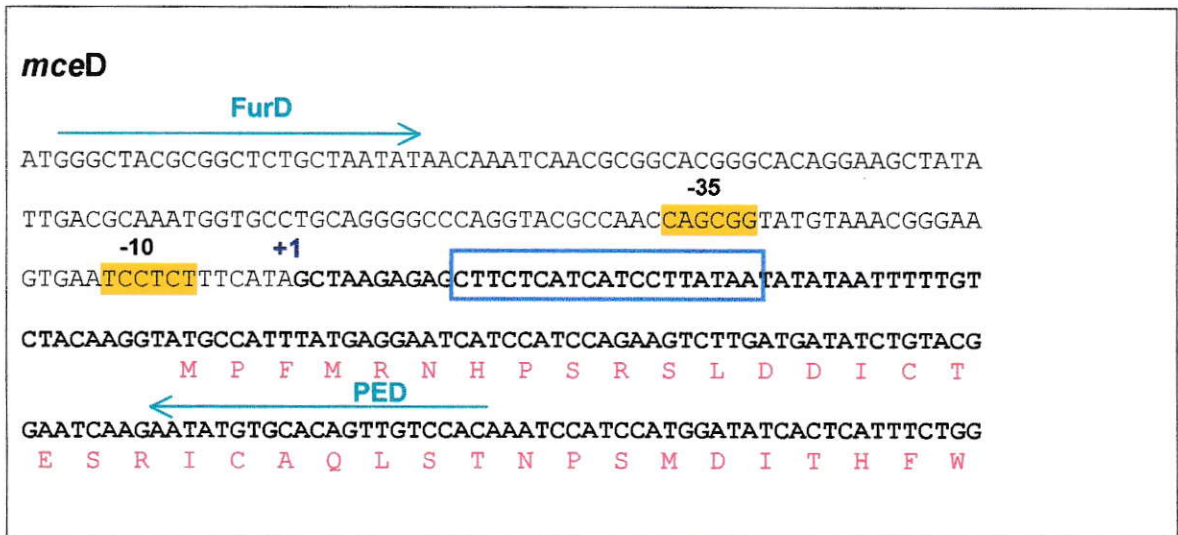
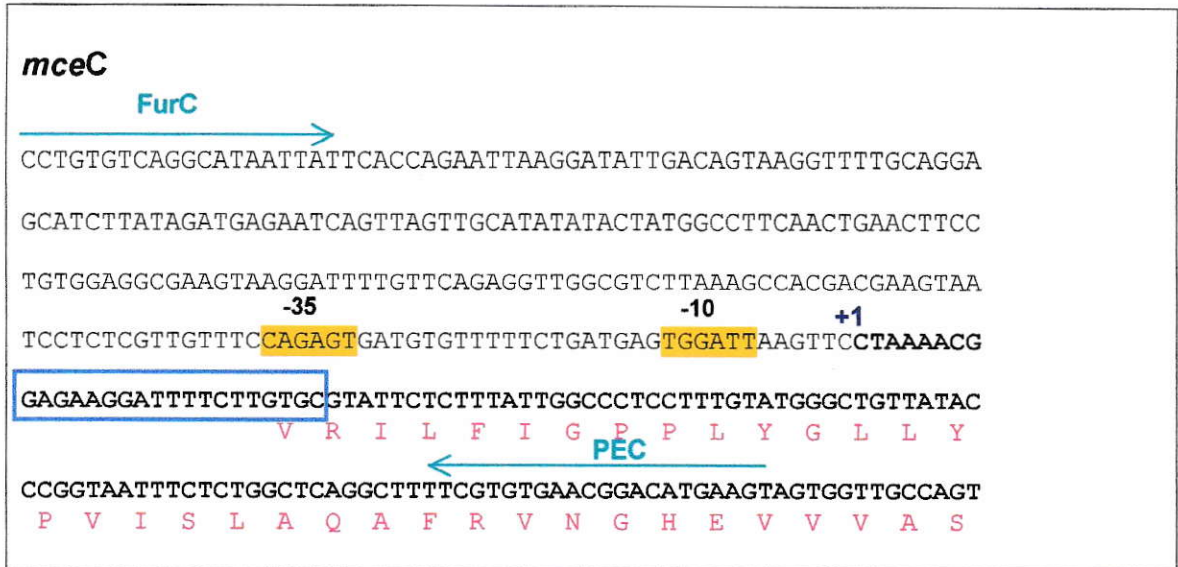


Fig. 27. Regiones de los genes *mceC* y *mceD* que posee las posibles cajas para la unión de la proteína Fur. Las cajas para la unión de la proteína Fur están indicadas con un rectángulo azul. El sitio de inicio de la transcripción de los genes esta señalado con el signo “+1”. Las flechas indican la ubicación de los partidores empleados para amplificar mediante PCR estas regiones.

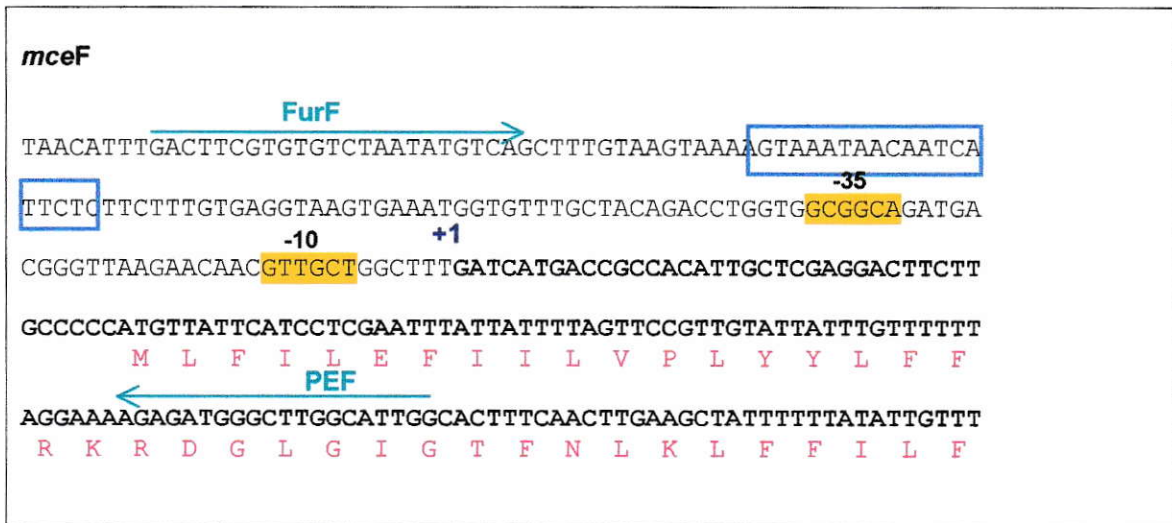


Fig. 28. Regiones de los genes *mceE* y *mceF* que posee las posibles cajas para la unión de la proteína Fur. Las cajas para la unión de la proteína Fur están indicadas con un rectángulo azul. El gen *mceE* posee dos posibles cajas de unión en cambio el gen *mceF* posee sólo una. El sitio de inicio de la transcripción de los genes esta señalado con el signo "+1". Las flechas indican la ubicación de los partidores empleados para amplificar mediante PCR estas regiones.

se analizaron mediante PCR y posteriormente se secuenciaron, obteniéndose los siguientes plasmidios: pFurC2 contiene un fragmento de 347 bp de la región promotora del gen *mceC* (Fig. 27), pFurD22 posee un fragmento de 267 bp de la región promotora de *mceD* (Fig. 27), pFurE1 tiene clonado un segmento de DNA 357 bp que incluye las dos posibles cajas Fur presentes en esta región promotora de *mceE* (Fig. 28), pFurE2-45 lleva un fragmento de 239 bp que posee sólo la segunda caja Fur de la región promotora de *mceE* (Fig. 28) y el plasmidio pFurF-A que contiene el fragmento de la región promotora de *mceF* de 258 bp (Fig. 28).

