

UCH-FC
Biotecnología
N.º 9.64
C. 1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE *orfL* Y *orfK*, DOS
PROTEÍNAS SIMILARES A MICROCINAS

Seminario de Título

Entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

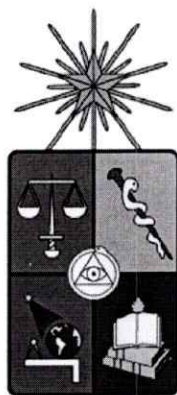
Por

Gonzalo Esteban Núñez Vásquez

Diciembre, 2012

Santiago-Chile

Director de Seminario de Título: Dra. Rosalba Lagos Mónaco



INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE *orfL* Y *orfK*, DOS PROTEÍNAS SIMILARES A MICROCINAS”

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

GONZALO ESTEBAN NÚÑEZ VÁSQUEZ

Dra. Rosalba Lagos Mónaco
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Dra. Rosalba Lagos Mónaco sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dr. Nicolás Guiliani
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Dr. Nicolás Guiliani sobre una línea horizontal.

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman
Evaluador

Firma manuscrita en azul de Dra. Jennifer Alcaíno Gorman sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Mayo de 2013

Autobiografía



Un 2 de marzo de 1989 comienza la odisea a la que llamo mi vida. Nací para formar parte de una familia compuesta por mis padres Isabel Vásquez y Pedro Núñez, y mis hermanos Javier y Felipe. Por ser el más pequeño de toda mi generación de primos, pude aprovechar el cariño de todos mis familiares más que ningún otro nacido antes que yo. Mi infancia estuvo en gran parte marcada por la natación, la crianza de perros (que hasta el día de hoy disfruto) y mis constantes intentos de demostrar más fuerza que mis hermanos. Mi papá constantemente desafiando mi mente, enseñándome ajedrez, y mi mamá con sus enormes muestras de cariño, me dieron una infancia plena y por eso les estoy eternamente agradecido.

Ya más grande (o mayor como diría mi madre ya que grande he sido siempre), en mi adolescencia, logré consolidar uno de los pilares más fuertes en mi vida, aparte de mi familia, mis amigos los "Jungleros". Isaías, Aldo, Tomas, Francisco, Benjamín, Adriano y Pablo. Juntos formamos el equipo de básquetbol del colegio, salimos a todos lados y nos metimos en cuanto problema pudimos. Amigos que hasta el día de hoy considero como una segunda familia y que me es imposible no mencionar, los quiero amigos.

En educación media descubrí mi gusto por las ciencias y las constantes ganas de saber el por qué de las cosas, gusto que durante los años de universidad ha ido creciendo sin descanso. Al entrar a la Universidad de Chile (un enorme orgullo) encontré una nueva pasión que me ayudó a mantener la cordura durante las semanas interminables de clases, la salsa. Hoy sigo bailando buscando siempre nuevos ritmos latinos para aprender, a la fecha ya he aprendido salsa, merengue, bachata, son cubano y un poco de cha cha.

En enero del 2011 ocurrió un evento que cambió mi vida de manera radical. Junto a mi amigo Isaías entramos a la Academia Hermanos Martinez a aprender kickboxing y muay thai. En este lugar bajo la tutela de mis maestros Hernán y Javier Martinez, cambié radicalmente mi estilo de vida y recuperé esa pasión y búsqueda incontrolable por ser el mejor. No podría imaginar mi vida sin la fuerza, constancia, pasión y seguridad que me entrega la pelea. Para aquellos que no entiendan lo que disfruto pelear, les diré que probablemente nunca han sentido el orgullo de poder llamarse a sí mismo guerrero.

Hoy en día siento que mi vida es más plena que nunca y planeo seguir dándolo todo como hijo, hermano, tío (desde el 9 de diciembre del 2012), amigo, guerrero y científico. Sin importar lo que venga más adelante, sé que con lo que he aprendido y con ayuda de la gente que me rodea voy a triunfar.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis padres por el apoyo incondicional y la paciencia interminable que han tenido conmigo durante toda mi vida. Gracias por enseñarme y mostrarme que soy capaz de lograr todo lo que me proponga. A Felipe por ser un amigo además de un hermano y estar ahí cada vez que lo necesité. A mis amigos por darme fuerza en aquellos momentos en que todos se veía distante.

Gracias a la Dra. Rosalba Lagos que además de ser mi tutora del seminario de título, se preocupó de mi formación como científico y me apoyó para poder lograr las metas profesionales que me había planteado.

Gracias a Jorge Flores mi primer tutor cuando entré al laboratorio. A Beatriz que no solo me enseñó cuanto necesité, sino que también fue una compañera con la que pude compartir muchas risas y así poder llevar un ambiente de laboratorio más tranquilo. Gracias Sergio por ayudarme en mi trabajo, incluso en aquellos momentos que tenías varias cosas que hacer, tu tiempo y dedicación fueron una gran ayuda en este último tiempo. Gracias Dani por ser, más que una compañera de trabajo, una amiga con quien poder compartir y disfrutar momentos de relajo para hacer el trabajo más llevadero. Gracias a Maca, Marisol, Cherie y Roselyn, que a pesar de que me recordaban constantemente lo chico que soy, me apoyaron no solo en el trabajo, sino que también en momentos personales con opiniones y consejos que hasta el día de hoy recuerdo y valoro. Gracias al resto de los integrantes actuales y antiguos del laboratorio que más de una vez me enseñaron a usar alguna máquina o a realizar algún experimento de la manera correcta.

Gracias a mis amigos Negro, Rusio, Tomy, Aldo, Adriano, Benja, Pablo, Flores, Finch, Gringo y Joaco por hacer que mi vida esté llena de alegrías y anécdotas, y por estar siempre junto a mi para lo que yo necesite. Me siento increíblemente afortunado por haberlos conocido.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AUTOBIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Bacteriocinas.....	1
1.2. La microcina E492.....	2
1.2.1. Propiedades de la microcina E492.....	2
1.2.2. Determinantes genéticos del sistema productor de la microcina E492.....	2
1.2.3. Mecanismo de acción de la microcina E492	5
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVOS.....	11
Objetivos generales.....	11

Objetivos específicos.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1. Materiales.....	12
2.1.1. Reactivos.....	12
2.1.2. Cepas bacterianas.....	13
2.1.3. Plásmidos y vectores.....	13
2.1.4. Partidores.....	13
2.2. Métodos.....	13
2.2.1. Medios de cultivo.....	13
2.2.2. Técnicas moleculares	17
2.2.3. Clonación de <i>orfL</i> en el vector pBAD33.....	17
2.2.4. Construcción de fusiones traduccionales <i>orfK-phoA</i>	17
2.2.5. Detección de la actividad bactericida.....	18
2.2.6. Curvas de crecimiento.....	18
2.2.7. Ensayos de inducción.....	19
2.2.8. Ensayo de sobrevida en placas.....	19
2.2.9. Ensayo de actividad β -galactosidasa	19
2.2.10. Ensayo de actividad y curva de progreso de la fosfatasa alcalina	20

RESULTADOS.....	21
3.1. Clonamiento del gen <i>orfL</i> en el vector pBAD33.....	21
3.2. Caracterización de la cepa <i>E. coli</i> BW25113 pBAD33- <i>orfL</i>	22
3.2.1. Actividad bactericida.....	22
3.2.2. Efecto de la sobreexpresión del gen <i>orfL</i> sobre la cepa BW25113	27
3.2.3. Efecto de la sobreexpresión de <i>orfL</i> sobre la curva de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> BW25113.....	29
3.2.4. Efecto de la sobreexpresión de <i>orfL</i> sobre la curva de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> BW25113 en conjunto con los distintos sistemas productores de la microcina.....	29
3.3. Determinación del efecto de la sobreexpresión de OrfK y OrfL sobre la membrana celular.....	32
3.4. Determinación de la topología de OrfK.....	39
3.4.1. Modelos <i>in silico</i>	39
3.4.2. Construcción de las fusiones traduccionales <i>orfK-phoA</i>	41
3.4.3. Validación de los modelos.....	45
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.....	14
Tabla 2. Plásmidos y vectores utilizados en este trabajo.....	15
Tabla 3. Partidores usados en este trabajo para las reacciones de PCR y secuenciación.....	16
Tabla 4. Ensayo de halos de inhibición sobreexpresando <i>orfL</i> en presencia de los sistemas productores de la microcina.....	23
Tabla 5. Sobrevida en placas agar LB o agar M9 de cepas que contienen los distintos sistemas productores en conjunto con pBAD33 o pBAD33- <i>orfL</i>	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Determinantes genéticos para la producción, modificación, exportación e inmunidad de la microcina E492	3
Figura 2. Alineamiento múltiple de las secuencias de OrfK y OrfL	6
Figura 3. Esquema de los determinantes genéticos de los diferentes sistemas productores de microcina E492 utilizados en este trabajo	9
Figura 4. Efecto de <i>orfL</i> sobre los halos de inhibición de los sistemas productores de la microcina	24
Figura 5. Ensayo para detectar si la sobreproducción de OrfL en <i>E. coli</i> BW25113 pMccE492 tiene efecto desde el medio extracelular	25
Figura 6. Ensayo para detectar si la sobreproducción de OrfL en <i>E. coli</i> BW25113 np220 tiene efecto desde el medio extracelular	26
Figura 7. Efectos de la expresión residual de <i>orfL</i> sobre las curvas de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> BW25113 transformada con los vectores pBAD33 o pBAD33- <i>orfL</i>	30
Figura 8. Efecto de la sobreexpresión de <i>orfL</i> sobre la cepa <i>E. coli</i> BW25113.....	31
Figura 9. Expresión residual de <i>orfL</i> en presencia de los sistemas productores de la microcina en medio LB	33
Figura 10. Expresión residual de <i>orfL</i> en presencia de los sistemas productores de la microcina en medio M9.....	34
Figura 11. Inducción de pBAD33 en presencia de los sistemas productores en medio LB	35
Figura 12. Inducción de pBAD33- <i>orfL</i> en presencia de los sistemas productores de la microcina en medio LB	36
Figura 13. Inducción de pBAD33 en presencia de los sistemas productores en medio M9	37

Figura 14. Inducción de pBAD33- <i>orfL</i> en presencia de los sistemas productores en medio M9	38
Figura 15. Efectos de <i>orfL</i> y <i>orfK</i> sobre la permeabilidad de la membrana celular	40
Figura 16. Predicción de topología de OrfK	42
Figura 17. Esquema de la obtención de las fusiones entre <i>orfK</i> y <i>phoA</i>	44
Figura 18. Ensayo de actividad PhoA para las fusiones traducciones OrfK-PhoA.....	46
Figura 19. Curva de progreso de la actividad PhoA de las fusiones OrfK-PhoA.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	ATP Binding Cassette
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
Da	Dalton
DO	Densidad Óptica
kb	Kilobases
Mcc	Microcina
nm	Nanómetro
ONPG	Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
pb	Par de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

La microcina E492 es una bacteriocina que ejerce su actividad sobre cepas de la familia de las *Enterobacteriaceae*, mediante la formación de poros que provocan la despolarización de la membrana de la célula. Dentro del "cluster" necesario para la producción de microcina activa se encuentran los marcos de lectura abiertos *orfK* y *orfL*.

El gen *orfK* posee identidad con los genes *mcmA* y *mcmI* que corresponden al gen estructural y de inmunidad de la microcina MccM. Se demostró que la sobreexpresión de este gen afecta la sobrevida de la bacteria, por lo que se propuso demostrar experimentalmente la topología de inserción a la membrana y su capacidad de permeabilizar la membrana citoplasmática. Por otro lado el gen *orfL*, presenta identidad con la familia de las microcinas que tienen unida covalentemente al extremo C-terminal una molécula tipo salmoquelina, pues posee un motivo de doble glicina, un sitio rico en serina y el motivo glicina-serina susceptible de sufrir esta modificación post-traducciona, lo que lo hace un buen candidato como posible regulador de la actividad de la MccE492. El estudio de *orfL* abordó la sobreexpresión y la permeabilización de la membrana.

Para determinar experimentalmente el efecto de *orfK* sobre la membrana de la célula se realizó un ensayo de actividad β -galactosidasa, que es detectable solo si la membrana se permeabiliza. Los resultados obtenidos en esta tesis permiten afirmar que la célula se permeabiliza al sobreexpresar *orfK*. Para determinar la topología de esta proteína, se realizó un estudio de predicción bioinformática obteniendo dos modelos. Mediante fusiones traduccionales con la proteína PhoA se concluyó que OrfK es una proteína de membrana con 3 segmentos transmembrana y su extremo amino terminal está orientado hacia el periplasma.

Para determinar el efecto de *orfL* sobre la producción de la microcina, se clonó el gen y se sobreexpresó utilizando como fondo los distintos sistemas productores de la microcina. Los resultados no permitieron asociar algún fenotipo a la sobreexpresión de esta proteína ya que no se detectaron cambios en la sobrevida, curva de crecimiento o actividad bactericida. Por otro lado, se determinó que su sobreexpresión no provoca la permeabilización de la membrana celular, de modo que su función hasta el momento es desconocida.

ABSTRACT

Microcin E492 is a bacteriocin that acts on strains of the *Enterobacteriaceae* family, through the formation of pores which causes membrane depolarization. Inside the cluster necessary for the production of active microcin, the open reading frames *orfK* and *orfL* are found.

The *orfK* gene has identity with the genes *mcmA* and *mcmI*, which are the structural and immunity genes for the microcin MccM. It has been shown that the overexpression of this gene affects negatively the survival of the bacterial cell, so it's been proposed to experimentally prove the membrane's insertion topology and its ability to permeabilize the cell's cytoplasmic membrane. On the other side, the *orfL* gene has identity with the microcin's family possessing a double-glycin motif, a serine rich region and a glycin-serine motif susceptible for post-translational modification at the C-terminal with a salmochelin-like molecule, which makes it a good candidate as a possible regulator of the MccE492's activity. The study of *orfL* covered the over-expression and membrane's permeabilization.

To experimentally determine the effect of *orfK* on the cell's membrane a β -galactosidase's activity assay was performed, in which the activity is only detectable if the cell's membrane is permeabilized. The results obtained in this thesis confirm that when *orfK* is overexpressed the cell is permeabilized. To determine the topology of this protein, a study of bioinformatic predictions was made and two models were obtained. With translational fusions with protein PhoA, it was concluded that OrfK is a membrane protein with 3 transmembrane regions with its amino end facing towards the periplasm.

To determine the *orfL*'s effect on microcin's production, the gene was cloned and overexpressed using different microcin producing systems as background. The results didn't allow to associate any phenotype with the overexpression of the protein because there wasn't any change detected in the bacterial survival, growth curve or bactericidal activity. On the other side, it was proven that its overexpression doesn't provoke cell's membrane permeabilization, so its function still remains unknown.

INTRODUCCIÓN

1.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son proteínas con propiedades antibacterianas producidas por bacterias Gram positiva y Gram negativa. El efecto de estas bacteriocinas es sobre cepas relacionadas o de la misma especie de la cepa productora (Reeves, 1965; Riley y Wertz, 2002). El mecanismo de acción es diverso, dentro de los cuales podemos encontrar inhibición de la transcripción (Bellomio y cols., 2007), degradación de ADN (Toba y cols., 1988) o formación de poros en la membrana citoplasmática (Lagos y cols., 1993; Braun y cols., 2002; Cascales y cols., 2007).

Dentro de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativa encontramos los grupos de las colicinas y las microcinas (Baquero y Moreno, 1984), caracterizadas por poseer una masa molecular mayor o menor a los 10 kDa, respectivamente. Las microcinas son producidas por miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae* y además de su baja masa molecular, se caracterizan por ser resistentes a condiciones extremas de pH o temperatura y a algunas proteasas, y por ser solubles en metanol.

Los genes implicados en la producción de microcina se encuentran organizados en operones, dentro de los cuales podemos encontrar, al menos, el gen estructural de la microcina, el gen de la inmunidad a la microcina y los genes responsables de la exportación (Kolter y Moreno, 1992). Las microcinas generalmente son modificadas post-traduccionalmente, por lo que además podemos encontrar genes responsables de la maduración.

1.2. La microcina E492

1.2.1. Propiedades de la microcina E492

La microcina E492 (MccE492) es producida por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 y realiza su acción bactericida sobre miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (de Lorenzo, 1984). Esta bacteriocina despolariza la membrana citoplasmática de la célula blanco (de Lorenzo y Pugsley, 1985), debido a que es capaz de formar canales iónicos selectivos para cationes en membranas lipídicas (Lagos y cols., 1993).

