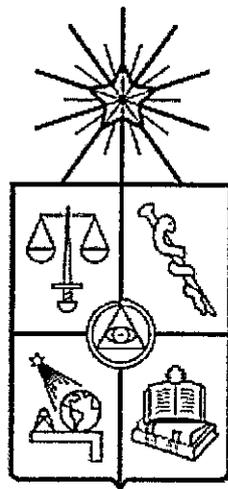


UCH-FC
Biotecnología
B593
-CL

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA QUIMÉRICA QUE
CONTIENE LOS MODULOS N- Y C-TERMINAL DE LA MICROCINA E492, UNA
BACTERIOCINA FORMADORA DE POROS, Y FtsB, UNA PROTEÍNA DE LA
DIVISIÓN BACTERIANA**

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

Por

Eduardo Andrés Bignon Silva

Octubre 2013

Santiago – Chile

Directora de Tesis: Dra. ROSALBA LAGOS MÓNACO

Co-Director de Tesis: Dr. OCTAVIO MONASTERIO OPAZO



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Eduardo Andres Bignon Silva: "CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA QUIMÉRICA QUE CONTIENE LOS MODULOS N- Y C-TERMINAL DE LA MICROCINA E492, UNA BACTERIOCINA FORMADORA DE POROS, Y FtsB, UNA PROTEÍNA DE LA DIVISIÓN BACTERIANA"** ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Rosalba Lagos Mónico
Directora Seminario de Título

Dr. Octavio Monasterio Opazo
Sub-Director Seminario de Título

Comisión revisora y Evaluadora

Dr. Francisco Chávez Espinoza
Presidente Comisión

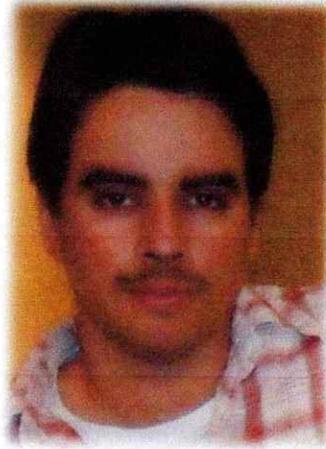
Dra. Julieta Orlando
Evaluadora

Rosalba Lagos Mónico
Octavio Monasterio Opazo
Francisco Chávez Espinoza
Julieta Orlando

Un sello circular con el texto "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE" rodeado por una línea decorativa.

Santiago de Chile, octubre de 2013

AUTOBIOGRAFÍA



Nací en Valdivia en 1984 en una lluviosa noche de tormenta eléctrica. De mi infancia basta decir que mi familia se movía constantemente y en esa época cambiar de ciudad y de gente era como cambiarse de zapatos. Supongo que en cierto grado todavía lo es y, este minuto sedentario, es mi muy querida tangente. Una ventaja de este estilo de vida es que me permitió darme cuenta de dos cosas muy importantes tempranamente en mi vida: primero que saber inglés no es solamente importante sino que esencial (cortesía de un pueblito llamado Camberlie) y segundo que toda la gente es básicamente igual, ni buena ni mala, todo el mundo hace lo que considera mejor en el momento. Cuando uno sabe lo que cada persona considera mejor y que tan lejos en el futuro mira para encontrarlo, uno puede decir que conoce a esa persona.

Después de crecer, viajar y aprender, me encontré en la facultad de ciencias de la universidad de Chile. Desde pequeño sabía que quería ser científico, la única pregunta era que clase de científico y aquí en la universidad lo descubrí. Pasados varios años en esta facultad, tratando de balancear mi tesis de pregrado con el doctorado, conocí a mi esposa "la Pazita". Basta decir que me enamore y que ya solo a medio año de conocerla ya sabía que quería pasar el resto de mi vida con ella, sólo me faltaba que ella sintiera lo mismo. Gracias a Dios ella si sentía lo mismo y ahora estamos esperando nuestra primera hija y reina doblemente la paz en mi hogar.

Esta pequeña autobiografía es para toda la gente que me quiere, no está hecha para entenderse, sino que para la gente que me conoce la vea y sonría. Si no entiendes algunas cosas esperemos que algún día lo hagas.

**Dedico esta tesis a mis padres,
mi señora y a mi futura hija.**

**"To achieve great things, two things are needed: a plan and not quite
enough time."**

(Leonard Bernstein)



TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| TABLA DE CONTENIDOS..... | ii |
| LISTA DE TABLAS..... | v |
| LISTA DE FIGURAS..... | vi |
| ABREVIATURAS..... | vii |
| RESUMEN..... | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Bacteriocinas..... | 1 |
| 1.2. Microcina E492..... | 2 |
| 1.2.1 Propiedades de la Microcina E492..... | 2 |
| 1.2.2 Estructura modular de la MicrocinaE492..... | 8 |
| 1.2.3 Mecanismo de acción de la microcina E492..... | 9 |
| 1.2.4 Cluster genético de la microcina E492..... | 10 |
| 1.3. Exportación de proteínas por sistemas ABC..... | 12 |
| 1.4 Sideróforos de tipo catecol..... | 13 |
| 1.5 División celular en bacterias..... | 15 |
| 1.5.1 Fisión binaria..... | 15 |
| 1.5.2 Complejo FtsQ/FtsB/FtsL..... | 18 |
| Hipótesis..... | 20 |
| Objetivo general..... | 21 |
| Objetivos específicos..... | 21 |

| | |
|---|----|
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 22 |
| 2.1. Materiales..... | 22 |
| 2.1.1. Reactivos..... | 22 |
| 2.1.2 Medios de cultivo..... | 23 |
| 2.1.2. Cepas bacterianas..... | 23 |
| 2.1.3 Amortiguadores..... | 23 |
| 2.1.4 Cepas bacterianas..... | 23 |
| 2.1.5. Plasmidios y vectores..... | 24 |
| 2.1.6. Partidores..... | 24 |
| 2.2. Métodos..... | 27 |
| 2.2.1. Técnicas moleculares..... | 27 |
| 2.2.2. Precipitación proteínas con TCA..... | 27 |
| 2.2.3. Purificación de la MccE492..... | 27 |
| 2.2.4. Purificación de la Proteína Quimérica intracelular..... | 27 |
| 2.2.5. Fraccionamiento subcelular..... | 28 |
| 2.2.6. Electroforesis en geles de poli(acrilamida SDS (SDS-PAGE) y tinción..... | 29 |
| 2.2.7. Western blot..... | 29 |
| 2.2.7.1. Electrotransferencia y exposición a anticuerpos..... | 30 |
| 2.2.7.2. Reacción colorimétrica fosfatasa alcalina..... | 30 |
| 2.2.8. Espectrometría de masas MALDI-TOF..... | 30 |
| 2.2.9. Detección y cuantificación de la actividad bactericida..... | 31 |
| 2.2.9.1. Preparación de placas de césped..... | 31 |
| 2.2.9.2 Detección de la actividad bactericida..... | 31 |
| 2.2.9.3. Preparación de esferoplastos..... | 32 |
| 2.2.9.4. Ensayos de sensibilidad a MccE492 sobre esferoplastos..... | 32 |

| | |
|--|----|
| 3. RESULTADOS..... | 33 |
| 3.1. Generación de la proteína quimérica MccE492::FtsB por medio de megapartidores..... | 33 |
| 3.2. Producción de la proteína quimérica..... | 36 |
| 3.3. Precitación de la proteína quimérica desde el sobrenadante..... | 36 |
| 3.4. Determinación de la localización intracelular de la proteína quimérica..... | 38 |
| 3.5. Purificación de la proteína quimérica intracelular..... | 40 |
| 3.6. Espectrometría de masa de la proteína quimérica..... | 40 |
| 3.7. Determinación del título de actividad antibacteriana..... | 43 |
| 4. DISCUSIÓN..... | 45 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 50 |
| 6. REFERENCIAS..... | 51 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en esta memoria..... | 25 |
| Tabla 2. Plasmidios y vectores utilizados en esta memoria..... | 25 |
| Tabla 3. Secuencia de los partidores empleados en esta memoria..... | 26 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Modelo de modificación y exportación de la microcina E492..... | 3 |
| Figura 2. La microcina E492 y su modificación post-traducciona..... | 5 |
| Figura 3. Modelo del ingreso de la microcina E492 a la célula blanco..... | 6 |
| Figura 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los precursores de las microcinas M, H47, I47 y E492..... | 7 |
| Figura 5. Esquema de la organización de los determinantes genéticos del sistema productor de la microcina E492..... | 11 |
| Figura 6. Esquema de la organización del divisoma bacteriano..... | 16 |
| Figura 7. Proteínas implicadas en etapas tempranas y tardías de la división bacteriana..... | 17 |
| Figura 8. Estrategia para la generación de la secuencia quimérica entre <i>mceA</i> y <i>ftsB</i> | 34 |
| Figura 9. Clonamiento de la secuencia quimérica entre <i>mceA</i> y <i>ftsB</i> en el vector pBAD33 entre los sitios <i>SacI</i> y <i>HindIII</i> | 35 |
| Figura 10. SDS-Page y westernblot de extracto total y proteínas extracelulares..... | 37 |
| Figura 11. SDS-Page y westernblot de las proteínas separadas por localización subcelular..... | 39 |
| Figura 12. SDS-Page y westernblot de la purificación de la proteína quimérica..... | 41 |
| Figura 13. Espectrometría de masa MALDI TOFF de la proteína quimérica purificada..... | 42 |
| Figura 14. Ensayo de actividad bactericida sobre esferoplastos de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)... | 44 |
| Figura 15. Estudio bioinformático del nivel de desorden intrínseco..... | 48 |
| Figura 16. Estudio bioinformático de la estructura secundaria..... | 49 |

ABREVIATURAS

ABC: ATP Binding Cassette

Amp: ampicilina

APS: persulfato de amonio

Ara: arabinosa

BCIP: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

bp: pares de bases

Cit: citrato

Cm: cloranfenicol

DHBS: 2,3- 2,3-Dihidroxibenzoilserina

DMF: N,N-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

Glc: glucosa

IC50: Concentración inhibitoria 50%

Kan: kanamicina

kb: kilobases

LB: caldo Luria Bertani

MALDI-TOF: desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo

MccE492: microcina E492

MGE: enteroquelina mono-glucosilada

NBT: nitroazul de tetrazolio

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

rpm: revoluciones por min

SDS: dodecilsulfato de sodio

Sm: estreptomina

TBS: amortiguador tris salino

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamino

TEN: tris EDTA Na (Sodio)

Tet: tetraciclina

Tricina: N-tris-(hidroximetil)-metilglicina

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

β -MeOH: beta mercaptoetanol

Resumen

La microcina E492 es una bacteriocina de 84 aminoácidos formadora de poros producida por *Klebsiella pneumoniae* RYC492. La microcina E492 es sintetizada como un precursor con un péptido señal en su extremo N-terminal que es reconocido y escindido, y posteriormente exportado por un sistema de exportadores de tipo I constituido por un transportador ABC (MceG), una proteína accesoria (MceH) y una proteína de membrana externa (TolC). Una característica de la microcina E492 es que existe una forma no modificada y otra modificada, siendo esta última la forma activa, la cual tiene unido postraduccionalmente al C-terminal un derivado de la salmoquelina. La modificación es llevada a cabo por los productos de los genes de la maduración *mceC*, *mceJ* y *mceI* y es esencial para el reconocimiento de la microcina E492 por parte de los receptores de sideróforos de tipo catecol (FepA, Fiu y Cir) localizados en la membrana externa de las células blanco, los cuales median su ingreso al periplasma.

Con el objetivo de caracterizar la funcionalidad de los módulos N- y C-terminal de la MccE492 se construyó mediante PCR solapado una proteína quimérica con el péptido líder de la microcina E492 (exportación), el dominio periplasmático de la proteína FtsB (implicada en la división bacteriana) y el dominio C-terminal de la microcina E492 (de captación hacia el periplasma). La expresión de esta quimera está comandada desde un promotor pBAD. Esta construcción se introdujo en células con un sistema de la microcina E492 que carece del gen estructural pero contiene todos los demás determinantes genéticos que permiten la exportación y modificación de esta bacteriocina. En este contexto se demostró que esta proteína quimérica con el dominio N-terminal de la microcina E492, no fue exportada, pues no se encontró entre las proteínas precipitadas del sobrenadante, y a pesar de poseer el dominio C-terminal de la microcina E492, no fue modificada postraduccionalmente, determinado por espectrometría de masa MALDI-TOF, mediante la cual se identificó la proteína quimérica pero no su forma modificada.

No se detectó actividad bactericida sobre *Escherichia coli* sensibles a la microcina E492, congruente con un módulo C-terminal no funcional al carecer de la modificación. Sin embargo, se observó actividad bactericida sobre esferoplastos (células con membrana externa permeabilizada) de *Escherichia coli*, demostrando el potencial de las proteínas de división bacteriana para el desarrollo de nuevos antibióticos.

ABSTRACT

Microcin E492 is a pore-forming bacteriocin of 84 aminoacids produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Microcin E492 is synthesized as a precursor with a signal peptide in the N-terminal that is recognized, cleaved and subsequently exported by an ABC transporter (MceG), its accessory protein (MceH) and the outer membrane protein TolC. Microcin E492 is produced both, in an unmodified and modified form, this last one being the active form that has a salmochelin derivative covalently bound to the C-terminal. The modification is done by the products of the maturation genes *mceC*, *mceJ* and *mceI*; and it's essential for the recognition of microcin E492 by the catechol type siderophore receptors (FepA, Fiu y Cir) localized in the outer membrane of the target cell, mediating the entry to the periplasm.

In order to characterize the functionality of the N- and C-terminal modules of MccE492, we constructed a chimeric protein with the N-terminal domain of microcin E492 (exportation), the periplasmic domain of the protein FtsB (implicated in the bacterial division) and the C-terminal domain of microcin E492 (uptake to the periplasmic space). The expression of this chimera is commanded from a pBAD promoter. This construction was introduced in cells carrying the microcin E492 system that lacks the structural gene but contains all the other genetic determinant that allow the exportation and modification of this bacteriocin. In this context it was demonstrated that this chimeric protein with the N-terminal domain from microcin E492 was not exported and, despite possessing the C-terminal domain of microcin E492, it wasn't posttranslationally modified, as seen by MALDI-TOF mass spectrometry, by means of which the chimeric protein was identified but not its modified form.

Antibacterial activity in *Escherichia coli* sensitive to microcin E492 was not detected, congruent with a non-functional C-terminal module, but antibacterial activity on *Escherichia coli* spheroplasts was detected, showing the potential of the bacterial division proteins for the development of new antibiotics.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Bacteriocinas

Una estrategia común entre bacterias es la eliminación de sus competidores por medio de la producción de agentes bactericidas secretados al medio extracelular. Éstos se pueden clasificar en dos grupos: los sintetizados enzimáticamente (antibióticos) y los sintetizados ribosomalmente (bacteriocinas) (**Pavlova y Severinov, 2006**). Las bacteriocinas son producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas caracterizándose por afectar a especies filogenéticamente relacionadas (**Reeves, 1965; Riley y Wertz, 2002**). Sus mecanismos de acción son variados y entre ellos se incluyen endodesoxiribonucleasas o endoribonucleasas, inhibidores de la síntesis de proteínas, de la DNA girasa o de la RNA polimerasa, y las formadoras de poros, que se insertan en la membrana plasmática de la célula blanco disipando el potencial de membrana (**Braun y cols., 2002**).