La cepa indicadora del sistema FurTA se transformó con los plasmidios pFurC2 y pFurD22 obteniéndose en ambos casos colonias blancas al crecer los transformantes en placas de agar MacConkey suplementadas con hierro (Fig. 29). Esto indica que la regulación por hierro en *mceC* observada utilizando la fusión traduccional MceC-LacZ, no está mediada por la putativa caja Fur localizada en la zona promotora recién descrita. En cambio al transformar *E. coli* H1717 con los plasmidios pFurE1 y pFurE2-45 que llevan la región promotora de *mceE* se obtuvo colonias rojas (Fig. 29). Un resultado similar se obtuvo al emplear el plasmidio pFurF-A que contiene el fragmento de la región promotora de *mceF* (Fig. 29). Estos resultados nos indicarían que sólo la región promotora de los genes *mceE* y *mceF* poseen secuencias capaces de titular a la proteína Fur en un ensayo del tipo FurTA.



Fig. 29. Análisis de las posibles cajas de unión de la proteína Fur de los genes *mceC*, *mceD*, *mceE* y *mceF* mediante ensayo de titulación de Fur (FurTA). Para estos experimentos se empleó la cepa de *E. coli* H1717 la que se transformó con los plasmidios que llevan la región del gen *mceC* (pFurC2), del gen *mceD* (pFurD22), del gen *mceE* que lleva las dos posibles cajas (pFurE1), del gen *mceE* que lleva sólo la segunda caja (pFurE2-45) y la del gen *mceF* (pFurF-A). Cuando esta cepa es transformada con un plasmidio que posee una región a la que se une la proteína Fur, la cepa expresa el gen *lacZ* y las colonias transformantes son visualizadas de color rojo al crecer en placas de agar MacConkey suplementadas con hierro. Como control negativo se utilizó el vector pACYC184 empleado para el clonamiento de las posibles cajas de los genes del sistema microcina E492.

### 3.4. ESTUDIOS DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA INMUNIDAD.

Las cepas de *E. coli* transformadas con plasmidios que llevan todos los genes del sistema microcina E492 (pJAM434 o pJAM229) son inmunes a la acción de la microcina que se encuentra en medio extracelular, ya sea que las células productoras estén en fase exponencial o estacionaria de crecimiento (Wilkens y cols., 1997). El mRNA que codifica para la proteína de inmunidad en estas cepas se expresa en ambas fases de crecimiento (Fig. 13). A su vez, el perfil de expresión traduccional de la inmunidad indica que esta proteína (MceB) se expresa durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento, teniendo su máximo de expresión durante fase exponencial (Fig. 20).

La cepa de *E. coli* VCS257pJI porta un plasmidio (pJI) que posee sólo los genes *mceA*, B, C, D y E del sistema y no produce microcina activa. Esta cepa es inmune a la microcina agregada exógenamente sólo en fase exponencial de crecimiento (Wilkens y cols., 1997). Esto podría deberse a que en esta construcción la proteína de inmunidad no se produce en fase estacionaria (no hay transcripción del gen *mceB* o no hay traducción de la proteína MceB), o porque la proteína de inmunidad se inactiva en fase estacionaria debido a la presencia o ausencia de algún producto génico del sistema.



### 3.4.1. Estudio de la expresión transcripcional de los genes *mceA* y *mceB* en la cepa de *E. coli* VCS257pJI.

Empleando la técnica de RT-PCR se estudió la expresión del mRNA *mceBA* en fase exponencial, exponencial tardía y estacionaria de crecimiento en la cepa de *E. coli* VCS257pJI. Para la etapa de transcripción reversa se empleó RNA total extraído de esta cepa y un partidor ubicado río abajo del gen *mceA* (partidor RL3) para sintetizar el cDNA del operón *mceBA* (Fig. 30A) y un partidor ubicado en la región 3' del gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa (partidor AMP2) para sintetizar el cDNA empleado como estandar interno. Los DNAs monohebra obtenidos se utilizaron como templado para la etapa de PCR donde se empleó una pareja de partidores que amplifica al gen *mceB* (RL1-RL2) (Fig. 30A) y una pareja de partidores que amplifica al gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa (AMP1-AMP2). Se detecta el mRNA de los genes *mceB* y *mceA* en fase exponencial, exponencial tardía y estacionaria de crecimiento como se aprecia en la Fig. 30B (carriles EM, ET y Est.). Por lo tanto, el fenotipo de pérdida de inmunidad en fase estacionaria de la cepa de *E. coli* VCS257pJI no está asociado a una pérdida de la transcripción del gen *mceB* en dicha fase de crecimiento.