La microcina es producida en su forma activa solamente durante fase exponencial de crecimiento (Orellana y Lagos, 1996). La MccE492 no modificada posee una masa molecular de 7.886 Da, un pI de 3,8 (Lagos y cols., 1999), es resistente al pH ácido, a temperaturas sobre los 90°C y al tratamiento con tripsina (de Lorenzo, 1984). Además, tiene la capacidad de formar fibras amiloides (Bieler y cols., 2006; Marín, 2006) e inducir apoptosis en líneas celulares humanas (Hetz y cols., 2002).

1.2.2. Determinantes genéticos del sistema productor de la microcina E492

Los determinantes genéticos necesarios para la producción, maduración y exportación de la microcina E492 se encuentran agrupados en un "cluster" de 13 kb dentro del cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492. Al analizar este segmento se identificaron al menos 15 marcos de lectura abiertos, *mceA*, *mceB*, *mceC*, *mceD*, *mceE*, *mceF*, *mceG*, *mceH*, *mceI*, *mceJ*, *orfS2*, *orfS3*, *orfL*, *orfX* y *orfK* (figura 1).

Los genes *mceA* y *mceB* forman parte de una misma unidad transcripcional. *mceA* corresponde al gen estructural de la MccE492 y codifica una proteína de 99 aminoácidos. Luego este precursor es cortado en el motivo de doble glicina al momento de ser secretado para dejar una proteína de 84 aminoácidos. *mceB* corresponde a una proteína de 95 aminoácidos que confiere inmunidad ante la microcina E492.

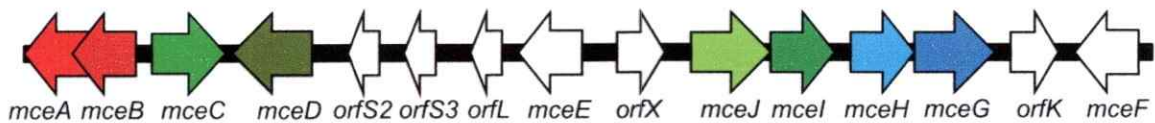


Figura 1. Determinantes genéticos para la producción, modificación, exportación e inmunidad de la microcina E492. Las direcciones de las flechas indican la orientación de los genes dentro del “cluster” de producción de la microcina E492. En blanco se encuentran los marcos de lectura abiertos de función desconocida, en tonos rojos está el gen estructural (*mceA*) y el gen de inmunidad (*mceB*) a la MccE492, en tonos verdes están los genes cuyas proteínas actúan directa, o indirectamente en el proceso de maduración (*mceC*, *mceD*, *mceJ* y *mceI*), y en tonos azules los genes responsables de la exportación (*mceH* y *mceG*).

Los genes *mceC*, *mceI* y *mceJ* son genes relacionados con la modificación post-traducciona (maduración) de la MccE492 (Lagos y cols., 2001) y mutaciones en cualquiera de estos 3 genes lleva a la producción de microcina inactiva. El gen *mceC* codifica para una proteína homóloga a una glicosiltransferasa cuya función es unir covalentemente una molécula de glucosa a la de enteroquelina para así formar una molécula de salmoquelina. Los genes *mceI* y *mceJ*, que codifican respectivamente una proteína homóloga a una aciltransferasa y a una sin homólogo conocido (Lagos y cols., 2001), unen covalentemente la molécula de salmoquelina al extremo carboxilo terminal de la MccE492 en su serina 84 (Lagos y cols., 2009).

La proteína MceD es homóloga a una salmoquelina esterasa, mientras que la proteína MceE presenta identidad con la proteína MchS4, que está encargada de promover la producción de enteroquelina en el sistema de la microcina MccH47 (Lagos y cols., 2009).

Los genes *mceG* y *mceH* forman parte de una sola unidad transcripcional, y codifican proteínas con identidad a los transportadores ABC del sistema exportador del tipo I y a la proteína accesoria del sistema de exportación (Lagos y cols., 2001). Su función estaría relacionada con la exportación de la MccE492.

La proteína MceF posee un alto nivel de identidad con la proteína McmM de los sistemas de las microcinas M y H47 (Lagos y cols., 2009). No existe aún una función asociada a esta proteína, sin embargo, se han encontrado similitudes entre esta proteína y las de la familia de las prenil proteasas, encargadas de la proteólisis de las prenil proteínas en el proceso de prenilación (Otto y cols., 1999).

Además de los genes mencionados anteriormente, dentro del sistema productor de la microcina E492 se encuentran 5 marcos de lectura abiertos cuyas funciones son desconocidas. Los marcos de lectura *orfS2* y *orfS3* codificarían proteínas truncas homólogas a las proteínas MchS2 y MchS3, que son equivalentes a la microcina MccH47

y su proteína de inmunidad respectivamente (Lagos y cols., 2009). Por otro lado, *orfX* es similar a *mchX* del sistema de la microcina MccH47. El marco de lectura abierto *orfK* codifica una proteína que posee identidad con dos proteínas del sistema de la microcina MccM, sus últimos 56 aminoácidos presentan similitud con MccA (gen estructural de MccM) y los primeros 75 aminoácidos presentan identidad con MccI, que corresponde a la proteína que otorga inmunidad contra MccM (Lagos y cols., 2009) (Figura 2A, 2B). Se comprobó que el gen *orfK* dentro del "cluster" de la microcina es transcrito (Tello, 2006). Por último, está *orfL* que codifica para un péptido con identidad a la familia de las microcinas (Figura 2C) en donde se puede destacar la presencia, en el extremo N-terminal, de un dominio similar a un péptido líder con un motivo de doble glicina y en el extremo C-terminal un dominio rico en serinas con el motivo glicina-serina que podría estar sujeto a una modificación post-traducciona con salmoquelina, como ocurre con la MccE492.

1.2.3. Mecanismo de acción de la microcina E492

Para que la MccE492 ejerza su efecto bactericida sobre la cepa objetivo, es necesario que esta última posea las proteínas TonB, ExbB, ManY, ManZ y por lo menos uno de los receptores FepA, Fiu o Cir (Lagos y cols., 2009).

En la primera etapa, la MccE492 es reconocida por alguno de los receptores de sideróforos FepA, Fiu o Cir, que se encuentran ubicados en la membrana externa de la bacteria objetivo. Este proceso es cooperativo siendo FepA el receptor principal. Una vez reconocida la molécula del tipo salmoquelina presente en la MccE492, ocurre un cambio conformacional en TonB y hay una transducción de energía desde éste hacia los receptores permitiendo el ingreso de la microcina. Una vez que la microcina ha sido translocada al periplasma, ésta interactúa con TonB y con la proteína de membrana interna ManYZ mediante un proceso aún desconocido, para ser insertada en la membrana interna y así ejercer su efecto bactericida.



Figura 2. Alineamiento múltiple de las secuencias de OrfK y OrfL. (modificado de Tello, 2006). **A)** Alineamiento entre OrfK y la microcina M de las cepas *E. coli* UPEC536 (CAC43417) y *E. coli* Nissle 1917 (CAD56176). **B)** Alineamiento entre OrfK y la proteína de inmunidad a la microcina M de las cepas *E. coli* UPEC536 (CAC43416) y *E. coli* Nissle 1917 (CAE55704). **C)** Alineamiento entre OrfL y las microcinas MccE492, MccH47 y MccM. En amarillo se encuentran los aminoácidos idénticos en todas las secuencias, en celeste los aminoácidos conservados para al menos 2 secuencias y en verde los aminoácidos de propiedades similares.

En esta tesis se intentó dilucidar el papel que juega OrfL y OrfK, ya sea sobre la regulación del sistema de la MccE492 o potenciación de la actividad bactericida, debido a la similitud que estas presentan con otras microcinas. Para ello, se realizaron distintos estudios orientados a determinar el efecto del gen *orfL* sobre cepas productoras de microcina E492; el efecto de *orfL* y *orfK* sobre la membrana de la célula; y por último para dilucidar la topología de membrana de la proteína OrfK.

La sobreexpresión del gen *orfL* fue usada para asociar el exceso de proteína con alguna función en la producción y/o regulación de la actividad de la MccE492. Se buscó algún cambio en la sobrevivencia o curva de crecimiento de la cepa productora y además un cambio en su actividad bactericida. Este trabajo ya fue realizado con otros genes como *orfK*, *mceF* y *mceD* (González, 2011), y se demostró el efecto negativo de OrfK tanto en la sobrevivencia como en curvas de crecimiento.

Para determinar si *orfK* y *orfL* tienen algún efecto sobre la permeabilidad de la membrana, se realizó un ensayo de Miller modificado (Destomieux-Garzón y cols., 2003). En el ensayo clásico de Miller, las células son permeabilizadas o lisadas para luego cuantificar la actividad de la β -galactosidasa. En el ensayo realizado en esta tesis se utilizó una cepa con el genotipo *lacZ*⁺ y *lacY*, es decir, una cepa de *E. coli* que no permite el ingreso de ONPG a la célula y que expresa constitutivamente la enzima β -galactosidasa. Con este ensayo, la actividad de la β -galactosidasa solo podría ser detectada si la célula es permeabilizada por la sobreexpresión de *orfK* u *orfL*.

Para determinar la topología de una proteína de membrana, se puede comenzar con una predicción bioinformática. Luego, la predicción de la topología de membrana es complementada mediante fusiones traduccionales con la enzima fosfatasa alcalina codificada por el gen *phoA*. Para que esta enzima sea funcional es necesario que sea translocada al periplasma donde se oxida y toma su conformación activa, por lo que al

fusionarla con "loops" de una proteína de membrana es posible determinar su orientación dependiendo de si hay o no actividad (Manoil y cols., 1990).

Los sistemas productores de microcina E492 para el estudio de sobre-expresión fueron cuatro (figura 3). El sistema pMccE492 posee los genes tal como se encuentran en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae* y produce microcina activa. Los otros tres sistemas producen microcina activa, sin embargo presentan ciertos cambios en el orden de los genes del "cluster" y algunos genes incompletos. El sistema pJAM434 posee un fragmento invertido que deja los genes *orfK* y *mceJIGH* bajo un promotor más débil, por lo que es considerado un sistema pobre productor de microcina. El sistema pJAM229 presenta una versión incompleta del gen *mceF*, mientras que pJEM15 (un derivado de pJAM229) presenta triplicado un segmento que posee los últimos 5 aminoácidos de *mceG* y a los genes *orfK* y *mceF* truncado, resultando en un sistema productor de microcina muy activa.

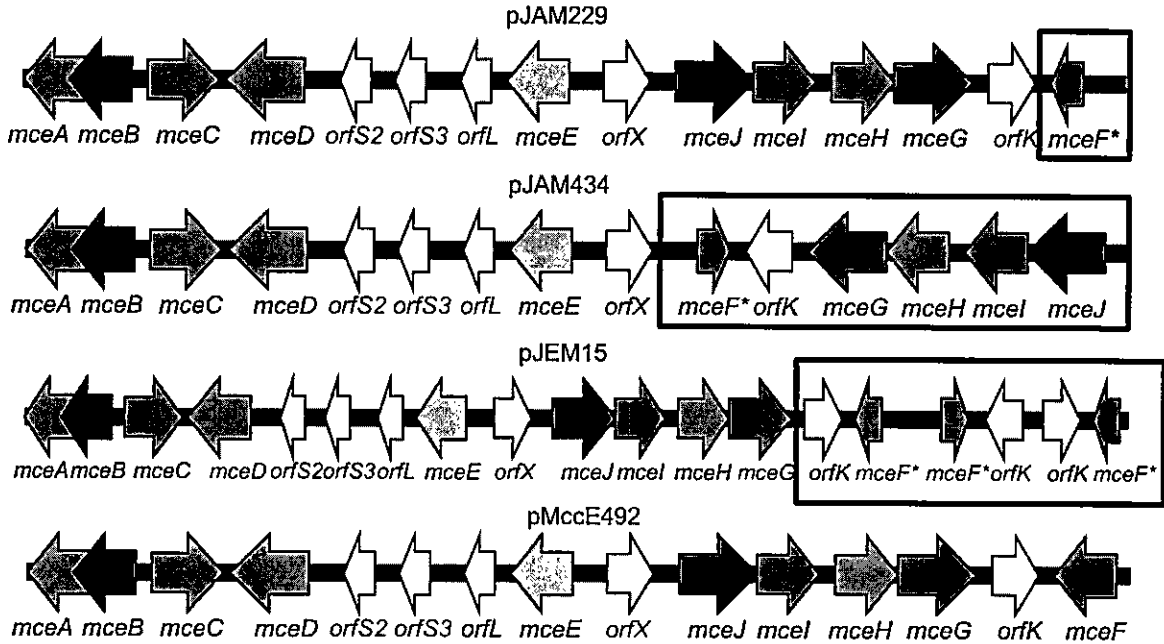


Figura 3. Esquema de los determinantes genéticos de los diferentes sistemas productores de microcina E492 utilizados en este trabajo. La dirección de la flecha indica la orientación de los genes. El asterisco en *mceF* corresponde a una versión trunca de éste. Las zonas que presentan cambios respecto al sistema productor en *Klebsiella pneumoniae* RYC492, se encuentran enmarcadas en negro.

HIPÓTESIS

Dado que el gen *orfK* se expresa, y la similitud que la proteína presenta con McmM y McmA, se propone que OrfK es una proteína integral de membrana, su topología se puede determinar por fusiones traduccionales con la fosfatasa alcalina, y además posee la capacidad de permeabilizar la membrana interna.

Por otro lado, debido a la similitud de OrfL con la MccE492 se postula que podría poseer un rol regulador en la producción de la microcina E492.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

1. Determinar la función de OrfL.
2. Determinar la topología de OrfK, y establecer si esta proteína produce permeabilización de la membrana interna.

Objetivos Específicos

1. Clonar el gen *orfL* en el plásmido pBAD33.
2. Caracterizar la sobreexpresión de la construcción pBAD33-*orfL* mediante ensayos de sobrevivencia y actividad bactericida sobre distintos fondos genéticos productores de microcina E492.
3. Determinar el efecto de OrfK y OrfL sobre la membrana mediante ensayos de permeabilización con ONPG.
4. Construir un modelo *in silico* de la topología de OrfK
5. Realizar fusiones traduccionales con los segmentos periplasmáticos y citoplasmáticos con la proteína fosfatasa alcalina para confirmar el modelo generado.
6. Caracterizar las fusiones mediante actividad de la fosfatasa alcalina.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos

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

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

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

Los desoxirribonucleótidos trifosfato se compraron en Omega Bio-Tek (Estados Unidos).

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

La agarosa se compró en Fermelo Biotec (Santiago, Chile).

El cloramfenicol fue se compró en Andrómaco (Santiago, Chile).

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

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

La tiamina, ácido p-cumárico, TEMED, glucosa, ONPG, 4-nitrofenil fosfato y tricina se compraron en Sigma Chemical Co (St.Louis, Missouri, Estados Unidos).

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

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

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

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

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

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

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



2.1.2. Cepas bacterianas

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

2.1.3. Plásmidos y vectores

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

2.1.4. Partidores

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

2.2. Métodos

2.2.1. Medios de Cultivo

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

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

Medio Mínimo Suplementado: El medio M9 fue suplementado con tiamina 1 g/mL, casaminoácidos 1mg/mL, MgSO₄x7H₂O 2 mM, CaCl₂ 0,1 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, glicerol 0,4% p/v.

