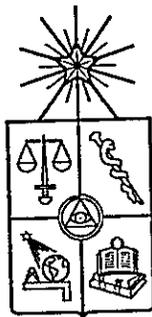


UCH-FC  
Biotecnología  
M 967  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**LA INTERACCIÓN ENTRE LA MICROCINA E492 Y EL FRAGMENTO C-TERMINAL  
DE LA PROTEÍNA TONB ES INDISPENSABLE PARA LA ACTIVIDAD  
BACTERICIDA**

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



por  
DANIELA CECILIA MUÑOZ SILVA

Directora de Seminario de Título: Dra. ROSALBA LAGOS MÓNACO  
Co-director de Seminario de Título: Dr. OCTAVIO MONASTERIO

Enero, 2010  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

**DANIELA CECILIA MUÑOZ SILVA**

**“LA INTERACCIÓN ENTRE LA MICROCINA E492 Y EL FRAGMENTO C-TERMINAL DE LA PROTEINA TONB ES INDISPENSABLE PARA LA ACTIVIDAD BACTERICIDA”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniero En Biotecnología Molecular

*Dra. Rosalba Lagos Mónaco*  
**Directora Seminario de Título**

*Rosalba Lagos Mónaco*  
*Octavio Monasterio Opazo*

*Dr. Octavio Monasterio Opazo*  
**Co-Director**

**Comisión de Evaluación**

*Dr. Marcelo Baeza Cancino*  
**Presidente Comisión**

*Marcelo Baeza Cancino*  
*Michael Handford*

*Dr. Michael Handford*  
**Evaluador**



Santiago de Chile, 21 de enero de 2010



## Autobiografía



Nací un día lunes 28 de julio de 1986, poco tiempo después de que mi madre se bajara del taxi en el hospital y cuando cumplía los 9 meses justos de gestación. Me pusieron Daniela Cecilia, que quiere decir "justicia de Dios ciega", de haber sabido lo que significaba quizás mis padres no me hubieran puesto así. Fui recibida por mis padres y por mi hermana mayor que el día de mi nacimiento cumplía 1 año y 3 meses. Viví los primeros 6 meses de mi vida en Santiago y después de ese tiempo mis padres se fueron a vivir a Melipilla, una ciudad pequeña que queda a una hora de Santiago, tranquila, apacible, bonita y ahí ha transcurrido casi la totalidad de mi vida. Cuando tenía unos 3 años entré al jardín Santa Mónica, luego al año siguiente estuve en el jardín Pillancito y tomé un año sabático antes de entrar a kínder en el colegio Marambio en el año 1992. Estuve unas 2 semanas en kínder y me instalaron en Primero Básico, razón por la cual por lo general fui en todos los cursos siempre la más chica de los compañeros, tanto en edad como en estatura. En este colegio hice varios amigos y también conocí a Marco, a los 5 años, con quien aun mantenga una amistad de casi 19 años y es sin duda lo que más rescato de mi etapa escolar en los primeros años. Cuando tenía 6 años nació mi hermana Camila, la única rubia de las 3 hermanas y también la más bonita y la más rebelde.

Cuando pasé a sexto me cambiaron de colegio y entré al colegio San Sebastián donde estuve hasta cuarto medio. Aquí abandoné el Jumper y conocí los uniformes con falda y colores alternativos. También fui compañera de curso una vez más de mi eterno amigo Marco. Las amistades que hice en esta etapa de mi vida son inolvidables y con ellos pasé momentos realmente muy gratos: Maga, Sepu, Marco, Carla A., Karlita, Pechant, Bor, Florcita, Morgado entre otros.

Desde siempre tuve la meta de entrar a la U y también me había dado cuenta que tenía cierto interés y habilidades para la biología. Aun así no sabía qué iba a estudiar y no fue hasta tercero medio que supe que existía la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. Me costó decidirme, pensaba que no lo iba a lograr porque los puntajes eran muy altos, pero lo logré y fue uno de los alivios más grandes que he sentido en toda mi vida. Entrar a la U hizo que cambiaran muchas cosas en mi vida: dejé de tener tiempo para cualquier otra cosa que no fuera estudiar, también comencé a pasar muchas horas al día sentada en el bus o arriba de una micro y a levantarme a horas irrisorias para llegar a clases a las 8 y media. A pesar de todo el estrés creo que me fue bastante bien y si no fuera por Física I que lo hice 2 veces habría sido un total éxito. Pero lo que definitivamente nunca olvidaré de la U son las personas que conocí y los amigos que hice, los carretes de cumpleaños, los almuerzos en el pasto, las chelitas en las gradas.

Actualmente ya no vivo en Melipilla, mi ciudad favorita, pues hace 3 años me trasladé a vivir a Santiago con 2 compañeros de la U: Gíssela y Vicente. Esto ha hecho que mi vida sea mucho más cómoda y me demoro 5 minutos en llegar a la U caminando. Aun me queda alrededor de 1 año para terminar mi paso por la U, ya que me encuentro desarrollando la Tesis de Magister en Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.



*A la Mama Licha,  
por poner los santos de cabeza aquí y allá.*

## Agradecimientos

Primero que todo agradezco a mis padres por el apoyo incondicional que me dieron cuando decidí estudiar una carrera de la que nunca habían escuchado hablar. También por el apoyo económico y la confianza que depositaron en mí durante todos estos años. Agradezco a mi madre por prepararme almuerzos ricos para llevar en potes a la U y por quedarse conmigo hasta tarde algunas noches acompañándome mientras estudiaba. Agradezco a toda mi familia por siempre felicitar mis logros y ser partícipes de una u otra manera de este proceso de mi vida. Al Tata y a la Mama, por su confianza sin límites en mí, por alegrarse más que yo de mis triunfos y a la Mama por todas las mandas que hizo cuando tenía pruebas difíciles. A la Vero, por sus succulentos potes rojos con almuerzos, por su cariño y su interés. A mis primos la Caro, por acogerme en su casa durante los primeros meses de U, también a la Jose y el Cristian, por celebrar conmigo los puntajes de la PSU, a la tía Vicky, la Pame, el Meme y a todos mis demás parientes por sus buenas vibras y su preocupación. Agradezco a la Dra. Rosalba lagos por haberme recibido en el laboratorio y haberme permitido aprender todo lo que ahora sé y también al Dr. Octavio Monasterio por participar en este proceso. Tengo que mencionar a una persona muy especial dentro del laboratorio, que también ha sido mi amiga durante todos estos años y fue la segunda persona que conocí cuando entramos a la carrera, ella es la Bea, con ella hemos vivido un proceso similar y nos hemos dado apoyo en numerosas oportunidades, hemos celebrado éxitos y llorado fracasos en el lab. Por supuesto no puedo dejar de nombrar a mi mentor, que me ayudó desde el principio y me enseñó casi todo lo que sé, Jorge, con el que siempre he podido contar para cualquier problema que tenga en los experimentos y siempre me ha ayudado con su experiencia y sus recomendaciones. También a Mario, con su experiencia y sus consejos ha contribuido mucho en esta tesis. A las ancestras Gabriela Mercado y Verónica García, por ser las más secas y la fuente de todo conocimiento en las materias con las que trabajo en el lab. A todos los que me enseñaron cosas que necesitaba aprender en el lab: María Jesús, Alexis, César, Cristian. A los compañeros BEM, que hacen que cada día de trabajo sea siempre algo llevadero: Gissela, Felipe Hurtado, Felipe Villanelo, Jonathan, Gonzalo, Eduardo, Paula, Pablo, Nicole, Raimundo y todos los demás. Tengo que hacer una mención honrosa a Roselyn Orellana y a Macarena Collao, por ser las mejores del BEM, las más eficientes, las más simpáticas y las que siempre lo saben todo. No seríamos nada sin ellas, nos ayudan mucho de verdad. También agradecer a don Pedro, parte muy importante del laboratorio Y por supuesto las gracias de todo corazón a los compañeros de clases, de carrete, los amigos del camino: Mati, Gaby, Cristian, Sonia, José, Vale, Nacho, Pame, Fran, Fefi, Lore, Pato, Yu, Cinthia, Andresillo, Claudia, Oriana y todos con los que alguna vez compartí buenos momentos. Agradecimientos especiales a las LP's, por ser las más prendidas y las más fiesteras, a mis convivientes la Gíss y Vicho, a la Emilia, el Blacky y la Niña. También agradezco al Seba, por la paciencia, el apoyo y el cariño en los casi 2 años que llevamos juntos, la mayor parte de este tiempo he trabajado en esta memoria de título y muchas veces no nos pudimos ver a causa de mi trabajo en el lab.

A todos mis amigos les quiero decir que los quiero muchísimo y arriba las LP's!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!..... Con cariño, Daniela Muñoz, la Chica.



## Tabla de contenidos

Informe de aprobación Seminario de Título .....	ii
Autobiografía .....	iii
Agradecimientos.....	v
Tabla de contenidos .....	vi
Lista de tablas .....	ix
Lista de figuras .....	x
Lista de abreviaturas .....	xi
Resumen.....	xii
Abstract .....	xiii
1 Introducción.....	1
1.1 Bacteriocinas .....	1
1.2 Microcina E492.....	2
1.2.1 El mecanismo de acción de la microcina E492 .....	3
1.3 La translocación de la MccE492 y TonB .....	4
Hipótesis .....	9
Objetivos .....	10
Objetivo general .....	10
Objetivos específicos.....	10
2 Materiales y Métodos.....	11
2.1 Materiales.....	11
2.1.1 Reactivos.....	11
2.1.2 Cepas bacterianas.....	13
2.1.3 Plasmidios .....	13



2.1.4 Partidores .....	13
2.2 Métodos.....	13
2.2.1 Medios de Cultivo .....	13
2.2.2 Métodos de biología molecular .....	13
2.2.3 Lisogenización de cepas de <i>E. coli</i> K12.....	16
2.2.4 Ensayos de inducción.....	16
2.2.5 Remoción de resistencia a antibiótico en la mutante TonB <sup>-</sup> .....	17
2.2.6 Purificación de la microcina E492 .....	17
2.2.7 SDS-PAGE e inmunoblot.....	18
2.2.8 Inmunoblot con anticuerpo anti cola de histidina.....	18
2.2.9 Medición de la concentración de la microcina E492 purificada. ....	19
2.2.10 Ensayos de actividad bactericida .....	19
2.2.11 Purificación del péptido C-terminal de TonB .....	19
2.2.12 Medición de la concentración del péptido C-terminal de TonB.....	20
2.2.13 Dicroísmo circular .....	20
2.2.14 Preparación de microcina para ensayos de sobrevida .....	21
2.2.15 Preparación de esferoplastos y ensayos de sobrevida .....	21
2.2.16 Análisis bioinformático .....	23
3 Resultados .....	24
3.1 Construcción del plasmidio portador del fragmento C-terminal de TonB.....	24
3.1.1 Amplificación y clonación del fragmento génico desde el plasmidio pIM91 .....	24
3.1.2 Características del péptido C-terminal de TonB.....	24
3.1.3 Ensayo de inducción e inmunoblot confirman la expresión del péptido C-terminal de TonB .....	27



3.2 Estudio de complementación funcional de los fragmentos N-terminal y C-terminal de TonB para la actividad bactericida de la microcina E492.....	29
3.2.1 Construcción de cepas portadoras de los fragmentos C-terminal y N-terminal de TonB.....	29
3.2.2 La cepa de JW5195 que expresa el fragmento N-terminal y el C-terminal de la proteína TonB no recupera la sensibilidad a la microcina E492.....	31
3.3 Estudio de la interacción entre el fragmento C-terminal de TonB y la microcina E492.....	33
3.3.1 Purificación del péptido C-terminal de TonB .....	33
3.3.2 El análisis por dicroísmo circular indica que el péptido C-terminal de TonB está plegado.....	36
3.3.3 Los esferoplastos de la mutante trunca de TonB $\Delta$ 109-239 son sensibles a la mezcla de microcina E492 y péptido C-terminal de TonB.....	36
4 Discusión.....	40
4.1 La cepa de <i>E. coli</i> JW5195 que expresa el segmento N-terminal y el segmento C-terminal de la proteína TonB no recupera la sensibilidad a la microcina E492.....	40
4.2 Los esferoplastos de mutante trunca de TonB $\Delta$ 109-239 son sensibles a la mezcla de microcina E492 y el péptido C-terminal de TonB .....	41
5 Conclusión.....	45
6 Proyecciones.....	46
7 Presentaciones a Congresos.....	47
8 Referencias .....	48