A su vez las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas se clasifican por su masa molecular en colicinas (masa mayor a 10 kDa) y microcinas (masa menor a 10 kDa) (**Baquero y Moreno, 1984**). Las colicinas se caracterizan por ser producidas por cepas de *Escherichia coli*, por tener sus genes codificados en plásmidos y porque su expresión está regulada por el sistema SOS (**Riley y Wertz, 2002**). Las microcinas en cambio son producidas por bacterias Gram negativas de la familia Enterobacteriaceae (**Baquero y Moreno, 1984**), son generalmente proteínas hidrofóbicas solubles en metanol y son resistentes a condiciones extremas de pH, temperatura y a algunas proteasas (**Kolter y Moreno, 1992**). Las microcinas se sintetizan como precursores y la mayoría son modificadas post-traduccionalmente, para lo que cuentan con genes de la maduración que codifican para enzimas involucradas en este proceso (**Kolter y Moreno, 1992**).

Recientemente se propuso una clasificación de las microcinas que incorpora criterios como la presencia, naturaleza y ubicación de las modificaciones post-traduccionales, la organización del clúster genético, y las secuencias del péptido líder (Duquesne y cols., 2007). De acuerdo a esta clasificación, las microcinas clase I son péptidos con una masa molecular inferior a 5 kDa, las cuales se encuentran modificadas post-traduccionalmente en su esqueleto. La clase II incluye péptidos de mayor masa molecular (en el rango de 5-10 kDa), y se divide en dos subclases: la IIa que contienen enlaces disulfuro pero no modificación post-traducciona (MccL, MccV, Mcc24); y la IIb, la cual integra a aquellas microcinas lineales que se modifican post-traduccionalmente en el C-terminal (MccE492, MccM y presumiblemente MccH47 y MccI47).

1.2 Microcina E492

1.2.1 Propiedades de la Microcina E492

La microcina E492 (MccE492) es una bacteriocina formadora de poros (Lagos y cols., 1993) producida naturalmente por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 que presenta actividad bactericida sobre otras bacterias Gram negativas tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Erwinia* (de Lorenzo, 1984). Su mecanismo de acción es a través de la despolarización de la membrana citoplasmática de la célula blanco (de Lorenzo y Pugsley, 1985) por medio de la formación de canales iónicos selectivos para cationes en bicapas lipídicas (Lagos y cols., 1993).

La MccE492 es un péptido hidrofóbico, con una masa molecular de 7887 Da (forma no modificada) (Lagos y cols., 1999). Esta microcina puede encontrarse modificada post-traduccionalmente en la serina-84 del extremo C-terminal (Figura 1; Thomas y cols., 2004). Mediante espectrometría de masa se determinó que la

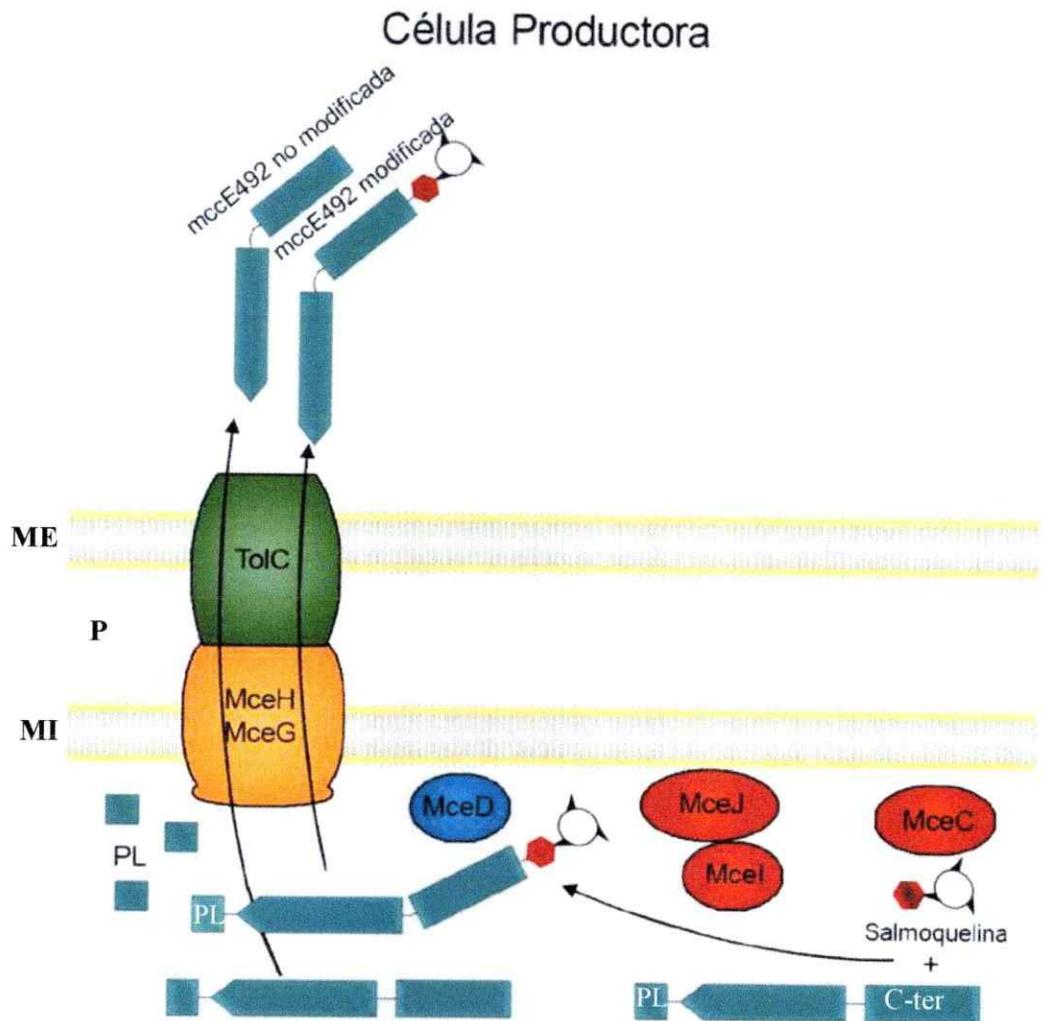


Figura 1. Modelo de modificación y exportación de la MccE492.

La MccE492 se sintetiza como una pre-proteína, que puede sufrir un proceso de modificación post-traduccional en su extremo C-terminal, en el que participan los productos génicos MceC, MceI, MceJ y MceD. Ambas formas, la modificada y la no modificada, al ser exportadas al medio extracelular por MceHG son procesadas por MceG, perdiendo el péptido líder (PL).

ME: Membrana Externa; P: Periplasma; MI: Membrana Interna.

Modificado de Lagos y cols. (2009).

modificación corresponde a una molécula tipo salmoquelina y que existen a lo menos 3 especies de mayor tamaño que la MccE492 sin modificar (7887 Da), las que corresponden a la modificada con el trímero de dihidroxibenzoilserina glucosilado (DHBS) (8718 Da); con el dímero de DHBS glucosilado (8495 Da); y con el monómero de DHBS glucosilado (8272 Da) (**Figura 2; Thomas y cols., 2004**). Dicha modificación post-traducciona favorecería la interacción de la MccE492 con los receptores de tipo catecol FepA, Fiu y Cir de la célula blanco pues estos receptores median su ingreso al periplasma de la célula (**Figura 3; Patzer y cols., 2003**). Alineamientos múltiples entre la MccE492 y otras microcinas de la clase IIb (MccM, MccH47 y MccI47) muestran que hay una gran identidad a nivel del C-terminal (**Figura 4**), pues dentro de los diez últimos aminoácidos, al menos cinco están 100% conservados. Uno de estos es la serina-84 y la glicina que la antecede en la posición 83, motivo que se repite en las posiciones 81 y 82 en la MccE492 (Gly-Ser-Gly-Ser; **Nolan y cols., 2007**).

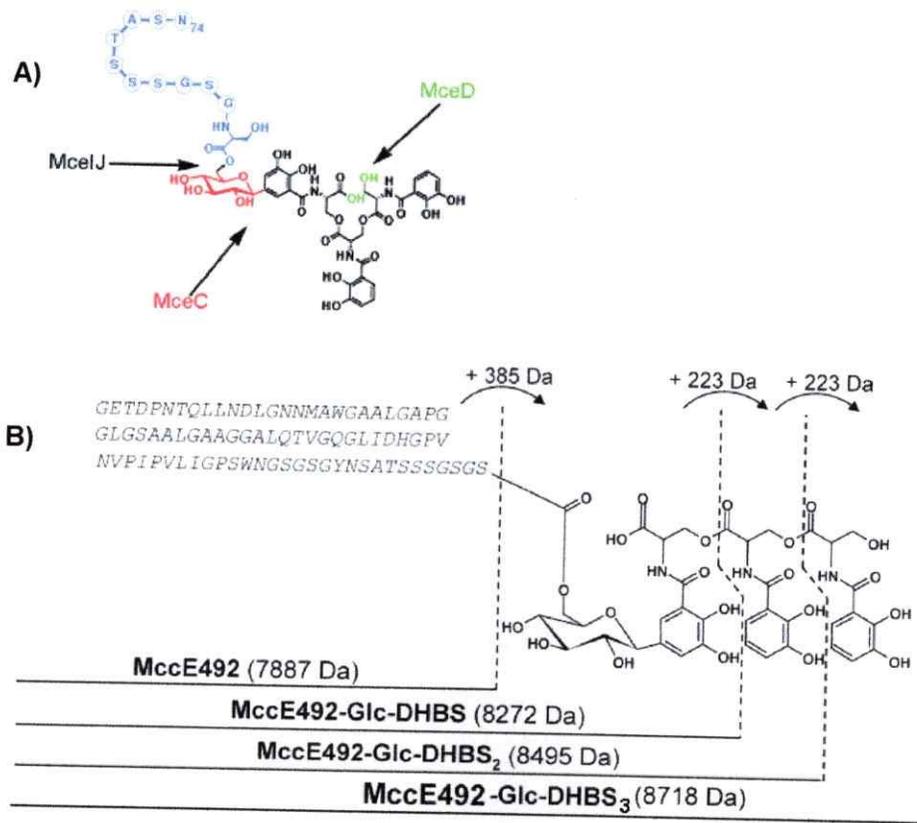


Figura 2. La microcina E492 y su modificación post-traduccional.

A) La MccE492 modificada post-traduccionalmente con una molécula tipo salmoquelina. Se muestran las enzimas del sistema de la MccE492 que participan en el proceso de modificación post-traduccional. En primer lugar, MceC glicosila una molécula de enteroquelina para generar la salmoquelina monoglucosilada. Posteriormente podría actuar MceD (linealización de la molécula de salmoquelina) o MceJ (unión covalente de la molécula de salmoquelina a la serina-84 de la MccE492). Figura adaptada de Nolan y cols. (2007).

B) La modificación consiste en un trímero de DHBS unido vía un enlace C-glicosídico a una β -D-glucosa la que se une al residuo 84 del péptido no modificado. MccE492 (7887 Da) es el péptido no modificado. Además se muestran los derivados modificados con Glc-DHBS (8272 Da), Glc-DHBS₂ (8495 Da) y Glc-DHBS₃ (8718 Da). Las diferencias de masa entre las diferentes especies se muestran en la parte superior. Figura adaptada de Vassiliadis y cols. (2007).

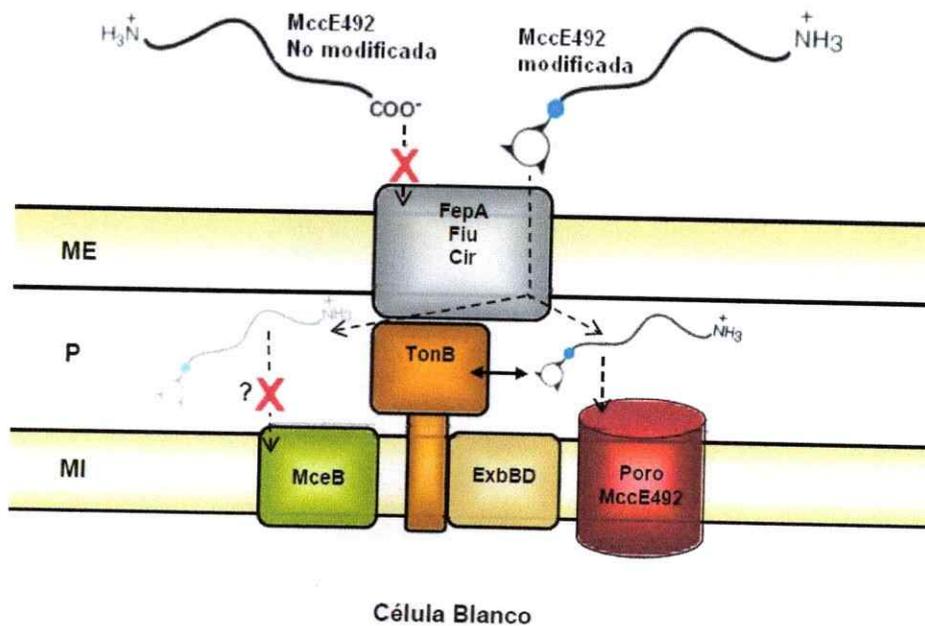


Figura 3. Modelo del ingreso de la MccE492 a la célula blanco.

La MccE492 modificada post-traduccionalmente ingresa a la célula blanco a través de los receptores de sideróforos FepA, Fiu y Cir, los cuales son energizados por el complejo TonB/ExbBD. La MccE492 no modificada no puede translocarse debido a que no es reconocida por estos receptores.

Una vez que la MccE492 se trasloca al periplasma y se inserta en la membrana interna con ayuda del complejo TonB/ExbBD, forma el poro que produce la despolarización de la membrana interna. La presencia de la proteína de la inmunidad (MceB) impide que la MccE492 lleve a cabo su actividad bactericida a través de un mecanismo que aún no se encuentra dilucidado.

ME: Membrana Externa; P: Periplasma; MI: Membrana Interna.

```

H47  ---MREITESQLRYISGAGGAPATSA-----NAAGAAAIVGALAGIPGGPILGVVVGAVSAGLTTAI-----GSTVSGSASSSAGGGS
E492 MELRMREISQKDLNLAFGAGETDPNTQLLNDLGNNMAWGAALGAPGGLGSAALGAAGGALQTVGQGLIDHGPVNVPIPVLIGPSWNGSGSGYNSATSSSGSGS
M    ---MRKLSENEIKQISGGDGDNDGQAEIPI--GSLAGTFISPGFGSIAGAYITGDKVHSWATTATVSPSPSPSGIGLS----SQFGSGRGTSSASSSAGGGS
I47  ---MREISDNMLDSVKGGMNLNGLP-----ASTNVIDLRGKDMGTVIDANGACWAPDTPSIIMY-----PGSGGPSYSMSSTSSANS GS

```

Figura 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los precursores de las microcinas M, H47, I47 y E492.