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

Cepa	Genotipo	Fuente o referencia
BL21 (DE3)	<i>F, ompT, rB, mB</i>	Novagen
BW25113	<i>rrnB, DElacZ4787, HsdR514, DE(araBAD)567, DE(rhaBAD)568, rph-1</i>	Colección Keio
MC1061	<i>araD139, Del(araA-leu)7697, Del(lac)X74, galK16, galE15(GalS), lambda⁻, e14⁻, mcrA0, relA1, rpsL150(strR), spoT1, mcrB1, hsdR2</i>	Casadaban y col., 1980

Tabla 2. Plásmidos y vectores utilizados en este trabajo

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
np220	pJAM434 <i>mceA</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Lagos y cols., 2001
pBAD33	Plásmido derivado de pACYC184 que permite modular la expresión transcripcional de genes. Cm ^r	Guzmán y cols., 1995
pBAD33- <i>orfK</i>	Derivado de pBAD33. Lleva entre los sitios de restricción <i>Sall</i> y <i>HindIII</i> un fragmento de 679 pb que corresponde al gen <i>orfK</i> . Cm ^r .	González, 2011
pBAD33- <i>orfK</i> Δ41-136- <i>phoA</i>	Derivado de pBAD33- <i>orfK-phoA</i> . Posee los primeros 40 aminoácidos de OrfK fusionado a PhoA. Cm ^r .	Este trabajo
pBAD33- <i>orfK</i> Δ91-136- <i>phoA</i>	Derivado de pBAD33- <i>orfK-phoA</i> . Posee los primeros 89 aminoácidos de OrfK fusionado a PhoA. Cm ^r .	Este trabajo
pBAD33- <i>orfK-phoA</i>	Derivado de pBAD33- <i>orfK</i> . Posee el gen <i>phoA</i> fusionado al extremo carboxilo terminal de <i>orfK</i> . Cm ^r .	Este trabajo
pBAD33- <i>orfL</i>	Derivado de pBAD33. Lleva entre los sitios de restricción <i>Sall</i> y <i>HindIII</i> un fragmento de 299 pb que contiene al gen <i>orfL</i> . Cm ^r .	Este trabajo
pCA24N- <i>phoA</i>	pCA24N (ASKA -) que presenta el gen <i>phoA</i> . Amp ^r	Colección Keio
pJAM229	Derivado de pJ digerido con <i>XhoI</i> . Contiene los genes para la producción de MccE492 activa. Amp ^r .	Wilkins y cols., 1997
pJAM434	Derivado de pJ, posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido con respecto a pJAM229. Es un pobre productor de la MccE492 activa. Amp ^r .	Wilkins y cols., 1997
pJEM15	Derivado de pJAM229, posee la triplicación de un fragmento interno <i>Sall</i> de 2,5 Kb (triple copia de <i>mceF</i>). Es un sobre-productor de MccE492 activa. Amp ^r .	Wilkins y cols., 1997
pMccE492	Derivado de pJRS1. Lleva en el sitio <i>Sall</i> un fragmento de 1640 pb que corresponde a los 5 últimos aminoácidos de <i>mceG</i> , y a los genes <i>orfK</i> y <i>mceF</i> . Contiene todos los genes del cluster de la microcina y produce microcina activa. Amp ^r .	González, 2011
pPELICAN	Derivado de pUC8. Posee el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> . Amp ^r .	Barolo y cols., 2000

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

Partidor	Secuencia 5' → 3'
pBAD33_F	ATGCCATAGCATT TTTTATCC
pBAD33_R	GATTTAATCTGTATCAGG
<i>HindIII</i> _F	ATATCTCCCAAAA AAGCTTT AACTTCCGCTGG
<i>Sall</i> _R	GGATAATGTCAAAA GTCGAC ATCTTAACGG
<i>phoA</i> _F	CTGGATTCTGCTCGAGGTGAAACAAAGCACTATTGC
<i>phoA</i> _R	CGGGTAAATGAAGCTTTTATTTAGCCCCAGAGCGG
<i>orfK</i> _Fd	TTTCTGTGGAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAG
<i>orfK</i> _Rd1	CATCATGTGCCTCGAGCAGAGCCGACCGCCACTCC
<i>orfK</i> _Rd2	GTCATCACCTCTCGAGATATCCATAATAATAACTAAG
<i>orfK</i> _Rd3	TGGGTCATCACTCGAGGGATACTTGCTTAATCTCGTTTTTCAG

En **negrita** se encuentra marcado la secuencia de corte de *HindIII*, subrayado la secuencia para *XhoI* y subrayado y en **negrita** la secuencia para *Sall*.

Placas de agar: Se prepararon las placas con medio LB o M9 suplementado, y 1,5% p/v de agar agar.

Agar blando: Se preparó con medio LB y 0,7% p/v de agar agar.

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

Los antibióticos utilizados para los cultivos de cepas que portaban plásmidos recombinantes, se encontraban en las siguientes concentraciones: ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 50 µg/mL y tetraciclina 10 µg/mL. Éstos fueron preparados según lo descrito por Sambrook y cols. (1989).

2.2.2. Técnicas moleculares

Los procedimientos de biología molecular no detallados en esta tesis (aislamiento de DNA plasmidial, preparación de electrocompetentes, digestión con enzimas de restricción, etc.), se realizaron usando métodos estandarizados (Sambrook y col., 1989; Ausubel y col., 1992).

2.2.3. Clonación de *orfL* en el vector pBAD33

El gen *orfL* fue amplificado utilizando el plasmidio pJAM229 como molde, y los partidores *Sall*_R y *HindIII*_F (tabla 3) mediante PCR. Una vez amplificado el gen, fue digerido con las enzimas *Sall* y *HindIII*, para luego ser ligado en el vector pBAD33 que posee los mismos sitios de restricción. Luego fue transformado en una cepa *E. coli* BW25113 y seleccionado mediante resistencia a cloramfenicol en placas agar LB.

2.2.4. Construcción de fusiones traduccionales *orfK-phoA*

Para la construcción de la fusión traduccional entre *orfK* y *phoA* en el carboxilo terminal se amplificó el vector pBAD33-*orfK* con los partidores *orfK*_Fd y *orfK*_Rd1 (tabla 3), mientras que el gen *phoA* fue obtenido del plasmidio pCA24N-*phoA* haciendo uso de los partidores *phoA*_F y *phoA*_R. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *HindIII* y *XhoI*, y finalmente ligados y transformados en una cepa *E. coli* BW25113. Las

transformantes fueron cultivadas en placas agar LB suplementadas con cloramfenicol. Este nuevo vector recibe el nombre de pBAD33-*orfK-phoA*.

La fusión traduccional entre OrfK Δ 91-136 y PhoA se obtuvo utilizando el plásmido pBAD33-*orfK-phoA* con los partidores *phoA_F* y *orfK_Rd3*. El producto de PCR fue digerido con la enzima de restricción *XhoI*, religado y transformado en una cepa *E. coli* BW25113. Las transformantes fueron cultivadas en placas agar LB suplementadas con cloramfenicol. Este nuevo vector recibe el nombre de pBAD33-*orfK* Δ 91-136-*phoA*.

La construcción del plásmido pBAD33-*orfK* Δ 41-136-*phoA*, que corresponde a la fusión entre OrfK Δ 91-136 y la enzima PhoA, se obtuvo utilizando como molde el vector pBAD33-*orfK-phoA* junto con los partidores *phoA_F* y *orfK_Rd2*. El amplicón obtenido fue digerido con la enzima de restricción *XhoI* y posteriormente ligado. El producto de la ligación fue transformado en una cepa *E. coli* BW25113 y cultivado en una placa agar LB suplementado con cloramfenicol.

2.2.5. Detección de la actividad bactericida

Para detectar actividad bactericida se sembraron las cepas a probar en placas de agar LB con un césped sensible *E. coli* BL21 (DE3) crecido en medio LB hasta fase estacionaria. Una vez sembradas las colonias sobre el césped sensible, se incubaron las placas a 37°C por un tiempo de 15-16 h y la actividad se visualizó por la aparición de halos de inhibición del crecimiento sobre el césped sensible.

2.2.6. Curvas de crecimiento

Se inocularon 50 mL de medio LB o M9 utilizando una dilución 1:100 de un cultivo "over night" y se mantuvo a 37°C con una agitación de 220 rpm. Para hacer las mediciones en cada tiempo se tomaron alícuotas de 1 mL y se determinó su DO_{600nm} en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A.

2.2.7. Ensayos de inducción

Se realizó el mismo procedimiento previamente descrito para las curvas de crecimiento, con el cambio de que a las 2 h se agregó arabinosa para inducir la expresión (concentración final de 0,2%), o glucosa para reprimir la expresión (con una concentración final de 0,1%).

2.2.8. Ensayo de sobrevida en placas

Para el ensayo de sobrevida se utilizaron placas LB y M9 suplementadas con arabinosa al 0,2%, o glucosa al 0,1%, y con los antibióticos correspondientes para cada cepa.

2.2.9. Ensayo de actividad β -galactosidasa

El ensayo de actividad de la β -galactosidasa, también conocido como ensayo de Miller (Miller, 1972). Se utilizó un inóculo de 1:100 de un cultivo "over night" en 30 mL de medio LB. Una vez que las células alcanzaron una DO_{600nm} aproximada de 0,4, se enfrió el cultivo para detener el crecimiento. Las células fueron centrifugadas a $5000 \times g$ por 10 min y suspendidas en buffer Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 0,06 M, $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0,04 M, KCl 0,01 M, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 M, β -mercaptoetanol 0,05 M). Las células una vez suspendidas, fueron separadas en 2 tubos y se les agregó glucosa a una concentración final 0,1%, o arabinosa a una concentración final 0,2% a cada uno. A los tiempos de 30 min, 2 h y 4 h se midió la DO_{600nm} de cada muestra y se tomó 1 mL para colocarlo en un baño termoregulado a $28^\circ C$ durante 5 min. Para empezar la reacción se agregaron 0,2 mL de ONPG (4 mg/mL), se esperó hasta que tomara un color amarillo claro, se registró el tiempo de la reacción y se detuvo con 0,5 mL de Na_2CO_3 1M. En conjunto con cada tubo se usó una réplica sin ONPG para medir la DO_{600nm} . Una vez terminada la reacción los tubos se centrifugaron a $14000 g$ por 3 min y se midió la DO_{420nm} del sobrenadante.

Las Unidades Miller (UM) fueron calculadas de la siguiente manera:

$$UM = 1000 \times \frac{DO_{420nm}}{t \times v \times DO_{600nm}}$$

Donde t es el tiempo de reacción en minutos y v es el volumen de cultivo utilizado.

2.2.10. Ensayo de actividad y curva de progreso de la fosfatasa alcalina

Se utilizó un inóculo de 1:100 de un cultivo "over night" en 50 mL de medio LB. Se crecieron los cultivos durante 30 min y luego fueron inducidos durante 2 h. Las células se centrifugaron a 5000×g por 10 min y luego se suspendieron en amortiguador Tris-HCl 1M pH 8. Se midió la DO_{600nm} y se diluyó el cultivo para dejarlo con un valor de 0,2. Se tomaron alícuotas de 1 mL y se colocaron en un baño termo-regulado a 37°C. Las células fueron permeabilizadas con 50 µL de cloroformo y 50 µL de SDS (0,1%). Para iniciar la reacción se agregaron 100 µL de 4-nitrofenil fosfato di-sodio hexahidrato (0,4%). Para el ensayo de actividad se esperó a que tomara un color amarillo claro y se registró el tiempo de reacción, mientras que para la curva de progreso se usaron tiempos de reacción fijos. La reacción fue detenida con 100 µL de KH_2PO_4 1 M. Una vez detenida la reacción se centrifugaron las muestras a 14000×g por 3 min y se midió la DO_{420nm} y DO_{550nm} del sobrenadante.

Las unidades de actividad (UA) se calcularon como sigue:

$$UA = \frac{DO_{420nm} - 1,75 \times DO_{550nm}}{t \times DO_{600nm}}$$

Donde t es el tiempo en minutos.

RESULTADOS

3.1. Clonamiento del gen *orfL* en el vector pBAD33

Para estudiar el efecto de *orfL* sobre los sistemas productores de microcina E492, se clonó este gen en el vector de expresión pBAD33. Se utilizó este vector por su compatibilidad con los distintos plasmidios que poseen el sistema de producción de la microcina y porque su expresión es regulada. Este vector posee el promotor *ara* y en condiciones normales se encuentra reprimido, esta represión puede aumentar en la presencia de glucosa, y si se encuentra en un medio con arabinosa se induce la expresión del gen clonado.

Para clonar el gen *orfL* se utilizó el plasmidio pJAM229 como molde para amplificar el gen mediante PCR, haciendo uso de los partidores *HindIII*_F y *Sall*_R (tabla 3). Luego de optimizar el proceso realizando un gradiente de temperaturas para encontrar una "T_m" óptima, se obtuvo un amplicón de 598 pb. El amplicón fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *Sall* y analizado en un gel de agarosa al 2%. El vector pBAD33 fue digerido con las enzimas previamente mencionadas, analizado y purificado desde un gel de agarosa al 1%.

Se realizó una reacción de ligación entre el vector pBAD33 y el amplicón que contenía a *orfL* (ambos previamente digeridos), y con la mezcla de ligado se transformó la cepa *E. coli* BW25113. Las transformantes fueron incubadas en placas de agar LB suplementado con cloramfenicol para seleccionar las células que habían integrado el plasmidio. Los clones positivos fueron analizados por PCR y por digestiones con enzimas de restricción de los plásmidos que contenían. Finalmente se secuenció el plasmidio y se comprobó que la construcción estaba correcta, así se obtuvo el plasmidio pBAD33-*orfL*.

3.2. Caracterización de la cepa *E. coli* BW25113 pBAD33-orfL

3.2.1. Actividad bactericida

La cepa *E. coli* BW25113 pBAD33-orfL fue sembrada sobre un césped sensible a la MccE492 para determinar si existía actividad bactericida. No hubo presencia de halo de inhibición tanto en la placa con glucosa como en la placa con arabinosa.

Posteriormente, esta cepa fue transformada con los distintos sistemas productores de la microcina (pMccE492, pJAM434, pJEM15 y pJAM229). Se repitió el experimento de inhibición del crecimiento en un césped sensible, esperando que la sobreexpresión de *orfL* en conjunto con la producción de la microcina provocara algún cambio en la actividad bactericida de esta última, y que se viera reflejado en un cambio en el tamaño del halo de inhibición del crecimiento. Al comparar el diámetro de los halos las distintas cepas con una cepa control, y posteriormente comparando estos valores entre sí, no se encontraron diferencias significativas entre éstas (tabla 4 y figura 4).

Para complementar el experimento anterior, se realizó un ensayo de halos de inhibición utilizando las cepas productoras de la microcina junto con el vector pBAD33, colocando una colonia de estas junto a las cepas *E. coli* BW25113 pBAD33-orfL np220 o pBAD33-orfL pMccE492. El objetivo de este experimento fue probar si OrfL podía actuar desde el medio extracelular, como ha sido descrito para factores de competencia, en donde la secreción de bacteriocinas está regulada por otros péptidos similares que actúan como moléculas tipo "quorum-sensing" (Vincent y cols., 2002), y producir algún efecto sobre la actividad bactericida de la microcina (figuras 5 y 6). Se utilizó el plasmidio np220 ya que posee los genes necesarios para la exportación y modificación de la microcina, pero con una mutación en el gen estructural, y el plasmidio pMccE492 ya que posee el

Tabla 4. Ensayo de halos de inhibición sobreexpresando *orfL* en presencia de los sistemas productores de la microcina

Cepa	% Halo LB + Arabinosa	% Halo LB + Glucosa
pJAM229 pBAD33- <i>orfL</i>	73,1 ± 15,4	82,8 ± 10,4
pJAM434 pBAD33- <i>orfL</i>	90,2 ± 8,0	101,6 ± 9,7
pJEM15 pBAD33- <i>orfL</i>	94,3 ± 4,2	102,7 ± 11,8
pMccE492 pBAD33- <i>orfL</i>	98,6 ± 6,2	101,4 ± 13,2

Todos los experimentos se realizaron sobre un césped sensible de *E. coli* BL21 (DE3). La cepa huésped que se utilizó para estos experimentos corresponde a *E. coli* BW25113. El promedio y desviación estándar de los valores obtenidos fue realizado con siete colonias por cepa. El 100% corresponde al tamaño del halo obtenido con la cepa que presentaba el sistema productor en conjunto con el vector pBAD33.