## Lista de tablas

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.....	14
Tabla 2. Plasmidios utilizados en este trabajo.....	15
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.....	15
Tabla 4. Configuración para la medición de dicroísmo circular.....	22
Tabla 5. Características del péptido C-terminal de TonB.....	26

## Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de transducción de energía de TonB según el modelo "Shuttle".....	6
Figura 2. Modelo de translocación al periplasma de la microcina E492.....	7
Figura 3. Amplificación y clonamiento del fragmento génico que codifica para el péptido C-terminal de TonB.....	25
Figura 4. Ensayo de inducción e inmunoblot anti cola de histidina del fragmento C-terminal de TonB.....	28
Figura 5. Ensayos de sobrevivencia y complementación de la cepa JW5195 sin resistencia antibiótica.....	30
Figura 6. Ensayos de inducción de cepas lisógenas.....	32
Figura 7. Ensayos de actividad bactericida realizados a las cepas con los plasmidios que expresan el fragmento N-terminal y el fragmento C-terminal de TonB.....	34
Figura 8. Purificación del péptido C-terminal de TonB.....	35
Figura 9. Espectro de dicroísmo circular del péptido C-terminal de TonB.....	37
Figura 10. Tratamiento de esferoplastos de la cepa JW5195/pIM91Δ109-239 con microcina E492 y el péptido C-terminal de TonB.....	38

## Lista de abreviaturas

A <sub>260</sub>	Absorbancia a 260 nm
A <sub>280</sub>	Absorbancia a 280 nm
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
Cm	Cloranfenicol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
MccE492	Microcina E492
O.D. <sub>450</sub>	Densidad óptica a 450 nm de longitud de onda
O.D. <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamino
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

## Resumen

La microcina E492 es una bacteriocina formadora de poros producida por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 que ha sido clonada y expresada en *Escherichia coli*. El mecanismo de acción de esta bacteriocina implica la translocación al periplasma mediada por los receptores de sideróforos de tipo catecol FepA, Fiu y Cir que se localizan en la membrana externa de la célula blanco, para una posterior inserción en la membrana citoplasmática donde forma un canal que causa la despolarización de la membrana y la muerte celular. La proteína TonB es esencial en este proceso, ya que forma un complejo energizador, permitiendo que los receptores de membrana externa reciban la energía necesaria para la translocación del ligando al periplasma. La presencia de esta proteína es requerida además para la acción bactericida de la microcina, posterior a su translocación, y específicamente postulamos que la región C-terminal de TonB es fundamental en este proceso. Para comprobar esta hipótesis, se realizó una construcción que expresara el fragmento C-terminal de TonB desde el codón 108 al 239, con el objetivo de estudiar las posibles interacciones entre este péptido purificado y la microcina E492. Además se utilizó este fragmento génico de *tonB* para complementar una cepa portadora de la proteína trunca TonB $\Delta$ 109-239. Los resultados mostraron que esta cepa complementada con el fragmento C-terminal no recupera la sensibilidad a la microcina, pero cuando la membrana externa de *E. coli* TonB $\Delta$ 109-239, insensible a la acción bactericida de la microcina es permeabilizada (esferoplastos), la sobrevivencia disminuye después de un tratamiento con una mezcla de la microcina E492 y el péptido C-terminal de TonB purificado. Este resultado indica que se requiere el fragmento C-terminal de TonB para la actividad bactericida de la microcina en un paso distinto de la translocación.

## Abstract

Microcin E492 is a pore-forming bacteriocin produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492 that has been cloned and expressed in *Escherichia coli*. The mechanism of action of this bacteriocin involves the translocation to the periplasm, mediated by the catechol siderophores receptors FepA, Fiu and Cir, which are located in the outer membrane of the target cell. Microcin E492 inserts into the inner membrane to form ion channels that produce the depolarization of the membrane and the death of the target cells. The protein TonB is essential in this process, since TonB forms an energy transduction complex that allows the receptors of the outer membrane to obtain the energy necessary for the translocation of the ligands to the periplasm. The presence of this protein is required for the bactericidal action of microcin E492 after the translocation process, and specifically we postulate that the C-terminal region of TonB is required for the interaction with the outer membrane receptors. To test this hypothesis, a construction that expresses the last 121 aminoacids (108 to 239) of the C-terminal fragment of TonB was constructed and the interaction between TonB and microcin E492 was studied. Additionally, this gene fragment of *tonB* was used to complement a strain carrying the truncated gene which lacks the last 120 codons (109-239). The strain expressing the C-terminal fragment of TonB did not recover the sensitivity to microcin E492 after complementation, but the bactericidal activity was observed on TonB $\Delta$ 109-239 cells with a permeable outer membrane (spheroplasts) treated with a mixture of microcin E492 and the TonB C-terminal fragment. This result shows the TonB C-terminal fragment is required for the antibacterial activity of microcin in a different step of translocation.

# 1 Introducción

## 1.1 Bacteriocinas

En el medio ambiente, las bacterias se encuentran formando amplias comunidades donde conviven con diversas especies compartiendo un mismo hábitat. La competencia por los recursos ha provocado que las bacterias desarrollen, a lo largo de su evolución, herramientas que les confieran ventajas competitivas sobre los demás organismos, como es la secreción de antibióticos. Dentro de los antibióticos se encuentran las bacteriocinas, las cuales corresponden a proteínas con actividad antibacteriana que se diferencian de los antibióticos clásicos, además de su naturaleza proteica, en que su espectro de acción se reduce a cepas relacionadas cercanamente a la cepa productora (Reeves, 1965).

Las bacteriocinas son producidas tanto por bacterias Gram-negativas como por Gram-positivas, exhibiendo una amplia diversidad en cuanto a tamaño, mecanismo de acción, inmunidad y secreción.

Las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-negativas difieren de las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas en que las primeras suelen ser liberadas a través de lisis celular y a menudo dependen de vías regulatorias del hospedero.

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas pueden ser divididas en 3 grupos según su tamaño: las colicinas (25-80 kDa), las microcinas (< 10 kDa) y las bacteriocinas tipo cola de fago. Las colicinas son inducidas por el sistema SOS, mientras que las microcinas no son inducidas por este sistema, característica que comparten con las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas. Las bacteriocinas

tipo cola de fago corresponden a ensamblajes peptídicos multiméricos, presentan una estructura tipo barra y son resistentes a nucleasas y proteasas (Riley y Chavan, 2007).

Las microcinas no son inducidas por el sistema SOS y no involucran un proceso de lisis celular para su liberación, sino que se secretan a través de exportadores específicos. Por otro lado, las microcinas son altamente hidrofóbicas, resistentes a temperatura y pH extremos y también a la acción de algunas proteasas (de Lorenzo y cols., 1985). Además, las microcinas pueden presentar variadas modificaciones post-traduccionales, las cuales a menudo son requeridas para la función antibiótica del péptido. Ejemplos de microcinas con modificaciones post-traduccionales son la microcina J25 (MccJ25), la microcina C7 (MccC7), y la microcina E492 (MccE492) (Thomas y cols., 2004).

## **1.2 Microcina E492**

La MccE492 corresponde a una bacteriocina de bajo peso molecular, producida y excretada por *Klebsiella pneumoniae* RYC492. El mecanismo de acción de la microcina implica la formación de poros en la membrana citoplasmática de la célula blanco, las cuales incluyen cepas de la familia Enterobacteriaceae. El fragmento de DNA cromosomal que contiene los determinantes genéticos para la producción y exportación de la microcina fue clonado y expresado en *Escherichia coli*, produciéndose microcina E492 recombinante con las mismas propiedades bioquímicas y electrofisiológicas (Wilkens y cols., 1997).

Los determinantes genéticos para la producción y exportación de la microcina, se encuentra en un fragmento de 13 kb en el cromosoma de *K. pneumoniae*, en el cual se han identificado 10 marcos abiertos de lectura (denominados *mce*ABCDEFGHIJ). Dentro de estos marcos de lectura se encuentra el gen codificante de la proteína

estructural de la microcina (*mceA*) y el gen codificante para la proteína de inmunidad (*mceB*), los cuales forman una única unidad transcripcional (Lagos y cols., 1999; 2001). También se han identificado los genes necesarios para la obtención de microcina activa (*mceC*, *mceJ*, *mceI*), y genes implicados para el transporte de la microcina hacia el espacio extracelular (*mceGH*) donde *mceG* constituiría un transportador ABC y *mceH* una proteína accesoría. Por su parte, los genes de la maduración, necesarios para la producción de microcina activa, se encuentran implicados en la modificación post-traducciona de MccE492. Se ha visto que *MceC* presenta homología a una glicosil transferasa, *MceI* es homólogo a una aciltransferasa, mientras que *MceJ* no presenta homólogo conocido. Mutantes en alguno de estos genes da como resultado la expresión de microcina inactiva (Lagos y cols., 2001). La MccE492 es producida de manera activa sólo en la fase exponencial de crecimiento, debido a que los genes implicados en la maduración (*mceI* y *mceJ*) son transcritos durante esta fase y no en fase estacionaria (Corsini y cols., 2002).

### **1.2.1 El mecanismo de acción de la microcina E492**

La actividad bactericida de la MccE492 radica en la capacidad de formar canales iónicos en la célula blanco. Para que la microcina sea internalizada, ésta debe ser primero reconocida por los receptores de sideróforos tipo catecol *FepA*, *Fiu* y *Cir*, que se encuentran en la membrana externa y translocada al periplasma (Strahsburger y cols., 2005). Para este reconocimiento es muy importante la modificación post-traducciona de la microcina, la cual corresponde a una molécula de salmoquelina, un sideróforo de tipo catecolico. Luego de su inserción, la microcina induce una rápida despolarización y permeabilización en la membrana citoplasmática de la célula blanco. Se ha demostrado que la microcina requiere la presencia de *TonB* para su entrada a la

célula blanco, puesto que células *tonB*<sup>-</sup> resultan insensibles a la microcina (de Lorenzo y Pugsley, 1985; Lagos y cols., 2001; Destoumieux-Garzón y cols., 2003).

### 1.3 La translocación de la MccE492 y TonB

TonB es una proteína que forma un complejo energizador en la membrana citoplasmática de las bacterias Gram-negativas. La función de este complejo es otorgar la energía desde la membrana citoplasmática a la membrana externa, usando para esto la fuerza protón motriz. Este complejo está formado por las proteínas TonB, ExbB y ExbD en una relación de 1 TonB : 2 ExbD : 7 ExbB (Higgs y cols., 2002). Si bien hay evidencia que apunta a una dimerización de TonB, no está claro si ésta se encuentra como monómero o como dímero en la membrana citoplasmática. El complejo transductor de energía de TonB se encuentra involucrado en el transporte desde la membrana externa al espacio periplasmático de sideróforos de hierro, vitamina B12 y también es necesaria para la infección de bacteriófagos y para la translocación de colicinas (Postle y Kadner, 2003).

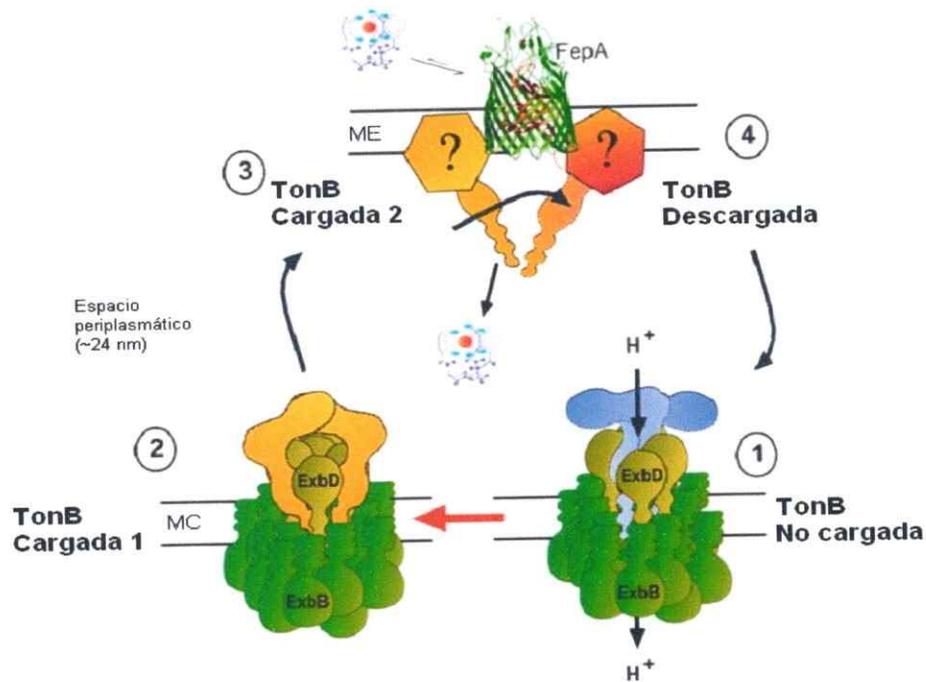
TonB es una proteína de 239 aminoácidos, la cual puede ser dividida en 3 dominios: dominio N-terminal (residuos 2-65), dominio rico en prolinas (residuos 66-102) y dominio C-terminal (residuos 103-239). El dominio N-terminal parece cumplir un papel importante en el proceso de transducción de energía, debido a que en esta región se producen las interacciones con ExbB/D para formar el complejo energizante, mientras que el dominio C-terminal es importante para la interacción de TonB con los receptores de membrana externa (Postle y Kadner, 2003).