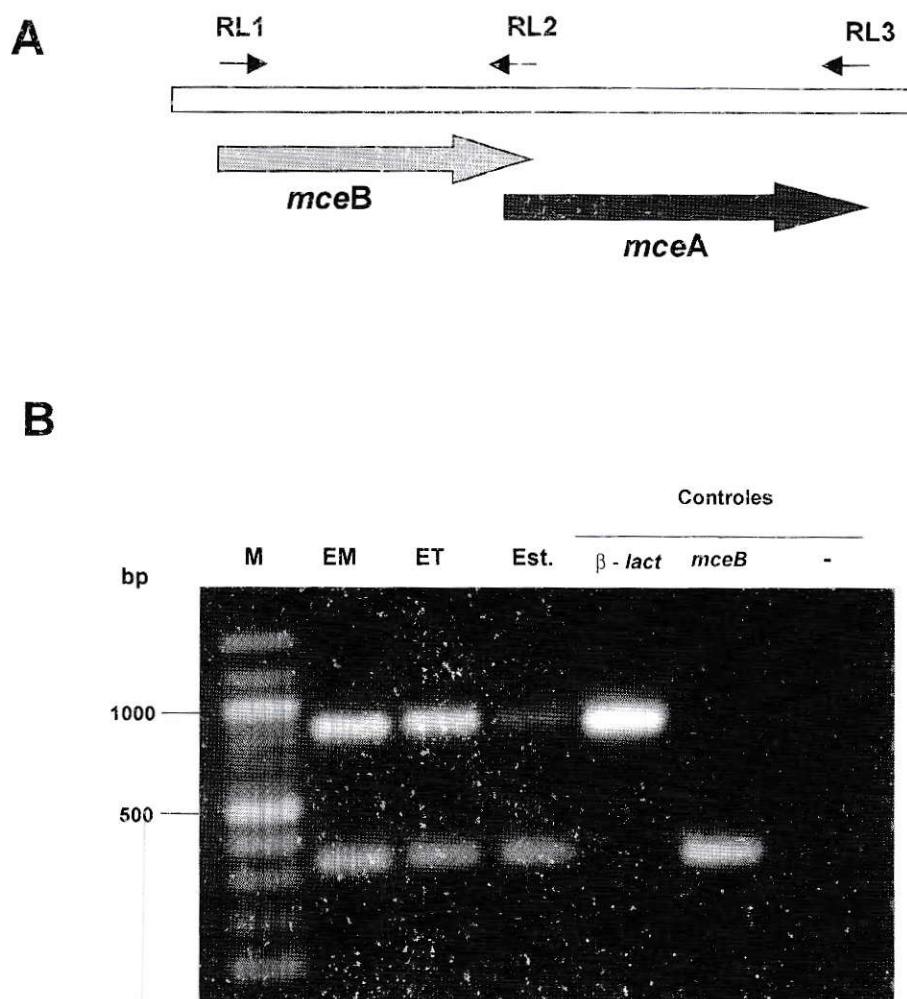


Fig. 30 . Estudio de la expresión transcripcional de los genes *mceA* y *mceB* en la cepa de *E. coli* VCS257pJl. (A) Esquema de la amplificación del mRNA de *mceBA* mediante RT-PCR. En la etapa de RT se empleó el partidor RL3 para sintetizar el cDNA monchebra. Posteriormente para la etapa de PCR se utilizaron los partidores RL1 y RL2, que amplifican solo el gen *mceB* (B) Expresión de los genes *mceA* y B mediante RT-PCR, en distintos estados de crecimiento de *E. coli* VCS257pJl. El producto de amplificación de 850 bp corresponde al mensajero de  $\beta$ -lactamasa empleado como control interno. El carril "-" corresponde al control en que la muestra de RNA se trató con DNasaI y se sometió directamente a una reacción de PCR sin realizar el paso de RT. El carril M corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA ladder. Para estos experimentos se utilizó RNA total aislado de cultivos crecidos hasta fase exponencial media (EM), exponencial tardía (ET) y estacionaria (Est.) en medio M9 suplementado con glucosa y citrato.





### **3.4.2. Efecto de la MccE492 intracelular en la sensibilidad en fase estacionaria en cepas de *E. coli* que portan el plasmidio pJI.**

Para intentar explicar el fenotipo de pérdida de inmunidad en fase estacionaria que presenta la cepa de *E. coli* VCS257pJI se abordó el estudio de este fenómeno desde un punto de vista genético. Para ello se evaluó la sensibilidad que presentan distintas construcciones a la microcina E492 (Tabla 7).

Cuando se preparó un césped con células crecidas hasta fase exponencial o estacionaria que no portan ningún plasmidio, estas células fueron sensibles a diluciones de MccE492 purificada sembradas sobre el césped (Tabla 7). Por otra parte cuando se empleó una cepa transformada con el plasmidio p157, se observó que estas células son siempre inmunes a la adición de MccE492 purificada (Tabla 7). El plasmidio p157 posee clonado el gen de la inmunidad (*mceB*) bajo el control del promotor del bacteriofago T7 en el vector de expresión pT7-7 (Lagos y cols., 1999).

Se preparó un césped con células de *E. coli* crecidas hasta fase exponencial que llevan el plasmidio pJI. Estas células fueron inmunes a la acción de la microcina, pero si el césped se preparaba con células crecidas hasta fase estacionaria, estas células eran sensibles a la acción de la microcina agregada exógenamente (Tabla 7).

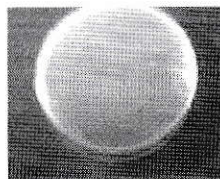
Para determinar si la presencia de la microcina intracelular producida por la cepa que porta el plasmidio pJI está relacionada con el fenotipo de pérdida de inmunidad en fase estacionaria se decidió remover el gen *mceA* que codifica para la microcina E492. Para tal motivo se construyó el plasmidio pMCA- $\Delta$ F que

**Tabla 7.** Sensibilidad a la microcina E492 de *E. coli* VCS257 transformada con diferentes construcciones que portan genes del sistema productor de microcina.

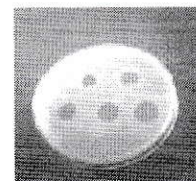
Cepa de <i>E. coli</i> transformada con:	Genes	Sensibilidad <sup>(7)</sup> de las células en:	
		Fase exponencial	Fase estacionaria
-	-	s	s
p157 <sup>(1)</sup>	<i>mce</i> B	i	i
pIBC <sup>(2)</sup>	<i>mce</i> B	i	i
pMAH34	<i>mce</i> A(His <sub>6</sub> )B <sup>(3)</sup>	i	i
pJI	<i>mce</i> ABCDE	i	s
pMCA-ΔF	<i>mce</i> BCDE	i	i
pJI + pIBC	<i>mce</i> ABCDE <sup>(4)</sup>	i	i
pMCA-ΔF + pMAH34	<i>mce</i> ABCDE <sup>(5)</sup>	i	i
pJI + pMAH34	<i>mce</i> ABCDE <sup>(6)</sup>	i	i

- (1) El plasmidio p157 lleva clonado el gen *mceB* bajo el control del promotor T7 en el vector pT7-7. Se usó como control en los experimentos.
- (2) El plasmidio pIBC lleva clonado el gen *mceB* bajo el control del promotor T7 en el vector pACYC184.
- (3) El plasmidio pMAH34 tiene clonado el gen *mceA* con una cola de histidina lo que hace que la microcina producida sea inactiva.
- (4) La cepa que porta esta doble transformación posee una mayor dosis genética del gen *mceB* ya que este gen está presente en ambos plasmidios.
- (5) Esta cepa posee una mayor dosis genética del gen *mceB* ya que este gen está presente en ambos plasmidios y el gen *mceA* posee una cola de histidina lo que hace que la microcina producida sea inactiva.
- (6) La cepa transformada con estos dos plasmidios posee una mayor dosis genética del gen *mceB* ya que este gen está presente en ambos plasmidios y posee una versión del gen *mceA* con cola de histidina y otra versión normal.
- (7) Los fenotipos que presentan las células frente a la adición exógena de la microcina purificada son:

i = inmune



s = sensible



posee los genes *mceB*, C, D y E y se analizó la sensibilidad a la microcina de una cepa de *E. coli* transformada con este plasmidio, encontrándose que esta cepa es inmune cuando el ensayo se hace con cultivo proveniente de fase exponencial o estacionaria de crecimiento (Tabla 7). Esto indicaría que la presencia de la microcina intracelular en fase estacionaria podría estar afectando la actividad de la proteína de inmunidad.

Para corroborar esto se decidió aumentar la cantidad de proteína de inmunidad subclonando este gen en un vector compatible con el plasmidio pJI. Para realizar esto se amplificó mediante PCR el gen de la inmunidad (*mceB*) con el promotor T7 empleando el plasmidio p157 como DNA templado, *Pfu* DNA polimerasa y los partidores T7pro y RL2. El fragmento amplificado se clonó en el vector pACYC184 en el sitio de restricción *EcoRV* interrumpiendo el marcador de resistencia a tetraciclina de este vector, dando origen a la construcción denominada pIBC.

La cepa de *E. coli* que porta el plasmidio pJI fue transformada con el plasmidio pIBC y se analizó la sensibilidad a la microcina de esta cepa que lleva los dos plasmidios, encontrándose que es inmune cuando el ensayo se hace con cultivo proveniente de fase exponencial o estacionaria de crecimiento en presencia o ausencia de IPTG 0,2 mM (Tabla 7). Esto nos indicaría que la mayor presencia de proteína de inmunidad contrarrestaría el efecto de la microcina intracelular en fase estacionaria.

Como la expresión del gen que codifica para la proteína de inmunidad está controlada por un promotor inducible se decidió repetir el experimento pero esta

vez agregando copias extras del gen *mceB* bajo el control de su propio promotor. Para tal efecto se transformó la cepa de *E. coli* que porta el plasmidio pJI con el plasmidio pMAH34. Esta construcción posee clonado los genes *mceA* y *mceB* bajo su promotor silvestre, que posee una secuencia que codifica para 6 histidinas (His6) al extremo 3' del gen *mceA*, lo que produce una microcina E492 con una cola de histidina en el extremo carboxilo terminal que es inactiva cuando se libera al medio extracelular. El análisis de sensibilidad a la microcina de la cepa que lleva los plasmidios pJI y pMAH34 indicó que la cepa es inmune cuando el ensayo se hace con cultivo proveniente de fase exponencial o estacionaria de crecimiento (Tabla 7). Esto estaría ratificando que una mayor cantidad de proteína de inmunidad contrarrestaría el efecto de la microcina intracelular producida a partir del plasmidio pJI.