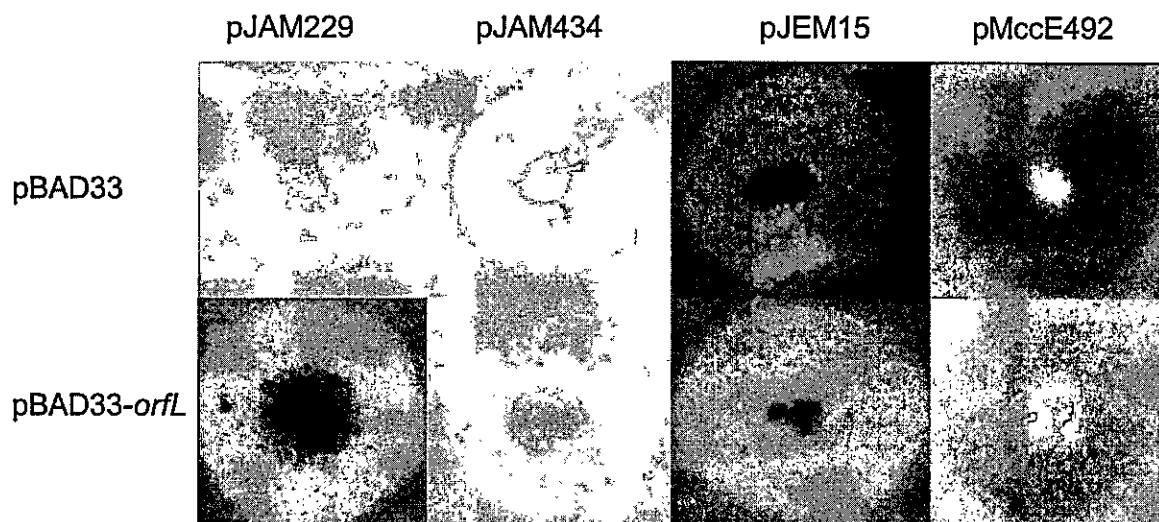


Figura 4. Efecto de *orfL* sobre los halos de inhibición de los sistemas productores de la microcina. Las cepas productoras corresponden a la cepa *E. coli* BW25113 transformada con alguno de los sistemas productores de la microcina y con pBAD33 o pBAD33-*orfL*. El césped sensible corresponde a la cepa BL21 (DE3). Todos los experimentos fueron realizados en placas agar LB suplementadas con arabinosa 0,2%, cloramfenicol y ampicilina.

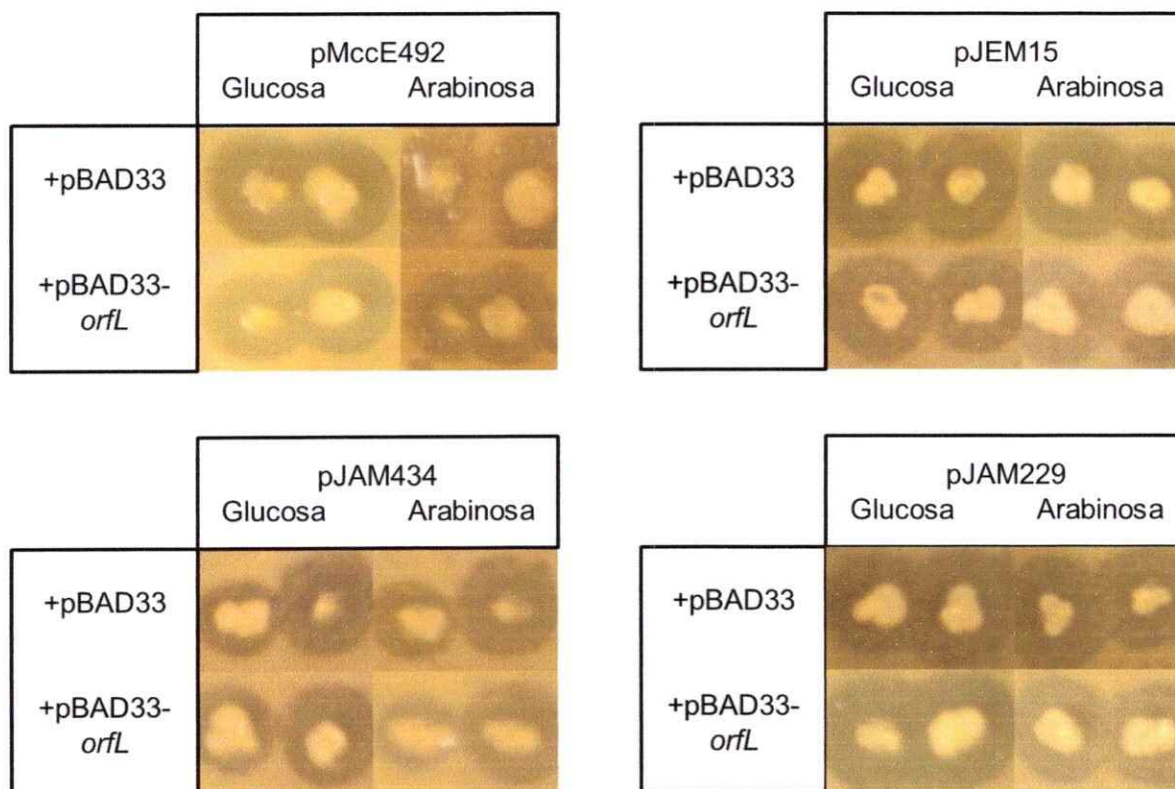


Figura 5. Ensayo para detectar si la sobreproducción de OrfL en *E. coli* BW25113 pMccE492 tiene efecto desde el medio extracelular. Todas las cepas utilizadas corresponden a la cepa *E. coli* BW25113, con excepción del césped sensible que es la cepa BL21 (DE3). En cada par de colonias inoculadas, la de la derecha corresponde a la cepa transformada con el vector pMccE492 con pBAD33 o pBAD33-orfL. La colonia de la izquierda corresponde al sistema productor mencionado en la parte superior de cada set de fotos en conjunto con el vector pBAD33. Las placas son de agar LB suplementado con cloramfenicol y ampicilina.

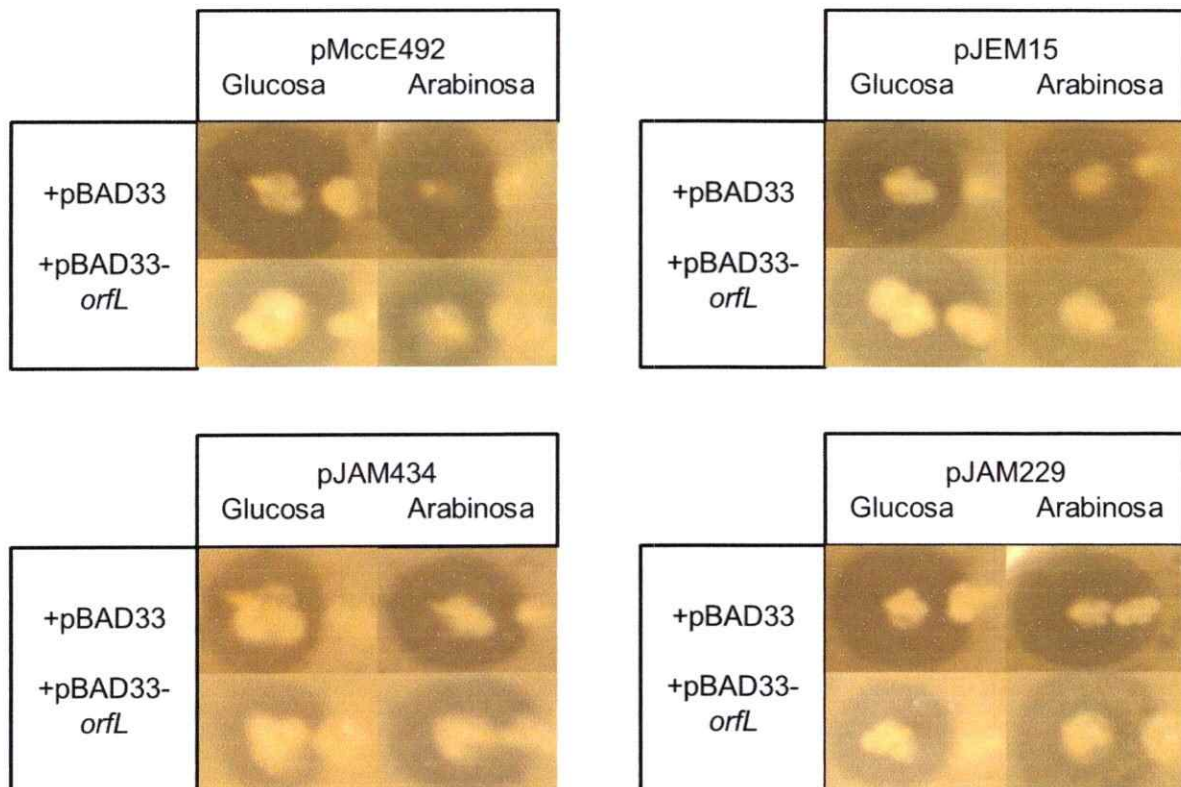


Figura 6. Ensayo para detectar si la sobreproducción de OrfL en *E. coli* BW25113 np220 tiene efecto desde el medio extracelular. Todas las cepas utilizadas corresponden a la cepa *E. coli* BW25113, con excepción del césped sensible que es la cepa BL21 (DE3). En cada par de colonias inoculadas, la de la derecha corresponde a la cepa transformada con el vector np220 con pBAD33 o pBAD33-orfL. La colonia de la izquierda corresponde al sistema productor mencionado en la parte superior de cada set de fotos en conjunto con el vector pBAD33. Las placas son de agar LB suplementado con cloramfenicol y ampicilina.

“cluster” productor completo de la microcina. Cada experimento se realizó en placas con medio inductor o inhibitorio de la expresión de *orfL*, y utilizando el vector vacío como control. Si hubiese un efecto estimulante o inhibitorio de la actividad antibacteriana se observaría una deformación, ya sea una protuberancia o una concavidad respectivamente, del halo de inhibición de la colonia probada. No se detectó cambio alguno en la forma del halo de inhibición formado por la cepa que poseía el sistema productor. Para ambas cepas con sobreproducción de *orfL* se obtuvieron los mismos resultados, ya sea comparando el vector sin inserto con el vector que contiene al gen *orfL*, o comparando el estado inducido con el reprimido para la expresión de *orfL*.

Además se logró probar que la cepa OrfL no presenta actividad bactericida cuando se encuentra en presencia del vector np220, plásmido que posee todos los determinantes genéticos para la maduración y exportación de la MccE492, pero con una mutación en el gen estructural.

3.2.2. Efecto de la sobreexpresión del gen *orfL* sobre la cepa BW25113

Se realizaron ensayos de sobrevivencia en placas LB o M9 con glucosa o arabinosa, para determinar si la sobreexpresión de *orfL* causaba una disminución en la sobrevivencia (tabla 5). No se detectó un cambio en la sobrevivencia de la cepa, ya sea comparando entre placas glucosa y arabinosa para una misma cepa o al compararla con la cepa control (BW25113 pBAD33).

Además se evaluó la sobrevivencia al sobreexpresar *orfL* en presencia de los distintos sistemas productores de MccE492, siguiendo las mismas condiciones que en el experimento anterior. Nuevamente no se detectó un cambio en la sobrevivencia al comparar la condición reprimida e inducida. Al comparar las cepas con el control (sistema productor

Tabla 5. Sobrevida en placas agar LB o agar M9 de cepas que contienen los distintos sistemas productores en conjunto con pBAD33 o pBAD33-*orfL*

Cepa	%Sobrevida LB	%Sobrevida M9
pBAD33	100,9 ± 26,1	95,9 ± 15,8
pBAD33- <i>orfL</i>	117,2 ± 58,0	103,9 ± 23,3
pJAM229 pBAD33	139,9 ± 69,1	101,0 ± 32,4
pJAM229 pBAD33- <i>orfL</i>	93,8 ± 79,5	96,5 ± 41,1
pJAM434 pBAD33	121,6 ± 89,3	94,5 ± 19,4
pJAM434 pBAD33- <i>orfL</i>	101,6 ± 69,2	96,0 ± 24,7
pJEM15 pBAD33	137,7 ± 60,9	85,7 ± 30,2
pJEM15 pBAD33- <i>orfL</i>	56,4 ± 45,2	104,2 ± 30,5
pMccE492 pBAD33	100,9 ± 26,1	95,9 ± 15,8
pMccE492 pBAD33- <i>orfL</i>	91,4 ± 29,6	85,1 ± 21,8

Todos los experimentos fueron realizados en la cepa *E.coli* BW25113. Los conteos de colonias y porcentajes de sobrevida fueron obtenidos de un triplicado. Se consideró como un 100% la sobrevida obtenida en las placas agar LB o M9 suplementadas con glucosa.

y pBAD33) se notó una disminución de 2 órdenes de magnitud para la cepa BW25113 pJAM434 pBAD33-*orfL*, es decir, donde ambas cepas fueron crecidas hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 0,6, para pJAM434 pBAD33 se obtuvo un recuento de células del orden de 10^8 UFC/mL, mientras que pJAM434 pBAD33-*orfL* solo alcanzó el orden de 10^6 UFC/mL.

3.2.3. Efecto de la sobreexpresión de *orfL* sobre la curva de crecimiento de la cepa *E. coli* BW25113

Se realizó una curva de crecimiento en la cepa *E. coli* BW25113 con los plásmidos pBAD33 o pBAD33-*orfL*. Las curvas fueron realizadas en los medios LB y M9 sin presencia de inductor o represor de la expresión, es decir, solo con la expresión residual del gen (figura 7). No se observaron diferencias entre las curvas de crecimiento con pBAD33 o pBAD33-*orfL*, por lo que la expresión residual del gen *orfL* no afectaría el crecimiento de la célula.

A continuación se realizaron curvas de crecimiento agregando glucosa (represor de la expresión), o arabinosa (inductor de la expresión) luego de 2 h de crecimiento de las células, nuevamente en los medios LB y M9. No se notaron alteraciones significativas en las curvas de crecimiento (considerando los tiempos generacionales), comparando pBAD33 con pBAD33-*orfL*, o comparando el medio con arabinosa o con glucosa (figura 8).

3.2.4. Efecto de la sobreexpresión de *orfL* sobre la curva de crecimiento de la cepa *E. coli* BW25113 en conjunto con los distintos sistemas productores de la microcina

Se siguió el mismo esquema utilizado en las curvas de crecimiento anteriores. Primero se realizaron las curvas en ausencia de inductor o represor de la expresión de *orfL*, pero esta vez en un huésped que lleva los sistemas productores de microcina E492

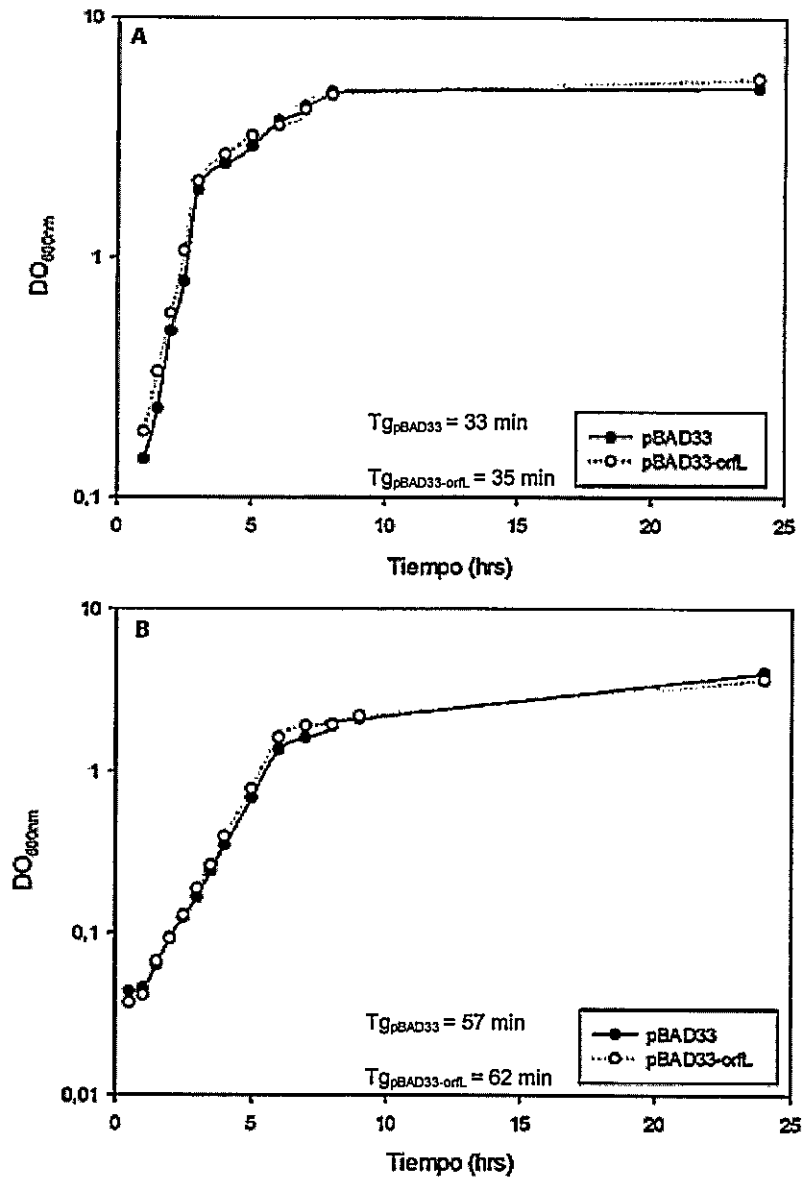


Figura 7. Efectos de la expresión residual de *orfL* sobre las curvas de crecimiento de la cepa *E. coli* BW25113 transformada con los vectores pBAD33 o pBAD33-*orfL*. Estos cultivos fueron crecidos en ausencia de arabinosa (inductor) o glucosa (repressor). A) Curva de crecimiento obtenida al crecer las cepas en medio LB. B) Curva de crecimiento obtenida al crecer las cepas en medio M9. Para el caso del medio M9 se utilizó glicerol con una concentración final del 0,4% como fuente de carbono. En todos los casos los medios se encontraban suplementados con cloramfenicol con las concentraciones especificadas en la sección de métodos. Se realizó una réplica del experimento obteniéndose resultados similares.