El mecanismo por el cual el complejo TonB confiere energía a estos receptores, ha sido motivo de mucha especulación, siendo el modelo más aceptado el llamado modelo "Shuttle". Según este modelo, el ciclo de transducción de energía comenzaría

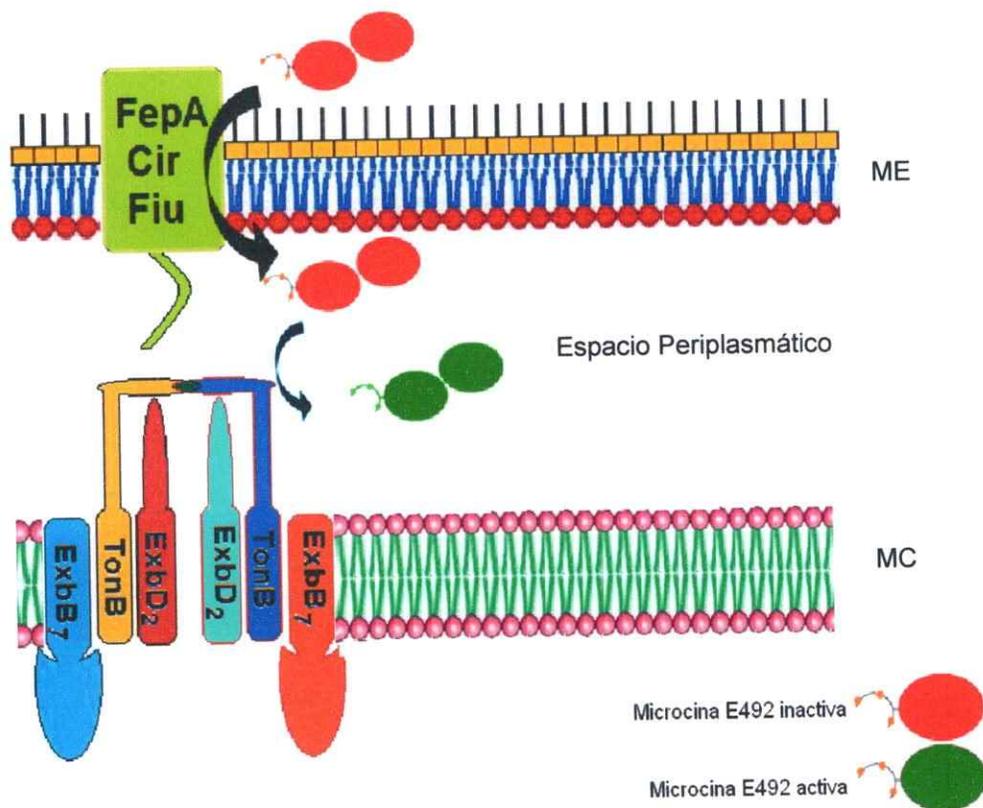
por una energización de TonB a un estado "cargado" a partir de un gradiente electroquímico. En el segundo paso del ciclo, TonB es translocado desde la membrana citoplasmática hasta la membrana externa. Aparentemente, este cambio no implica una difusión libre entre ambas membranas, sino que en el estado "cargado" se produce una liberación desde la membrana citoplasmática que permite a TonB tener un mayor contacto de la región C-terminal con la membrana externa. En el tercer paso, TonB interactuaría con los transportadores dependientes de TonB de la membrana externa, liberando la energía que permite la translocación del ligando del receptor hacia el espacio periplasmático (Figura 1) (Postle y Larsen, 2007). A pesar de ser el modelo más aceptado, existe evidencia experimental basada en fusiones traduccionales de TonB con GFP que afirmarían que el N-terminal de TonB permanece en la membrana citoplasmática, lo que se contrapone al modelo recién mencionado (Kaserer y cols., 2008).

Los transportadores de membrana externa TonB-dependientes presentan una región llamada caja TonB que interactúa con la proteína TonB. La caja TonB corresponde a una región moderadamente conservada cerca del N-terminal de los transportadores TonB-dependientes, que interactuaría con los residuos circundantes a la glutamina 160 de TonB. Mutaciones en la caja TonB de los transportadores afecta las funciones que son dependientes de TonB, pero no altera las independientes, como su inserción en la membrana y la unión del sustrato (Postle y Kadner, 2003).

En el caso de la MccE492, es necesaria la presencia de TonB para que los receptores de membrana externa FepA, Fiu y Cir, portadores de la caja TonB, tengan la energía para la translocación de la microcina hacia el espacio periplasmático, pero además, una vez en el periplasma, la microcina requiere la presencia de TonB para ejercer su actividad bactericida sobre la célula blanco (Figura 2). Esto se ha visto a través de



**Figura 1. Ciclo de transducción de energía de TonB según el modelo "Shuttle".** (1) En el primer paso el complejo TonB se encontraría en una forma no cargada la cual pasaría a una forma "cargada" (2) por efecto de la fuerza protón motriz. Esta forma "cargada" de TonB se translocaría desde la membrana citoplasmática a la membrana externa (3) para interactuar con los receptores de membrana externa dependientes de TonB, liberando la energía y permitiendo la translocación al periplasma de los ligandos de los receptores (4). La forma TonB "descargada" volvería a la membrana citoplasmática. Modificado de Postle y Larsen, 2007.



**Figura 2. Modelo de la translocación al periplasma de la microcina E492.** La microcina es reconocida por los receptores de membrana externa FepA, Cir y Fiu, los cuales permitirían la translocación al periplasma de la microcina mediante la energización del complejo TonB. Una vez en el periplasma la microcina tendría una interacción con el fragmento C-terminal de TonB lo que implicaría el paso de la microcina a una forma competente para la inserción en la célula blanco y formación de poros en la membrana citoplasmática. ME, membrana externa; MC, membrana citoplasmática. Modificado de Flores, 2009.

ensayos con células *tonB*<sup>-</sup> cuya membrana externa ha sido permeabilizada (esferoplastos) los cuales han resultado ser insensibles a la acción bactericida de la microcina (Lagos y cols., 2001). Estudios de este laboratorio han revelado que mutantes que presentan una delección en la zona C-terminal de TonB ( $\Delta$ 109-239) presentan insensibilidad frente a la microcina tanto en células no tratadas como en esferoplastos. Por esto, la región C-terminal de TonB sería imprescindible para ejercer la acción bactericida de la microcina. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los transportadores TonB-dependientes, la microcina no presenta una caja TonB, de manera que una interacción entre TonB y la MccE492 no está clara.

## **Hipótesis**

A partir de los antecedentes expuestos, se postula que la microcina E492 interactúa con el fragmento C-terminal de TonB para ejercer su actividad bactericida, por tanto debería observarse actividad antibacteriana al restituir esta interacción en células carentes de esta región e insensibles a la microcina.

Esta hipótesis de trabajo será sometida a una confirmación experimental.

## Objetivos

### Objetivo general

Determinar si el fragmento C-terminal de TonB purificado interactúa con la microcina E492 para producir una acción bactericida sobre la célula blanco.

### Objetivos específicos

1. Realizar una construcción que exprese el fragmento C-terminal de TonB desde la cual pueda ser purificado.
2. Determinar si existe una complementación funcional *in vivo* entre fragmentos N-terminal y C-terminal de TonB que permita la recuperación del fenotipo sensible a la microcina.
3. Establecer si una cepa portadora de una proteína trunca de TonB disminuye su sobrevivencia al incubarse con una mezcla de microcina E492 y péptido C-terminal de TonB purificado.

## 2 Materiales y Métodos

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Reactivos

Las enzimas de restricción *Nde* I y *Xho* I, y la enzima DNA Ligasa T4 fueron compradas en New England Biolabs (Ipswich, MA, Estados Unidos).

La Polimerasa de ADN Taq fue comprada en Invitrogen (Carlsbad, California, Estados Unidos).

Las membranas de nitrocelulosa para remover sales del ADN se obtuvieron desde Millipore (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos).

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

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

Los reactivos cloruro de sodio, hidróxido de sodio, fosfato dibásico de potasio, cloruro de calcio, citrato de sodio, maltosa, acetonitrilo, peróxido de hidrógeno, sacarosa, cloruro de potasio, acetato de amonio, bicarbonato de sodio, ácido tricloroacético, acetona, sulfato de níquel, Coomassie (azul brillante G-250), azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, etanol absoluto y isopropanol fueron comprados en Merck (Darmstadt, Alemania).

Los reactivos tiamina, ácido p-cumárico, lisozima, persulfato de amonio, TEMED, glucosa y tricina fueron comprados en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

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

Los reactivos cloruro de amonio, sulfato de magnesio heptahidratado, acrilamida, Tween 20, EDTA, cloruro de guanidinio y glicerina fueron comprados en Winkler Ltda. (Santiago, Chile).

Los reactivos de grado técnico: el metanol, el etanol y el ácido acético fueron comprados en TCL limitada (Santiago, Chile).

El imidazol y el SDS fueron comprados en AppliChem (Darmstadt, Alemania).

El fosfato disódico fue comprado en Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, España).

Los casaminoácidos y el agar fueron comprados en Becton (Sparks, Maryland, Estados Unidos).

El fosfato monobásico de potasio trihidratado fue comprado en J.T. Baker Chemical Co. (Estados Unidos).

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

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

El tris, la ampicilina y la glicina fueron comprados en U.S Biological (Swampscott, MA, Estados Unidos).

La kanamicina fue comprada en Gibco (Invitrogen).

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

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

Las bolsas de diálisis fueron compradas en Spectrum Laboratories Inc. (Estados Unidos)

El luminol se compró en Fluka Chemie AG (Buchs, Suiza).

### **2.1.2 Cepas bacterianas**

Las cepas bacterianas y su fenotipo se muestran en la Tabla 1

### **2.1.3 Plasmidios**

Los plasmidios utilizados se detallan en la Tabla 2

### **2.1.4 Partidores**

Los partidores utilizados y sus secuencias se muestran en la Tabla 3

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Medios de Cultivo**

**Medio LB.** Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, NaOH 0,35 mM.

**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

**Medio M9 suplementado.** Después de autoclavar el medio M9 fue suplementado con CaCl<sub>2</sub> 100 µM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mM, Citrato 0,2% v/v, CAA 0,1% v/v, Tiamina 1 mg/L a concentración final.

**Agar Blando.** Se preparó en Medio M9 con 7,5 g/L de agar agar.

**Placas agar.** Las placas se prepararon con medio LB y 1,5% p/v de agar agar. Los antibióticos fueron añadidos a una concentración final de 100 µg/mL para la ampicilina y 50 µg/mL para la kanamicina y el cloranfenicol.