### **3.4.3. Factores que alteran la sensibilidad a la microcina en cepas de *E. coli* que portan el gen de inmunidad.**

Como se determinó en el punto anterior, la presencia de una microcina que no puede exportarse como es el caso de la producida por el plasmidio pJI interfiere con la proteína de la inmunidad. Sin embargo, este fenotipo no se observa en todas las construcciones que no exportan microcina.

Por otro lado al realizar un estudio de sensibilidad a la microcina en una cepa de *E. coli* que lleva el plasmidio p4S-12 que porta los genes del sistema microcina *mceA*, B, C, D, E y F, se encontró que la cepa era sensible a la microcina tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento (Tabla



8). Resultado similar se obtuvo cuando se utilizó una cepa transformada con el plasmidio pJI y con el plasmidio p6-18 que porta el gen *mceF* (Tabla 8). Sin embargo, al realizar el mismo estudio con una cepa que portaba el plasmidio pMCA-12, que fue construido a partir de p4S-12 y que sólo posee los genes *mceB*, C, D, E y F, se encontró que esta cepa es inmune a la microcina E492 agregada exógenamente cuando se preparó un césped con células provenientes de fase exponencial o estacionaria de crecimiento (Tabla 8). La cepa que lleva el plasmidio p4S-12 se transformó con el plasmidio pIBC, que posee el gen que codifica para la inmunidad (*mceB*). Esta cepa con los dos plasmidios posee un fenotipo inmune a la microcina agregada exógenamente cuando se realizó el análisis de sensibilidad con células provenientes de fase exponencial o estacionaria de crecimiento en presencia o ausencia de IPTG 0.2 mM (Tabla 8). Esto indicaría que, al igual que para la construcción pJI, la microcina intracelular estaría afectando la actividad de la proteína de inmunidad y mayor cantidad de la proteína de inmunidad contrarrestaría el efecto de la microcina intracelular.

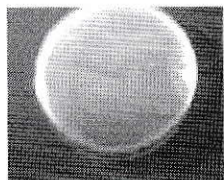
Para estudiar si sólo la posible acumulación de microcina intracelular era la responsable del fenotipo de pérdida de inmunidad se clonaron sólo los genes *mceB* y *mceA* con su promotor en el plasmidio pACYC184 originando la construcción pMceAB. Al analizar la sensibilidad a la microcina de una cepa de *E. coli* que porta el plasmidio pMceAB se determinó que este plasmidio le confiere inmunidad a la cepa, ya sea que el cultivo provenga de fase exponencial o estacionaria de crecimiento (Tabla 8).

**Tabla 8.** Rol de MceA en la sensibilidad a la microcina agregada exógenamente de *E. coli* VCS257(DE3) transformada con diferentes genes del sistema productor de microcina E492.

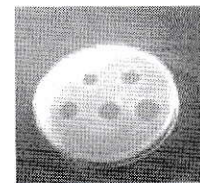
Cepa de <i>E. coli</i> transformada con:	Genes	Sensibilidad <sup>(5)</sup> de las células en:	
		Fase exponencial	Fase estacionaria
-	-	s	s
p157 <sup>(1)</sup>	<i>mce</i> B	i	i
pIBC <sup>(2)</sup>	<i>mce</i> B	i	i
pJI	<i>mce</i> ABCDE	i	s
p4S-12	<i>mce</i> ABCDEF	s	s
p6-18	<i>mce</i> F <sup>(3)</sup>	s	s
pJI + p6-18	<i>mce</i> ABCDEF	s	s
pMCA-12	<i>mce</i> BCDEF	i	i
p4S-12 + pIBC	<i>mce</i> ABCDEF <sup>(4)</sup>	i <sup>(6)</sup>	i <sup>(6)</sup>
pMceAB	<i>mce</i> AB	i	i
pBSC47	<i>mce</i> ABC	i	i
pLOL3	<i>mce</i> E	s <sup>(6)</sup>	s <sup>(6)</sup>
pMceAB + pLOL3	<i>mce</i> ABE	i <sup>(6)</sup>	i <sup>(6)</sup>
pJIC4	<i>mce</i> DE	s	s
pMceAB + pJIC4	<i>mce</i> ABDE	i	i

- (1) El plasmidio p157 lleva clonado el gen *mceB* bajo el control del promotor T7 en el vector pT7-7. Se usó como control en los experimentos.
- (2) El plasmidio pIBC lleva clonado el gen *mceB* bajo el control del promotor T7 en el vector pACYC184.
- (3) El plasmidio p6-18 lleva clonado el gen *mceF* bajo el control del promotor silvestre en el vector pBAD33.
- (4) La cepa que porta esta doble transformación posee una mayor dosis genética del gen *mceB* ya que este gen está presente en ambos.
- (5) Los fenotipos que presentan las células frente a la adición exógena de la microcina purificada son:

i = inmune



s = sensible



- (6) El experimento se realizó en presencia o ausencia de IPTG 0,2 mM obteniéndose el mismo resultado.

Este resultado sugiere, que la microcina intracelular por si sola no afecta la actividad de la proteína de inmunidad, y que necesitaría de las proteínas codificadas por los genes *mceC*, *D*, *E* y/o *F* para afectar la actividad de la proteína de inmunidad.

Por tal motivo se realizó un análisis de sensibilidad a la microcina a una cepa transformada con el plasmidio pBSC47, que contiene los genes *mceA*, *B* y *C*. Este análisis indicó que la cepa que porta este plasmidio es inmune a la microcina en fase exponencial y estacionaria de crecimiento (Tabla 8). La cepa que lleva el plasmidio pBSC47 se transformó con el plasmidio pLOL3, que porta el gen *mceE* bajo el control del promotor T7. Esta cepa con los dos plasmidios posee un fenotipo inmune a la microcina agregada exógenamente cuando se realizó el análisis de sensibilidad con células provenientes de fase exponencial o estacionaria de crecimiento en presencia o ausencia de IPTG 0,2 mM (Tabla 8). También se realizó un análisis de sensibilidad a una cepa transformada con los plasmidios pMceAB (que porta los genes *mceA* y *B*) y pJIC4 (que porta el gen *mceD* y *E*), encontrándose que esta cepa es inmune a la microcina agregada exógenamente cuando se utilizan células provenientes de un cultivo en fase exponencial o estacionaria de crecimiento.