El alineamiento fue hecho con el programa Multalin, version 5.4.1. Los aminoácidos conservados en las cuatro microcinas están en rectángulos. La flecha indica el sitio de procesamiento durante la exportación. La línea roja indica el péptido líder (N-terminal) y la azul el dominio de captación (C-terminal). Se observa gran identidad en ambos dominios independientemente del dominio toxico. Figura adaptada de Azpiroz y cols. (2007)

1.2.2 Estructura modular de la MccE492

Debido a que la región C-terminal en las microcinas de clase IIb es muy conservada se propuso que esta zona es clave para la modificación postraduccional que caracteriza a la clase. Al fusionar cruzadamente los dominios de la microcina H47 y la colicina V se demostró que resultan intercambiables, generando proteínas quiméricas con la actividad de una microcina y el reconocimiento de otra. De este modo se comprobó que la microcina H47 y la colicina V poseen estructuras modulares, con un dominio de captación en el C-terminal y un dominio tóxico localizado en la región N-terminal (**Azpiroz y Laviña, 2007**).

El módulo de captación de la microcina H47 estaría ubicado en el C-terminal, específicamente en los últimos 10 aminoácidos. Alineamientos de esta región muestran una gran identidad entre las microcinas H47, I47, M y E492 (**Figura 4**), lo que sugiere que este "dominio" sería reconocido por los receptores de sideróforos de la misma forma para todas estas microcinas (**Azpiroz y Laviña, 2007**). Es muy probable que estos dominios se encuentren modificados postraduccionalmente mediante la unión covalente de una molécula tipo salmoquelina, del mismo modo que la MccE492, y que sea esta modificación una pieza importante en el reconocimiento del receptor (**Nolan y cols., 2007**).

1.2.3 Mecanismo de acción de la microcina E492.

Cuando la MccE492 se inserta en la membrana citoplasmática de la célula sensible, forma canales iónicos que llevan a la despolarización de la célula, a la pérdida del potencial de membrana y a una reducción drástica de los niveles de ATP (de Lorenzo y Pugsley, 1985; Lagos y cols., 1993; Baeza, 2003; Destomieux-Garzón y cols., 2003).

Para insertarse en la membrana, la MccE492 debe cruzar la membrana externa de las células sensibles, y como ya se mencionó, esta traslocación al espacio periplasmático ocurre por medio de los receptores de sideróforos tipo catecol FepA, Fiu y Cir (**Figura 3; Strahsburger y cols., 2005**). Estos receptores reconocen al derivado de salmoquelina con el que la microcina está modificada (**Figura 2**) permitiendo la interacción entre ambos, emulando una estrategia de "caballo de Troya" (**Fischbach y cols., 2006**).

La translocación de la MccE492 al periplasma de la célula sensible necesita el sistema transductor de energía TonB/ExbBD (**Figura 3; Pugsley y cols., 1986; Lagos y cols., 2001**). TonB es una proteína de 239 aminoácidos cuya función es transducir la energía de la membrana interna a la membrana externa de la célula, y que participa en el transporte activo de diversos sideróforos, metales y otros nutrientes (**Postle y Kadner, 2003**).

Para la transducción de la energía, TonB necesita de las proteínas ExbB y ExbD, que se localizan en la membrana interna de las células (**Larsen y cols., 1999**). Este complejo es el encargado de entregar energía a los transportadores presentes en la membrana externa para movilizar los sustratos hasta el periplasma (**Postle y Kadner, 2003**).

1.2.4 Clúster genético de la microcina E492

Los determinantes genéticos necesarios para la producción, el procesamiento, la exportación y la inmunidad de la MccE492 se encuentran en un segmento de 13 kilobases (kb) del cromosoma de *K. pneumoniae*. Este segmento fue clonado y expresado en *E. coli*, obteniéndose MccE492 con propiedades idénticas a la producida por *K. pneumoniae* RYC492 (Wilkens y cols., 1997). Al analizar este segmento se identificaron 15 marcos de lectura abiertos denominados *mceA*, B, C, D, F, E, J, I, H, G y *orfK,L,S2,S3* y X (Lagos y cols., 2009).

Los genes *mce* se ordenan en seis unidades transcripcionales (Figura 5) (Lagos y cols., 2001). La primera unidad corresponde a los genes *mceA* y *mceB*. El gen *mceA* corresponde al gen estructural de la MccE492 y codifica para una pre-proteína que es procesada al momento de su exportación en su extremo N-terminal produciéndose una proteína madura de 84 aminoácidos (Lagos y cols., 2001). El gen *mceB* codifica para una proteína integral de membrana de 95 aminoácidos que confiere inmunidad ante su propia actividad bactericida (Lagos y cols., 1999), y se sobrepone con la región que codifica para el péptido líder de la MccE492. Los genes *mceC*, *mceJ*, *mceI* y *mceD* están involucrados en el proceso de maduración (Lagos y cols., 2001). Cepas con mutaciones en los genes de la maduración producen microcina inactiva (Lagos y cols., 2001) y no modificada (Mercado y cols., 2008). El gen *mceC* es homólogo a una glicosil transferasa que participa en la síntesis del sideróforo salmoquelina, *mceD* es homólogo a una enteroquelina esterasa (*iroD*), *mceI* a una acil transferasa, en tanto que *mceJ* no tiene homólogo conocido pero es necesario para el proceso de maduración. Se ha demostrado *in vitro* que las cuatro proteínas codificadas en estos genes son responsables del proceso de modificación post-traducciona, tanto en la MccE492 silvestre como en un decapeptido sintético que contiene los 10 últimos aminoácidos del C-terminal

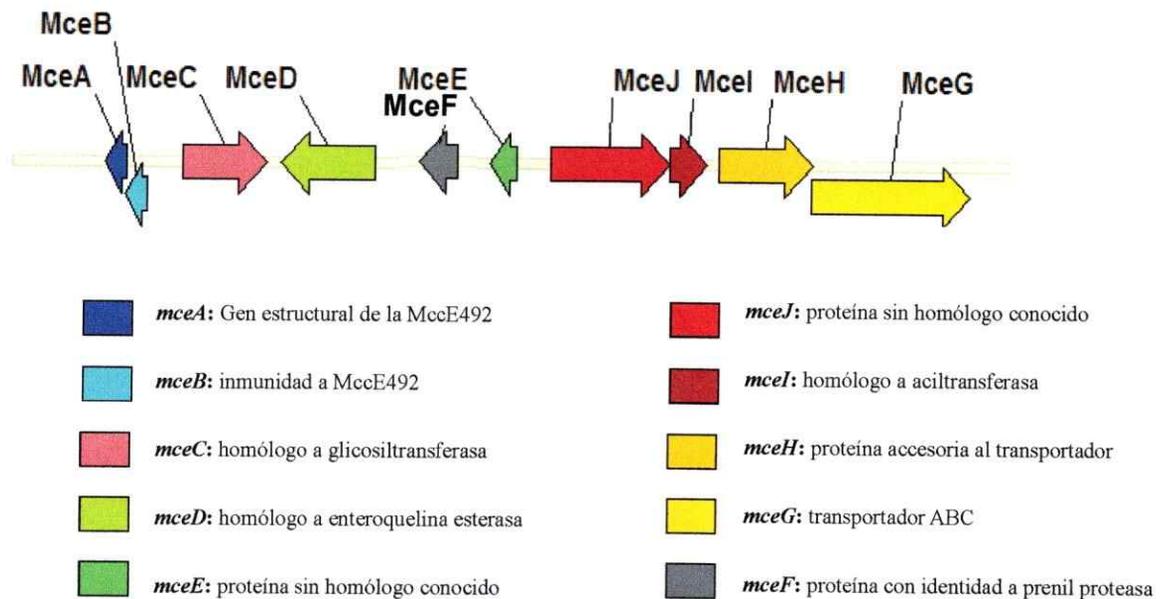


Figura 5. Esquema de la organización de los determinantes genéticos del sistema productivo de la microcina E492.

Las flechas representan la orientación de los distintos marcos abiertos de lectura que se encuentran en el fragmento de 13 kb que contiene al sistema productivo de la microcina E492. Se indican además sus funciones o las homologías. En amarillo se muestran los genes involucrados en la exportación, mientras que en rojo y rosado se muestran los relacionados con la maduración de esta microcina. En azul está el gen estructural y en celeste el gen de la inmunidad. En verde están los genes cuya función definitiva aún no ha sido asignada.

de la MccE492 (Nolan y cols., 2007). El gen *mceE* codifica para una proteína de 114 aminoácidos sin homólogo conocido. El gen *mceF* codifica para una proteína homologa a una prenil proteasa, pero se desconoce su función exacta en el sistema. Los productos de los genes *mceH* y *mceG* están involucrados en la exportación de la mceE492 (figura 1). El gen *mceG* tiene una alta identidad con los transportadores ABC del sistema de exportación tipo I, en tanto que *mceH* corresponde a la proteína accesoria del sistema de exportación (Lagos y cols., 2001).

1.3. Exportación de proteínas por sistemas ABC

En bacterias Gram negativas existen cinco sistemas de secreción de proteínas (sistemas tipo I, II, III, IV y auto-transporte). El sistema de secreción de tipo I, también conocido como sistema ABC dedicado, permite la exportación específica de proteínas desde el citoplasma al espacio extracelular sin pasar por un intermediario periplasmático (Delepelaire, 2004). Para esto, el sistema de transporte ABC necesita de una proteína accesoria periplasmática anclada a la membrana interna y una proteína de membrana externa perteneciente a la familia de TolC. El sistema tipo I es utilizado por la mayoría de las microcinas descritas hasta el momento (L, M, 24, H47, E492 y colicina V) (Braun y cols., 2002; Pons y cols., 2002; Lagos y cols., 2001). En el caso particular de la MccE492 el transportador ABC es la proteína MceG y la proteína accesoria es MceH (Figura 1). Para el reconocimiento de la proteína exportada se han descrito dos mecanismos; uno en el cual la señal de exportación se encuentra en el extremo carboxilo, y otro donde la señal de exportación se encuentra en el extremo amino de la proteína. La proteínas HylA (hemolisina) de *E. coli*, Has (hemóforo) de *Serratia marcescens*, algunas metaloproteasas de *Erwinia chrysanthemi* y *Pseudomonas aeruginosa* son exportadas mediante una secuencia señal ubicada en el extremo carboxilo. Esta

secuencia es una región rica en glicina, poco conservada que permanece junto con la proteína después de la exportación. Experimentos realizados intercambiando esta señal de exportación han permitido establecer que esta región determina la especificidad de la proteína por su exportador (Holland y cols., 2005). El segundo mecanismo es utilizado principalmente por los sistemas de exportación de microcinas y es similar al mecanismo descrito en los sistemas de exportación de bacteriocinas en bacterias Gram positivas. En ambos sistemas, las proteínas son sintetizadas como pre proteínas con una señal de exportación o péptido líder de aproximadamente 20 aminoácidos que presenta un motivo de doble glicina que sirve como sitio de procesamiento para una actividad peptidasa ubicada en el dominio N-terminal del transportador ABC (Michiels y cols., 2001; van Belkun y cols., 1997). El motivo de doble glicina está conservado en todos los péptidos líder de las proteínas exportadas por este tipo de transportador (Michiels y cols., 2001). El procesamiento es realizado por el propio transportador, el cual posee en el extremo amino un dominio de aproximadamente 160 aminoácidos que corresponde a una peptidasa (Biemans-Oldehinkel y cols., 2005; Wu y Tai., 2004).

1.4 Sideróforos de tipo catecol

Las bacterias elaboran y secretan quelantes de hierro de alta afinidad denominados sideróforos para solubilizar el hierro antes de transportarlo a su citoplasma. Los siderofóros suelen ocupar los grupos hidroxamato, α -hidroxilato y catecol como quelantes de hierro extremadamente efectivos (Neilands, 1995).

Dentro de los sideróforos de tipo catecol, la enteroquelina (figura 2A) es la más estudiada. Este sideróforo, aislado por primera vez desde *E. coli* y *Salmonella enterica* (Pollack y Neilands, 1970; O'Brien y Gibson, 1970), une hierro con una constante de afinidad extraordinariamente alta de 10^{-52} M (Crossa y Walsh, 2002). La enteroquelina consiste en un trímero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoilserina

(DHBS), cuya biosíntesis requiere en primera instancia de la vía del chiquimato (síntesis de aminoácidos aromáticos) para generar el corismato (Bentley, 1990). Posteriormente, a partir del corismato, una serie de reacciones gobernadas por la maquinaria codificada en el operón *entABCDEF* producen la enteroquelina (Crossa, 1989; Gehring y cols., 1997; Gehring y cols., 1998).

Una vez exportada la apo-enteroquelina (forma no unida a hierro), ésta captura hierro, pasa a su forma holo (unida a hierro) y es importada al medio intracelular principalmente por el receptor de sideróforos tipo catecol FepA o en menor medida por los receptores Fiu y Cir (Pugsley y Reeves, 1977). Una vez dentro de la célula es hidrolizada para liberar el hierro unido (O'Brien y cols., 1971).

Se ha descrito en *S. enterica* la presencia del locus *iroA*, conformado por dos operones convergentes *iroN* e *iroBCDE*, el cual codifica para proteínas que permiten la glicosilación de los bloques de DHBS que son las unidades que forman la salmoquelina, utilizando como sustrato la enteroquelina y UDP-glucosa como dador del grupo glicosil (Fischbach y cols., 2005); formando enteroquelina monoglucosilada (MGE), enteroquelina diglucosilada (DGE) e incluso enteroquelina triglucosilada (TGE), en reacciones sucesivas (figura 2B). Estas moléculas de enteroquelina glucosiladas han sido llamadas genéricamente salmoquelinas y se caracterizan por ser sideróforos de tipo catecol más hidrofílicos (Hantke y cols., 2003). La glicosilación de la enteroquelina cambiaría sus propiedades físicas y estéricas sin comprometer su actividad biológica (Fischbach y cols., 2006) por lo que a diferencia de la enteroquelina, la salmoquelina no sería secuestrada por la siderocalina, una proteína del sistema inmune innato de los mamíferos (Fischbach y cols., 2006). La proteína IroN, homóloga a FepA, es el receptor para la salmoquelina férrica y al igual que FepA y Cir es capaz de reconocer otros sideróforos (Hantke y cols., 2003).

1.5 División celular en bacterias

1.5.1 Fisión binaria

La mayoría de las bacterias se dividen por un proceso denominado fisión binaria; en el cual las células aumentan de tamaño y se separan en dos células hijas casi idénticas. El crecimiento es acompañado de la replicación y segregación de los cromosomas, recibiendo uno cada célula hija. Estudios genéticos y de biología celular determinaron la existencia de 10 proteínas esenciales para la división en *Escherichia coli*, cuya localización en el septum es crucial para la formación del complejo de división ya que sin alguna de ellas las células crecen como filamentos incapaces de dividirse (Vicente y cols., 2002).