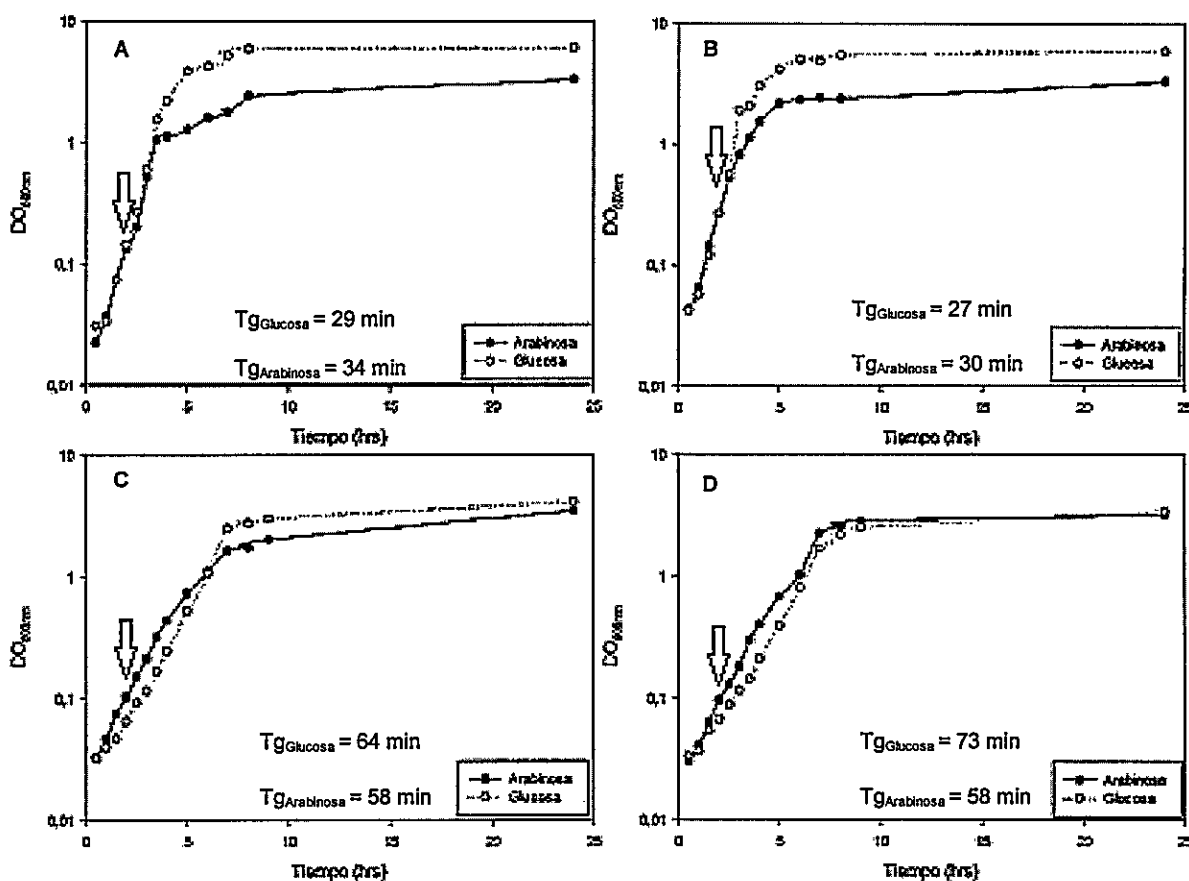


Figura 8. Efecto de la sobreexpresión de *orfL* sobre la cepa *E. coli* BW25113. Todos los experimentos fueron realizados en la cepa *E. coli* BW25113. Luego de 2 horas de crecimiento se agregó glucosa o arabinosa al medio de cultivo para reprimir o inducir la expresión de *orfL*. El medio M9 fue suplementado con glicerol como fuente de carbono con una concentración final de 0,4%. **A)** Cepa con el vector pBAD33 en medio LB. **B)** Cepa con el vector pBAD33-*orfL* en medio LB. **C)** Cepa con el vector pBAD33 en medio M9. **D)** Cepa con el vector pBAD33-*orfL* en medio M9. La flecha indica el momento en que se agregó glucosa o arabinosa. Se realizó una réplica del experimento obteniéndose resultados similares.

(pJAM229, pJAM434, pJEM15 y pMccE492). No se encontraron diferencias significativas entre las curvas de crecimiento con los distintos sistemas productores, ya sea comparando pBAD33 con pBAD33-*orfL* o comparando los distintos sistemas productores, para LB o M9 (figuras 9 y 10).

Luego se repitió el experimento anterior agregando glucosa o arabinosa después de 2 h de crecimiento. No se obtuvieron diferencias entre las cepas que poseen el vector pBAD33-*orfL* en comparación con el vector vacío (pBAD33). Tampoco hubo una diferencia al momento de inducir o reprimir la expresión de *orfL*. Las curvas de crecimiento son todas semejantes entre sí, y a su vez, son similares a las obtenidas en los experimentos anteriores al probar la expresión residual del gen *orfL* en presencia de los sistemas productores de la microcina. Tampoco se detectó un efecto al comparar entre los medios LB y M9 (figuras 11 – 14).

3.3. Determinación del efecto de la sobreexpresión de OrfK y OrfL sobre la membrana celular

En este ensayo se cuantificó la actividad β -galactosidasa utilizando una variación del método de Miller. En este caso la actividad de esta enzima no está asociada con su nivel de expresión, sino que debería ser proporcional al grado de permeabilización de la membrana. Para esto fue necesario el uso de una cepa que no pudiera ingresar el reactivo ONPG, es decir que fuera *lacY*⁻; y que expresara constitutivamente el gen de la β -galactosidasa (*lacZ*⁺). En estos experimentos se utilizó la cepa *E. coli* MC1061 (tabla 1) que presenta un genotipo *lacY*⁻, *lacZ*⁺, y para obtener una expresión constitutiva de la β -galactosidasa se transformó con el plásmido pPELICAN que codifica este gen.

Se transformó sucesivamente la cepa *E. coli* MC1061 pPELICAN con los plasmidios pBAD33, pBAD33-*orfK* o pBAD33-*orfL*, y la producción de β -galactosidasa se detectó en placas agar LB X-gal para las tres cepas.

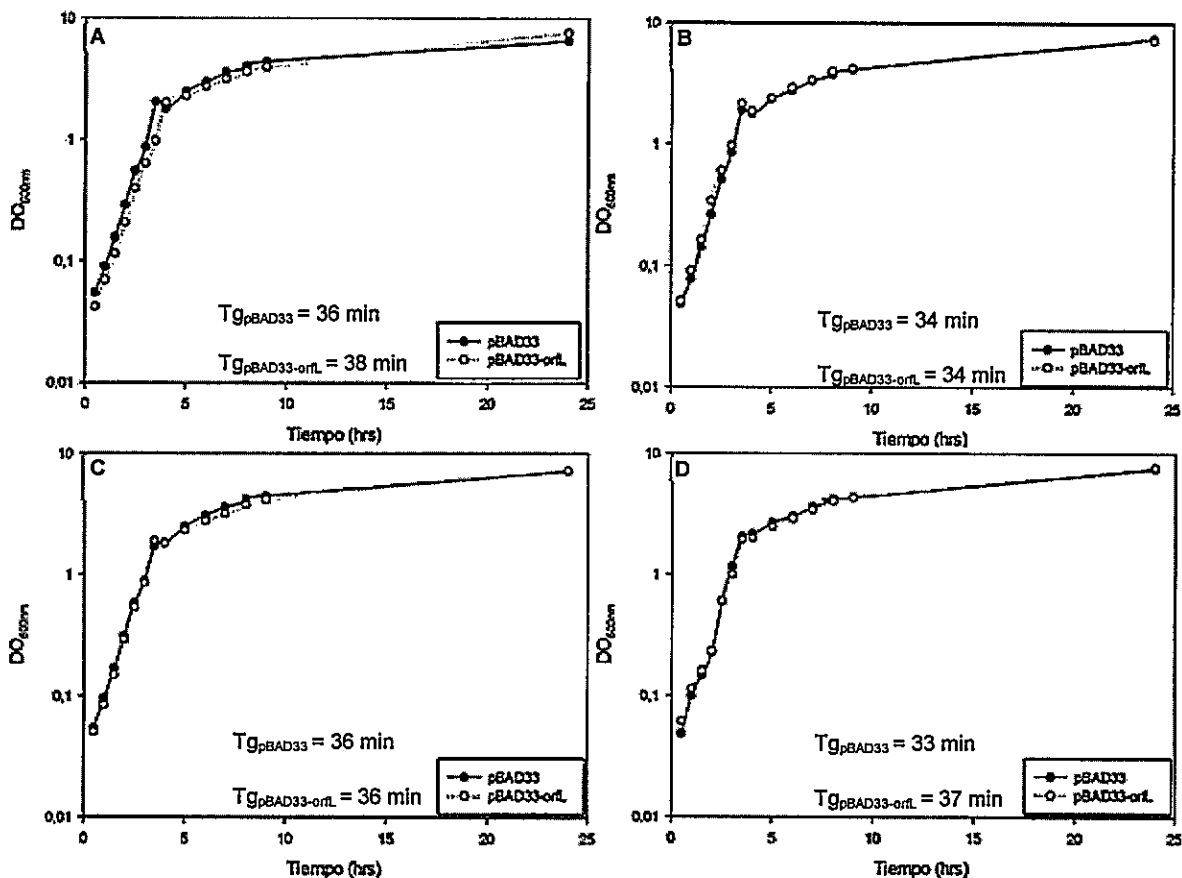


Figura 9. Expresión residual de *orfL* en presencia de los sistemas productores de la microcina en medio LB. Todos los experimentos fueron realizados en la cepa *E. coli* BW25113 transformada con los distintos sistemas productores de la microcina y con pBAD33 o pBAD33-*orfL*. **A)** Cepa con el sistema productor pJAM229. **B)** Cepa con el sistema productor pJAM434. **C)** Cepa con el sistema productor pJEM15. **D)** Cepa con el sistema productor pMccE492. Se realizó una réplica del experimento obteniéndose resultados similares.

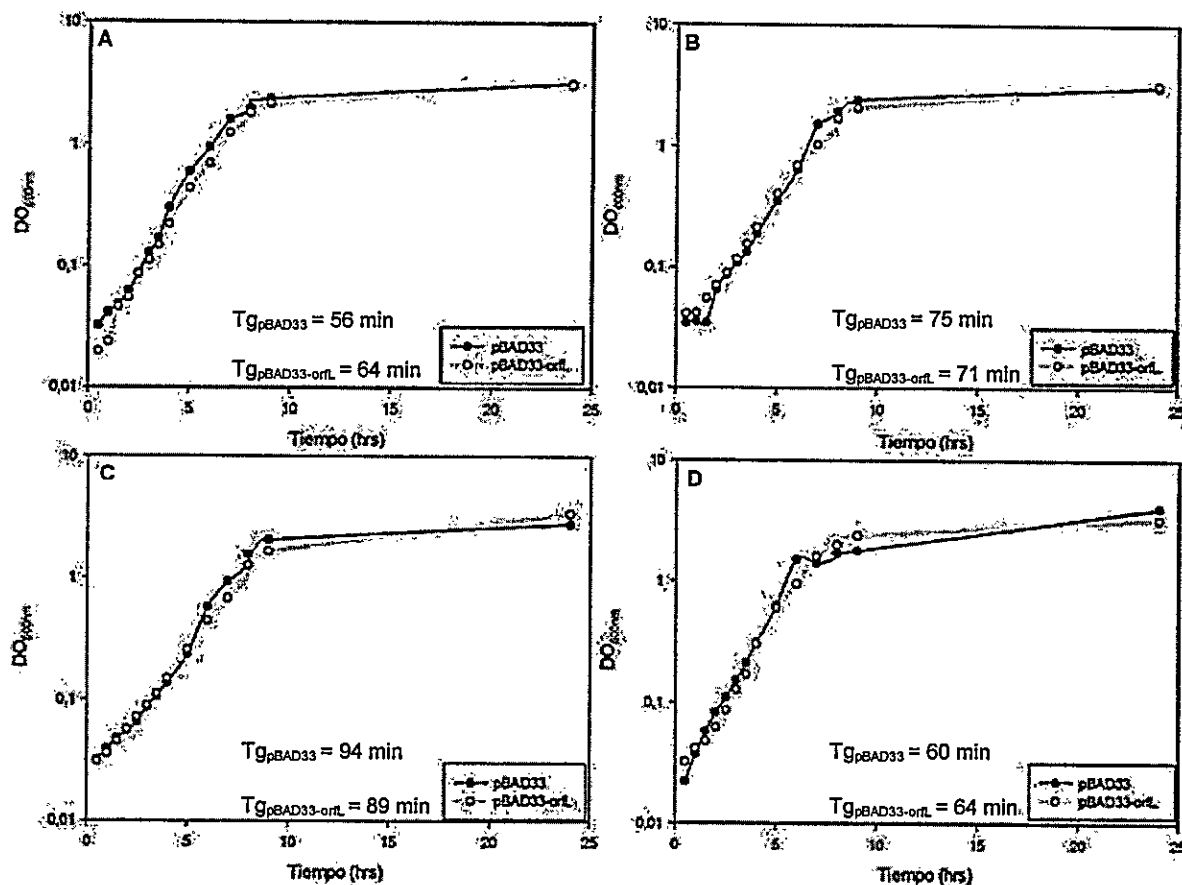


Figura 10. Expresión residual de *orfL* en presencia de los sistemas productores de la microcina en medio M9. Todos los experimentos fueron realizados en la cepa *E. coli* BW25113 transformada con los distintos sistemas productores de la microcina y con pBAD33 o pBAD33-*orfL*. A) Cepa con el sistema productor pJAM229. B) Cepa con el sistema productor pJAM434. C) Cepa con el sistema productor pJEM15. D) Cepa con el sistema productor pMccE492. Se realizó una réplica del experimento obteniéndose resultados similares.