De estos resultados se deduce que las proteínas codificadas por los genes *mceC*, *mceD* y *mceE* no son responsables por sí solas de afectar a la proteína de inmunidad en fase estacionaria. La pérdida de inmunidad en fase estacionaria se debe a la presencia de una combinación de los productos de los

genes *mceC*, *mceD* y *mceE* y este fenómeno estaría potenciado por la presencia del producto del gen *mceF*.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Características de la organización transcripcional de los genes involucrados en la producción de microcina E492

El sistema productor de microcina E492 del plasmidio pJAM434 está constituido por 10 genes (*mceA*, B, C, D, E, F, G, H, I y J) que se encuentran contenidos en un fragmento de DNA de 13 kb. Estos genes se agrupan formando 7 unidades transcripcionales: 4 unidades monocistrónicas (*mceC*, *mceD*, *mceE* y *mceF*), 2 unidades bicistrónicas (*mceBA* y *mceHG*) y una unidad policistrónica (*mceJIHG*) (Fig. 12). La unidad bicistrónica *mceBA* que agrupa al gen que codifica para la proteína de inmunidad y al gen que codifica para la microcina E492 corresponde a un ordenamiento (gen inmunidad - gen de microcina) que está presente en otros sistemas productores de microcina como el de colicina V, microcina 24, microcina H47 y microcina M (Fig. 1). De similar manera la unidad bicistrónica *mceHG* que agrupa a los genes que codifican para el sistema exportador también posee homólogos en otros sistemas productores de microcina. Sin embargo, el único ejemplo comprobado experimentalmente de una unidad policistrónica que agrupe a genes de maduración y exportación en sistemas productores de microcinas corresponde a la unidad *mceJIHG* del sistema microcina E492. Otro ejemplo como el de esta unidad transcripcional policistrónica podría encontrarse en los sistemas productores de microcina H47 y M que poseen un ordenamiento de los genes *mchCDEF* homólogo al de la

unidad transcripcional del sistema microcina E492 pero hasta el momento no se ha demostrado experimentalmente que estos genes se cotranscriban.

El análisis de las regiones promotoras de cada una de las unidades transcripcionales reveló que la unidad *mceBA* posee un promotor que se ajusta al consenso para el reconocimiento de la RNA polimerasa- $\sigma^{70}$ . Al comparar el promotor de *mceBA* con el de su homólogo en el sistema productor de colicina V, encontramos que la mayor coincidencia se encuentra en la región -35 donde sólo cambia una base conservándose 5 de los 6 nucleótidos (TTGACN), en cambio la región -10 posee una mayor variabilidad (TAATAA en *MccE492* y TATCGT en *colV*).

#### **4.2. Regulación transcripcional de la expresión de la microcina E492.**

Una característica común en todas las microcinas descritas hasta el momento en la literatura, es que estas bacteriocinas se expresan cuando las células llegan a fase estacionaria de crecimiento (Kolter y Moreno, 1992; Chiucholo y cols., 2001). La producción durante la fase estacionaria de microcina B17 y C7 es dependiente de la transcripción de los genes estructurales de estos antibióticos, la que es controlada a través de promotores que se activan cuando las células llegan al término de la fase exponencial de crecimiento (Kolter y Moreno, 1992; Moreno y cols., 2002). La expresión de la colicina V es inducida por la limitación del hierro en la fase estacionaria bajo el control de la proteína reguladora Fur (Kolter y Moreno, 1992), ya que la expresión de los promotores

existentes en este sistema de colicina V se induce al final de la fase exponencial de crecimiento al ir desapareciendo el hierro disponible para la célula (Boyer y Tai, 1998). La microcina J25 también posee una expresión dependiente de la fase de crecimiento, pero aun no se ha establecido cual es el mecanismo por cual se expresa durante la fase estacionaria (Chiucholo y cols., 2001).

La microcina E492 activa es sintetizada mayoritariamente durante la fase exponencial de crecimiento (de Lorenzo y cols., 1984; Orellana y Lagos, 1996). Al caracterizar la expresión del mRNA que codifica para esta microcina (MceA), se determinó que no hay una regulación transcripcional directa como en los casos antes señalados, ya que la microcina se expresa en ambas fases indicando que el promotor de este gen no es regulable por la fase de crecimiento.

Al analizar la expresión de MccE492 durante fase estacionaria de crecimiento se encontró que la proteína se sintetiza y secreta pero es inactiva (Corsini y cols., 2002). Este resultado es concordante con la presencia del mRNA para la microcina durante la fase estacionaria. La carencia de actividad de la microcina producida en fase estacionaria podría deberse a la ausencia de alguna o algunas de las demás proteínas codificadas en el resto de los genes del sistema y que son necesarias en la producción de microcina activa. De hecho, el fenotipo de producción de microcina E492 inactiva también se ha detectado en mutantes para los genes de maduración *mceC*, *mecl* y *mceJ* del sistema microcina E492 (Lagos y cols., 2001).

Al analizar la expresión del resto de los genes del sistema microcina E492 durante el crecimiento bacteriano, se detectó que la mayoría de los genes se transcriben durante ambas fases de crecimiento, salvo los genes *mecI* y *mceJ*, que se expresaban sólo durante fase exponencial. Los productos génicos de estos se han asociado a un rol en la maduración de la microcina (Lagos y cols., 2001). La proteína MceI posee homología con una aciltransferasa del sistema de citolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y con una aciltransferasa del sistema de leucotoxina de *Pasteurella hemolytica* (GenBank A43599 y P16533). Las aciltransferasas antes nombradas están muy relacionadas con la aciltransferasa HlyC del sistema productor de hemolisina de *E. coli* (Lagos y cols., 2001).

Por tal motivo y de acuerdo a los antecedentes de este trabajo, una de las causas de la producción de microcina inactiva durante la fase estacionaria de crecimiento se debería a la falta de expresión del mensajero de los genes *mceI* y *mceJ*.

Otro factor a considerar es la expresión del gen de la proteína de maduración MceC durante fase estacionaria. Si bien se detecta mediante RT-PCR la expresión de mRNA del gen que codifica para esta proteína durante la fase estacionaria, los niveles de la proteína disminuyen 3 veces en esta fase de crecimiento, disminución en la expresión que la técnica de RT-PCR empleada en esta Tesis no es capaz de discriminar. Pero los experimentos de hibridación Northern detectaron la variación del mRNA de *mceC* cuando se empleó RNA total de fase exponencial tardía.



### **4.3. Papel de los genes de maduración (*mceC*, *mceI* y *mceJ*) en la producción de microcina activa.**

Como se describió anteriormente, la síntesis de microcina E492 activa ocurre sólo durante la fase exponencial de crecimiento, pues sólo en esta fase se transcriben los genes de maduración *mceI* y *mceJ*. Esto sugiere que la microcina inactiva sintetizada durante la fase estacionaria correspondería a una microcina inmadura, pues también se obtuvo microcina inactiva independiente de la fase de crecimiento en mutantes por transposición en los genes de maduración (*mceC*, *mceI* y *mceJ*) (Lagos y cols., 2001). Las microcinas inactivas aisladas, ya sea desde fase estacionaria de crecimiento o desde mutantes en los genes de maduración según los protocolos desarrollados en nuestro laboratorio carecen de modificaciones postraduccionales (Lagos y cols., 2001; Pons y cols., 2002) y sólo presentan diferencias en el contenido de estructura secundaria con respecto a la microcina activa (Baeza, 2003).

Si bien recientemente se ha descrito que bajo ciertas condiciones de medio de cultivo es probable obtener microcina E492 activa modificada postraduccionamente por la unión a un sideróforo tipo catecol (Thomas y cols., 2004), los métodos desarrollados en nuestro laboratorio nos ha permitido purificar una microcina activa que carece de esta modificación en su esqueleto polipeptídico y por lo tanto el proceso de maduración de esta microcina implicaría un mecanismo que excluye la modificación postraducciona. La participación de los productos de los genes *mceC*, *mceI* y *mceJ* en el proceso

de maduración podría ocurrir de manera directa o indirecta pudiendo especularse varios posibles mecanismos.

Una posibilidad de acción indirecta es que la forma activa de la microcina sea causada por la acción de factores presentes en el sistema de exportación o en la membrana externa que alteren el plegamiento de la microcina, ya sea durante la exportación o en la superficie celular, y que estos factores sean los blancos de acción de los productos de los genes de maduración del sistema microcina E492.