En bacilos como *E. coli* la división involucra la invaginación de la membrana celular, seguido por la septación, en que la síntesis de la pared celular separa las células hijas. La septación involucra un cambio en la dirección de síntesis de péptidoglicanos sin afectar su funcionalidad (Buddelmeijer y cols., 2002). Actualmente se acepta un modelo secuencial de dependencia para la unión de estas proteínas donde primero llegan las proteínas de división tempranas que son principalmente citoplasmáticas (Figura 6). FtsZ es la primera proteína en llegar y al polimerizar forma la estructura denominada anillo Z, actuando como el punto de partida para la unión de FtsA y ZipA que lo conectan con el resto de las proteínas en la membrana. Las proteínas que siguen en la secuencia se denominan "proteínas de división tardía" siendo proteínas transmembrana principalmente periplasmáticas que poseen pequeños dominios citoplasmáticos dispensables, con la excepción de FtsL (Goehring y cols., 2005). El orden secuencial de las proteínas de división es: FtsZ > [FtsA, ZapA, ZipA] > (FtsE, FtsX) > FtsK > FtsQ > (FtsB, FtsL) > FtsW > FtsI > FtsN > amiC > EnvC, donde las proteínas en corchetes son independientes entre ellas pero dependientes de FtsZ y las entre paréntesis se ensamblan simultáneamente (Figura 7; Vicente y cols., 2002).

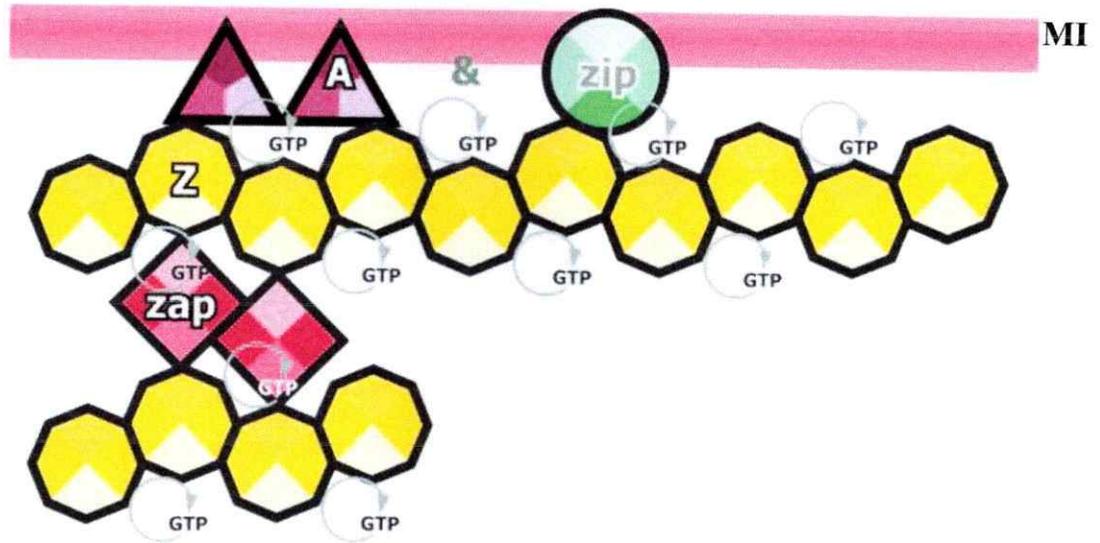


Figura 6. Esquema de la organización del divisoma bacteriano.

Proteínas de división temprana. Z, FtsZ; A, FtsA; Zip, ZipA; Zap; MI, membrana interna. El ensamblaje del anillo de FtsZ depende de FtsA y/o ZipA. La mantención del anillo Z es dependiente de energía ya que la polimerización de FtsZ requiere GTP. Figura adaptada de Vicente y cols., 2002.

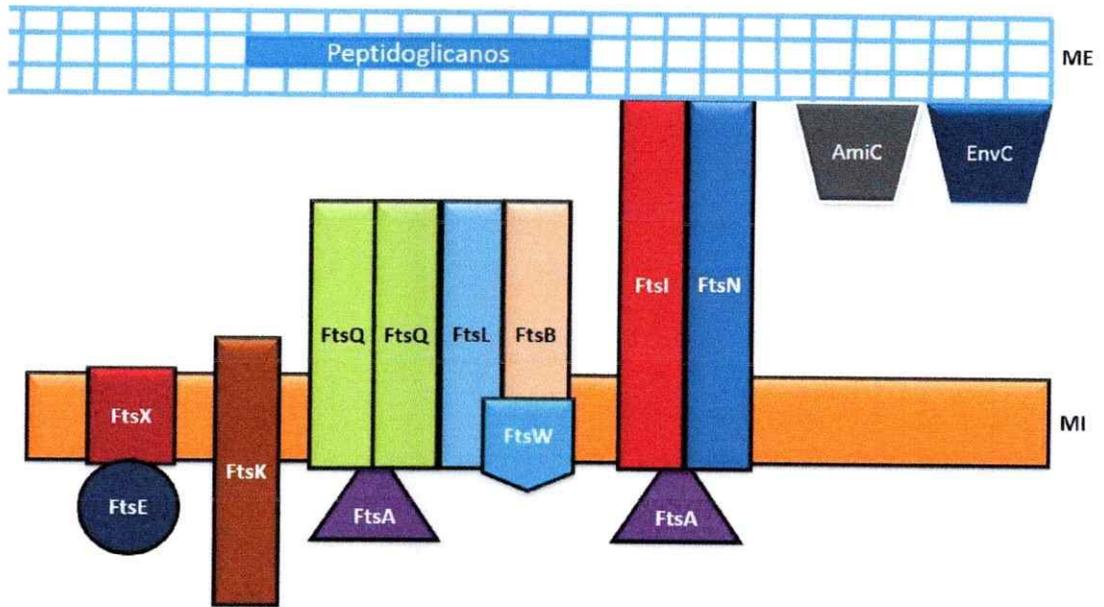


Figura 7. Proteínas implicadas en etapas tempranas y tardías de la división bacteriana.

Las proteínas se ordenan de izquierda a derecha. MI; membrana interna, ME; membrana externa. Figura adaptada de Vicente y cols. (2002).

1.5.2 Complejo FtsQ/FtsB/FtsL

Dentro de este complejo las proteínas transmembrana FtsQ/FtsB/FtsL son proteínas de membrana bitópicas con un pequeño dominio N-terminal citoplasmático y un gran dominio C-terminal periplasmático. Estas se encuentran en baja concentración dentro de la célula y son esenciales para la viabilidad celular (**González y col., 2009**). El complejo FtsQ/FtsB/FtsL actúan como conector entre las proteínas de división temprana (predominantemente citoplasmáticas, forman el anillo Z) y las proteínas de división tardías (predominantemente periplasmáticas, interactúan con la maquinaria de síntesis del péptidoglicano) (**González y cols., 2009, Goehring y cols., 2005**).

FtsL y FtsB son proteínas pequeñas (121 y 103 aa, respectivamente) con una zona periplásmica que contiene residuos de leucina separados por 7 aminoácidos, que forman un "cierre de leucina" formando estructuras "coiled-coil" a través de la cual interactúan. FtsB y FtsL son co-dependientes para su localización en la zona media de la célula y la depleción de FtsB resulta en la desaparición de FtsL indicando que FtsL requiere de FtsB para su estabilización (**Buddelmeijer y cols., 2004**). Las proteínas FtsL y FtsB interaccionan en ausencia de FtsQ y son capaces de reclutar las proteínas de división temprana. Para reclutar a las proteínas de división tardía, el complejo FtsB/FtsL necesita interaccionar con FtsQ formando el complejo FtsQ/FtsB/FtsL (**Figura 7; Villanels y cols., 2011**).

Debido a la interacción específica entre FtsB y FtsL, con su "cierre de leucina" que se forma entre sus dominios periplasmáticos, se plantea que es posible afectar su interacción agregando de forma exógena copias del dominio periplasmático de FtsB y así bloquear el reclutamiento de las proteínas de división tardía. Además debido a que los niveles de FtsB, FtsL y FtsQ en la célula están interrelacionados, ya que estas proteínas al interaccionar entre sí se estabilizan protegiéndose de la degradación (**González y col., 2009**), se presume que un

desbalance en las concentraciones de cualquiera de estas proteínas tendrá un efecto global sobre la concentración de las demás. Debido a la importancia del complejo FtsQ/FtsB/FtsL la disrupción de cualquiera de sus componentes debe tener un efecto nocivo sobre la célula.

Hipótesis

La MccE492 presenta, hacia el N-terminal, un péptido líder que actúa como un módulo; por lo que su presencia en una proteína quimérica le podría conferir la capacidad de exportación en presencia del sistema de exportación apropiado. Hacia el C-terminal la MccE492 presenta un módulo que permitiría la modificación postraduccional con una molécula tipo salmoquelina, y por ende una quimera que contenga este módulo sería susceptible de ser reconocida por células que expresan los receptores de sideróforo del tipo catecol.

El complejo periplasmático FtsQ/FtsB/FtsL, esencial para la división celular, es altamente regulado y un desbalance por la presencia exógena de alguno de sus componentes puede tener efectos nocivos sobre la bacteria blanco. Dentro de estas proteínas la pareja FtsB y FtsL parece ser especialmente importante debido a que su interacción precede a la formación del complejo FtsQ/FtsB/FtsL, por lo que se presume que su desbalance tendrá el mayor efecto nocivo. Esto las hace blancos ideales como antibióticos si se logra su ingreso al periplasma.

Objetivo general

Determinar la modularidad de los extremos N- y C- terminal de la MccE492 e investigar el efecto antibiótico de una proteína quimérica entre MccE492 y FtsB sobre células sensibles.

Objetivo Específicos

1. Construcción de una proteína quimérica entre los dominios N- y C- terminal de la microcina E492 y el dominio periplasmático de FtsB.
2. Evaluar la funcionalidad de los módulos N- y C- terminal en la proteína quimérica.
3. Evaluar la toxicidad de la proteína quimérica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales.

2.1.1. Reactivos.

Los reactivos bis-acrilamida, SDS, fosfato di-ácido de sodio, estándar de bajo peso molecular para péptidos, glucosa, Tween 20, tricina, L-aminoácidos, tiamina, ácido p-cumárico se compraron en Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O., USA.

Las membranas de nitrocelulosa VSWP02500 para remover las sales de los ácidos nucleicos pre-electroporación se obtuvieron en Millipore, USA.

Las membranas de nitrocelulosa para western blot, acrilamida, persulfato de amonio, TEMED y cubetas de electroporación se compraron en BioRad Laboratories Inc., Hercules, C.A., USA.

El azul de bromofenol, cloroformo, azul de coomassie, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, acetonitrilo, cloruro de calcio y sacarosa se compraron en Merck, Darmstadt, Alemania.

El cloruro de sodio, agar, tris, glicina, glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, β -MeOH, citrato de sodio, agarosa, acetato de amonio, marcadores de peso molecular para fragmentos de DNA escala 1 kb y escala 100 pb, se compraron en Winkler, Santiago, Chile.

El cloruro de potasio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio se obtuvieron de Fluka Chemie AG, Messersmittstr, Suiza.

Los reactivos de grado técnico: ácido acético, etanol, metanol, ácido clorhídrico se adquirieron en TCL, Santiago, Chile.

La triptona, la bactotriptona, los casaminoácidos y el extracto de levadura se compraron en DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

El hidróxido de sodio se obtuvo en J. T. Baker, Estado de México, México.

La kanamicina, y el cloranfenicol se compraron en el Laboratorio Bestpharma S.A.

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

El anticuerpo secundario IgG-HRP anti-conejo preparado en cabra se obtuvo en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA.

La membrana de dialis MWCO: 6-8,000 se compró en Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O., USA.

El marcador de peso molecular, Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder, se compró a

El reactivo de Bradford, se compró a Gene-X-press. Santiago, Chile.

El inhibidor de proteasas se compró a ROCHE Chile, Santiago, Chile.

Los partidores diseñados se compraron a GrupoBios S.A., Santiago, Chile.

2.1.2. Medios de Cultivo.

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

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

M9 suplementado (M9-S). El medio M9 se suplementó con CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄·7H₂O 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1 mg/mL, casaminoácidos 1 mg/mL, como fuente de carbono glucosa 0,2% p/v.

Agar blando. Se prepararon tubos con medio mínimo M9 y 0,7% p/v de agar agar.

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

2.1.3. Amortiguadores.

Amortiguador TEN. 10 mM Tris, 10 µM EDTA y 100 mM NaCl. pH 8.

2.1.4. Cepas bacterianas.

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

2.1.5. Plasmidios y vectores.

En la Tabla 2 se describen los plasmidios y vectores utilizados en este trabajo

2.1.6. Partidores.

En la Tabla 3 se muestran los partidores utilizados en este trabajo.

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

| Cepa | Genotipo | Fuente |
|-----------|---|----------------|
| BW25113 | <i>rrnB</i> DE <i>lacZ</i> 4787 HsdR514 DE(<i>araBAD</i>)567 DE(<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph-1</i> | Colección KEIO |
| BL21(DE3) | F ⁻ <i>ompT</i> gal [dcm] [lon] <i>hsdSB</i> (rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) | Novagen |
| Top10 | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ ⁻ | Invitrogen |

Tabla 2. Plásmidos y vectores utilizados en este trabajo.

| Plásmidos | Características relevantes | Fuente o referencia |
|--------------|--|-----------------------|
| pACYC184 | Plasmidio de propósito general Cm ^r Tet ^r | Chang y Cohen, 1978 |
| pJAM434 | Derivado de pJ que fue construido en el cosmidio pHC79 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> , posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido con respecto a pJAM229. Es un pobre productor de MccE492 activa. Amp ^r | Wilkens y cols., 1997 |
| pJAM229 | Derivado de pJ que fue construido en el cosmidio pHC79 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> , contiene los genes para la producción de la MccE492 activa. Amp ^r | Wilkens y cols., 1997 |
| pJEM15 | Derivado de pJAM229, posee la duplicación de un fragmento interno de 2,5 Kb <i>Sall</i> (<i>mceF</i>). Es un sobreproductor de MccE492 activa. Amp ^r | Wilkens y cols., 1997 |
| np220 | pJAM434 <i>mceA</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r | Lagos y cols., 2001 |
| p157 | Derivado de pT7-7 que lleva el gen <i>mceB</i> en un fragmento <i>NdeI-EcoRI</i> de 0,3 Kb. Amp ^r | Lagos y cols., 1999 |
| pBAML | Derivado de pACYC184. Contiene los genes <i>mceBA</i> bajo el mando del promotor natural de la MccE492, clonado en el sitio <i>BamHI</i> . Cm ^r | Colección Laboratorio |
| pCA24N::ftsB | Derivado de pCA24N. Contiene el gen <i>ftsB</i> bajo el mando del promotor inducible por IPTG PT5- <i>lac</i> , clonado en el sitio <i>StuI</i> . Cm ^r | Colección ASKA |
| pBAD33 | Derivado de pACYC184. Permite modular la expresión transcripcional de genes bajo el promotor inducible por Arabinosa pBAD. Cm ^r | Guzman y cols., 1995 |
| pEDU | Derivado de pBAD33. Contiene los genes <i>mceB</i> y la secuencia quimérica MccE492-FtsB bajo el mando del promotor pBAD, clonados entre los sitios <i>SacI</i> y <i>HindIII</i> . Cm ^r | Este trabajo |

Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo

| Partidor | Secuencia (5' -> 3') |
|-----------------|--|
| P1 | CCTTTGCACAGAGCTCTCAATGCGCTTCAGTTAACGGATAAAACTTATGAC |
| P2 | CATCATCATTGACGCGGGTATAGTCATGTATATACCTGGATCGGTCTCTCCTGCACCAAAAG |
| P3 | CTTTTGGTGCAGGAGAGACCGATCCAGGTATACATGACTATACCCGCGTCAATGATGATG |
| P4 | GATGTTGCGCTGTTATAACCACTACCGCTACCTCGATTGTTTTGCCCCGCAGACTGT |
| P5 | AGCTAACAAAACGGGGCGTCTGACAGGTAGCGGTAGTGGTTATAACAGCGCAACATC |
| P6 | CGACAAGCTAAAGCTTTGACTTTAGGCATAAGGATCTCGCACCACC |
| PB1p | CGGAGAAGGATTTTCTTGTGCG |
| PB2 | ATTCATTGTGGAGCTCCTCCTGTTTTCTTTTCAGTCATGGC |
| PmcfF | ATCGATAACGTAGTGATACTTACAATAAATGGAGCTAAGAATG |
| PmcfR | ATTCGCTAGCCCAAAAAACGG |
| Mcc-Fus-F | ACAGGAGAAATCTAGAGGCCGGCCGGCCAATAAAGAGAATACGC |
| LacZ-Pelic-R | CGGTA ^{<i>CTCAGGCGCCACCTATTTTTGACACCAGACCA</i>} |

Se indica en **negrita** los sitios *SacI*, subrayados los sitios *HindIII* y en **negrita con cursiva** los sitios *ClaI*.