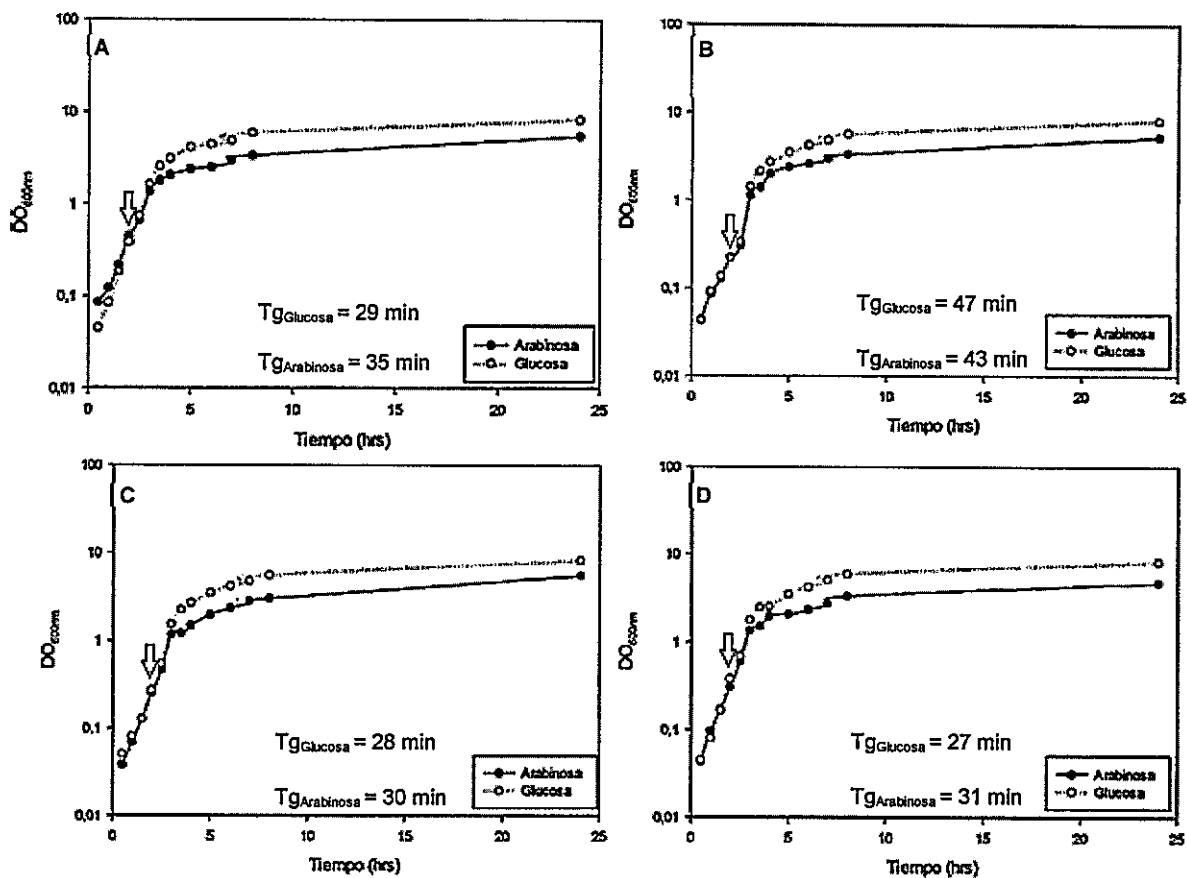


Figura 11. Inducción de pBAD33 en presencia de los sistemas productores en medio LB. Curvas de crecimiento en medio LB de *E. coli* BW25113 transformadas con los sistemas productores de MccE492 y pBAD33. A las 2 horas de crecimiento se agregó glucosa o arabinosa al cultivo. **A)** Cepa con el sistema productor pJAM229. **B)** Cepa con el sistema productor pJAM434. **C)** Cepa con el sistema productor pJEM15. **D)** Cepa con el sistema productor pMccE492. La flecha indica el momento en que se agregó glucosa o arabinosa. Se realizó una réplica del experimento obteniéndose resultados similares.

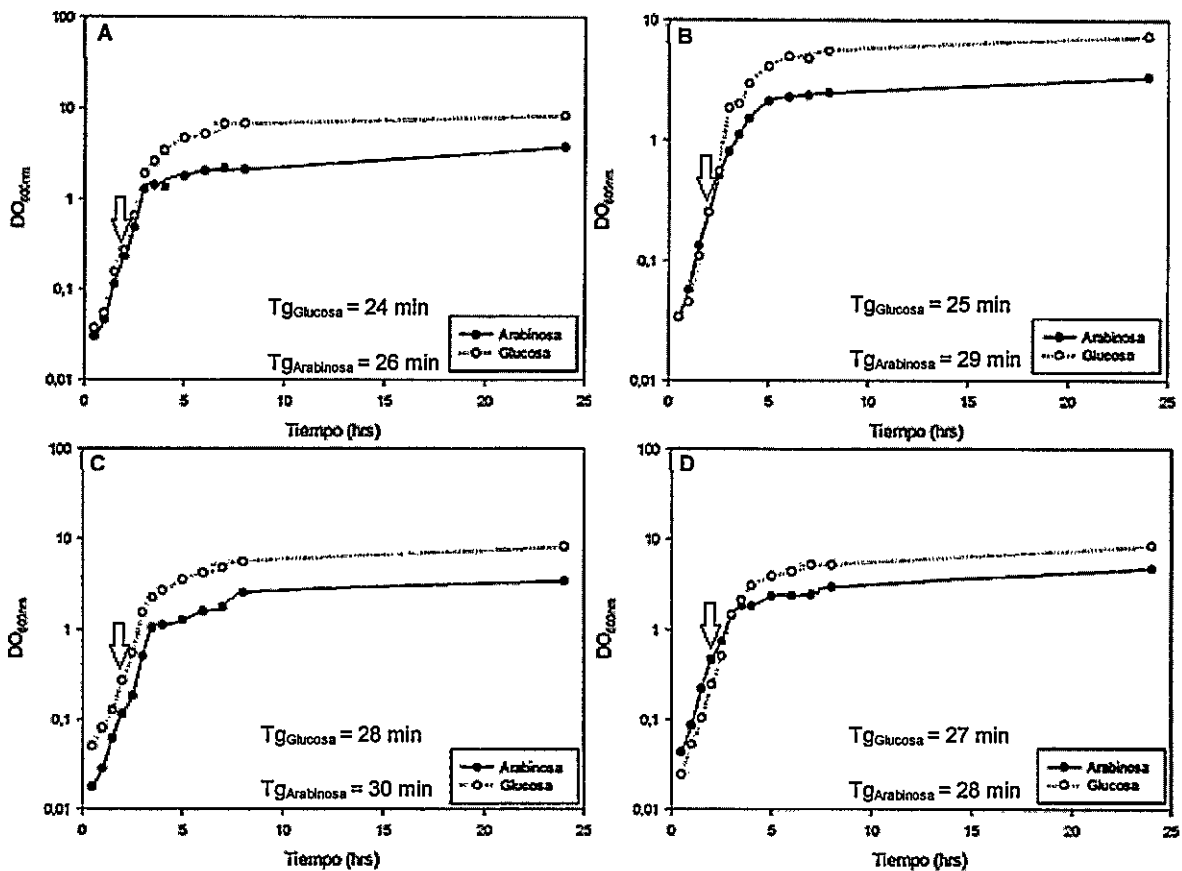


Figura 12. Inducción de pBAD33-*orfL* en presencia de los sistemas productores de la microcina en medio LB. Curvas de crecimiento en medio LB de *E. coli* BW25113 transformadas con los sistemas productores de MccE492 y pBAD33-*orfL*. A las 2 horas de crecimiento se agregó glucosa o arabinosa al cultivo. A) Cepa con el sistema productor pJAM229. B) Cepa con el sistema productor pJAM434. C) Cepa con el sistema productor pJEM15. D) Cepa con el sistema productor pMccE492. La flecha indica el momento en que se agregó glucosa o arabinosa. Se realizó una réplica del experimento obteniéndose resultados similares.

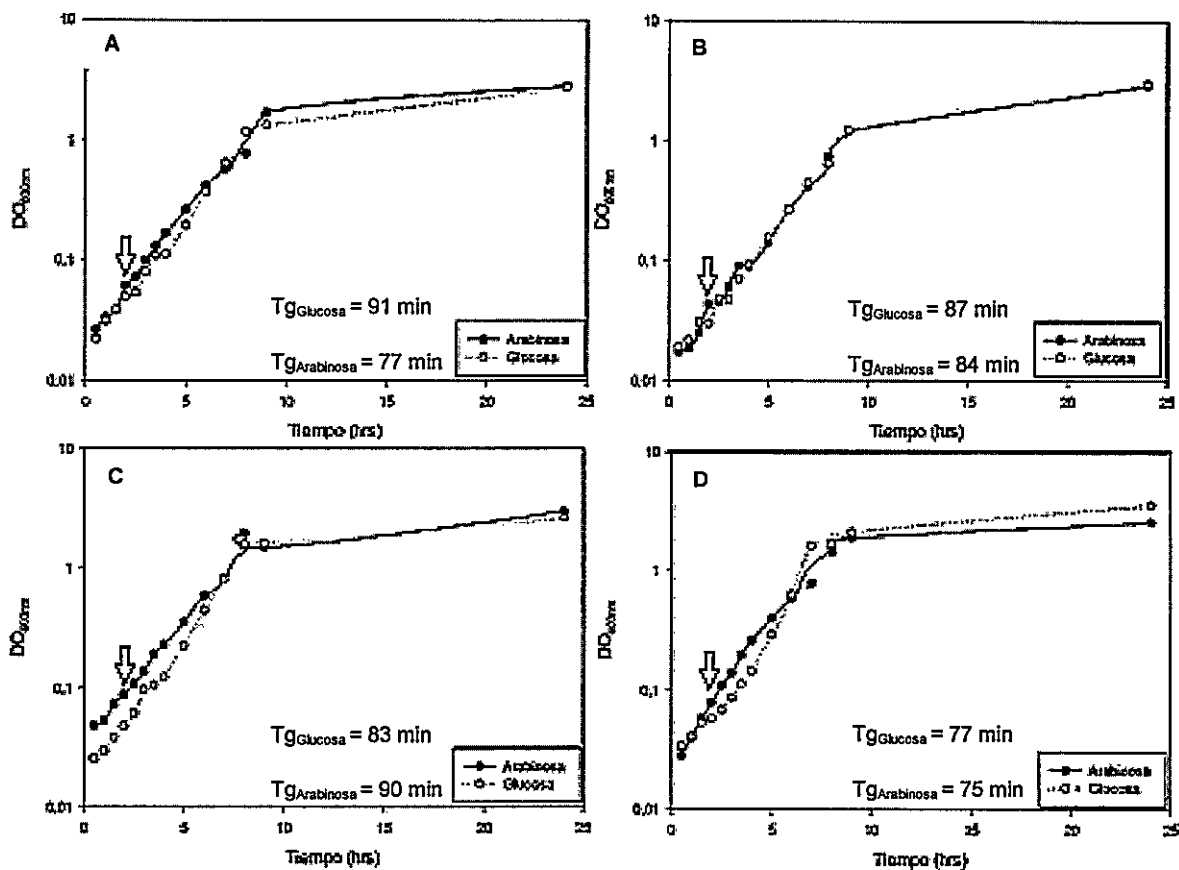


Figura 13. Inducción de pBAD33 en presencia de los sistemas productores en medio M9. Curvas de crecimiento en medio M9 de *E. coli* BW25113 transformadas con los sistemas productores de MccE492 y pBAD33. A las 2 horas de crecimiento se agregó glucosa o arabinosa al cultivo. **A)** Cepa con el sistema productor pJAM229. **B)** Cepa con el sistema productor pJAM434. **C)** Cepa con el sistema productor pJEM15. **D)** Cepa con el sistema productor pMccE492. La flecha indica el momento en que se agregó glucosa o arabinosa. Se realizó una réplica del experimento obteniéndose resultados similares.

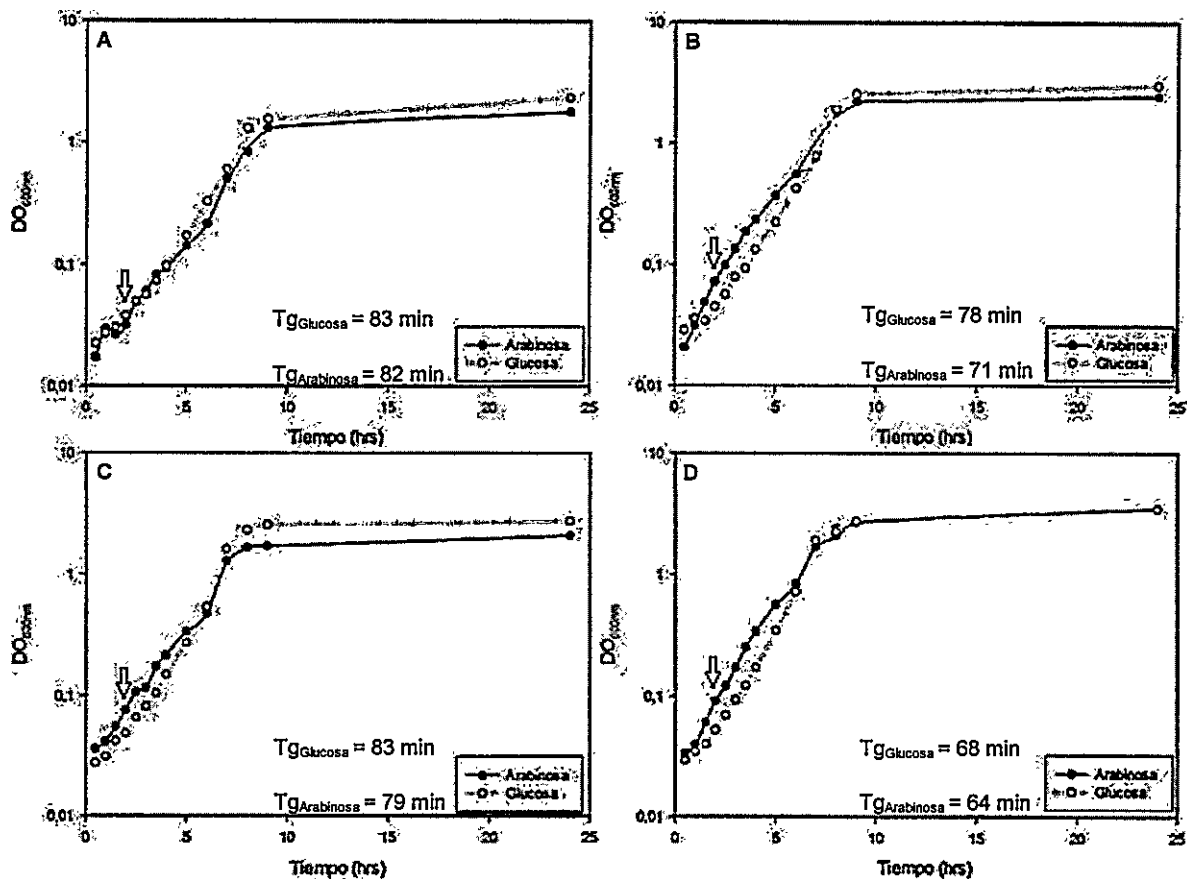


Figura 14. Inducción de pBAD33-*orfL* en presencia de los sistemas productores en medio M9. Curvas de crecimiento en medio M9 de *E. coli* BW25113 transformadas con los sistemas productores de *MccE492* y *pBAD33-orfL*. A las 2 horas de crecimiento se agregó glucosa o arabinosa al cultivo. **A)** Cepa con el sistema productor *pJAM229*. **B)** Cepa con el sistema productor *pJAM434*. **C)** Cepa con el sistema productor *pJEM15*. **D)** Cepa con el sistema productor *pMccE492*. La flecha indica el momento en que se agregó glucosa o arabinosa. Se realizó una réplica del experimento obteniéndose resultados similares.

Como control positivo al momento de cuantificar la actividad β -galactosidasa las células fueron permeabilizadas con SDS y cloroformo, esto constituye un 100% de permeabilización y por lo tanto el valor máximo que se debería obtener si es que alguna de las proteínas permeabilizara la membrana. Para el caso de las cepas transformadas con pBAD33 y pBAD33-*orfL* no se detectó actividad significativa, mientras que la construcción pBAD33-*orfK* presentó una actividad de 63 Unidades Miller (UM) luego de 30 min de inducción y a las 4 h ya presentaba el mismo valor que el control positivo (figura 15).

Una de las opciones que debía ser descartada durante la realización de este experimento, era si OrfL u OrfK provocaban la lisis de las células en vez de su permeabilización. De ser éste el caso, el sobrenadante de las muestras debería presentar actividad β -galactosidasa. Esta actividad se midió para cada uno de los tiempos de inducción utilizados, pero no se detectó actividad β -galactosidasa alguna. En conclusión, tanto OrfK como OrfL no provocan la ruptura de las células que los sobreproducen, y por otro lado OrfK sería la única proteína estudiada en esta tesis, que tendría la capacidad de permeabilizar la membrana. Este resultado es coherente con los efectos observados al sobreproducir estas proteínas (González, 2011 y esta tesis).