### **2.2.2 Métodos de biología molecular**

Los métodos de biología molecular, como el aislamiento de DNA plasmidial, preparación de células electrocompetentes, transformación mediante electroporación, digestión con enzimas de restricción, ligamiento de fragmentos de DNA con enzima

**Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.**

<b>Cepa de <i>E. coli</i></b>	<b>Genotipo/Fenotipo</b>	<b>Fuente</b>
BL21(DE3)	BL21 portadora de profago $\lambda$ portador del gen de RNA polimerasa del bacteriófago T7	Novagen
K-12 ME9262	F <sup>-</sup> , <i>metE90</i> , <i>trpA9605</i> , <i>trpR55</i> , <i>lacI22</i> , <i>lacZ118</i> , <i>rpsL171</i> , <i>azi-9</i> , <i>nalA18</i> , <i>thyA708</i> , <i>deo-29</i> , <i>mhA102</i> , <i>recA200</i> , <i>lexA3</i>	Colección Keio
JW5195	Derivada de ME9262. Gen <i>tonB</i> reemplazado por gen de resistencia a kanamicina.	Colección Keio
ME9262/pET28-C-terTonB	Derivada de ME9262, portadora de plasmidio pET28/C-terTonB. Kan <sup>r</sup> .	Este trabajo
ME9262/pET28-C-terTonB/pIM91 $\Delta$ 109-239	Derivada de ME9262, portadora de plasmidio pET28/C-terTonB y de plasmidio pIM91 $\Delta$ 109-239. Kan <sup>r</sup> y Cm <sup>r</sup> .	Este trabajo
JW5195/pET28-C-terTonB	Derivada de JW5195, portadora del plasmidio pET28/C-terTonB. Kan <sup>r</sup> .	Este trabajo
JW5195/pET28-C-terTonB/pIM91 $\Delta$ 109-239	Derivada de JW5195, portadora del plasmidio pET28/C-terTonB y el plasmidio pIM91 $\Delta$ 109-239. Kan <sup>r</sup> y Cm <sup>r</sup> .	Este trabajo
JW5195/pIM91	Derivada de JW5195, portadora del plasmidio pIM91. Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
JW5195/pIM91 $\Delta$ 109-239	Derivada de JW5195, portadora del plasmidio pIM91 $\Delta$ 109-239. Kan <sup>r</sup> y Cm <sup>r</sup> .	Este trabajo

**Tabla 2. Plasmidios utilizados en este trabajo.**

Plasmidio	Genotipo/Fenotipo	Replicón	Copias por célula	Fuente
pJEM15	Portador de determinantes genéticos para MceE492. Duplicación de un fragmento <i>Sal</i> I de 2,5 kb (gen <i>mceF</i> ). Amp <sup>r</sup> .	ColE1	15-20	Wilkins y cols
pET28a	Kan <sup>r</sup> , vector con promotor y terminador del bacteriófago T7, cola de 6 histidinas para clonar en N-terminal o C-terminal, represor lacI	ColE1	15-20	Novagen
pET28-C-terTonB	Derivado de pET28, con fragmento C-terminal de TonB (codones 108-238) clonado entre sitios de restricción <i>Nde</i> I (238) y <i>Xho</i> I (158). Kan <sup>r</sup> .	ColE1	15-20	Este trabajo
pIM91	pSU2718 portando el gen <i>tonB</i> . Cm <sup>r</sup> .	p15A	18-22	Traub y cols., 1993
pIM91Δ109-239	pIM91 portando la mutación TonBΔ109-239. Cm <sup>r</sup> .	p15A	18-22	Flores, 2009

**Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo**

Partidor	Secuencia 5'-3'
TonBC-TerF	CTTCTTCATCATATGCAGCCAAAACGCGATGTCAAAC
TonBC-TerR	TTCCATCAACCTCGAGTCATTACTGAATTTCCGGTGGTGCCG
MP18	AGCGGATAACAATTTACACAGGAT
M13F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
T7 Pro primer	TAATACGACTCACTATAGGG

Se muestran subrayados los sitios de restricción para las enzimas *Nde* I, en TonBC-TerF, y *Xho* I en TonBC-TerR.

DNA Ligasa T4, se llevaron a cabo mediante métodos estandarizados (Sambrook y Russell, 2001).

### **2.2.3 Lisogenización de cepas de *E. coli* K12**

Para la lisogenización de las cepas de *E. coli* K12 JW5195 Y K12 ME9262, se utilizó el Kit de Lisogenización  $\lambda$ DE3 (Novagen). Ambas cepas fueron crecidas independientemente en medio LB suplementado con 0,2% de maltosa y 10 mM de  $MgSO_4$  a 37°C hasta una  $O.D._{600} = 0,5$ . Se mezclaron con  $10^8$  unidades formadoras de placa de  $\lambda$ DE3,  $10^8$  unidades formadoras de placa de fago "helper" y  $10^8$  unidades formadora de placa de fago de "selección" con 2,5  $\mu$ L del cultivo bacteriano. Luego la mezcla fue incubada por 20 minutos a 37°C y crecida sobre una placa LB suplementada a 37°C durante toda la noche.

La verificación de lisogenización fue realizada mediante un ensayo de inducción con IPTG utilizando como control las cepas sometidas al tratamiento de lisogenización transformadas con el plasmidio pCA24N/sdiA el cual se encuentra bajo el promotor T7. Posteriormente, se realizó un ensayo de inducción con las cepas transformadas con el plasmidio pET28-C-terTonB.

### **2.2.4 Ensayos de inducción**

Los ensayos de inducción realizados a las cepas lisogenizadas con el gen de la RNA polimerasa del fago T7 fueron realizados como se describe a continuación. Las cepas bacterianas fueron crecidas en un cultivo líquido a 37°C con agitación hasta alcanzar una  $O.D._{600} = 0,6$ . La mitad del cultivo fue inducido con IPTG a concentración final de 0,3 mM, mientras que la otra mitad se dejó como control sin inducir. Los cultivos fueron incubados a 37°C con agitación por 3 horas, se tomó una alícuota de 1 mL de cada cultivo y se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 rpm. El sedimento se

lavó 3 veces con TBS Tween 0,1% y se resuspendió en 75  $\mu$ L de TBS Tween. Se adicionaron 25  $\mu$ L de Buffer de carga 4X y se visualizó mediante SDS-PAGE.

### **2.2.5 Remoción de resistencia a antibiótico en la mutante TonB<sup>-</sup>**

Debido a que la cepa de *E. coli* K12 JW5195 presenta una interrupción del gen codificante de la proteína TonB mediante el método de Datsenko y Wanner (2000), fue necesario remover la resistencia al antibiótico siguiendo los métodos ya descritos. Para esto, células electrocompetentes de esta cepa fueron transformadas con el plasmidio termosensible pCP20, seleccionando las transformantes resistentes a ampicilina crecidas a 30°C. Los clones transformantes fueron crecidos en cultivos líquidos durante toda la noche a 43°C, temperatura a la cual se pierde el plasmidio. Se seleccionaron clones sobrevivientes a esta temperatura que perdieran el plasmidio pCP20 y la resistencia cromosomal a kanamicina (Datsenko y Wanner, 2000).

### **2.2.6 Purificación de la microcina E492**

Para la purificación de MccE492 se siguió un procedimiento preparativo para altas cantidades de microcina. Se activaron 50 g de Silica Gel 100-C18 con 300 mL de acetonitrilo 100% y se mantuvo con agitación a 4°C durante toda una noche. La resina se dejó decantar por 30 minutos y se retiró el acetonitrilo, agregando en su lugar 300 mL de agua nanopura. Se centrifugaron a 8000 g durante 30 minutos 4 litros de cultivo de la cepa productora crecida en medio M9 suplementado con citrato y glucosa a 37°C y en agitación de 220 rpm y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de polietersulfona a la temperatura de 4°C. Posteriormente, se adicionó la resina activada y se agitó por 20 minutos a 4°C. El contenido se filtró en un embudo Büchner que tenía un papel filtro y que estaba acoplado a un matraz kitasato, utilizando presión negativa. La resina fue lavada con 100 mL de metanol y luego con 100 mL de acetonitrilo 25%.

La microcina fue eluída con lavados sucesivos de acetonitrilo 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 100%.

### **2.2.7 SDS-PAGE e inmunoblot**

La microcina purificada fue caracterizada mediante SDS-PAGE realizado según las condiciones descritas por Schägger y von Jagow (1987). Para la transferencia del inmunoblot se utilizaron membranas de nitrocelulosa. La transferencia se realizó a 100 V, 90 minutos a -20°C usando un buffer de transferencia que contenía 25 mM Tris-HCl, 190 mM de glicina. Se usó un anticuerpo policlonal preparado en conejo contra el fragmento C-terminal de la mceE492 [SGSGYNSATSSSGSGS] (Mercado y cols., 2008) a una dilución de 1:500. El anticuerpo secundario utilizado fue un anti IgG de conejo preparado en cabra y conjugado a peroxidasa de rábano a una dilución 1:20.000. La reacción de quimioluminiscencia se llevó a cabo en Tris-HCl pH 8,5, 1,25 mM luminol, 0,2 mM ácido p-cumárico. La reacción se inició con la adición de una alícuota de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentración final 0,01%). La membrana fue expuesta a la película autoradiográfica durante 1 minuto.

### **2.2.8 Inmunoblot con anticuerpo anti cola de histidina**

Para realizar un inmunoblot con un anticuerpo anti cola de histidina, se utilizó anticuerpo primario preparado en ratón a una dilución 1:2000 y anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa a dilución 1:20.000. La reacción de quimioluminiscencia se realizó en las mismas condiciones que para la microcina E492.

### **2.2.9 Medición de la concentración de la microcina E492 purificada.**

La concentración de microcina en diferentes pasos de purificación fue determinada midiendo la absorbancia de las muestras a longitudes de onda de 260 y 280 nm utilizando el método de Warburg y Christian (1941) con la siguiente fórmula:

$$[\mu\text{g/mL}] = 1000 \times [(A_{280} \times 1,55) - (A_{260} \times 0,76)]$$

### **2.2.10 Ensayos de actividad bactericida**

Para determinar la actividad bactericida de la microcina en las distintas cepas se mezclaron 3 mL de agar blando con alicuotas de 100  $\mu\text{L}$  del cultivo y se sembraron sobre placas LB. Se realizaron diluciones seriadas en base 2 de la microcina purificada y se depositaron 5  $\mu\text{L}$  de cada dilución sobre el césped de la célula sensible y de las cepas mutantes. Las placas fueron incubadas a 37°C por 12 horas y la actividad bactericida fue visualizada por la aparición de halos de inhibición de crecimiento.

### **2.2.11 Purificación del péptido C-terminal de TonB**

Para la purificación del péptido C-terminal de TonB, se utilizó 1 litro de cultivo de la cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET28-C-terTonB. El cultivo fue crecido a 37°C y en agitación a 150 rpm hasta una O.D.<sub>600</sub> = 0,6 y luego fue inducido por 3 horas con IPTG a una concentración de 0,3 mM. Posteriormente el cultivo fue centrifugado por 35 minutos a 5000 rpm y 4°C. El sedimento fue lavado con buffer TEN (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1mM, NaCl 100mM, pH 8) y resuspendido en este mismo buffer. Luego las células fueron sonicadas 2 veces por 2,5 minutos (45 watt, potencia 6) y el lisado se centrifugó a 14.000 rpm y 4°C por 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante para la purificación. Ésta se llevó a cabo utilizando una columna empaquetada con 5 mL de resina Probond®, la cual fue lavada sucesivamente con 30 mL de agua nanopura y 20

mL de buffer TEN. Se cargó la fracción sobrenadante en la columna y se realizó un lavado con 20 mL de buffer TEN. Las eluciones se realizaron con lavados sucesivos de imidazol-TEN a las concentraciones de 1 mM, 50 mM, 150 mM, 300 mM y 500 mM de imidazol. El volumen de elusión fue de 15 mL en las concentraciones de imidazol de 1mM, 50 mM y 500 mM, mientras que las eluciones de 150 mM y 300 mM fueron colectadas en 10 fracciones de 1,5 mL. La columna se lavó con 30 mL de agua nanopura, 25 mL de NaCl 1M y 20 mL de agua nanopura. Finalmente se realizó un lavado con 25 mL de etanol 20%, condición en la cual fue almacenada.

#### **2.2.12 Medición de la concentración del péptido C-terminal de TonB**

Para la medición de concentración del péptido purificado se tomó una alícuota de 20  $\mu$ L de la muestra y se le agregó 60  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 10%. La mezcla fue incubada en hielo por 30 minutos y se centrifugó a 14.000 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 300  $\mu$ L de acetona pura previamente enfriada en hielo. Se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm por 30 minutos y se descartó el sobrenadante dejando que se evaporara toda la acetona a temperatura ambiente. Se resuspendió en 100  $\mu$ L de cloruro de guanidinio y se midió la absorbancia a 280 nm.