2.2. Métodos.

2.2.1. Técnicas moleculares.

Los procedimientos de biología molecular no detallados, como aislamiento del DNA plasmidial, preparación de las células electrocompetentes, transformación mediante electroporación, digestión con las enzimas de restricción, etc., se realizaron utilizando métodos estandarizados (Sambrook y cols. 1989; Ausubel y cols., 1992).

2.2.2. Precipitación de proteínas con TCA

Se creció la cepa Top10 np220 de *E.coli* con el vector pBAD33 o con pEDU en medio LB a 37 °C, 220 rpm por 22 h hasta una DO₆₀₀ de 1,5. Se obtuvo el sobrenadante por medio de centrifugación y se trató con TCA en hielo a una concentración final de 10% p/v. Se incubó 30 minutos en hielo antes de centrifugar a 15.000 g por 30 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó en acetona dos veces para neutralizar la muestra. El precipitado se resuspendió en amortiguador de carga 4x y se analizó en un SDS-PAGE.

2.2.3. Purificación de la MccE492.

Se creció la cepa top10 pBamI np220 de *E.coli* en medio mínimo M9-S a 37° C, 220 rpm por 22 h hasta una DO₆₀₀ de 1,0. Un litro de sobrenadante de cultivo se filtró a través de un cartucho de fase reversa Sep-Pack C-18 (Waters). El cartucho se lavó con 3 mL de metanol 60% y 3 mL de acetonitrilo 25%. La microcina se eluyó con 3 mL de acetonitrilo 50%.

2.2.4. Purificación de la Proteína Quimérica intracelular.

Se creció la cepa top10 pEDU np220 de *E.coli* en medio LB a 37° C, 220 rpm hasta una DO₆₀₀ de 0,6 y luego se indujo el promotor pBAD con arabinosa 0,2% final. Después de 6 h de inducción se sedimentaron las células centrifugando a 15.000 g por 30 minutos, suspendiéndolas en amortiguador TEN y congelando a -80 °C.

Posteriormente las células se lisaron por calor a 95 °C por 30 min en un baño María y se centrifugó a 15.000 g por 30 min para eliminar los restos insolubles, recuperando el sobrenadante. Éste se precipitó con porcentajes crecientes de sulfato de amonio, usando pasos de 5%, en el rango de 25% a 90%. Se recuperó la mayor cantidad de proteína quimérica en la fracción 35-40%. Por último se dializó contra Amortiguador TEN para eliminar el sulfato de amonio.

2.2.5. Fraccionamiento subcelular.

Se creció la cepa Top10 np220 de *E.coli*, con el vector pBAD33 o con pEDU en medio LB a 37° C, 220 rpm hasta una DO₆₀₀ de 0,6 y luego se indujo el promotor pBAD con arabinosa 0,2% final. Después de 6 horas de inducción se sedimentaron las células centrifugando a 15.000 g por 30 minutos, suspendiéndolas en amortiguador de lisis con bisulfito sódico 100 mM, DTT 1 mM e inhibidor de proteasa ROCHE según sus especificaciones (una pastilla cada 50 ml). Las bacterias se lisaron por sonicación por 5 min a 45 Wats y posteriormente se ultracentrifugaron a 100.000 g por 1 h para separar la fracción de proteínas citoplasmáticas (sobrenadante) de la fracción de membrana y los cuerpos de inclusión (sedimento). El sedimento se solubilizó en amortiguador de lisis con 0,3% de Tritón X-100 y 0,5% de ácido desoxicólico, agitando a 4 °C por una hora. Posteriormente se ultracentrifugó a 100.000 g por 30 min separando el sobrenadante con la fracción de proteínas de membrana, del sedimento con la fracción de cuerpos de inclusión. Esta última se solubilizó en urea 8M con agitación toda la noche.

2.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) y tinción.

Los geles se prepararon con tres fases: separadora, espaciadora y concentradora. El gel separador consistió en 16,5% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1% y glicerol al 10%. El gel espaciador consistió en 10% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1%. El gel concentrador contenía 3% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5; SDS 0,1%. A cada una de estas soluciones se les agregó 0,033% de APS y 2,2 mM de TEMED. La solución de corrida para el cátodo fue Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1% y para el ánodo Tris-HCl 0,2 M pH 8,9. A cada muestra de 10 μ L se le agregó 5 μ L de amortiguador de carga 4X (glicerol 40%; Tris-HCl 50 mM pH 7,6; SDS 10%; β -MeOH 20%; azul de bromofenol 0,04% p/v). La mezcla se incubó a 95° C durante 10 min. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE. Como marcador de peso molecular se utilizó "Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder" (10-170 KDa), que contiene proteínas con las siguientes masas: 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 y 10 kDa. Las bandas de las proteínas vienen pre teñidas.

Los geles se tiñeron con plata de acuerdo al método de **Blum y cols (1987)** o con azul de Coomassie R-250 0.1% en una solución metanol 50%, ácido acético glacial 10%.

2.2.7. Western blot.

2.2.7.1. Electrotransferencia y exposición a anticuerpos.

Las proteínas del gel de la SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 90 min a 100 V, 500 mA y -20° C empleando amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20%) previamente enfriado. La membrana se bloqueó con leche descremada *Svelty* al 5% en TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, Tween 0,1%) durante toda la noche a 4° C.

Luego se incubó con el anticuerpo primario policlonal de conejo contra el fragmento C-terminal de la MccE492 [SGSGYNSATSSSSGSGS] (Mercado y cols., 2008) (dilución 1:1.000) durante 1 h, seguido de 3 lavados con amortiguador TBS-Tween. A continuación se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario anticonejo preparado en cabra y conjugado con peroxidasa (dilución 1:20.000). La membrana se reveló mediante electroquimioluminiscencia.

Como marcador de peso molecular se empleó "Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder" (10-170 KDa), que contiene proteínas con los siguientes pesos: 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 y 10 kDa.

2.2.7.2. Reacción colorimétrica fosfatasa alcalina.

La membrana se reveló en 10 mL de Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM y $MgCl_2$ 5 mM con 66 μ L de NBT (en DMF 70%) y 32 μ L de BCIP 1% (en DMF 100%). La membrana se dejó reaccionar entre 5 y 10 min, dependiendo de la intensidad de la señal obtenida. Posteriormente la reacción se detuvo con H_2O nano pura.

2.2.8. Espectrometría de masas MALDI-TOF.

Las muestras purificadas se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (CEPEDEQ, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile). La matriz ácido sinapínico (SA) se preparó a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% v/v 1:2. Se prepararon diluciones 1:2 de las muestras con la matriz y se depositaron 2 μ L de cada una de las diluciones en una placa porta muestra micro scout. Los espectros se obtuvieron en un equipo Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Inc., MA-USA). Previo a la obtención de los espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo correspondiente a una mezcla de péptidos de masas 5.000-17.000 Da. Para la obtención de los espectros se trabajó en modo ión positivo y detección lineal. Los

espectros finales corresponden a espectros sumados correspondientes a 10 barridos de 40 disparos de láser aplicados en diferentes puntos tomados al azar de las muestras previamente preparadas en placa.

2.2.9. Detección y cuantificación de la actividad bactericida.

2.2.9.1. Preparación de placas de césped.

Sobre placas de agar M9-S se esparcieron 4 mL de agar blando fundido en el que se incluyó 150 μ L de un cultivo bacteriano crecido hasta fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,6-0,7$). Las cepas bacterianas que portan los plasmidios recombinantes se crecieron en medio líquido o en placas suplementadas con los antibióticos correspondientes, a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 100 μ g/mL, cloranfenicol 50 μ g/mL, y kanamicina 50 μ g/mL. Éstos fueron preparados según lo descrito por Sambroock y cols. (1989).

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

Para la cuantificación de la actividad bactericida de las muestras se realizaron diluciones seriadas en base 2 en agua nanopura estéril. Se tomaron alícuotas de 3 μ L de cada una de las diluciones y se depositaron sobre placas agar-M9-S con un césped de la cepa de interés, que se formó con 4 mL de agar blando fundido y 150 μ L de un cultivo en medio LB crecido hasta fase exponencial con los antibióticos correspondientes según la cepa. Las placas se incubaron a 37° C durante 14-16 h, y el título de la muestra se expresó como la última dilución en base 2 que presentó un halo de inhibición del crecimiento sobre el césped indicador.

2.2.9.3. Preparación de esferoplastos.

Los esferoplastos se prepararon de acuerdo a lo descrito por **Weiss (1976)**. La cepa sensible se creció en 100 mL de medio M9 suplementado con glicerol al 0,5% p/v hasta una OD₆₀₀ de 0,5. Las células se colectaron por centrifugación, se lavaron 2 veces con 20 mL de 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, y se resuspendieron en 20 mL de 100 mM Tris-HCl, 20% sacarosa, pH 8,0. Mientras se mantenía una agitación constante, se adicionaron lentamente 2 mL de una solución de 0,1 M EDTA, pH 8,0, y se incubó por 15 min. Posteriormente, lentamente se adicionó 1 mL de una solución 2 mg/mL de lisozima y se incubó por 15 min. En forma rutinaria la cantidad de esferoplastos se determinó por la disminución del título celular después de diluciones seriadas en agua (solución hipotónica) *versus* la obtenida en presencia de sacarosa.

2.2.9.4. Ensayos de sensibilidad a MccE492 sobre esferoplastos.

Se incubaron durante 20 min alícuotas de 100 µL de esferoplastos con 100 µL de muestra de MccE492 en la concentración deseada y resuspendida en el amortiguador Tris-HCl, 100 mM, 20% sacarosa, pH 8,0. Se sembraron diluciones seriadas en el mismo amortiguador sobre placas agar-LB y el título celular se determinó mediante el conteo de UFC (unidades formadores de colonias). El porcentaje de viabilidad de los esferoplastos se estimó respecto del control sin tratamiento con MccE492.

Para calcular el IC50 los datos de viabilidad obtenidos a distintas concentraciones de la proteína quimérica se ajustaron usando el programa Sigmaplot 11 con la ecuación $inh = \min inh + \frac{\max inh - \min inh}{1 + [Q]^b / 10^{b \log IC50}}$, donde *inh* es el porcentaje de inhibición, *b* un factor de corrección y *[Q]* es la concentración de la proteína quimérica en µMolar.

3. RESULTADOS

3.1. Generación de la proteína quimérica MccE492-FtsB por medio de megapartidores.

Para la construcción del plásmido de la proteína quimérica por PCR se utilizó el plásmido pCA24N::*ftsB* (ASKA) como templado para la región periplasmática de *ftsB* la cual se amplificó con los partidores P3 y P4. El plásmido pBAML se utilizó como templado de la zona N- y C-terminal del gen *mceA* usando los partidores P1-P2 y P5-P6 respectivamente.

La estrategia que se utilizó para generar la secuencia quimérica fue diseñar partidores capaces de hibridar tanto con la secuencia codificante que corresponde al N- o C- terminal de la MccE492 y simultáneamente con la zona periplasmática de FtsB. De este modo el partidador P2, que fue diseñado para la secuencia N-terminal del gen *mceA*, cuenta con una cola capaz de hibridar con la primera zona codificante de la región periplasmática de *ftsB*; y el partidador P3, diseñado para la primera zona de la región periplasmática de *ftsB*, cuenta con una cola capaz de hibridar con la secuencia 3' de la secuencia N- terminal del gen *mceA*. Los productos generados por P1-P2, P3-P4 y P5-P6 cuentan cada uno con distintas zonas de hibridación de 40 pb donde sus secuencias son complementarias. Debido a estas zonas, los productos de las amplificaciones hibridan y con un nuevo paso de elongación se genera una única secuencia quimérica denominada P1-P6 (Figura 8A y 8B).

Posteriormente, el segmento P1-P6 se clonó en el vector pBAD33 usando los sitios de cortes agregados a la secuencia de los partidores P1 y P6 (*SacI* e *HindIII*, respectivamente) generando el plásmido denominado pEDU (Figura 9A y 9B).

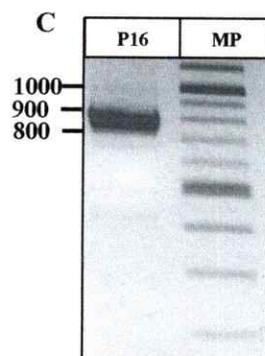
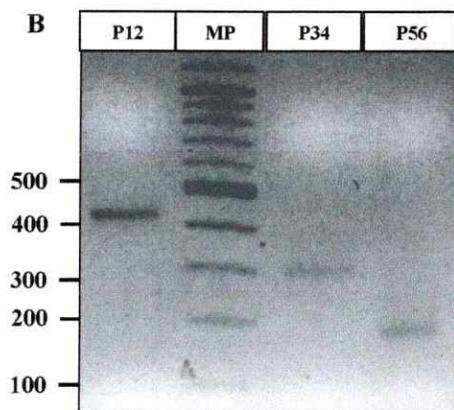
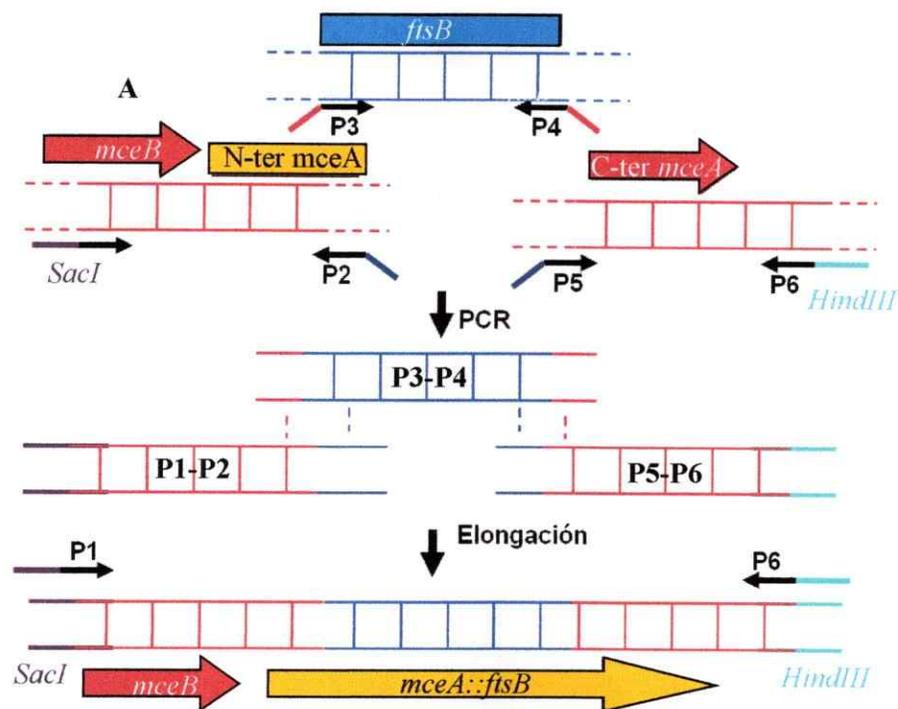


Figura 8. Estrategia para la generación de la secuencia quimérica *mceA::ftsB*.