3.4. Determinación de la topología de OrfK

3.4.1. Modelos *in silico*

Ya que los experimentos anteriores apuntan a que OrfK se insertaría en la membrana de la célula, es de importancia determinar la orientación en la que ésta se inserta y el número de segmentos implicados en esto, es decir, la topología de inserción de membrana de la proteína. Para esto, un método aceptado es el estudio de predicción



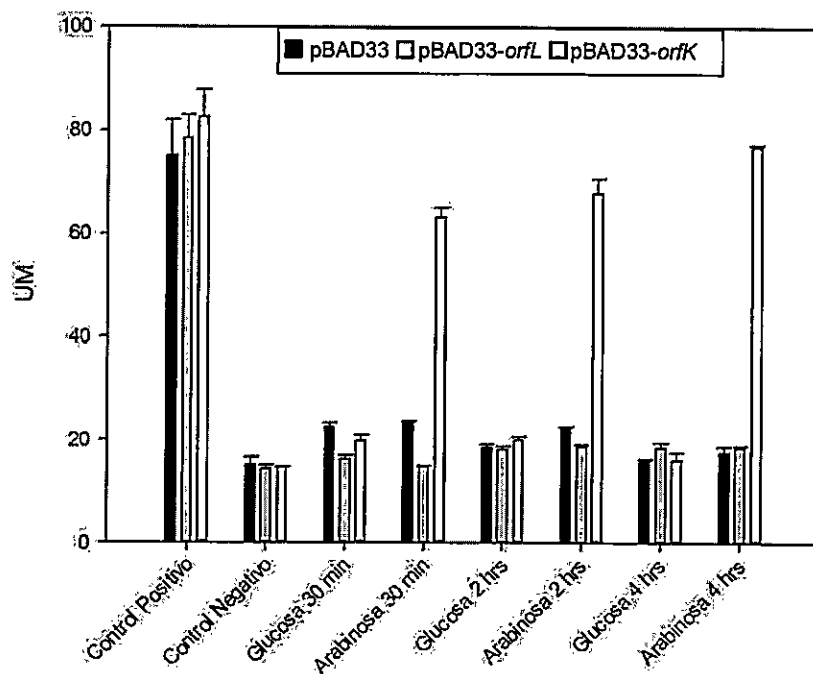


Figura 15. Efectos de *orfL* y *orfK* sobre la permeabilidad de la membrana celular. Todos los experimentos se realizaron en la cepa *E. coli* BW25113 transformado con los plasmidios pBAD33, pBAD33-*orfL* o pBAD33-*orfK*. El control positivo corresponde a la cepa permeabilizada con 10 μ L cloroformo y 10 μ L SDS (0,1%), y el control negativo es una muestra sin tratamiento. Los tiempos corresponden al tiempo de inducción (arabinosa) o represión (glucosa) de la expresión. UM corresponde a Unidades Miller.

bioinformática de la topología, que luego debe ser corroborada mediante el uso de fusiones traduccionales con algún reportero que cambie sus propiedades de acuerdo a su localización subcelular. Para esta tesis se escogió como reportero la proteína fosfatasa alcalina (PhoA), esta proteína cuando se encuentra en el periplasma se oxida y solo de esa manera puede alcanzar su conformación activa. De esta manera al realizar fusiones traduccionales entre la proteína a estudiar y PhoA es posible determinar cuáles son las zonas que se encuentran orientadas hacia el citoplasma o hacia el periplasma celular dependiendo si hay ausencia o presencia de actividad, respectivamente.

Se usaron los programas HMMTOP, TMHMM, TMPred y TopPred y se obtuvieron cuatro modelos que predicen la topología de la proteína OrfK (figura 16). Todos los modelos coinciden en que OrfK sería una proteína integral de membrana con tres segmentos transmembrana. De los modelos generados, tres (HMMTOP, TMPred y TopPred) coinciden con una configuración que coloca el extremo amino terminal hacia el citoplasma de la célula, en tanto que TMHMM predice la configuración opuesta.

Para la corroboración de uno de los modelos generados, se procedió a construir tres fusiones traduccionales entre distintos segmentos de OrfK y la proteína PhoA. Las fusiones fueron realizadas entre PhoA y la tirosina 40, la serina 90 o la leucina 136 de OrfK. Esto se resume en una fusión entre PhoA y el primer "loop", el segundo "loop" o el extremo C-terminal de la proteína OrfK, respectivamente.

3.4.2. Construcción de las fusiones traduccionales OrfK-PhoA

Para la obtención de la primera fusión traduccional (PhoA unido al extremo C-terminal de OrfK) se utilizó como molde el plasmidio pCA24N-*phoA* con los partidores *phoA_F* y *phoA_R* (tabla 3) que contiene el gen *phoA*. El producto de PCR obtenido corresponde a un amplicón con un tamaño de 1.448 pb, que fue observado en un gel de

A
 VKEGGYSKKV DIKTTIAFV INYLFFYITV SLYLSYYYGY DFFNLYMLFL SLAITSLSLW LNVRFYFFYR FNNKGVKMRK LSENEIKQVS GGDGNDGQAE

LIAGAIAGT FLSPGIGSIA GAYVQWSLAL EWRSAL

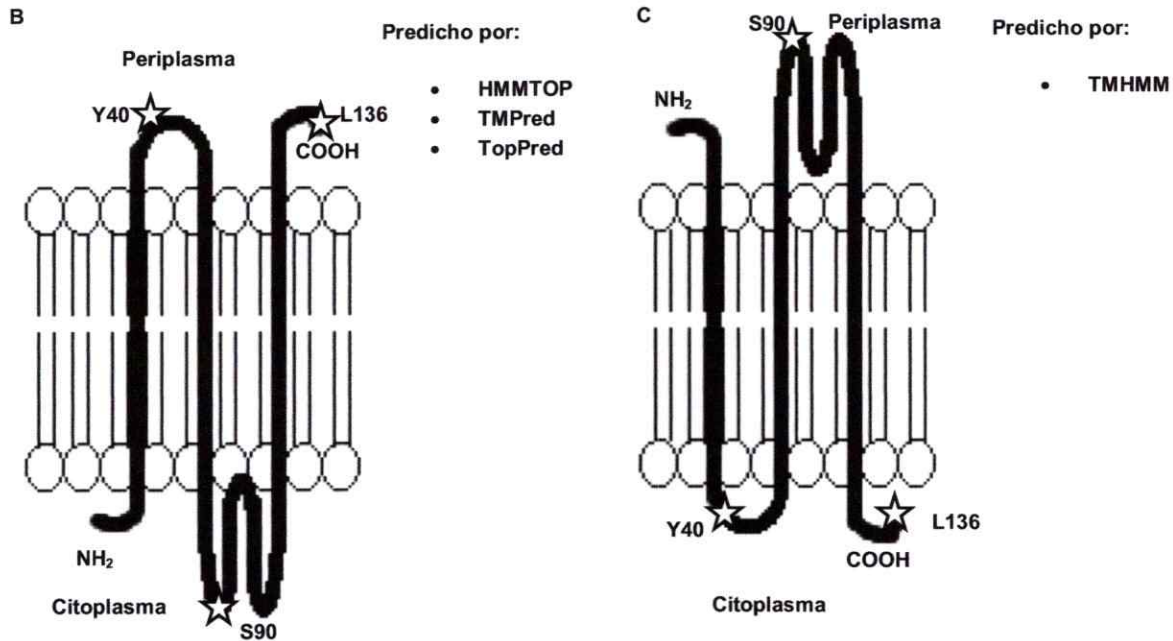


Figura 16. Predicción de topología de OrfK. Estudio bioinformático de predicción de topología de inserción en la membrana para OrfK. **A)** En verde se marcan los segmentos citoplasmáticos, en rojo los segmentos de transmembrana y en azul los segmentos periplasmáticos. El nombre escrito en el costados de cada línea corresponde al programa utilizado para la predicción. **B)** Esquema representativo de la topología predicha por los programas HMMTOP, TMPred y TopPred. **C)** Esquema representativo de la topología predicha por el programa TMHMM. Las estrellas en la tirosina 40, la serina 90 y la leucina 136 de OrfK, indican los puntos en donde se realizarán las fusiones con la proteína PhoA.

agarosa al 1%. Se utilizó como molde el plasmidio pBAD33-*orfK* con los partidores *orfK_Fd* y *orfK_Rd1* (tabla 3) en una reacción de PCR divergente, para obtener el plasmidio pBAD33-*orfK* linealizado con los sitios de restricción necesarios para realizar la fusión. Se obtuvo un producto de PCR de 5.835 pb que fue analizado y purificado de un gel de agarosa al 1%.

Ambos productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI* en una doble digestión dada la compatibilidad de ambas enzimas.

Se realizó una reacción de ligación entre ambos fragmentos ya digeridos y las células transformadas con este DNA fueron cultivadas en placas agar LB suplementadas con cloramfenicol. La construcción fue comprobada con el uso de enzimas de restricción y PCR, y posteriormente fue secuenciada. El vector obtenido recibe el nombre de pBAD33-*orfK-phoA* (figura 17).

Utilizando la fusión traduccional ya obtenida como base, se utilizaron los partidores *phoA_F* y *orfK_Rd2* (tabla 3) para obtener un amplicón de 6.970 pb que luego fue digerido con la enzima de restricción *XhoI*. Se realizó una reacción de ligación con el producto obtenido luego de la digestión y se siguieron los mismos pasos que en la construcción de la fusión anterior para comprobar la construcción. Así se obtuvo la construcción pBAD33-*orfK* Δ 41-136-*phoA* (figura 17), que corresponde a una fusión entre el primer "loop" de OrfK y la enzima PhoA.

Para la construcción del plasmidio pBAD33-*orfK* Δ 91-136-*phoA* (figura 17), que corresponde a la fusión entre el segundo "loop" de OrfK y la enzima PhoA, se utilizó como molde el plasmidio pBAD33-*orfK-phoA* con los partidores *phoA_F* y *orfK_Rd3*. El producto de PCR que tenía un tamaño de 7.120 pb fue digerido con la enzima de restricción *XhoI* y

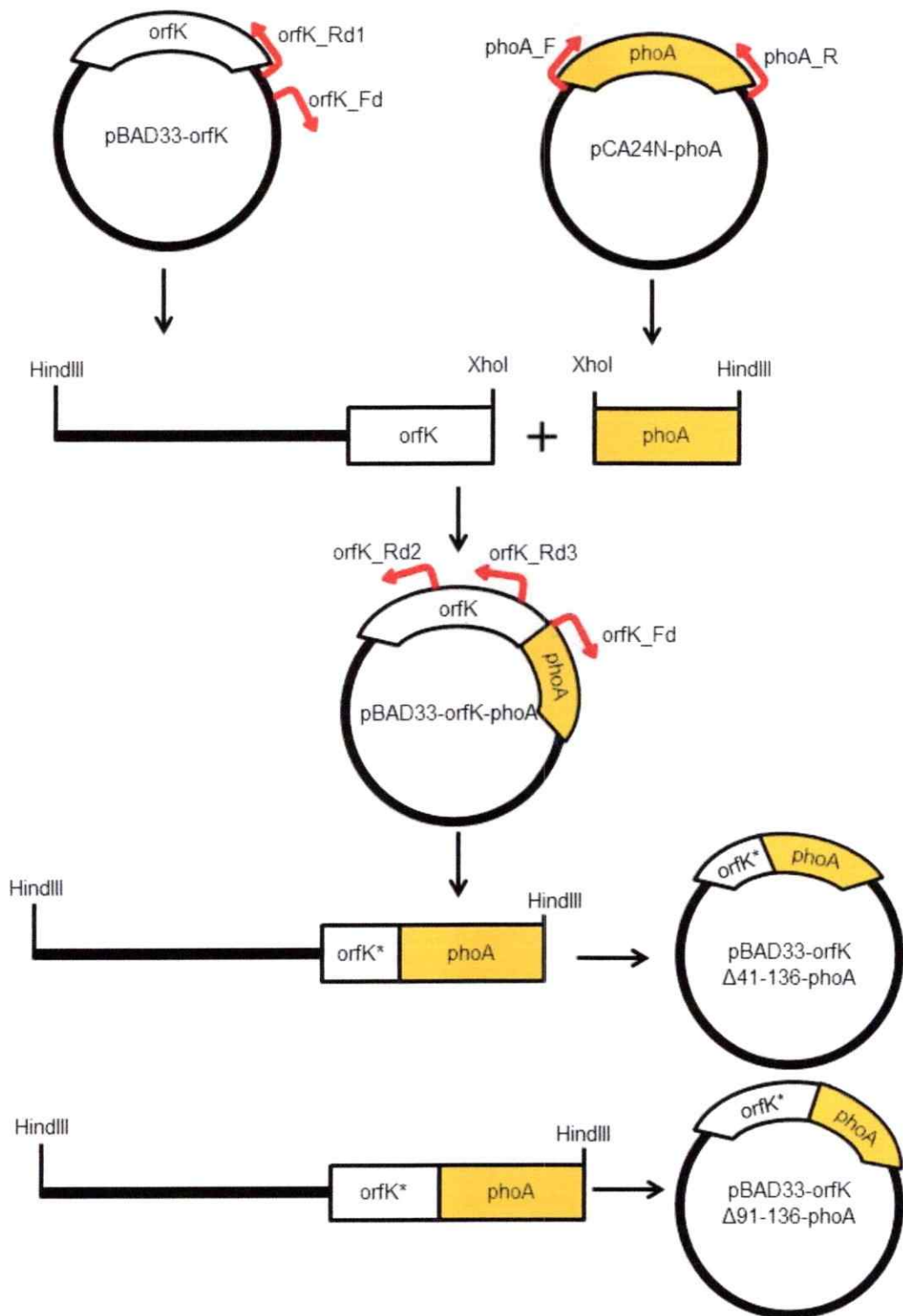


Figura 17. Esquema de la obtención de las fusiones entre *orfK* y *phaA*. Esquema ilustrativo que explica el método utilizado para obtener las fusiones traduccionales entre los genes *orfK* y *phaA*. En rojo se encuentran los partidores y las flechas indican el sentido en el que hibridan.

luego se realizó una reacción de ligación. Las células transformadas obtenidas fueron comprobadas igual que en los casos anteriores.

3.4.3. Validación de los modelos

Cuando la enzima fosfatasa alcalina se ubica en el periplasma de la célula se oxida y toma su conformación activa. En los modelos se espera que aquellas fusiones que mantengan a PhoA en el periplasma presenten una actividad significativamente más alta, y esto se analizó mediante un ensayo de actividad en placas agar LB suplementadas con cloramfenicol, arabinosa y el reactivo cromógeno BCIP. Se obtuvieron colonias azules (positiva para actividad PhoA) en los tres casos.

Debido a que las tres fusiones obtenidas presentaban actividad fosfatasa alcalina se procedió a cuantificar la actividad PhoA para poder validar uno de los dos modelos obtenidos, ya que la diferencia en actividad entre una fusión orientada hacia el citoplasma y otra hacia el periplasma debería ser significativa. Se cuantificó la actividad enzimática a un único tiempo para las tres fusiones y la mayor actividad se obtuvo con la cepa que contiene la fusión en el segundo loop de OrfK y PhoA. Para las fusiones en el primer loop y el extremo C-terminal de OrfK (que en ambos modelos poseen la misma orientación) se detectó una actividad 10 veces menor (figura 18).

Para comprobar el resultado obtenido anteriormente se realizó una curva de progreso para cada una de las fusiones y con el vector vacío como control (pBAD33). La mayor velocidad de reacción obtenida fue para la fusión correspondiente al segundo loop de OrfK, mientras que para el control no se detectó actividad alguna (figura 19). Estos resultados apoyan el modelo generado por el programa TMHMM, que correspondería al modelo correcto (figura 16c).

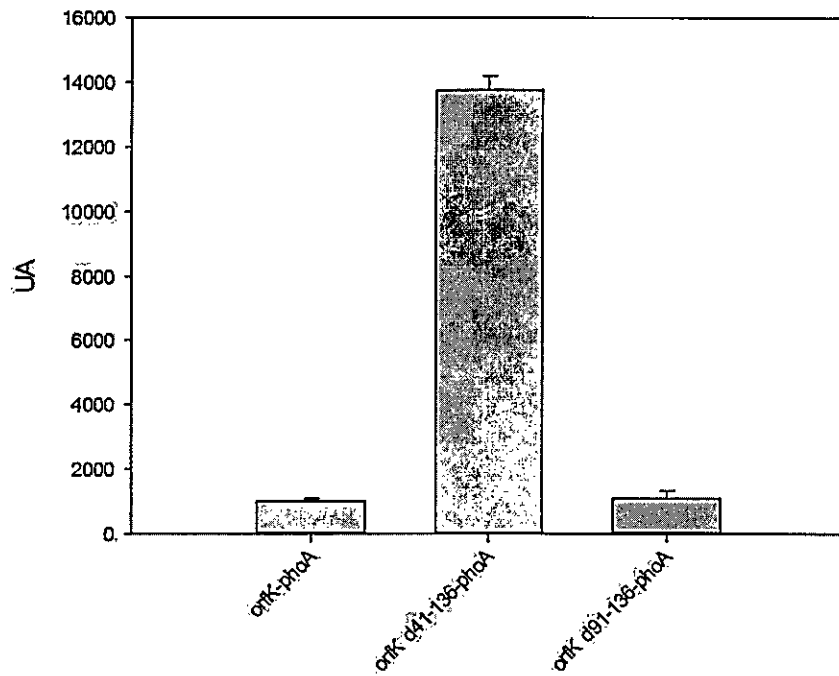


Figura 18. Ensayo de actividad PhoA para las fusiones traduccionales OrfK-PhoA. Todos los experimentos fueron realizados en la cepa huésped *E. coli* BW25113 que es $\Delta phoA$. Luego del período de crecimiento e inducción, las cepas fueron permeabilizadas con cloroformo y SDS previo a la adición del reactivo cromógeno. UA corresponde a Unidades de Actividad.