#### **2.2.13 Dicroísmo circular**

Se utilizaron espectros de dicroísmo circular como criterio de evaluación de la estructura secundaria del péptido C-terminal de TonB en condiciones no denaturantes. Para estas mediciones se utilizó el péptido a una concentración de 0,51 mg/mL, el cual había sido previamente dializado contra buffer fosfato 0,1 M (26,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 69,5 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) y KCl 50 mM, pH 8, para no interferir en la medición, en un volumen final de 300  $\mu$ L. El péptido se sometió a desnaturación con cloruro de

guanidinio de la siguiente manera: se prepararon muestras a la misma concentración de péptido en buffer fosfato con concentraciones crecientes del agente caotrópico cloruro de guanidinio (0, 0,55 M, 1,1 M y 2,2 M). En los controles para cada muestra se reemplazó el volumen ocupado por el péptido con igual volumen de buffer fosfato. Las muestras fueron incubadas en hielo durante toda la noche y antes de la medición fueron ultracentrifugadas en una airfuge a 72.000 g (15 psi) por 20 minutos. La medición de dicroísmo circular se realizó en una cubeta de paso óptico de 1 mm y el equipo fue configurado como se muestra en la Tabla 4.

#### **2.2.14 Preparación de microcina para ensayos de sobrevida**

Para los ensayos de sobrevida, la microcina purificada fue concentrada en un concentrador al vacío Centrivap Labconco a 60°C para evaporar de la muestra todo el acetonitrilo. Luego, la microcina fue resuspendida en agua nanopura a la concentración deseada.

#### **2.2.15 Preparación de esferoplastos y ensayos de sobrevida**

Los esferoplastos se prepararon a partir de un inóculo de 100 mL de LB con la cepa correspondiente y fueron crecidos a 37°C y 150 rpm hasta alcanzar una  $O.D._{450} = 1$  (alrededor de  $O.D._{600} = 0,6$ ). El cultivo fue centrifugado a 700 g y 4°C, en tubos Falcon, y lavado 2 veces con 15 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8, estéril. El sedimento fue resuspendido en 5 mL de buffer sacarosa (Tris-HCl 100 mM, sacarosa 20%, pH 8, estéril) y se le agregó 1,6 mL de EDTA 0,1 M, estéril, con agitación y con una incubación posterior de 15 minutos. Luego de la incubación se le agregó lentamente 500  $\mu$ L de lisozima 2 mg/mL preparada en buffer sacarosa agitando suavemente por 15 minutos. Los esferoplastos estuvieron listos para usarse en los ensayos de sobrevida

**Tabla 4. Configuración para la medición de dicroísmo circular.**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Longitud de onda inicial	250 nm
Longitud de onda final	190 nm
Paso de resolución	0,4 nm
Velocidad	50 nm/min
Acumulación	5
Respuesta	0,5 s
Ancho de Banda	1 nm
Sensibilidad	50 mdeg

posteriores. En todos los ensayos se utilizaron 100  $\mu$ L de células tratadas con 100  $\mu$ L de microcina o mezcla de microcina y péptido C-terminal de TonB.

Para los ensayos de sobrevivencia con microcina, se utilizaron condiciones con buffer sacarosa (control vida), agua nanopura (control muerte) y microcina a concentración final de 100  $\mu$ g/mL.

Para los ensayos de sobrevivencia utilizando el péptido C-terminal de TonB, se utilizaron tratamientos con buffer sacarosa (control vida), agua nanopura (control muerte), microcina a concentración final 400  $\mu$ g/mL, péptido C-terminal de TonB a concentración final de 300  $\mu$ L/mL, y 2 incubaciones separadas tanto con el péptido como con la microcina (MP<sub>1</sub> y MP<sub>2</sub>). En los controles las células fueron incubadas con 100  $\mu$ L de buffer sacarosa (control vida) o de agua nanopura (control muerte). En el caso de las incubaciones con microcina o con el péptido solamente, las células se incubaron con 75  $\mu$ L de buffer sacarosa y 25  $\mu$ L de microcina o de péptido. Para las incubaciones con la mezcla de microcina y el péptido, las células fueron incubadas con 50  $\mu$ L de buffer sacarosa, 25  $\mu$ L de microcina y 25  $\mu$ L de péptido. Para la incubación MP<sub>1</sub>, la microcina con el péptido fueron incubados por 5 minutos antes de ser agregadas las células tratadas, mientras que en la incubación MP<sub>2</sub>, las células fueron primero incubadas por 5 minutos con el péptido luego de los cuales se agregó la microcina.

#### **2.2.16 Análisis bioinformático**

El análisis del péptido C-terminal de la proteína TonB fue realizado con el programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen). Para la realización de gráficos se utilizaron los programas Microsoft Office Excel 2007 y Sigma Plot 9.0.

## **3 Resultados**

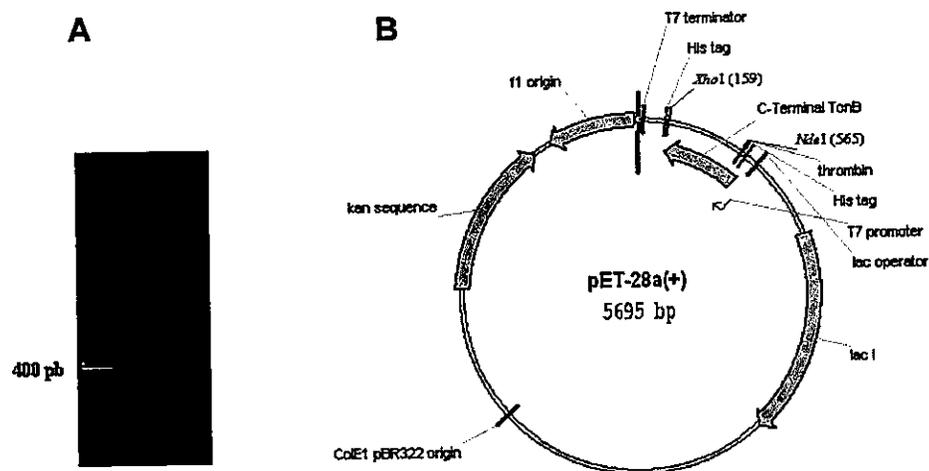
### **3.1 Construcción del plasmidio portador del fragmento C-terminal de TonB**

#### **3.1.1 Amplificación y clonación del fragmento génico desde el plasmidio pIM91**

Para los ensayos y experimentos a realizar en este trabajo, fue necesario contar con un plasmidio que expresara el fragmento C-terminal de TonB. Esta construcción se realizó obteniendo el fragmento génico *tonB* desde el codón 108 hasta el 239 desde el plasmidio pIM91 a partir de una reacción de PCR utilizando los partidores TonBC-terF y TonBC-terR. Se obtuvo un fragmento de DNA de 431 pb que portaba el sitio de restricción para la enzima *Nde* I en la posición 5' y el sitio de restricción para la enzima *Xho* I en la posición 3' (Figura 3A). El fragmento, luego de ser digerido con las enzimas de restricción *Xho* I y *Nde* I, fue clonado en el plasmidio pET28a, previamente digerido con ambas enzimas, resultando el vector pET28-C-terTonB de 5695 pb (Figura 3B).

#### **3.1.2 Características del péptido C-terminal de TonB**

Mediante el programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen), se obtuvieron las propiedades teóricas del péptido que se expresaría desde el plasmidio pET28-C-terTonB, que predice un peso molecular de 16,6 kDa, y un coeficiente de extinción molar de 8250 (tabla 5). En base a estos valores se elaboraron las siguientes etapas de este trabajo.



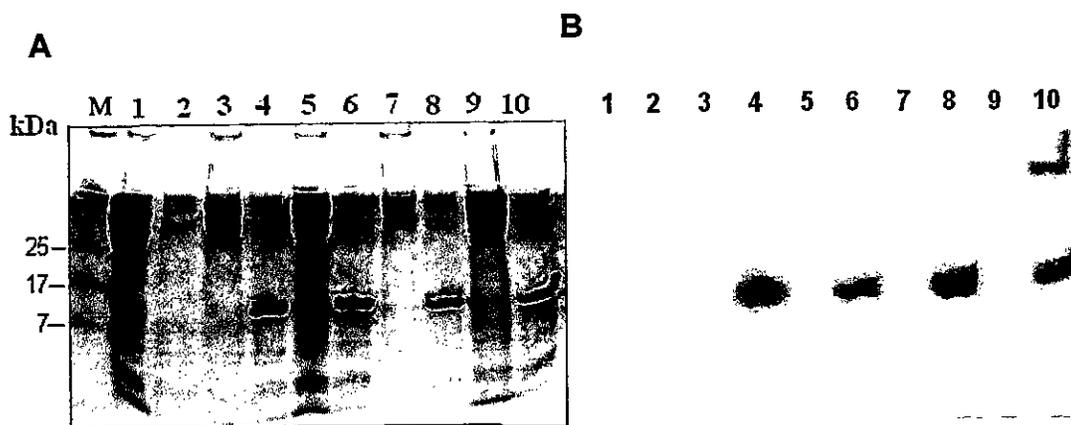
**Figura 3. Amplificación y clonamiento del fragmento génico que codifica para el péptido C-terminal de TonB. A:** Visualización de los productos de PCR para la amplificación del fragmento de DNA de *tonB* que codifica para el fragmento C-terminal de TonB. Se observa la banda esperada con un tamaño aproximado de 400 pb. **B:** Clonamiento del fragmento en el vector pET28, luego de digestiones con las enzimas de restricción *Nde* I y *Xho* I. El plasmidio resultante de 5695 pb porta el fragmento génico clonado.

**Tabla 5. Características del péptido C-terminal de TonB**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Longitud del péptido	152 aa
Peso molecular	16,6 kDa
Coefficiente de extinción molar	8250
1 A [280] de péptido	2,02 mg/mL
A[280] de 1 mg/mL de péptido	0,50 U.A.
Punto isoeléctrico	10,74
Carga a pH 7	11,38

### **3.1.3 Ensayo de inducción e inmunoblot confirman la expresión del péptido C-terminal de TonB**

La expresión bajo inducción del fragmento C-terminal de TonB a partir del plasmidio pET28-C-terTonB se realizó en la cepa BL21(DE3), cepa que expresa la RNA polimerasa del bacteriófago T7, después de incubar con IPTG. Las condiciones de inducción se realizaron de manera similar a lo hecho por Wallace y cols., 2008. Para el ensayo se utilizó la misma cepa transformada con el plasmidio pET28 como control negativo, el cual no mostró ningún péptido sobreexpresado al someter a la cepa a una inducción. Los 4 clones analizados que portan el segmento C-terminal de TonB no producen ninguna banda sobresaliente en el gel de poliacrilamida de las muestras no inducidas, en tanto que bajo condiciones de inducción, se observa una banda que se destaca por su tamaño entre las proteínas totales visualizadas que corresponde a 16,6 kDa, el peso molecular esperado del péptido C-terminal de TonB (Figura 4A). Debido a la cola de 6 histidinas en el fragmento N-terminal con la cual está fusionado el péptido, se confirmó su fenotipo a través de un inmunoblot con anticuerpo anti cola de histidinas. En el control negativo no se detectó ningún péptido con cola de histidinas, mientras que para los 4 clones analizados se puede apreciar una banda correspondiente con un péptido portador de una cola de histidinas. Cuando no se realiza la inducción, se observa que esta banda es tenue, mientras que con inducción esta banda se torna intensa, diferenciándose de la expresión basal (Figura 4B). Con este resultado se confirmó la expresión del péptido C-terminal de TonB unido a una cola de histidinas.



**Figura 4. Ensayo de inducción e inmunoblot anti cola de histidina del fragmento C-terminal de TonB.** A: Ensayo de inducción realizado a la cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET28-C-terTonB. B: Inmunoblot anti cola de histidina. Carril M: marcador de peso molecular; carril 1 y 2: control *E. coli* BL21(DE3)/pET28 sin y con inducción con IPTG. Los clones a continuación corresponden a *E. coli* BL21(DE3)/pET28-C-terTonB. Carril 3 y 4: clon 1 sin y con inducción con IPTG; carril 5 y 6: clon 2 sin y con inducción con IPTG; carril 7 y 8: clon 3 sin y con inducción con IPTG; carril 9 y 10: clon 4 sin y con inducción con IPTG. Se observa que las bandas sobreexpresadas en ensayo de inducción coinciden con la reacción inmunológica contra las colas de histidinas visualizadas mediante el inmunoblot.