(A) Diagrama de los pasos de hibridación y amplificación, en azul las secuencias provenientes del sistema de la *MccE492* y en rojo el gen *ftsB*. Los partidores usados se numeran desde P1 a P6 y las zonas de estos que hibridan con el producto de la amplificación del otro gen se señalan como líneas perpendiculares conectadas con líneas punteadas a la zona donde hibridan. (B) Gel de agarosa 2,5% con los productos de PCR obtenidos con los partidores P1-P2 (P12, tamaño esperado 364 pb), P3-P4 (P34, tamaño esperado 305 pb) y P5-P6 (P56, tamaño esperado 140 pb). (C) Gel de agarosa 2,5% con el producto de la elongación de la hibridación de los fragmentos P12, P34 y P56 generando el fragmento P16 (tamaño esperado 774 pb). PM: marcadores de peso molecular escala 100 pb a 1 kb.

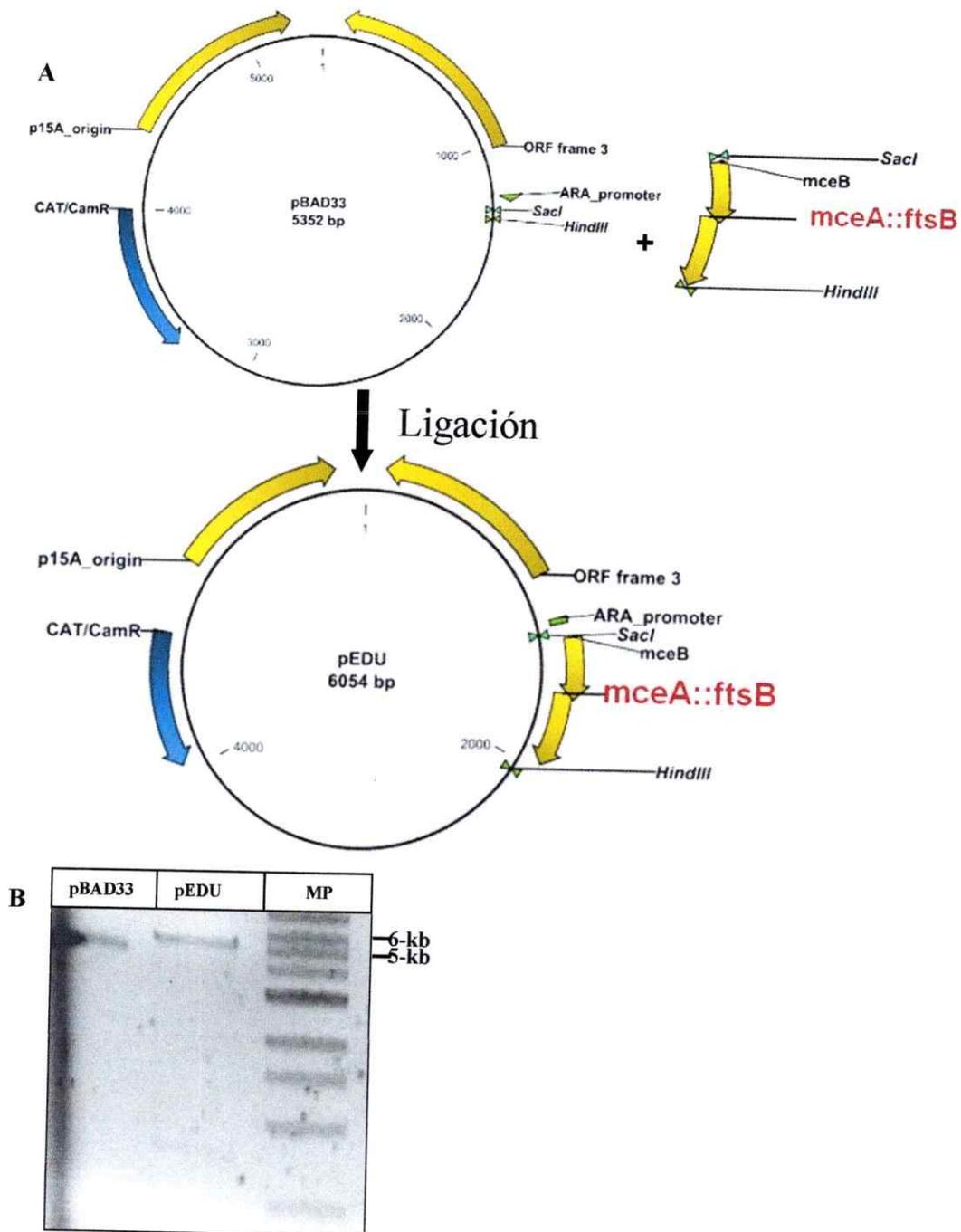


Figura 9. Clonamiento de la secuencia quimérica entre *mceA* y *ftsB* en el vector pBAD33 entre los sitios *SacI* y *HindIII*.

(A) Estrategia para el clonamiento de la secuencia quimérica. Se cortó el fragmento P16 y el vector pBAD33 usando los sitios de corte *SacI* e *HindIII*. Posteriormente se ligaron ambos fragmentos generando el vector pEDU.

(B) Gel de agarosa 1% con los plásmidos pBAD33 (5352 pb) y su derivado pEDU (6054 pb), ambos linerizados con la *SacI*.

PM: marcadores de peso molecular escala 100 pb a 1 kb.

3.2. Producción de la proteína quimérica.

Para comprobar que la proteína quimérica se expresa, se hicieron extractos totales de la cepa de *E.coli Top10 np220* que porta el plásmido pEDU o pBAD33, inducido con arabinosa. El plásmido np220 cuenta con todo el sistema genético de la MccE492 pero posee una mutación en el gen estructural *mceA* por lo que no produce MccE492. De este modo la proteína quimérica es el único sustrato del sistema de modificación y exportación de *np220*.

Los extractos totales de *E.coli Top10* portando los plasmidios np220/pEDU, y np220/pBAD33 se sometieron directamente a electroforesis en SDS-PAGE (**Figura 10 A**, proteínas totales) o westernblot usando el anticuerpo contra el C-terminal de la MccE492 (**Figura 10 B**, proteína quimérica). Se observó que en la cepa con el plásmido pEDU después de 6h de inducción, se produce una proteína con una masa molecular compatible con la proteína quimérica (**Figura 10 A Ed_{6h}**) y que esta banda desaparece a las 8 horas (**Figura 10 A Ed_{8h}**). Esta misma banda de proteína da señal positiva en un westernblot contra el C-terminal de la proteína (**Figura 10 B Ed_{6h}**) y en el control negativo con el vector pBAD33 no da señal (**Figura 10 B 33_{6h}**). Debido a que el anticuerpo es policlonal se observa una banda inespecífica en el westernblot (**Figura 10 B**, flecha roja) tanto en la cepa con el plásmido pEDU como con pBAD33.

Se concluye que la proteína quimérica se sintetiza, pero que esta expresión cesa entre las 6 y 8 horas de inducción.

3.3. Precitación de la proteína quimérica desde el sobrenadante.

Para comprobar la exportación de la proteína quimérica, se estudió la presencia de la proteína en el medio de cultivo por medio de una precipitación de proteínas totales con TCA. Las bacterias se sedimentaron, separándolas del sobrenadante al cual se añadió TCA 10% final. No se identificó ninguna banda del peso esperado

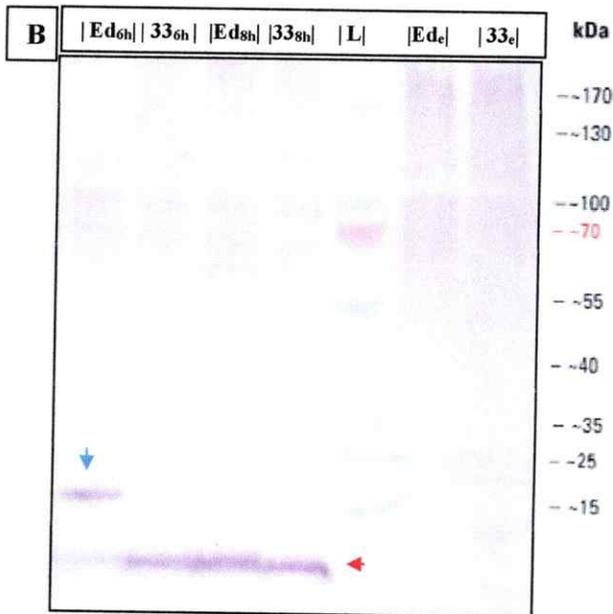
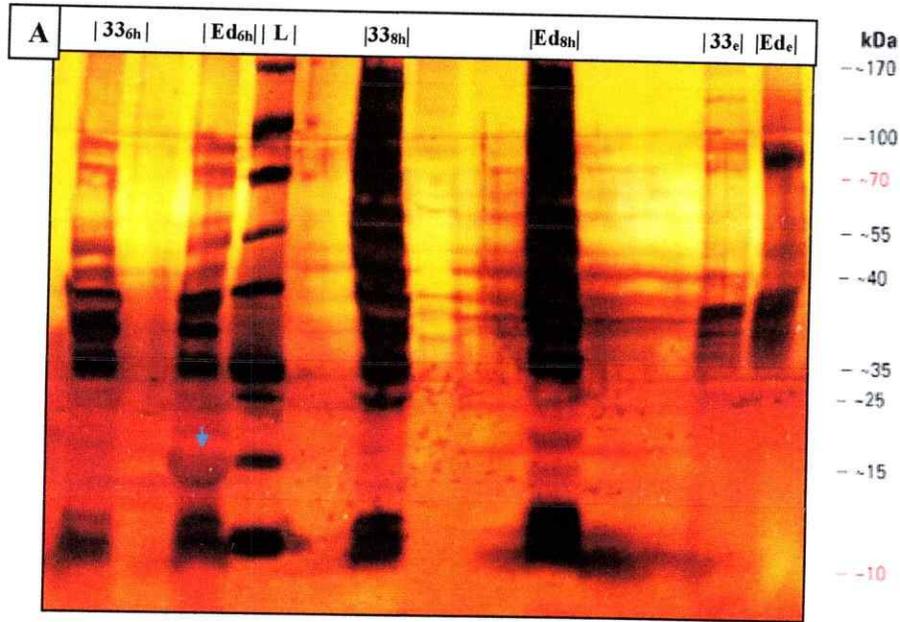


Figura 10. SDS-Page y westernblot de proteínas totales y extracelulares.

La cepa *Top10 np220* de *E.coli*, con el vector pBAD33 (**33**) o con pEDU (**Ed**), se indujo con arabinosa 0,2% entre 6 (**33_{6h}** y **Ed_{6h}**) y 8 horas (**33_{8h}** y **Ed_{8h}**). Las proteínas totales del sobrenadante del cultivo se precipitaron con TCA 10% y se solubilizaron en amortiguador TEN (**33_e** y **Ed_e**). Se identificaron la proteína con tinción de plata (**A**) o westernblot con un anticuerpo anti C-terminal de la MccE492 (**B**).

Se indica la proteína quimérica con una flecha celeste y una banda inespecífica del anticuerpo con una flecha roja.

L: marcadores de peso molecular escala 15 a 170 kDa.

para la proteína quimérica (**Figura 10A**, Ed_e) o señal en el westernblot (**Figura 10B**, Ed_e). Se observa que el tratamiento con TCA 10% precipitó proteínas de la muestra (**Figura 10A**, Ed_e y **33_e**) demostrando que la precipitación de proteínas totales ocurre. Se concluye que la proteína quimérica no se exporta.

3.4. Determinación de la localización intracelular de la proteína quimérica.

Una explicación para la incapacidad de la proteína quimérica para exportarse es su que no estaría disponible para la exportación, por agregación en cuerpos de inclusión o asociación a membrana. Para descartar esta posibilidad se determinó la localización intracelular de la proteína por fraccionamiento celular (**Figura 11**). La proteína quimérica se detectó en la fracción citoplasmática pero no en la fracción de membrana o en cuerpos de inclusión (**Figura 11**, Ed_i). Nuevamente se observan bandas inespecíficas como en la **figura 10**.

Se concluye que la falta de exportación no es debido a que la proteína quimérica está formando cuerpos de inclusión o asociada a membrana, sino porque el péptido señal en el extremo N-terminal de la proteína quimérica parece no ser suficiente para la exportación.

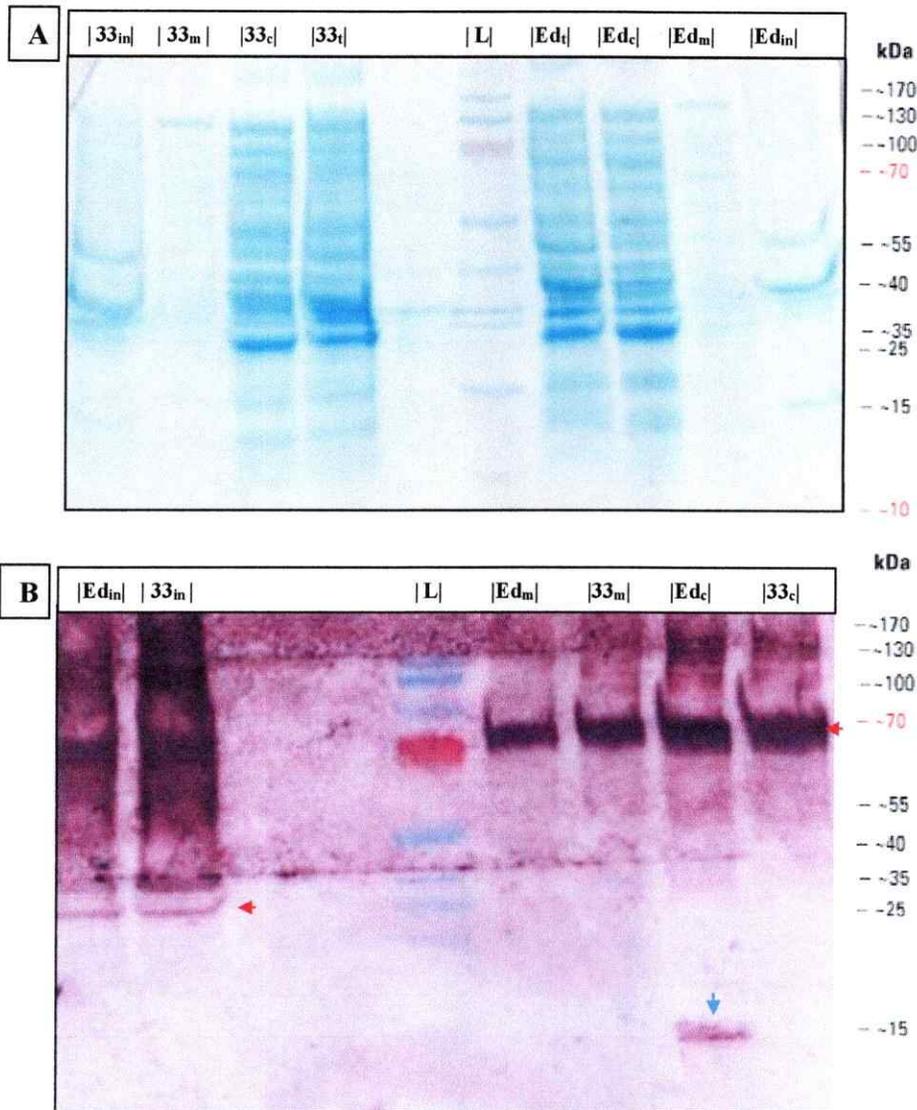


Figura 11. SDS-Page y westernblot de las proteínas separadas por localización subcelular.