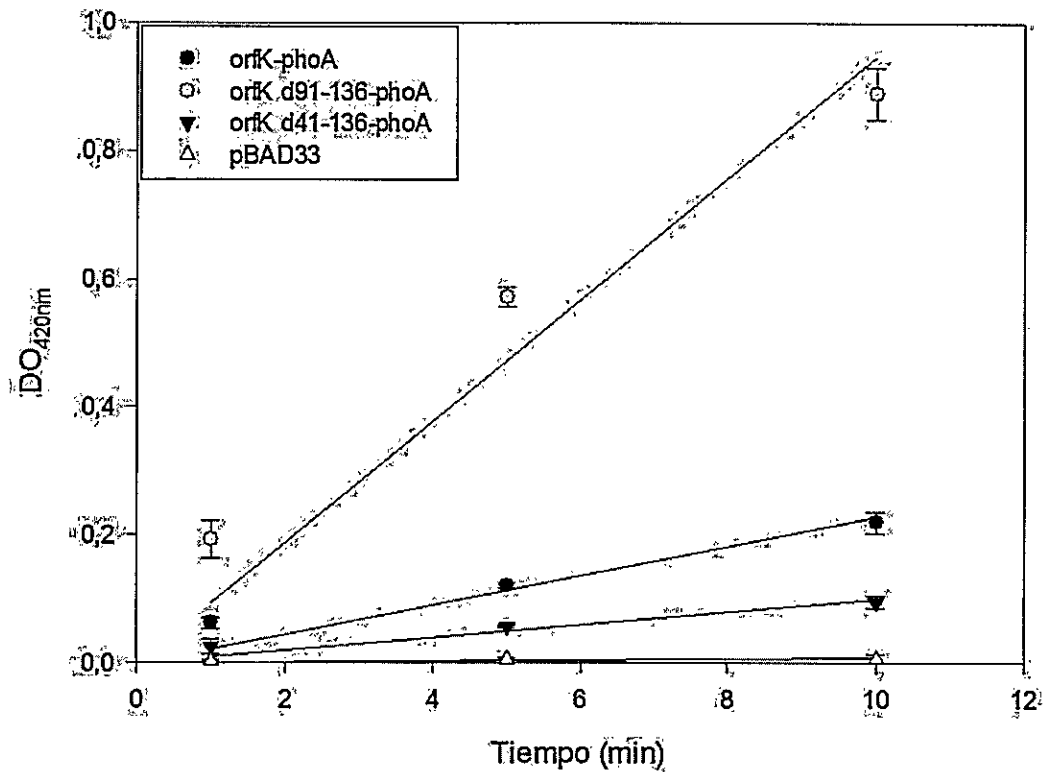


Figura 19. Curva de progreso de la actividad PhoA de las fusiones OrfK-PhoA. Todos los experimentos fueron realizados sobre la cepa *E. coli* BW25113 transformada con las distintas fusiones traduccionales OrfK-PhoA o con pBAD33. Mediante una regresión lineal para cada curva y luego calculando las unidades de actividad se obtuvieron los siguientes valores: pBAD33 1,50 UA/min; pBAD33-*orfK-phoA* 55,23 UA/min; pBAD33-*orfK* Δ 91-136-*phoA* 350,33 UA/min; y pBAD33-*orfK* Δ 41-136-*phoA* 35,04 UA/min. UA corresponde a Unidades de Actividad.

Existía la posibilidad de que los ensayos de actividad de la fosfatasa alcalina y la curva de progreso se vieran afectados por un cambio en la sobrevivencia de la célula. Específicamente, una posible lisis celular y liberación de las proteínas de fusión podría resultar en una mayor actividad en los ensayos. Para comprobar esta duda se realizó un ensayo de sobrevivencia en placas de agar LB suplementadas con cloramfenicol y glucosa (expresión inhibida) o arabinosa (inducción de la expresión). Se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de $97,3\% \pm 44,6\%$ para pBAD33-*orfK-phoA*, $106,5\% \pm 78,2\%$ para pBAD33-*orfK* Δ 91-136-*phoA* y $133,3\% \pm 52,1\%$ para pBAD33-*orfK* Δ 41-136-*phoA*. Estos experimentos comprueban que no hay una lisis celular significativa que pueda alterar las medidas de la actividad PhoA.

DISCUSIÓN



Los microorganismos han desarrollado una serie de estrategias para competir por un mismo nicho. Dentro de éstas está la producción de microcinas, que corresponden a péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular que ejercen su efecto bactericida sobre cepas de la misma especie o cercanas a la cepa productora (Baquero y cols., 1984).

En el caso de *Klebsiella pneumoniae* RYC492, se caracterizó la presencia de la microcina E492 (MccE492). El gen que codifica esta microcina se encuentra en un "cluster" que posee los genes estructural, de inmunidad, de maduración y de exportación, para poder así producir y exportar la microcina activa (Lagos y cols., 1999).

Esta tesis tenía como fin el estudio de dos genes cuyas funciones en los procesos de regulación, maduración y/o exportación son aún desconocidos. Por un lado, está la proteína integral de membrana OrfK cuya identidad con las proteínas estructural y de inmunidad de la microcina McM, además de su efecto adverso en la sobrevida al ser sobreexpresado (González, 2011), la hace un buen candidato para su estudio. Por otro lado está la proteína OrfL, que se asemeja a la familia de las microcinas a la cual pertenece la MccE492 ya que poseería un péptido líder necesario para la exportación caracterizado por el motivo de doble glicina, y en el extremo C-terminal un dominio rico en serinas, terminando con un motivo glicina-serina que podría sufrir una modificación post-traducciona con una molécula de salmoquelina (Lagos y cols., 2009).

En primera instancia se buscó si OrfL poseía actividad antimicrobiana como la microcina. No se detectó actividad bactericida al sobreexpresar *orfL*, tanto en presencia o ausencia del sistema de maduración y exportación de la microcina MccE492. Estos resultados permiten descartar la posibilidad de que OrfL actúe como una segunda

microcina, o por lo menos que el sistema productor de MccE492 no posee los componentes necesarios para "otorgarle" actividad a OrfL.

Se procedió a buscar si la expresión de *orfL* tenía algún efecto regulador sobre la MccE492. Para esto se buscaron cambios en la actividad bactericida de ésta mediante el ensayo de halos de inhibición del crecimiento. En una primera instancia no se detectaron cambios en el tamaño del halo de inhibición formado por una cepa productora de microcina que sobreexpresara el gen *orfL*, sin embargo, aun existía la posibilidad de que el rol regulador sobre la actividad bactericida fuera como un producto de secreción (Vincent, 2002) y que fuera necesario que *orfL* interactuara con la microcina una vez secretada por las cepas productoras. Para esto se inocularon colonias productoras de microcina junto a colonias que sobreexpresaban *orfL*, y en este caso tampoco se obtuvo algún efecto sobre la actividad bactericida.

Se buscó si *orfL* tenía algún efecto en la cepa que lo sobreexpresara, así como ocurre con *orfK* (González, 2011). El ensayo de sobrevivencia en placas probó que las células no morían al sobreexpresar *orfL*; sin embargo, podría ocurrir que sí afectara a las células durante el crecimiento pero que estas fueran capaces de recuperarse de manera tardía. Esta hipótesis fue descartada al observar las curvas de crecimiento ya que no se observaron diferencias significativas entre las condiciones inducidas o inhibidas para la expresión de *orfL*. Para terminar de complementar estos experimentos se buscó si OrfL tenía algún efecto sobre la permeabilidad de la membrana celular mediante el ensayo de Miller. No se encontró efecto de permeabilización de la membrana celular.

Existía la posibilidad de que para que la sobreexpresión de *orfL* tuviera algún efecto sobre la cepa que lo produjera, fueran necesarios otros componentes del sistema productor de la microcina. Los ensayos de sobrevivencia y las curvas de crecimiento en

conjunto con los sistemas productores no produjeron resultados que apoyaran esta hipótesis.

En resumen, se realizaron una serie de experimentos para probar si es que OrfL presentaba actividad bactericida, efectos adversos sobre la cepa que lo sobreexpresara y si regulaba o afectaba la actividad bactericida de la MccE492. Los experimentos sugieren que la sobreexpresión de *orfL* no tendría efecto alguno. Sin embargo, no es suficiente para decir que no tiene función ya que falta estudiar una cepa productora de microcina que carezca de este gen.

La segunda parte de esta tesis se enfocó en el estudio de un gen que ya había probado tener efectos adversos sobre la cepa que lo sobreexpresara, *orfK*.

Como el gen *orfK* posee identidad con una microcina (MccM) que a su vez pertenece a la misma familia que la MccE492, y es potencialmente una proteína integral de membrana, se esperaba que su efecto adverso en la sobrevivencia de la bacteria fuera por una disrupción de la membrana celular. Para esto se realizó un ensayo de Miller, adaptado con una cepa que permite cuantificar la permeabilidad de la membrana, y al comparar el estado inducido y reprimido se pudo comprobar que OrfK provoca una permeabilización de la membrana, ya que el reactivo ONPG pudo ingresar a la célula para ser hidrolizado. Se descarta que la actividad registrada fuera por lisis de la bacteria, ya que de ser ese el caso se habría detectado actividad β -galactosidasa en el sobrenadante, lo que no ocurrió.

Finalmente se determinó si OrfK era una proteína integral de membrana y la topología de ésta. El perfil de hidropatía de OrfK indica que esta correspondería a una proteína integral de membrana con tres segmentos transmembrana. Es por esto que se realizaron tres fusiones traducionales entre los genes *orfK* y *phoA*. Las fusiones obtenidas

recibieron el nombre de pBAD33-*orfK-phoA* (fusión en el carboxilo terminal), pBAD33-*orfK* Δ 91-136-*phoA* (fusión en el segundo "loop") y pBAD33-*orfK* Δ 41-136-*phoA* (fusión en el primer "loop"). Al comparar la actividad detectada para las distintas fusiones traduccionales, se puede afirmar que el primer "loop" y el carboxilo terminal se encuentran con la misma orientación y que ésta sería la opuesta a la del segundo loop. Esto es consistente con los tres segmentos de transmembrana que se obtuvieron mediante el perfil de hidropatía. Por el alto valor de actividad de la fosfatasa alcalina obtenido con la fusión *orfK* Δ 91-136-*phoA*, en comparación con las otras dos fusiones, significaría que el segundo loop sería el que presenta la enzima orientada hacia el periplasma. Además esto permite confirmar experimentalmente que OrfK correspondería a una proteína integral de membrana. En resumen, los experimentos realizados apoyan el modelo que orienta el extremo amino terminal hacia el periplasma y el carboxilo terminal hacia el citoplasma. Este modelo fue propuesto por el programa TMHMM, solamente uno de los cuatro utilizados, esto significa que basándose solamente en la aproximación bioinformática, el modelo predilecto era el incorrecto. Esto reafirma la necesidad de comprobar experimentalmente todos los resultados obtenidos mediante aproximaciones teóricas, ya que la célula está compuesta por una red de interacciones altamente compleja y extensa, es por esto que el método bioinformático solo debe ser considerado como una aproximación al problema y no como la solución a éste.

El ensayo de sobrevivencia mostró que cuando se sobreexpresa OrfK fusionado a PhoA, no provoca la muerte de las bacterias. Posiblemente OrfK, una proteína de solo 136 aminoácidos, al estar fusionada con la proteína PhoA que es de mayor tamaño, pierde su acción permeabilizadora, probablemente por una pérdida en la interacción con otros componente de la membrana o una interacción con otros monómeros de OrfK para poder actuar como un multímero.

CONCLUSIONES

- Los experimentos realizados con *orfL* no arrojaron resultados sobre cual podría ser su función.
- OrfL no posee la capacidad de permeabilizar la membrana interna de la cepa que lo sobreexpresa.
- OrfK es una proteína integral de membrana con tres segmentos transmembrana y con su extremo amino terminal orientado hacia el periplasma, que produce la permeabilización de la membrana cuando es sobreexpresada.
- La fusión de la proteína PhoA al extremo carboxilo terminal elimina el efecto adverso de OrfK en la sobrevivencia celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1992) Short protocols in molecular biology, 2nd ed. Greene Publishing Associates, New York, N.Y.
- Baquero, F., Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 117 – 124.
- Barolo, S., Carver, L.A., Posakony, J.W. (2000) GFP and β -Galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *BioTechniques*. **29**: 726 – 732.
- Bellomio, A., Vincent, P., Aruri, B., Farías, R., Morero, R. (2007) Microcin J25 has dual and independent mechanism of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *J. Bacteriol.* **189**: 4180 – 4186.
- Bieler, S., Silva, F., Soto, C., Belin, D. (2006) Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires de mannose permease. *J. Bacteriol.* **188**: 7049 – 7061.
- Braun, V., Patzer, S.I., Hantke, K. (2002) Ton- dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*. **84**: 365 – 380.
- Casadaban, M.J., Cohen, S.N. (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**: 179 – 207.
- Cascales, E., Buchanan, S., Duché, D., Kleantous, C., Lloubés, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., Cavard, D. (2007) Colicin Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 158 – 229.
- de Lorenzo, V. (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Microbiol.* **139**: 72 – 75.

- de Lorenzo, V., Pugsley, A.P. (1985) Microcin E492, a low molecular weight peptide antibiotic which causes depolarization of *Escherichia coli* cytoplasmatic membrane. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **27**: 666 – 669.
- Destomieux-Garzón, D., Thomas, X., Santamaria, M., Goulard, C., Barthélémy, M., Boscher, B., Bessin, Y., Molle, G., Pons, A., Letellier, L., Peduzzi, J., Rebuffat, S. (2003) Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**: 1031 – 1041.
- González, B. (2011) Efecto de la expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* sobre cepas productoras de microcina E492. Tesis Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Guzmán, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 4121 – 4130.
- Hetz, B., Bono, M., Barros, L., Lagos, R. (2002) Microcin E492, a channel forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Aca. Sci. U S A.* **99**: 2696 – 2701.
- Kolter, R., Moreno, F. (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 141 – 163.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cicche, X., Monasterio, O. (1993) Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**: 145 – 148.
- Lagos, R., Villanueva, J.E., Monasterio, O. (1999) Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.* **181**: 212 – 217.

- Lagos, R., Baeza, M., Corsini, G., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J.A., Vergara, C., Monasterio, O. (2001) Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**: 229 – 243.
- Lagos, R., Tello, M., Mercado, G., García, V., Monasterio, O. (2009) Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**: 74 – 85.
- Manoil, C., Mekalanos J.J., Beckwith, J. (1990) Alkaline phosphatase fusions: sensors of subcellular location. *J. Bacteriol.* **172**: 515 – 518.
- Marín, M. (2006) La sobreproducción de los genes de la maduración de la MccE492 aumenta la actividad bactericida y retarda la formación de agregados de tipo amiloide. Seminario de título para optar al título de Ingeniera en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Orellana, C., Lagos, R. (1996) The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcin antagonist. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**: 297 – 303.
- Otto, J., Edward, K., Young, S., Casey, P. (1999) Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein-specific protease. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 8379 – 8382.
- Reeves, P. (1965) The bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **29**: 24 – 45.
- Riley, M., Werts, J. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 117 – 137.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tello, M. (2006) La especificidad, exportación y procesamiento de la microcina E492 y colicina V dependen del dominio ABC de sus transportadores. Tesis Doctor en Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Toba, M., Masaki, H., Ohta, T. (1988) Colicin E8, a DNase which indicates an evolutionary relationship between colicins E2 and E3. *J. Bacteriol.* **170**: 3237 – 3242.
- Vincent, G.H.E., Lars, A., Dzung, B.D., Leiv S.H., Helge, H., Ingolf, F.N. (2002) Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81**: 639 – 654.
- Wilkens, M., Villanueva, J.E., Cofre, J., Chnaiderman, J.S., Lagos, R. (1997) Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetics determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4789 – 4794.