### **3.2 Estudio de complementación funcional de los fragmentos N-terminal y C-terminal de TonB para la actividad bactericida de la microcina E492.**

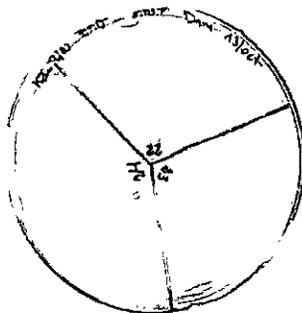
#### **3.2.1 Construcción de cepas portadoras de los fragmentos C-terminal y N-terminal de TonB**

Para el estudio de la complementación se utilizó la cepa de *E. coli* K-12 ME9262 y la cepa carente de *tonB* JW5195 (Baba y cols., 2006), las cuales fueron transformadas con el plasmidio pET28-C-terTonB, que expresa el péptido C-terminal de la proteína TonB. La cepa ME9262 no presenta resistencia antibiótica, pero la cepa JW5195, que presenta una delección del gen TonB realizada según el método de Datsenko y Wanner (2000), es resistente al antibiótico kanamicina. Debido a que el plasmidio pET28-C-terTonB presenta esta misma resistencia fue necesario remover este gen de resistencia en la cepa JW5195. Para ello se introdujo el plasmidio pCP20, el cual expresa la recombinasa FLP que, mediante un proceso de recombinación, remueve la resistencia antibiótica (Datsenko y Wanner, 2000). El plasmidio pCP20 presenta un origen de replicación termosensible por lo que fue posible curar a la cepa del plasmidio sensible a kanamicina incubando a la temperatura restrictiva (Figura 5A). La cepa sin resistencia fue transformada con el plasmidio pIM91 portador del gen *tonB* y por lo tanto por complementación recupera la función, lo que se comprobó por la recuperación del fenotipo sensible a la microcina E492 (Figura 5B). Debido a que la expresión del plasmidio pET28-C-terTonB requiere la presencia de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, ambas cepas fueron sometidas a una lisogenización con el profago DE3 (ver materiales y métodos). Como control, las

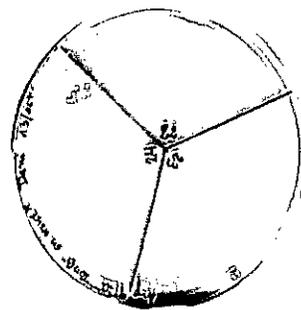
A



LB

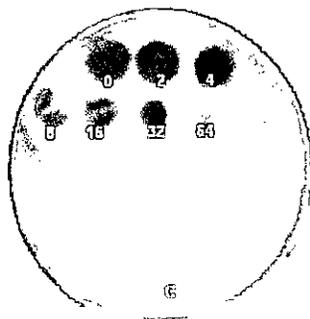


Kanamicina



Ampicilina

B

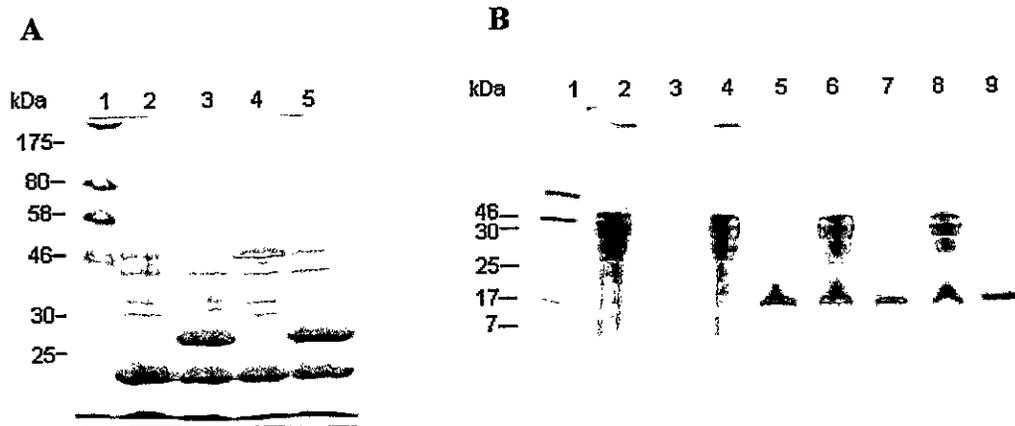


**Figura 5. Ensayos de sobrevivencia y complementación de la cepa JW5195 sin resistencia antibiótica. A:** Siembras de la cepa *E. coli* JW5195 en placas LB y en placas con los antibióticos kanamicina y ampicilina de 3 clones independientes. Se observa crecimiento de la cepa en LB, sin embargo la cepa ha perdido su resistencia al antibiótico kanamicina contenida en la cepa original y tampoco presenta resistencia al antibiótico ampicilina, lo que indica que la cepa ha sido curada del plasmidio pCP20. **B:** Ensayo de actividad realizado a la cepa JW5195 sin resistencia antibiótica complementada con el plasmidio pIM91 portador del gen *tonB*. Se depositaron 5  $\mu$ L de diluciones seriadas de una muestra purificada de MccE492. Los números sobre los halos de inhibición indican la dilución usada.

células lisogenizadas fueron transformadas con el plasmidio pCA24N que expresa la proteína SdiA de 30,6 kDa, inducible con IPTG, la cual puede ser visualizada por medio de un gel de poliacrilamida. El ensayo de inducción dio como resultado que tanto en ME9262 como en JW5195 la expresión de la proteína se observa sólo en los casos en que se adicionó IPTG, lo que comprueba la correcta expresión de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 en las cepas lisogenizadas con DE3 (Figura 6A). Cuando se llevó a cabo la transformación de ambas cepas con el plasmidio pET28-C-terTonB y se realizó la inducción, se vio que el péptido C-terminal de TonB se expresó aún en ausencia de IPTG, a un nivel similar a la condición de inducción (Figura 6B). Las cepas ME9262/pET28-C-terTonB y JW5195/pET28-C-terTonB fueron transformadas con el plasmidio pIM91Δ109-239, el cual expresa una proteína trunca de TonB que carece del fragmento de la proteína desde el residuo 108 al 239. A partir de estas cepas fue posible llevar a cabo el estudio de complementación de los fragmentos N-terminal y C-terminal de TonB.

### **3.2.2 La cepa de JW5195 que expresa el fragmento N-terminal y el C-terminal de la proteína TonB no recupera la sensibilidad a la microcina E492.**

Se probó si al coexpresar los dominios amino y carboxilo terminal separados existía complementación funcional de TonB realizando ensayos de actividad de la microcina. La cepa ME9262 se usó como control positivo, pues posee un gen que presenta TonB de manera funcional y se observó que presenta sensibilidad a la microcina hasta la dilución 64. Por el contrario, JW5195, usada como control negativo, no presentó sensibilidad a la microcina por carecer del gen *tonB*. Se transformaron con los distintos plasmidios y se observó que las cepas derivadas de ME9262 mantuvieron su sensibilidad a la microcina hasta la dilución 64, y las cepas derivadas de JW5195 se



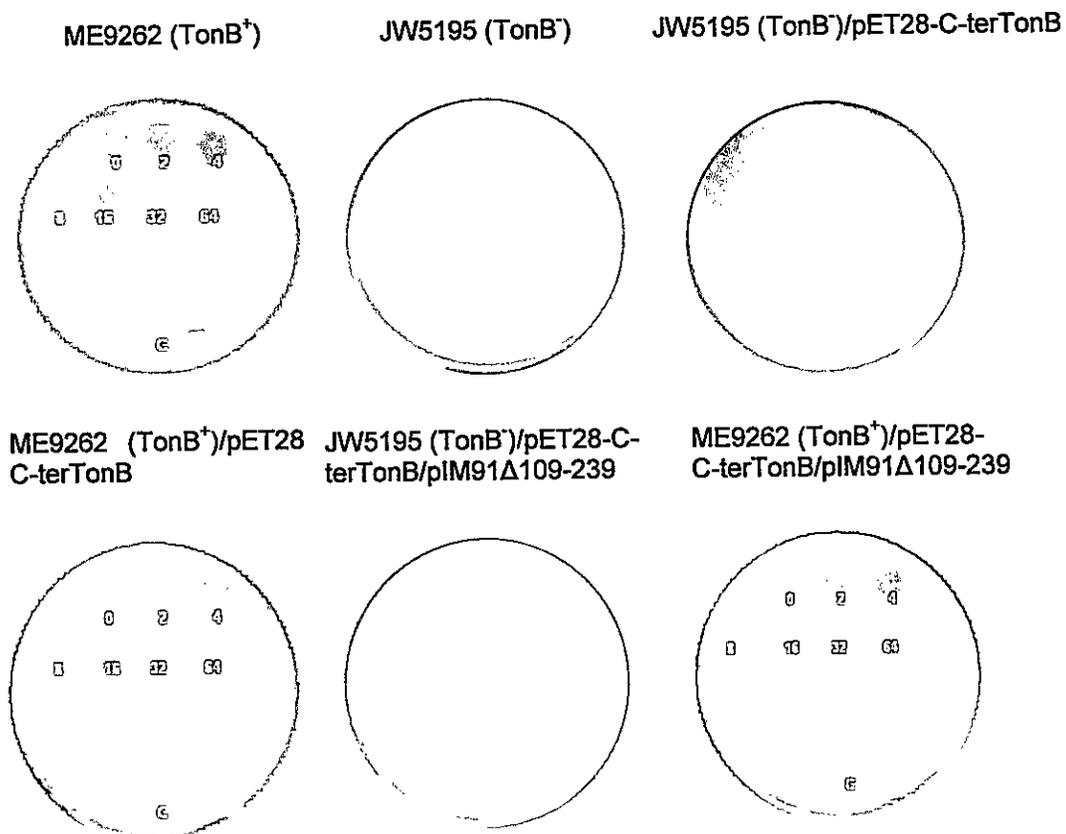
**Figura 6. Ensayos de inducción de cepas lisógenas.** **A.** Los ensayos se realizaron en las cepas *E. coli* ME9262 y JW5195 (*tonB*) transformadas con el plasmidio pCA24N como control de lisogenización. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2 y 3: extracto celular de ME9262/pCA24N sin y con inducción con IPTG; carril 4 y 5: extracto celular de la cepa JW5195/pCA24N sin y con inducción con IPTG. **B.** Ensayo de inducción realizado a las cepas ME9262 y JW5195 transformadas con el plasmidio pET28-C-terTonB. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2 y 3: extracto celular de la cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET28 sin y con inducción con IPTG; carril 4 y 5: extracto celular de la cepa BL21(DE3)/pET28-C-terTonB sin y con inducción con IPTG; carril 6 y 7: extracto celular de la cepa ME9262/pET28-C-terTonB sin y con inducción con IPTG; carril 8 y 9: extracto celular de la cepa JW5195/pET28-C-terTonB sin y con inducción con IPTG. Se distingue en la Figura A, que la proteína sólo es sobreexpresada cuando el cultivo es inducido con IPTG, mientras que en la Figura B la proteína es igualmente expresada en presencia o ausencia del inductor en el cultivo celular en las cepas lisogenizadas.

mantuvieron insensibles a la microcina, concluyéndose que no hubo complementación funcional (Figura 7).

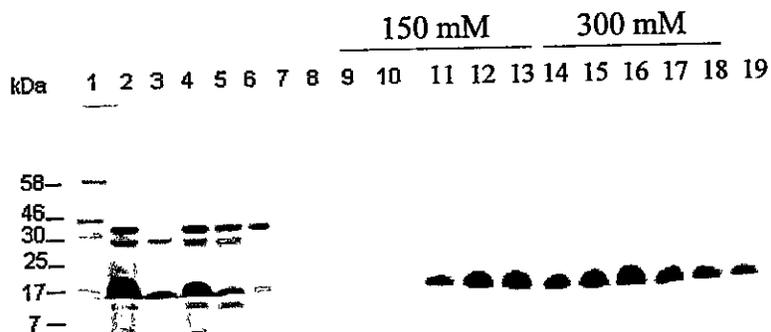
### **3.3 Estudio de la interacción entre el fragmento C-terminal de TonB y la microcina E492**

#### **3.3.1 Purificación del péptido C-terminal de TonB**

La purificación del péptido C-terminal de TonB se llevó a cabo a partir de la cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET28-C-terTonB. La purificación se realizó en una columna con la resina Probond, la cual presenta una alta afinidad y selectividad por la cola de 6 histidinas que posee el péptido. La recuperación del péptido desde la columna se llevó a cabo mediante eluciones sucesivas con soluciones de imidazol a distintas concentraciones (1 mM, 50 mM, 150 mM, 300 mM, 500 mM). La visualización del péptido en las distintas fracciones colectadas mediante geles de poliacrilamida reveló que el péptido eluye principalmente a las concentraciones entre 150 mM y 300 mM de imidazol (Figura 8). Si bien las fracciones eluidas a estas concentraciones presentaron una cantidad significativa del péptido, la pureza con que éste se encontró varió en las diferentes fracciones. Así, se visualizan contaminantes de bajo peso molecular en las fracciones de más alta concentración de imidazol. Por esto, se trabajó con el péptido eluido entre las concentraciones 150 mM y 300 mM de imidazol. Estas fracciones se mezclaron, obteniéndose una muestra de 15 mL con una concentración del péptido de 3,89 mg/mL. Se dializaron 10 mL de esta muestra con el objetivo de limpiar la solución de imidazol y de contaminantes de bajo peso molecular, obteniéndose una preparación de péptido a una concentración de 2,4 mg/mL.