Una explicación de la acción directa de las proteínas MceC, MceI y MceJ sobre la microcina E492 es que dichas proteínas actúen como chaperonas moleculares promoviendo la conformación activa de la microcina. Este modelo quizás sea el menos probable ya que ninguna de las proteínas de maduración del sistema presenta homología con chaperonas descritas hasta el momento.

Una explicación bastante probable es que los productos de los genes de maduración conserven la actividad glicosiltransferasa y aciltransferasa sugeridas por análisis de la secuencia. Estas proteínas podrían participar en la síntesis de un metabolito tipo sideróforo que interactuaría o se uniría de manera no covalente a la microcina E492 para que ésta adoptara una conformación activa una vez procesada y exportada al espacio extracelular.

#### **4.4. Papel del hierro en la expresión en la microcina E492**

La expresión de los genes del sistema productor de colicina V es inducida por la limitación de hierro en fase estacionaria de crecimiento (Kolter y Moreno, 1992).

Los promotores de este sistema poseen secuencias consenso para la unión de la proteína reguladora Fur (Boyer y Tai, 1998). La transcripción de los genes bajos estos promotores es activada al final de la fase exponencial de crecimiento al ir disminuyendo la cantidad de hierro en la célula (Boyer y Tai, 1998).

Fur es una proteína de 17 kDa que posee un dominio N-terminal de unión a DNA del tipo HTH (hélice-vuelta-hélice) (Stojilkovic y Hantke, 1995) y un dominio C-terminal de unión a metales, involucrado también en la dimerización (Coy y Neilands, 1991). Cada monómero de Fur une dos iones metálicos, un átomo de  $Zn^{2+}$ , que forma parte estructural de la proteína y un átomo de  $Fe^{2+}$ .

Durante la fase exponencial, cuando hay un mayor contenido de hierro intracelular, la proteína Fur estaría en su estado activo como un dímero con dos átomos de  $Fe^{2+}$  lo que le permitiría a este represor unirse a los promotores e inhibir la transcripción. Pero cuando el hierro intracelular empieza a escasear Fur pierde los átomos de  $Fe^{2+}$  y concomitantemente su afinidad por los promotores que poseen sitios de unión a Fur, produciéndose la transcripción (Escolar y cols., 1999).

La carencia de hierro en el medio de cultivo de una cepa bacteriana productora de microcina E492 produce una disminución de la actividad microcina (Orellana y Lagos, 1996), que es lo opuesto a lo observado en el sistema colicina V (Boyer y Tai, 1998). Los resultados presentados en esta Tesis establecen que la ausencia de hierro no tiene efecto directo sobre la expresión de la microcina E492 y su inmunidad. Este ión tampoco tendría algún efecto directo sobre la

expresión transcripcional de los otros genes del sistema, pues se determinó mediante RT-PCR que la ausencia o presencia de hierro en el medio de cultivo no tuvo efecto importante sobre la expresión de los mRNAs de los genes de maduración y exportación *mceC*, *J*, *I*, *G* y *H*.

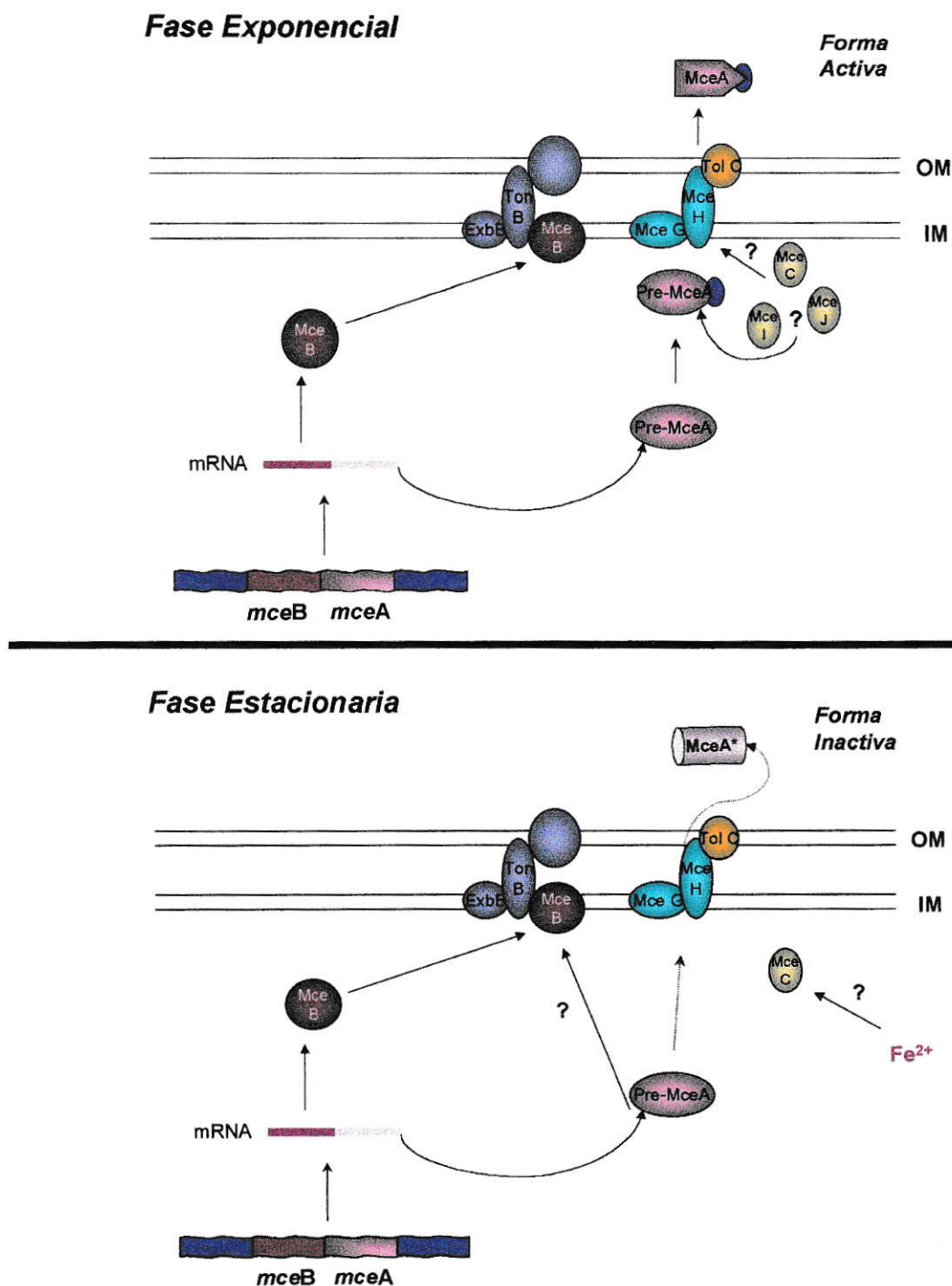
Sin embargo el análisis del efecto del hierro sobre la expresión traduccional de la proteína MceC reveló que en cultivos carentes de hierro no disminuyen los niveles de esta proteína durante la fase exponencial de crecimiento y solo se afectó la traducción durante fase estacionaria. La discrepancia entre los datos de expresión transcripcional y traduccional para el caso de *mceC*, se deben a que el cambio observado en los niveles de expresión (tres veces) no es capaz de ser discriminado por el método de RT-PCR empleado. Pero si se analiza esta disminución producida por hierro y se compara con el efecto que produce este metal en otros sistemas productores de microcinas como el de colicina V, se observa que la disminución de hierro tiende a activar la expresión de los genes (Boyer y Tai, 1998) y no a disminuirla como en el caso de MceC del sistema microcina E492. Esto haría interesante a futuro profundizar en el mecanismo por el cual el hierro produce la disminución de la expresión de MceC en fase estacionaria.