La cepa de *E.coli top10 np220* con el vector pBAD33 (**33**) o con pEDU (**Ed**) se indujo con arabinosa 0,2% por 6 h. Las proteínas totales (**Ed_t** y **33_t**) se separaron en proteínas citoplasmáticas (**Ed_c** y **33_c**), proteínas de membrana (**Ed_m** y **33_m**) y cuerpos de inclusión (**Ed_{in}** y **33_{c_{in}}**). Se identificaron las proteínas con azul de Coomassie (**A**) o westernblot con un anticuerpo anti C-terminal de la MccE492 (**B**). Se indica la proteína quimérica con una flecha celeste y las bandas inespecíficas del anticuerpo con una flecha roja.
L: marcadores de peso molecular escala 15 a 170 kDa.

3.5. Purificación de la proteína quimérica intracelular.

A partir de cultivos de la cepa *E.coli Top10 np220* complementada con *pEDU* o *pBAD33* (control negativo), se purificó la proteína expresada intracelularmente (Figura 12).

En el primer paso de purificación se eliminó gran parte de las proteínas intracelulares mediante una denaturación térmica. Posteriormente se concentró la muestra precipitando las proteínas con 10 volúmenes de acetona y solubilizando en amortiguador TEN (Figura 12, Ed₁). En el segundo paso de purificación, se fraccionó la muestra del paso 1 usando distintos porcentajes de sulfato de amonio. La proteína quimérica precipitó a una saturación del 47% de sulfato de amonio (Figura 12, Ed₂).

3.6. Espectrometría de masa de la proteína quimérica.

En el espectro de masa MALDI-TOF analizado (Figura 13A) se observan varias señales, dentro de las cuales hay un pico con una masa de 12428 compatible con la proteína quimérica, cuyo peso esperado de 12423.47. Se hizo una aproximación de este pico para analizarlo en más detalle y buscar otros picos cercanos con una masa compatible con las formas modificadas de la proteína (Figura 13B). No se observó ninguna señal para los valores de las formas modificadas de la proteína quimérica (Figura 13B, líneas rojas). Se observan otros picos a la derecha del pico de masa 12428 (Figura 13B, flechas verdes). Estos tienen masa de 12452 (12428 +24), 12492 (12428 +64) y 12523 (12428 +95). Lo más probable es que sean aductos de la proteína quimérica con iones de sales presentes en la muestra (Zhang y cols., 2002).

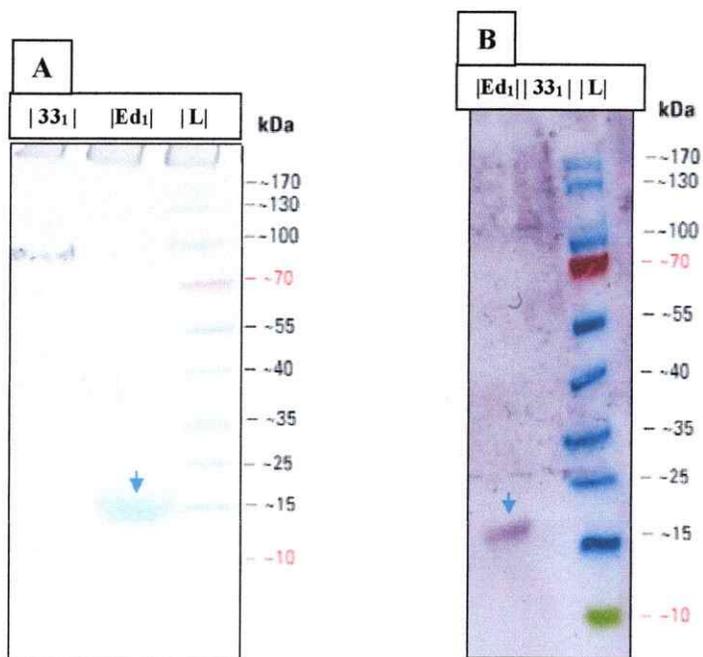


Figura 12. SDS-Page y westernblot de la purificación de la proteína quimérica.

La cepa de *E.coli* Top10 np220 con el vector pBAD33 (33) o con pEDU (Ed) se indujo con arabinosa 0,2% por 6 h. Se purificó la proteína quimérica mediante denaturación térmica seguido de precipitación con sulfato de amonio 35-40% (Ed₁ y 33₁). Se identificaron las proteínas con azul de Coomassie (A) o westernblot con un anticuerpo anti C-terminal de la MccE492 (B). Se indica la proteína quimérica con una flecha celeste.

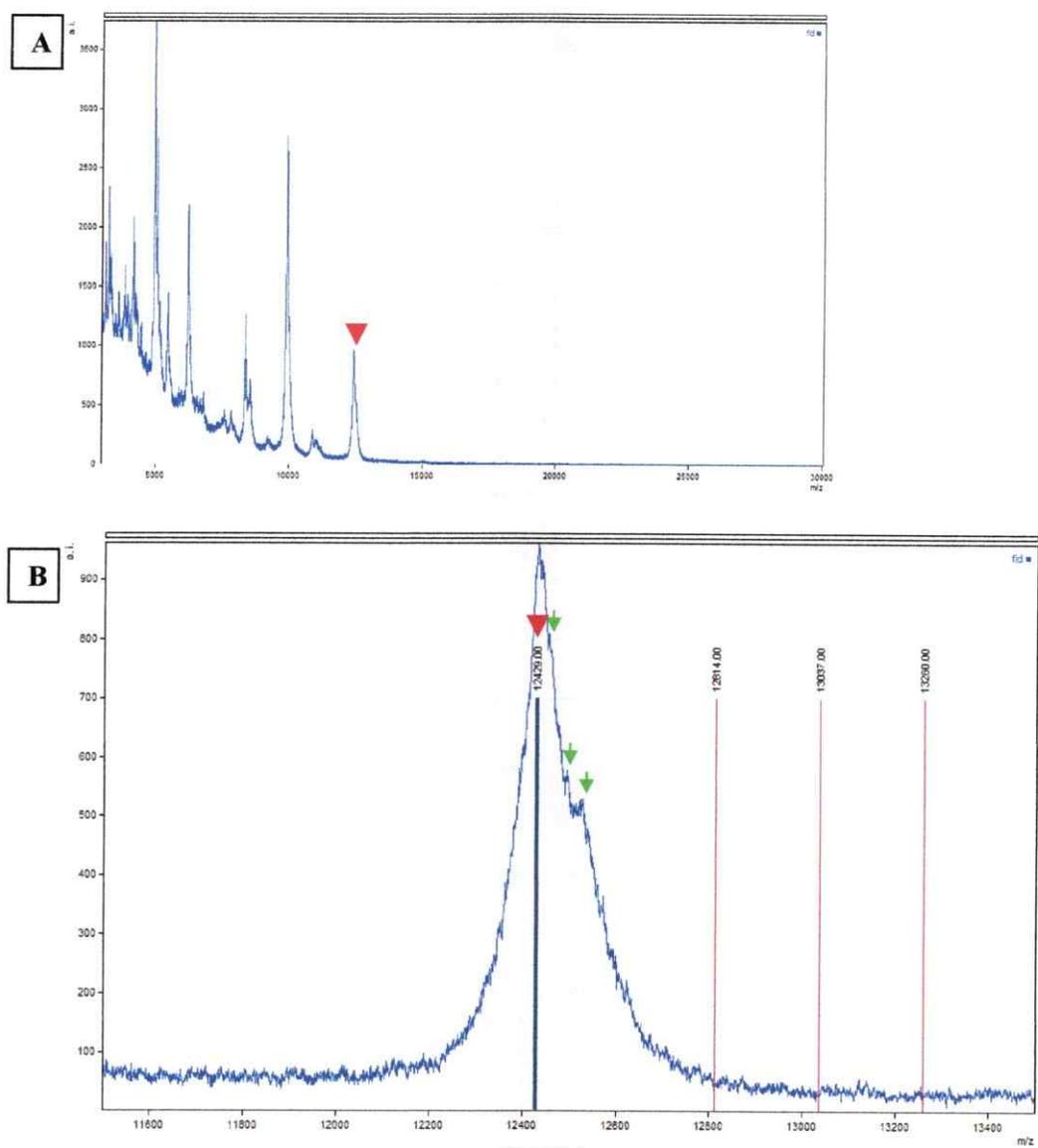


Figura 13. Espectrometría de masa MALDI TOFF de la proteína quimérica purificada.

Se muestra el espectro de la muestra analizada sobre la matriz de ácido sinapínico (SA) (A). Se muestra un acercamiento al pico de la proteína quimérica (B). La línea azul muestra la masa del pico de 12428 Da (la masa teórica de la proteína quimérica es 12423.47 Da) y las líneas rojas las masas que se esperan de las formas modificadas de la proteína quimérica (12614 Da, 13037 Da y 13260 Da). Se indica la proteína quimérica con un triángulo rojo y los posibles aductos con flechas verdes.

Se concluye que el C-terminal de la MccE492 en la proteína quimérica no es modificado postraduccionalmente, porque posiblemente el contexto de la proteína es importante para su reconocimiento por el complejo de modificación postraduccional.

3.7. Determinación del título de actividad antibacteriana.

Para determinar la actividad bactericida de la proteína quimérica se empleó un césped de la cepa sensible *E. coli* BL21(DE3), usando el método de la dilución crítica. Se inició la dilución con la proteína quimera purificada a 1 mg/ml y la MccE492 a 48 µg/ml (control positivo). Con la MccE492 se observaron halos de inhibición hasta la dilución 8 (187,5 ng/ml), en cambio con la proteína quimérica no se observaron en ninguna dilución. Para determinar si la falta de actividad es debido a que la proteína quimérica es incapaz de translocarse al periplasma, se hizo el ensayo de actividad bactericida sobre esferoplastos de la misma cepa sensible (**Figura 14**) Se calculó el IC50 de la actividad bactericida en 1,81 µM. Se concluye que la falta de modificación post-traduccional de la proteína quimérica es la causa de su falta de actividad bactericida. Así, se demuestra la capacidad bactericida de las proteínas de la división bacteriana y su potencial para el desarrollo de nuevos antibióticos.

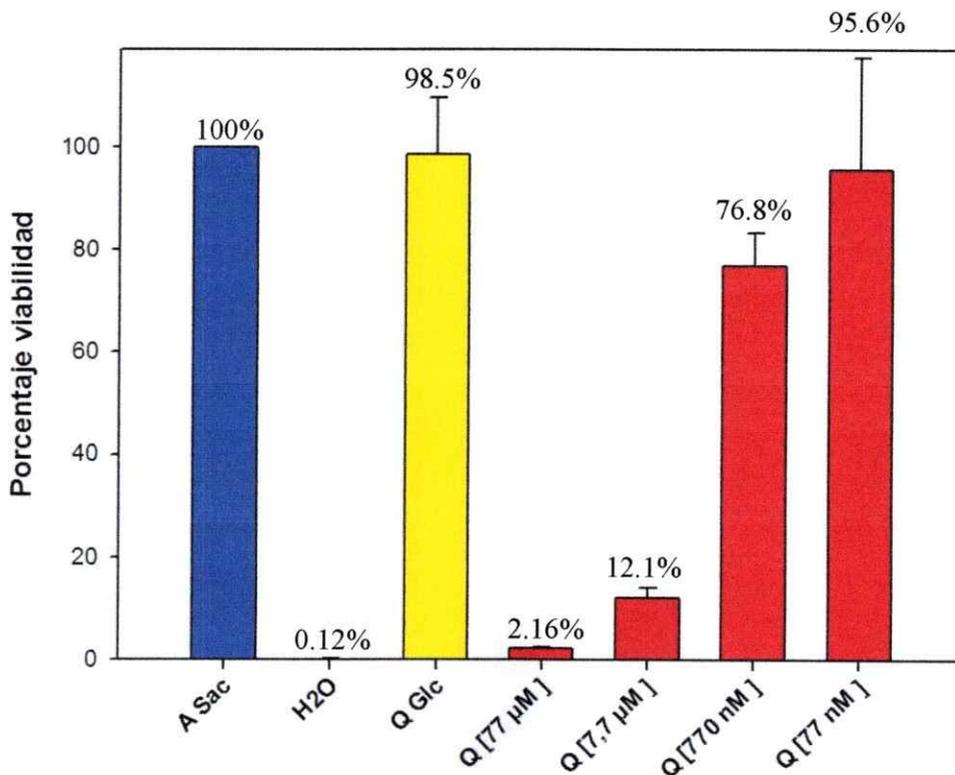


Figura 14. Ensayo de actividad bactericida sobre esferoplastos de *E. coli* BL21 (DE3).

Se incubaron 100 µL de células por 20 min con 100 µL de proteína quimérica suspendidas en amortiguador Tris-HCl 100 mM, 20% sacarosa, pH 8,0 (amortiguador sacarosa) y a continuación se determinaron las UFC.

Las muestras ocupadas fueron: solo amortiguador sacarosa (A Sac), agua nanopura (H₂O), muestra purificada a partir de la cepa productora reprimida con glucosa (Q Glc) y la proteína quimérica a una concentración final de 77 µM (1 mg/mL), 7.7 µM (100 µg/mL), 770 nM (10 µg/mL) y 77 nM (1 µg/mL). Se Calculó el IC50 de la proteína quimérica en 1,81 µM.

Se consideró como 100 % el número de UFC obtenidas en la condición control con amortiguador sacarosa. Las barras indican la desviación estándar de 3 ensayos en triplicado representativos de 3 experimentos independientes.