**Figura 7. Ensayos de actividad bactericida realizados a las cepas con los plasmidios que expresan el fragmento N-terminal de TonB y el fragmento C-terminal de TonB.** Se depositaron 5  $\mu$ L de diluciones seriadas de MccE492 sobre céspedes de las cepas que se describen a continuación. La cepa ME9262 y la cepa JW5195 fueron transformadas con el plasmidio pET28-C-terTonB, portador del fragmento C-terminal de TonB, y el plasmidio pIM91 $\Delta$ 109-239, portador del fragmento N-terminal de TonB. Como control negativo se usó la cepa JW5195, insensible a la microcina, mientras que el control positivo fue la cepa ME9262 sensible a la microcina hasta la dilución 64.



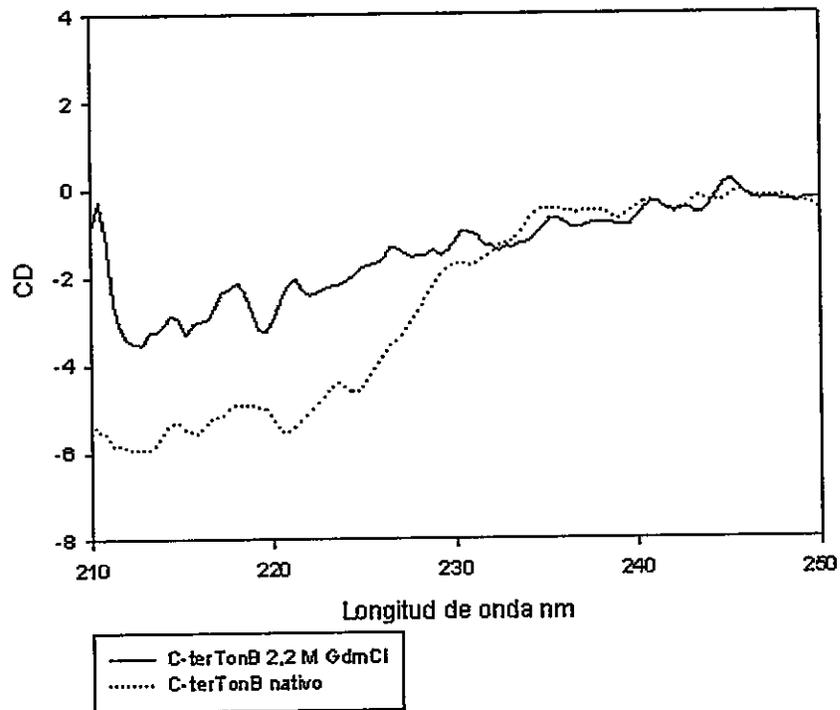
**Figura 8. Purificación del péptido C-terminal de TonB.** La purificación fue hecha en una columna con la resina Probond a partir de un extracto de un cultivo celular de la cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET28-C-terTonB que posteriormente fue sometido a PAGE. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: extracto celular total; carril 3: fracción total de membranas del extracto; carril 4: fracción total soluble del extracto; carril 5: fracción no retenida en la columna; carril 6: eluido del buffer TEN; carril 7: elusión con imidazol 1mM; carril 8: elusión con imidazol 50 mM; carril 9 y 13: elusiones sucesivas con imidazol 150 mM; carril 14-18: elusiones sucesivas con imidazol 300 mM; carril 19: elusión con imidazol 500 mM.

### **3.3.2 El análisis por dicroísmo circular indica que el péptido C-terminal de TonB está plegado**

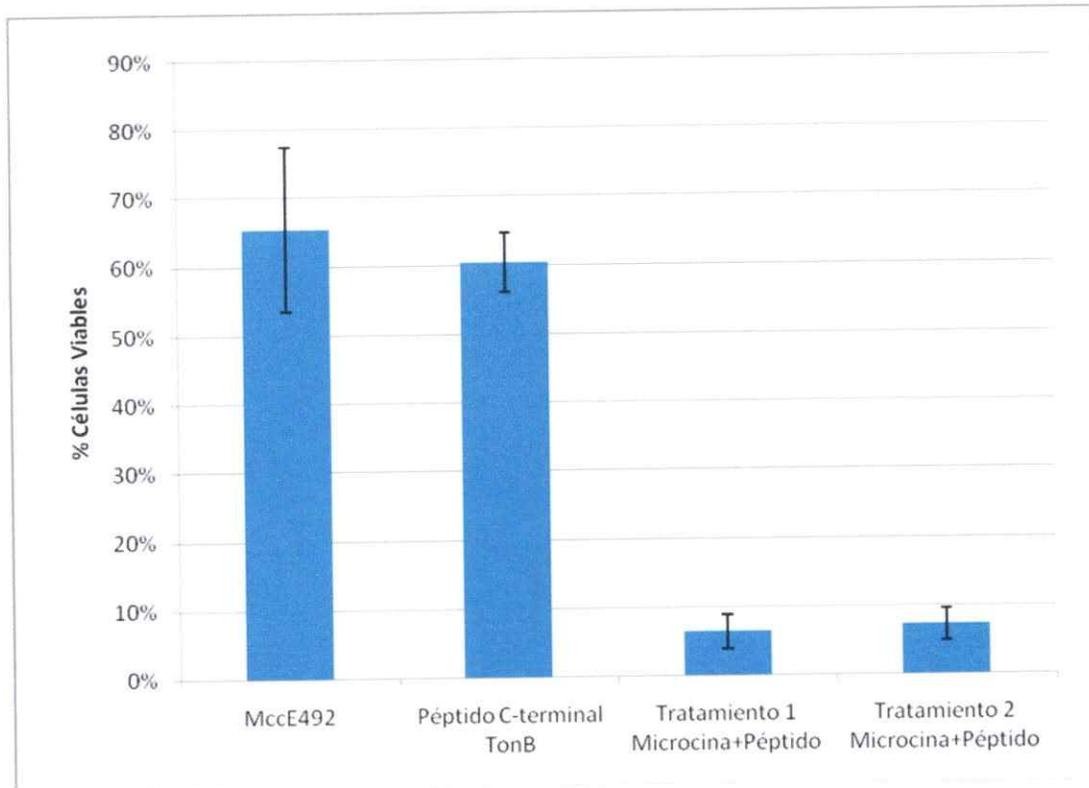
El uso del péptido C-terminal de TonB requiere que éste se encuentre en condiciones nativas de plegamiento, puesto que las interacciones a estudiar con la microcina E492 serían de tipo estructural. Como criterio para evaluar si el péptido C-terminal de TonB está en forma plegada después de la purificación, se realizó un análisis por dicroísmo circular. En la figura 9 se observa que la muestra nativa, es decir en ausencia de agente denaturante, presenta un mínimo de absorción en 222 y 210 nm, señal característica de estructura secundaria de tipo  $\alpha$ -hélice. Al incubar la muestra con el agente denaturante cloruro de guanidinio a concentración de 2,2 M, se obtiene un espectro en el que los mínimos recién mencionados se ven disminuidos, mostrando pérdida de estructura secundaria. Este resultado indica que el péptido purificado presenta estructura secundaria, la cual se pierde en presencia de cloruro de guanidinio (Figura 9).

### **3.3.3 Los esferoplastos de la mutante trunca de TonB $\Delta$ 109-239 son sensibles a la mezcla de microcina E492 y péptido C-terminal de TonB**

La interacción entre el péptido C-terminal de TonB y la microcina E492 fueron estudiadas mediante la influencia que este péptido pudiera tener sobre la microcina para ejercer su actividad bactericida sobre la célula blanco. Para esto se realizaron ensayos con esferoplastos de la cepa JW5195/pIM91 $\Delta$ 109-239, es decir células cuya membrana externa ha sido permeabilizada. Los esferoplastos fueron incubados con solo microcina (control negativo) observándose una alta sobrevida (65,45%) (Figura 10). Este resultado indica que las células no son sensibles a la microcina, ya que esta sobrevida es cercana al 100% que se obtiene en la incubación de los esferoplastos en



**Figura 9. Espectro de dicroísmo circular del péptido C-terminal de TonB.** La línea punteada indica el espectro obtenido del péptido en buffer fosfato 0,1 M. La línea continua indica el espectro obtenido en presencia de cloruro de guanidinio 2,2 M.



Tratamiento	Porcentaje de células viables de la cepa JW5195/pIM91Δ109-239
MccE492	65,45 ± 0,1191
Péptido C-terminal TonB	60,36 ± 0,0425
Tratamiento 1 Microcina+Péptido	6,31 ± 0,0244
Tratamiento 2 Microcina+Péptido	7,19 ± 0,0232

**Figura 10. Tratamiento de Esferoplastos de la cepa JW5195/pIM91Δ109-239 con microcina E492 y el péptido C-terminal de TonB.** Los datos corresponden a un promedio de 3 ensayos distintos. En el gráfico se incluye el error en unidades de porcentaje. El 100% de sobrevivencia corresponde a células sin tratamiento con microcina ni péptido C-terminal. Tratamiento 1: los esferoplastos fueron incubados simultáneamente con microcina y péptido C-terminal de TonB. Tratamiento 2: los esferoplastos fueron incubados por 5 minutos con el péptido C-terminal de TonB y posteriormente se adicionó la microcina.

ausencia de microcina o de péptido. La incubación de los esferoplastos con el péptido C-terminal de TonB, resultó en una sobrevivencia de 60,36%, lo cual indica que el péptido no afecta mayormente la sobrevivencia. En cambio, al incubar la microcina con el péptido C-terminal de TonB se obtuvo una sobrevivencia de 6,31% en el primer tratamiento, en el cual la microcina y el péptido fueron sometidos a una breve incubación antes de ser agregados a los esferoplastos. El segundo tratamiento con microcina y péptido C-terminal, las células fueron incubadas con el péptido C-terminal durante 5 minutos y luego se agregó a la incubación la microcina, lo que resultó en una sobrevivencia de 7,19%. En ambos casos de incubación conjunta se observa una disminución drástica de la sobrevivencia celular al ser comparada con los controles solo con la microcina o el péptido (Figura 10).

## 4 Discusión

### 4.1 La cepa de *E. coli* JW5195 que expresa el segmento N-terminal y el segmento C-terminal de la proteína TonB no recupera la sensibilidad a la microcina E492

La proteína TonB es una proteína de membrana citoplasmática que se encuentra formando un complejo energizador que permite el transporte desde la membrana externa al espacio periplasmático de moléculas como sideróforos de hierro, entre otras (Postle y Kadner, 2003). En un trabajo previo se obtuvieron mutantes que tenían en su región codificante codones de término, por lo tanto se infirió que expresaban una proteína TonB trunca, y que tenían una menor sensibilidad a la acción bactericida de la microcina E492. Estas mutantes fueron construidas mediante experimentos de mutagénesis al azar con hidroxilamina sobre un plasmidio portador del gen *tonB* (Baeza, 2003). En experimentos posteriores se construyó la misma mutante, pero esta vez se delecionó el fragmento C-terminal de TonB. Como resultado se obtuvo que las cepas que expresaban esta mutante trunca por delección son insensibles a la acción de la microcina, y no se encontró el fenotipo rezumante antes visto (Flores, 2009). Una de las explicaciones por las cuales se observa el fenotipo rezumante, es que, al presentar un codón de término y aun estar presentes los codones que codifican para el fragmento C-terminal de TonB, existe la posibilidad de que el C-terminal se traduzca en forma independiente, pues existe una metionina que puede ser utilizada para el inicio y que complementa a la proteína trunca. Alternativamente, en una fracción del mensajero puede ocurrir un corrimiento en el marco de lectura que evada el codón de término y luego retome la traducción correcta de la proteína.

En este trabajo no se observó una complementación funcional entre la proteína trunca TonB $\Delta$ 109-239 construida mediante delección y el fragmento C-terminal restante, que abarca desde el codón 108 al 239.