Por otra parte, el análisis bioinformático de la secuencia de los genes del sistema productor de microcina E492 reveló la existencia de secuencias consenso para la unión de la proteína reguladora Fur. Esto sugiere que la expresión de los genes *mceC*, *mceD*, *mceE*, *mceF*, *mceH* y *mceI* podría ser regulada por la proteína Fur en respuesta a la presencia o ausencia de hierro.

Si bien el análisis de la expresión transcripcional reveló que los genes involucrados en la maduración y exportación de la microcina no sufrían regulación por hierro se decidió probar si las secuencias detectadas mediante métodos bioinformáticos tenían algún significado biológico. Para ello se utilizó el sistema de detección *in vivo* FurTA (ensayo de titulación de Fur) encontrándose que las cajas Fur presentes en la región promotora de los genes *mceE* y *mceF* eran las únicas capaces de tener una funcionalidad *in vivo*. Sin embargo esta funcionalidad no se correlaciona con los datos de expresión transcripcional, ya que los genes *mceE* y *mceF* se transcriben tanto en fase exponencial como estacionaria. Una posible explicación es que el putativo efecto regulatorio de la proteína Fur es un cambio moderado en los niveles de expresión que no es posible cuantificar por RT-PCR.

#### **4.5. Modelo para la producción de microcina E492.**

Los resultados obtenidos permiten postular el siguiente modelo para la producción de microcina E492 (Fig. 31). La microcina E492 es sintetizada como una preproteína (pre-MceA) a partir de un mRNA bicistrónico. Los productos de los genes de maduración (MceC, MceI y MceJ) participan de manera indirecta o directa sobre pre-MceA propiciando un cambio conformacional necesario para la síntesis de una microcina activa o para la síntesis de un cofactor que permita obtener una microcina activa. Esto ocurre posiblemente durante la exportación. La pre-MceA es exportada hacia el espacio extracelular mediante un sistema transportador del tipo ABC constituido por las proteínas del sistema microcina



**Fig. 31. Modelo de la síntesis de microcina E492.** La microcina E492 (MceA) es sintetizada como un pre-proteína (pre-MceA) a partir de un mRNA bicistónico. La pre-MceA sufre un proceso de maduración por acción de las proteínas MceC, MceI y MceJ y posteriormente es procesada y exportada por MceG, MceH y TolC obteniéndose microcina E492 activa (MceA). La proteína de inmunidad (MceB) es sintetizada a partir del mismo mRNA que la microcina E492. En ausencia de alguna de las proteínas de maduración la microcina se produce y exporta en forma inactiva, como la se producida en fase estacionaria. OM, membrana externa; IM, membrana interna.

MceG y MceH y la proteína del huésped TolC. Durante este proceso de exportación se procesa el péptido líder de pre-MceA. En el medio extracelular la microcina E492 activa ejerce su acción bactericida sobre la célula blanco. Para prevenir que la microcina ejerza su acción sobre la célula productora el sistema sintetiza la proteína de inmunidad (MceB). Esta proteína previene la acción de la microcina extracelular interactuando con TonB o con MceA o con ambos en la membrana interna, impidiendo de esta manera que la microcina forme un poro en la membrana citoplasmática y mate a la célula.

Durante la fase estacionaria de crecimiento no hay transcripción del mensajero para los genes de maduración *mceI* y *mceJ*. Por lo tanto no están presentes las proteínas de maduración MceI y MceJ y los niveles de MceC también decrecen, pero no tan drásticamente. La pre-MceA sintetizada en fase estacionaria no sufre el proceso de maduración y por tal motivo se exporta al extracelular una microcina que no posee la conformación adecuada y que por tanto es inactiva.

Alguno de los eventos propuestos en este modelo requieren confirmación experimental. En este sentido el próximo paso es demostrar la manera en que las proteínas de maduración actúan sobre MceA para producir una microcina activa.

#### **4.6. Pérdida de inmunidad a la microcina durante la fase estacionaria de crecimiento.**

El fenotipo de pérdida de inmunidad durante la fase estacionaria de crecimiento observado en cepas de *E. coli* que portan el plasmidio pJI no está asociado a la

falta de la proteína de inmunidad (MceB) en dicha etapa del crecimiento bacteriano, ya que se detectó que el mRNA que codifica para MceB se transcribe en fase exponencial, exponencial tardía y estacionaria.

El plasmidio pJI sólo posee los genes *mceA*, B, C, D y E del sistema microcina E492; por lo tanto, la cepas de *E. coli* que llevan este plasmidio producen sólo microcina intracelular la que no puede exportarse por falta de los genes *mceG* y *mceH* que codifican para el aparato exportador.

La microcina intracelular producida está involucrada en el fenotipo de pérdida de inmunidad en fase estacionaria, ya que al emplear células transformadas con un plasmidio que carece del gen de microcina (*mceA*) y que posee los genes *mceB*, C, D y E, éstas siempre son inmunes a la microcina agregada exógenamente. Es más, al agregar copias extras del gen *mceB* a la célula bacteriana que porta el plasmidio pJI, también se revirtió el fenotipo, ya que la mayor cantidad de proteína de inmunidad contrarrestaría el efecto de la microcina producida durante la fase estacionaria. Pero la microcina intracelular no da cuenta por sí sola del fenotipo observado, ya que una célula que porta un plasmidio que tiene sólo los genes *mceA* y *mceB* es siempre inmune. Es más, si se emplea una cepa que lleva los genes *mceABC*, también es inmune y si se utiliza una cepa *mceABE* o una cepa con los genes *mceABDE* se obtiene un fenotipo inmune.

El análisis de sensibilidad a la microcina en mutantes por transposición para los genes exportadores *mceG* y *mceH* (np108 y np203) reveló que no se produce el fenotipo de pérdida de inmunidad en fase estacionaria. Por lo tanto, la ausencia



de exportación de la microcina más la presencia de los productos de los genes *mceC*, *mceD* y *mceE* serían los responsables del fenotipo de pérdida de inmunidad en fase estacionaria en la cepa *E. coli* VCS257pJI.

Esto nos lleva a postular que la microcina sintetizada, al no poder exportarse por falta de los genes de exportación, se acumula a nivel intracelular y ésta acumulación asociada a la participación de dos o más proteínas interfieren con el papel normal que cumple la proteína de inmunidad de proteger a la célula.

## 5. CONCLUSIONES

- La organización genética del sistema productor de microcina E492 en el plasmidio pJAM434 está formada por 10 genes agrupados en 7 unidades transcripcionales: *mceBA*, *mceC*, *mceD*, *mceE*, *mceF*, *mceHG* y *mceJIHG*.
- La microcina E492 organizada en un operón bicistrónico junto con la proteína de inmunidad, se sintetiza tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento
- Durante la fase estacionaria se sintetiza microcina E492 inactiva debido a la ausencia de la transcripción de los genes *mceI* y *mceJ* involucrados en la maduración de la microcina E492. El gen *mceC* también disminuye su expresión en esta fase.
- La ausencia de hierro no tiene un efecto directo sobre la expresión transcripcional y traduccional de la microcina E492 y su inmunidad, ni tampoco sobre la expresión transcripcional de los otros genes del sistema.
- De todas las regiones promotoras que presentaban secuencias de unión al regulador Fur detectadas por análisis bioinformático en el sistema microcina

E492, se comprobó experimentalmente que sólo las localizadas en los promotores de los genes *mceE* y *mceF* tienen funcionalidad *in vivo*.