La ubicación del péptido del fragmento C-terminal de TonB es en el citoplasma y lo más probable es que en esta construcción este segmento no sea translocado a través de la membrana citoplasmática hacia el periplasma para poder interactuar con la parte N-terminal de TonB, insertada en la membrana. Esto explicaría por qué no se observó complementación funcional. Cuando este fragmento forma parte de la proteína TonB, está unido a la región N-terminal que se inserta en la membrana, y por lo tanto es probable que a través de esta inserción se produzca la translocación. Por otro lado, hay que tener presente que el fragmento C-terminal posee una cola de 6 histidinas en la parte N-terminal, lo cual podría impedir su paso hacia la membrana plasmática. Para aclarar estas interrogantes haría falta realizar una complementación en que se asegure que el péptido C-terminal traspase la membrana citoplasmática, por ejemplo mediante la adición de una señal de una proteína translocadora. Sólo si este experimento arroja un resultado negativo se puede descartar la posibilidad de la complementación funcional entre ambas partes de la proteína TonB.

#### **4.2 Los esferoplastos de mutante trunca de TonB $\Delta$ 109-239 son sensibles a la mezcla de microcina E492 y el péptido C-terminal de TonB**

En el proceso de energización llevado a cabo por el complejo TonB, el dominio C-terminal de TonB es de gran importancia, pues este fragmento estaría implicado en la interacción existente entre esta proteína y los receptores de membrana externa dependientes de TonB. La interacción se realizaría con una región de alrededor de 5 residuos aminoacídicos llamada caja TonB que se encuentra en la zona N-terminal de

la mayoría de los receptores de membrana externa dependientes de TonB. Esta zona es medianamente conservada, pues se ha demostrado que es altamente tolerante a las mutaciones (Peacock y cols., 2005). Si bien se presume que existe una interacción entre TonB y la microcina E492, ésta no es clara, pues la microcina no presenta una caja TonB. La microcina requiere la presencia de TonB para poder ser translocada hacia el periplasma y luego para adquirir una conformación activa que permitiría ejercer su acción bactericida sobre la célula blanco, puesto que células que expresan mutante de TonB cuyo C-terminal ha sido deletado, no presentan sensibilidad a la microcina cuando su membrana externa ha sido permeabilizada (Flores, 2009). En este trabajo se ha observado que esferoplastos de una cepa que expresa esta mutante trunca TonB $\Delta$ 109-239, si bien es insensible a la acción de la microcina, su sobrevivencia disminuye drásticamente cuando la incubación se realiza en presencia del péptido C-terminal de TonB en conjunto con la microcina. Este resultado sugiere fuertemente que el péptido C-terminal de TonB interactuaría con la microcina, y que al no producirse esta interacción que es el caso de la incubación sólo con la microcina, no produciría una conformación activa de la microcina que permita su acción sobre la célula blanco.

En la interacción que se produce entre TonB y los receptores de membrana externa que presentan la caja TonB, la zona circundante al residuo glutamina 160 del C-terminal de TonB cobra vital importancia. Se ha determinado que la delección de 7, 9 y 11 residuos aminoacídicos centrados en la glutamina 160 inactivan TonB e impiden su interacción con la membrana externa (Vakharia-Rao y cols., 2007). Por otro lado, también se ha señalado que el "cluster" aromático de la región C-terminal de TonB sería importante para su actividad, específicamente los residuos fenilalanina 202, triptófano 213, tirosina 215, fenilalanina 180 y fenilalanina 230. Se determinó también que sustituciones dobles por alanina en algunos de estos residuos, inactivan la

proteína pero ésta mantiene la habilidad de interactuar con la membrana externa (Ghosh y Postle, 2004). Por otra parte, Kaserer y cols. (2008), determinaron que existiría una afinidad general de parte de TonB por las proteínas, siendo esta afinidad mayor en el caso de proteínas de membrana externa. Más aún, habría afinidad incluso por receptores de membrana externa cuya caja TonB ha sido delecionada, aunque en menor grado que con la proteína completa. En el mecanismo propuesto por Kaserer y cols., (2008) TonB existiría en forma monomérica y dimérica intercambiables, las cuales presentarían distintas afinidades, siendo la forma dimérica de la parte C-terminal la responsable de las afinidades no específicas.

Como ya se mencionó antes, se desconoce la naturaleza de la interacción que ocurre entre el péptido C-terminal de TonB y la microcina, de manera que permanece la interrogante de cuáles residuos aminoacídicos de la zona C-terminal son importantes para esta interacción que conlleva a la actividad bactericida de la microcina, y si la interacción con la microcina requiere un C-terminal de TonB en forma monomérica o dimérica.

El análisis mediante difracción circular permitió comprobar que la purificación del péptido C-terminal de TonB utilizado en este estudio está en forma plegada, observándose la presencia de estructura secundaria de tipo  $\alpha$ -hélice, de manera similar al espectro de difracción circular obtenido por Wallace y cols., 2008. La estructura cristalina obtenida de la región C-terminal de TonB revela la presencia de estructura secundaria tipo  $\alpha$ -hélice y lámina  $\beta$  (Chang y cols., 2001; Ködding y cols., 2004), por lo que el espectro obtenido en este trabajo estaría dentro de lo esperado. Por esto, se presume que la estructuración presente en el péptido es importante para la interacción.

Los resultados obtenidos indican que existe una interacción entre la parte C-terminal de TonB y la microcina que es necesaria para ejercer su acción bactericida,

pero persisten interrogantes en cuanto a la naturaleza de esta interacción. Una de estas interrogantes es si la parte C-terminal de TonB podría funcionar como un centro de nucleación a partir del cual empezaría a formarse el poro en la membrana citoplasmática o si esta interacción induce un cambio conformacional en la microcina que le permite interactuar con otros elementos presente en el espacio periplasmático y en la membrana citoplasmática y en conjunto inducen la formación del poro.

Un aspecto que debe dilucidarse es si los esferoplastos preparados a partir de una cepa deficiente en TonB son sensibles a la mezcla de microcina y fragmento C-terminal de TonB. Esta información permitirá acotar los dominios de interacción de TonB en la microcina E492.

## 5 Conclusión

- La construcción de un vector portador del fragmento C-terminal de TonB fusionado a una cola de histidinas permite la expresión del péptido en *E. coli* y su posterior purificación.
- La purificación del péptido C-terminal de TonB fusionado a una cola de histidinas no ocasiona pérdida de estructura secundaria, obteniéndose un péptido en forma plegada.
- La interacción entre la microcina E492 y el fragmento C-terminal de TonB es necesaria para producir la actividad bactericida.

## 6 Proyecciones

A partir de los resultados obtenidos en esta memoria de título se desprende que aun existen interrogantes que deben ser respondidos en futuros experimentos. Es por eso que se desprenden las siguientes proyecciones:

1. Establecer las interacciones que ocurren *in vitro* entre el péptido C-terminal de TonB y la microcina E492.
2. Establecer si el péptido C-terminal de TonB purificado y la microcina E492 en conjunto pueden disminuir la sobrevivencia de una cepa carente de *tonB* en sus células permeabilizadas.
3. Determinar si la inserción de la microcina en la membrana citoplasmática de la célula blanco se produce por interacciones específicas entre la microcina y la región C-terminal de TonB o si se requiere además una proteína TonB funcional en este proceso.

## 7 Presentaciones a Congresos

- Muñoz, D., Flores, J., Monasterio, O. y Lagos, R. 2009. La interacción entre la microcina E492 y el fragmento C-terminal de la proteína TonB es indispensable para la actividad bactericida. *Biological Research* 42 (suplemento A), 2009. LII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile.

## 8 Referencias

- Baba, T., A. Takeshi, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. Datsenko, M. Tomita, B. Wanner y H. Mori. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* Doi: 10.1038/msb4100050.
- Baeza, M. 2003. Mecanismo de inmunidad, de traslocación y de conversión tipo prión de la mceE492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Chang, C., A. Mooser, A. Plückthun y A. Wlodawer. 2001. Crystal Structure of the Dimeric C-terminal Domain of TonB Reveals a Novel Fold. *J. Biol. Chem.* **276**: 27535-27540.
- Corsini, G., M. Baeza, O. Monasterio y R. Lagos. 2002. The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochimie.* **84**: 539-544.
- Datsenko, K. y B. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**: 6640-6645.
- de Lorenzo, V. y A. Pugsley. 1985. Microcin E492, a Low-Molecular-Weight Peptide Antibiotic Which Causes Depolarization of the *Escherichia coli* Cytoplasmic Membrane. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **27**: 666-669.
- Destoumieux-Garzón, D., X. Thomas, M. Santamaria, C. Goulard, M. Barthélémy, B. Boscher, Y. Bessin, G. Molle, A. Pons, L. Letellier, J. Peduzzi y S. Rebuffat. 2003. Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**: 1031-1041.
- Flores, J. 2009. Función del extremo C-terminal de la proteína TonB en la sensibilidad a la microcina E492. Memoria de Título. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Ghosh, J. y K. Postle. 2004. Evidence for dynamic clustering of carboxy-terminal aromatic amino acids in TonB-dependent energy transduction. *Mol. Microbiol.* **51**: 203-213.
- Higgs, P., R. Larsen y K. Postle. 2002. Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol Microbiol.* **44**: 271-281.

- Kaserer, W., X. Jiang, Q. Xiao, D. Scott, M. Bauler, D. Copeland, S. Newton y P. Klebba. 2008. Insight from TonB Hybrid Proteins into the Mechanism of Iron Transport through the Outer Membrane. *J. Bacteriol.* **190**: 4001-4016.
- Ködding J., F. Killig, P. Polzer, S. P. Howard, K. Diederichs y W. Welte. 2004. Crystal Structure of a 92-Residue C-terminal of TonB from *Escherichia coli* Reveals Significant Conformational Changes Compared to Structures of Smaller TonB Fragments. *J. Biol. Chem.* **280**: 3022-3028.
- Lagos, R., M. Baeza, G. Corsini, C. Hetz, E. Strahsburger, J. Castillo, C. Vergara y O. Monasterio. 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., J. Villanueva y O. Monasterio. 1999. Identification and Properties of the Genes Encoding Microcin E492 and Its Immunity Protein. *J. Bacteriol.* **181**: 212-217.
- Larsen, R., G. Deckert, K. Kastead, S. Devanathan, K. Keller y K. Postle. 2007. His<sub>20</sub> Provides the Sole Functionally Significant Side Chain in the Essential TonB Transmembrane Domain. *J. Bacteriol.* **189**: 2825-2833.
- Nolan, E. y C. Walsh. 2009. How Nature Morphs Peptide Scaffolds into Antibiotics. *ChemBioChem.* **10**: 34-53.
- Peacock, R., A. Weljie, S. Howard, F. Price, H. Vogel. 2005. The Solution Structure of the C-terminal Domain of TonB and Interaction Studies with TonB Box Peptides. *J. Mol. Biol.* **345**: 1185-1197.
- Postle, K. y R. Kadner. 2003. Microreview. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**: 869-882.
- Postle, K. y R. Larsen. 2007. TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals.* **20**: 453-465.
- Reeves, P. 1965. The bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **29**: 24-45.
- Riley, M. y M. Chavan. 2007. Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer-Verlag (eds.). pp 1-21.
- Sambrook, J. Y D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory Manual. 3ra edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press (eds.)
- Schägger, H. y G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368 - 379.
- Strahsburger, E., M. Baeza, O. Monasterio y R. Lagos. 2005. Cooperative Uptake of Microcin E492 by Receptors FepA, Fiu, and Cir and Inhibition by

Siderophore Enterochelin and Its Dimeric and Trimeric Hydrolysis Products. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **49**: 3083-3086.

- Thomas, X., D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi, C. Alfonso, A. Blond, N. Birlirakis, C. Goulard, L. Dubost, R. Thai, J-C Tabet y S. Rebuffat, S. 2004 Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.*, **279**: 28233-28242.
- Traub, I., S. Gaisser y V. Braun. 1993. Activity domains of the TonB protein. *Mol. Microbiol.* **8**: 409 - 423.
- Vakharia-Rao, H., K. Kastead, M. Savenkova, C. Bulathsinghala y K. Postle. 2007. Deletion and Substitution Analysis of the *Escherichia coli* TonB Q160 Region. *J. Bacteriol.* **189**: 4662: 4670.
- Warburg, O. y W. Christian. 1941. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Zschr.* **29**: 589-59.
- Wilkens, M., J. Villanueva, J. Cofré, J. Chnaiderman y R. Lagos. 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.