- La disminución en la expresión traduccional mediada por hierro de MceC observada utilizando fusiones traduccionales no está correlacionada con la putativa caja Fur localizada en la zona promotora del gen *mceC*.
- La sensibilidad a la microcina E494 durante la fase estacionaria de crecimiento de cepas de *E. coli* que portan el plasmidio pJI, no está asociada con una pérdida de la transcripción del gen de inmunidad (*mceB*), sino a un efecto propio de la microcina intracelular sintetizada por estas cepas producto de la carencia de las proteínas de exportación y a la acción conjunta de las proteínas MceC, MceD y MceE.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Asencio, C., Pérez-Díaz, J.C. Martínez, M.C. y Baquero, F. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**:7-14.
- Baeza, M. (2003) Mecanismo de inmunidad, de translocación y de conversión tipo prión de la microcina E492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Baquero, F. y Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 117-124.
- Banker, R. y Carmeli, S. (1999) Inhibitors of serine proteases from a waterbloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron* **55**: 10835–10844.
- Baumler, A.J., Norris, T.L., Lasco, T., Voigt, W., Reissbrodt, R., Rabsch, W. y Heffron, F. (1998). IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **180**: 1446-145.
- Bohannon, D.E., Connell, N., Keener, J., Tormo, A., Espinosa-Urgel, M., Zambrano, M.M. y Kolter, R. (1991) Stationary-phase-inducible "gearbox" promoters: differential effects of *katF* mutations and role of sigma 70. *J. Bacteriol.* **173**: 4482-4492.
- Boyer, A.N. y Tai, P.C. (1998) Characterization of the *cvaA* y *cvi* promoters of the colicin V. Export system: iron-dependent transcription of *cvaA* is modulated by downstream sequences. *J. Bacteriol.* **180**: 1662-1672.
- Bravo, A., DeTorronegui, G. y Díaz, R. (1987) Identification of components of a new stability system of plasmid R1, ParD, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 101-110.
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., de Bolle M.F.C., Thevissen, K., de Samblanx, G.W. y Osborn, R.W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**: 297-323.
- Castillo, J.A. (2003) Mecanismo de exportación y procesamiento de la microcina E492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Castilho, B.A., Olfson, P. y Casadaban, M.J. (1984) Plasmid insertion mutagenesis and *lac* gene fusion with mini-mu bacteriophage transposons. *J. Bacteriol.* **158**: 488-495.

- Cohen, S., Chang, A., Boyer, H., and Helling, R. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **70**: 3240-3244.
- Corsini, G., Baeza, M., Monasterio, O. y Lagos, R. (2002) The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochimie* **84**: 539-544.
- Coy, M. y Neilands, J.B. (1991) Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* **30**: 8201-8210.
- Chang, A.C.Y., y Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic mini plasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141-1156.
- Chiucholo, M.J. Delgado, M., Farias, R. y Salomón, R. (2001) Growth-phase dependent expression of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* **183**: 1755-1764.
- de Lorenzo, V., Martínez, J. y Asensio, C. (1984) Microcin-mediated interactions between *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 391-400.
- de Lorenzo, V. (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **139**: 72-75.
- de Lorenzo, V. (1985) Factors affecting microcin E492 production. *J. Antibiot.* **38**: 340-345.
- de Lorenzo, V. y Pugsley, A.P. (1985) Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:666-669.
- del Castillo, I., Gomez, J.M. y Moreno, F. (1990) *mprA*, an *Escherichia coli* gene that reduces growth-phase-dependent synthesis of microcins B17 and C7 and blocks osmoinduction of *proU* when cloned on a high-copy-number plasmid. *J Bacteriol.* **172**:437-445.
- Faust, B., Hoffmeister, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Haag, S., Schneider, P., Decker, H., Kunzel, E., Rohr, J. y Bechthold, A. (2000) Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces fradiae* Tu2717. *Microbiology* **146**: 147-154.

- Escolar, L., Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**: 6223-6229.
- Gaggero, C., Moreno, F. y Laviña, M. (1993) Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J. Bacteriol.* **175**: 5420-5427.
- Genilloud, O., Moreno, F. y Kolter, R. (1989) DNA sequence, products, and transcriptional pattern of the genes involved in production of the DNA replication inhibitor microcin B17. *J. Bacteriol.* **171**: 1126-1135.
- Gilson, L., Mahanty, H.K. y Kolter, R. (1990) Genetics analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J.* **9**: 3875-3884.
- Gratia, A. (1925) Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacile. *CR Séances Soc. Biol. Fil.* **93**: 1040-1041.
- 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.
- Hohn, B. y Collins, J. (1980) A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* **11**: 291-298.
- Jack, R.W., Tagg J.R. y Ray, B. (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 171-200.
- Kolter, R. y Moreno, F. (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 141-163.
- Klaenhammer, T. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39-85.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X. y Monasterio, O. (1993) Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**: 145-148.
- Lagos, R., Villanueva, J.E. y Monasterio, O. (1999) Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.* **181**: 212-217.
- Lagos, R., Baeza, M., Corsini, G., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J.A., Vergara, C. y Monasterio, O. (2001) Structure, organization, and

characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**: 229-243.

- Lehrer, R.I., Linchtenstein, A.K. y Ganz, T. (1993) Defensinas: antimicrobials and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Ann. Rev. Immunol.* **11**:105-128.
- Miller, J. (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Press. New York. pp. 71-74.
- Moreno, F., González-Pastor, J.E., Baquero, M.R. y Bravo, D. (2002) The regulation of microcin B, C and J operons. *Biochimie* **84**: 521-529.
- Orellana, C. y Lagos, R. (1996) The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcina antagonist. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**: 297-303.
- Oscariz, J. y Pisabarro, A. (2001) Clasificación and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* **4**: 13-19.
- Otten, S., Liu, X., Ferguson, J. y Hutchinson C. (1995) Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius dnrQS* genes encoding a daunosamine biosynthesis enzyme and a glycosyl transferase involved in daunorubicin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **177**: 6688-6692.
- Patzer, S., Baquero, M.R., Bravo, D., Moreno, F. y Hantke, K. (2003) The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catechol siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron. *Microbiology* **149**: 2557-2570.
- Pons, A., Zorn, N., Vignon, D., Delalande, F., Van Dorsselaer, A. y Cottenceau, G. (2002) Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 229-230.
- Pugsley, A.P., Moreno, F. y de Lorenzo, V. (1986) Microcin-E492-insensitive mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3253-3259.
- Riley, M.A. y Wertz, J.E. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:117-137.
- Sablé, S., Duarte, M., Bravo, D., Lanneluc, I., Pons, AM., Cottenceau, G. y Moreno, F. (2003) Wild-type *Escherichia coli* producing microcins B17, D93, J25, and L; cloning of genes for microcin L production and immunity. *Can J Microbiol.* **49**:357-361.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Silver, S. y Walderhaug, M (1992). Gene regulation of plasmid and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev.* **56**: 195-228.
- Stojiljkovic, I., Bäumler, A. y Hantke, K. (1994) Identification and characterization of a new iron-regulated *Escherichia coli* genes by Fur titration assay. *J. Mol. Biol.* **236**: 531-543.
- Stojiljkovic, I. y Hantke, K. (1995) Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol. Gen. Genet.* **247**: 199-205.
- Thomas, X., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Afonso, C., Blond, A., Birlirakis, N., Goulard, C., Dubost, L., Thai, R., Tabet, J.C. y Rebuffat, S. (2004) Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.* **279**: 28233-28242.
- Wilkens, M., Villanueva, J., Cofré, J., Chnaiderman, J. y Lagos, R. (1997) Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4789-4794.
- Zasloff, M. (1987) Megainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5449-5453.