4. DISCUSIÓN

La MccE492 es exportada y procesada por un sistema exportador ABC compuesto por los genes *mceGH*. Este sistema reconoce el péptido líder de la MccE492 que se caracteriza por una secuencia en el extremo N-terminal con un motivo de doble glicina, específicamente una glicina alanina (Lagos y cols., 2001). En esta investigación se demostró que el péptido líder de la MccE492 no sería el único factor implicado en la exportación de la proteína, pues la proteína quimérica no es exportable. Se determinó que la proteína quimérica no se agrega en cuerpos de inclusión ni se asocia a la membrana (Figura 12), estando disponible en el citoplasma para el sistema de exportación MceGH. Esto indica que el péptido líder no es suficiente y que su contexto es importante para el reconocimiento y/o exportación por parte MceGH. Esto no es un caso particular ya que se han caracterizado otros sistemas donde el péptido líder no es suficiente para el proceso de exportación y donde, además, son necesarias señales internas en la proteína (Guilvout y cols., 1995; Campion y cols; 1997). También es posible que la proteína quimérica se pliegue antes de poder exportarse, ya que se sabe que los sistemas de exportación ABC, como el de la MccE492, necesitan como sustrato una proteína desplegada (Delepelaire, 2004).

En el año 2007, Azpiroz y Laviña demostraron que la microcina H47 y la colicina V poseen un módulo de captación en el C-terminal y un módulo tóxico localizado en el N-terminal de las proteínas maduras. Al fusionar cruzadamente los módulos de estas dos microcinas, se demostró que el reconocimiento por receptores específicos y su actividad tóxica resultaron ser intercambiables. El dominio de captación de la microcina H47 estaría ubicado específicamente en los últimos 10 aminoácidos del C-terminal. Alineamientos de esta región muestran una gran identidad entre las microcinas H47, I47, M y E492 (Figura 4), lo que sugiere que este dominio sería reconocido por los receptores de sideróforos de la misma

forma para las microcinas H47, I47, M y E492, y esto ocurriría gracias a que se encuentran modificadas post-traduccionalmente mediante la unión covalente de una molécula del tipo salmoquelina, demostrándose que estos últimos 15 aminoácidos son necesarios para modificarse postraduccionalmente *in vitro* (Nolan y cols., 2007). Por estas razones se esperaba que el motivo de captación fuera modular *in vivo*. Extrañamente en la proteína quimérica no se detectó la forma modificada, lo que parece indicar que en este caso, el modulo C-terminal se ve afectado por otros factores y por sí mismo no es suficiente para la modificación postraducciona *in vivo*. De nuevo existe la posibilidad de que el complejo de modificación postraducciona necesite el C-terminal desplegado y que en la proteína quimérica éste esté inaccesible.

En nuestro laboratorio se ha generado una proteína quimérica con el N- y C-terminal de la MccE492 pero con el dominio periplasmático de *FtsL*. Esta proteína quimérica tampoco es capaz de exportarse, pero muestra actividad bactericida dependiente de los receptores catecólicos al igual que la MccE492, lo indica que se modifica postraduccionalmente (Poch, Tesis de Doctorado). Esto apoya la posibilidad de que la proteína quimérica estudiada en este seminario de Título bloquee de algún modo la interacción de su C-terminal con la maquinaria de modificación postraducciona MceJI.

Para analizar esta hipótesis, se hizo un análisis bioinformático sobre el nivel de desorden intrínseco (Xue, 2010, Figura 15) y la estructura secundaria (Cole, 2008, Figura 16) de las proteínas quiméricas (*FtsB* y *FtsL*) y la MccE492. El único punto del análisis donde difiere la proteína quimérica de *FtsB*, es cerca del extremo C-terminal (Figura 16A, flecha roja) donde tiene una zona con alta probabilidad de sábana beta y valores teóricos de exposición al solvente muy bajos. La proteína quimérica de *FtsL* también cuenta con una zona con alta probabilidad de sábana beta cerca del C-terminal, pero con valores levemente más altos de exposición al

solvente. Esto estaría conforme con la proposición de que esta zona está inaccesible y bloqueé el acceso al módulo C-terminal. Recientemente se demostró que FtsB genera homodímeros, a través, de toda su región periplasmática (**Lapointe 2013**) lo que apoya la hipótesis de que el C-terminal esta inaccesible para su modificación postraducciona.

Otra posibilidad es que alguno de los múltiples residuos cargados de la proteína quimérica esté generando una repulsión electrostática con el sistema de exportación MceGH y/o con el complejo de modificación postraducciona MceJI, pero al comparar la proteína quimérica de este trabajo con la quimera de FtsL, la cual muestra actividad dependiente de los receptores catecólicos (**Poch, Tesis de doctorado**), se observa que ambas cuenta con múltiples residuos cargados incluyendo uno antes del C-terminal (**Figura 16**, flecha azul), por lo que es poco probable que sea un efecto electrostático.

Las bacterias gram negativas son más resistentes a antibióticos que las bacterias gram positivas debido a que cuentan con una membrana externa impermeable siendo uno de los principales problema para el desarrollo de nuevos antibióticos lograr que pasen esta barrera (**Page. 2012**). Para este problema el dominio C-terminal de la mceE492 muestra gran potencial ya que permite el paso del antibiótico al periplasma imitando un nutriente esencial, usando una estrategia de "caballo de troya" por lo que el desarrollo de resistencia a este medio de ingreso se dificulta por la necesidad de la bacteria de obtener Hierro, el cual es un nutriente limitante para organismos patógenos (**Fischbach y cols., 2006**). Para futuro trabajo se buscara discernir los factores que impiden que el extremo C-terminal se modifique en esta proteína quimérica, partiendo por eliminar la zona de baja exposición al solvente (**Figura 16A**, flecha roja) o agregando una secuencia "linker" entre el dominio periplasmático de ftsB y el C-terminal de la MccE492 que permita la modificación.

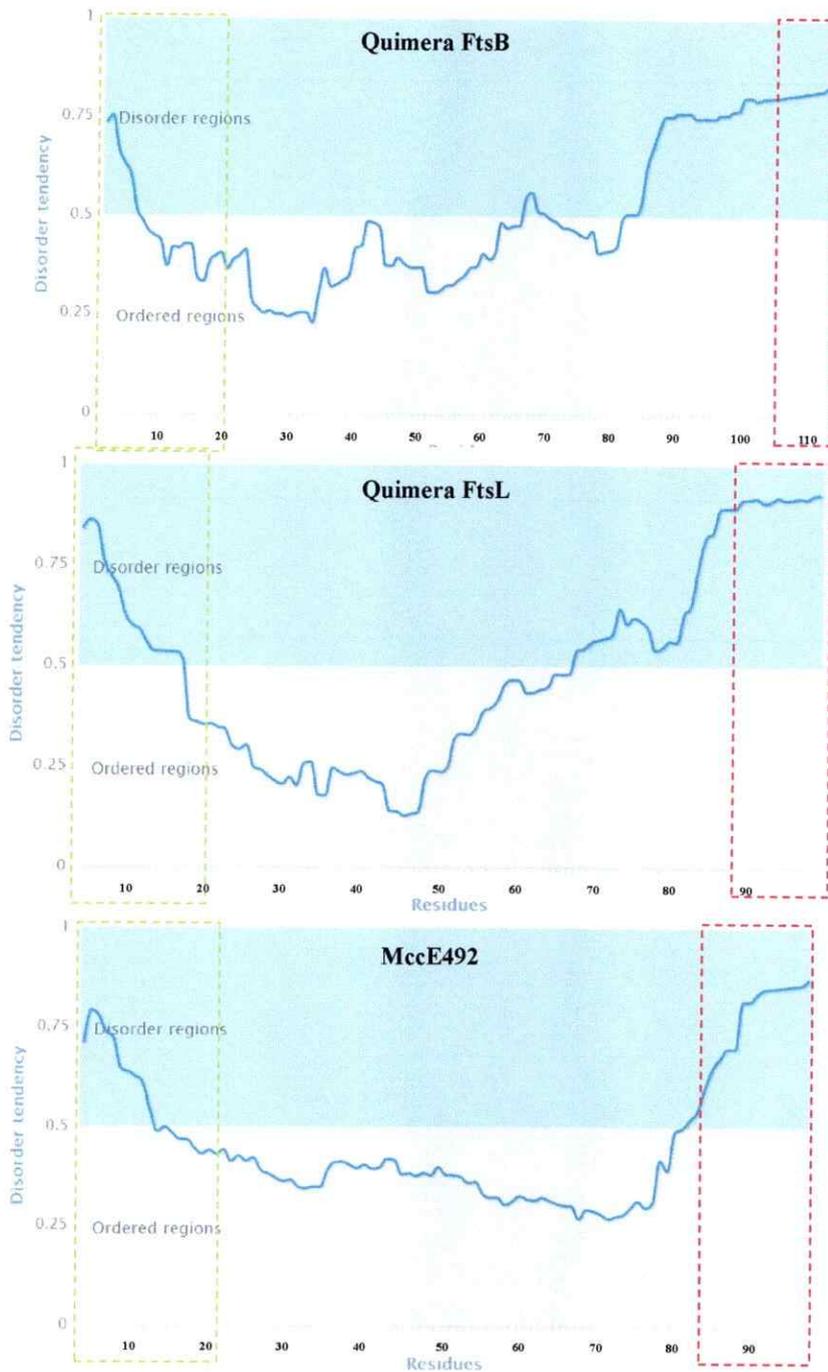


Figura 15. Estudio bioinformático del nivel de desorden intrínseco.

Se analizó el nivel de desorden intrínseco con el programa DisProt (Xue y cols., 2010) de las secuencias de la quimera de FtsB, la MccE492 y la quimera de FtsL. Valores sobre 0.5 indican que la zona es intrínsecamente desordenada.

Se enmarca con un rectángulo verde la zona N-terminal del péptido líder y en un rectángulo rojo la zona C-terminal del dominio de captación.

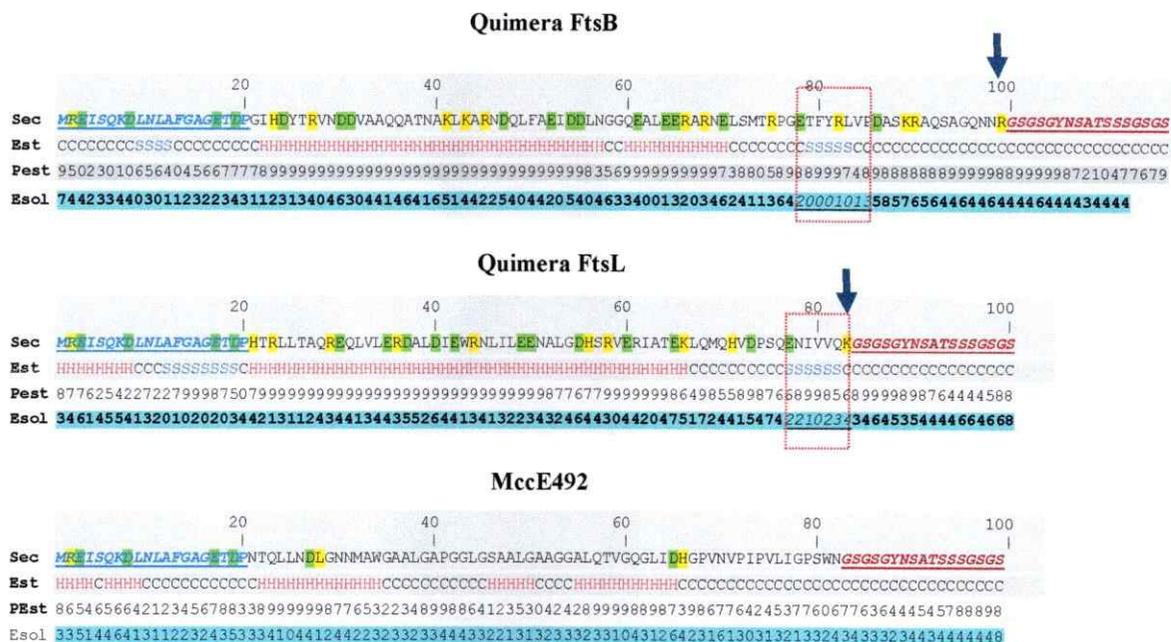


Figura 16. Estudio bioinformático de la estructura secundaria.

Se analizó la estructura secundaria con el programa Jpred (Cole y cols., 2008) de las secuencias de la quimera de FtsB, la MccE492 y la quimera de FtsL. Se muestra la secuencia de aminoácidos (Sec), la estructura secundaria (Est), la certeza en la predicción de estructura secundaria (PEst) y la exposición a solvente (Esol). Las estructuras predicha son hélice alfa (H), estructura beta (S) y hélice superenrollada (C). La certeza de la predicción de estructura va de 0 (baja certeza) a 9 (alta certeza). La exposición al solvente va de 0 (mínima exposición) a 9 (máxima exposición).

Subrayadas y en color azul se encuentra la zona N-terminal del péptido líder; subrayada y en color rojo la zona C-terminal del dominio de captación. Encerrada en línea punteada roja se encuentra la zona con alta probabilidad de sabana beta y baja exposición al solvente. En verde se resaltan los residuos con carga negativa (ácido aspártico y ácido glutámico) y en amarillo los con carga positiva (lisina, arginina e histidina). La flecha azul indica un grupo cargado positivamente cerca del C-terminal en las quimeras.

5. CONCLUSIONES

- La proteína quimérica no se exporta al medio extracelular lo cual indica que el péptido líder no es suficiente para la exportación, y que el contexto tiene importancia.
- Esta proteína quimérica no se modifica postraduccionalmente, lo cual sugiere que el contexto de la proteína puede tener importancia en este proceso.
- Existe un efecto bactericida de la proteína quimérica sobre esferoplastos, demostrando que la aplicación exógena de una proteína reguladora de la división bacteriana tiene efectos antibióticos.

6. REFERENCIAS

- Azpiroz, M.** y Laviña, M. (2007) Modular structure of microcin H47 and colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**:2412-2419.
- Baquero, F.** y Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.*, **23**:117-124.
- Baeza, M.** (2003) Mecanismo de inmunidad, de traslocación y de conversión tipo prión de la mceE492. Tesis Doctoral, Doctorado en Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Bentley, R.** (1990) The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **25**:307-384.
- Biemans-Oldehinkel, E.,** Doeven, M. y Poolman, B. (2005) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* **580**:1023-1035.
- Blum, H.,** Beier, H., Gross, H., (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gel. *Electrophor.*, **8**:93-99.
- Braun, V.,** Patzer, S. y Hantke, K. (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*, **84**:365-380.
- Buddelmeijer, N.,** y Beckwith, J. (2004) A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol. Microbiol.*, **52**:1315-1327.

Buddelmeijer, N., Judson, N., Boyd, J., Mekatanos, J., y Beckwith, J. (2002) YgbQ, a cell division protein in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**:6316-6321.

Campion, SR., Elsasser, E. y Chung, R. (1997). Amino-Terminal Charge Affects the Periplasmic Accumulation of recombinant Heregulin/EGF Hybrids Exported Using the *Escherichia coli* Alkaline Phosphatase Signal. *Prot. Exp. and Purif.*, **10**: 331-339.

Chang, A. y Cohen S. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.*, **134**:1141-1156.

Cole C., Barber J. y Barton J. (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.*, **36**:197-201.

Crossa, J. (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **84**:539-544.

Crossa, J. y Walsh, C. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**:223-249.

de Lorenzo, V. (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.*, **139**:72-75.

de Lorenzo, V. y Pugsley, A. (1985) Microcin E492, a low-molecular weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**:666-669.

Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1694**:149-161.

Destoumieux-Garzón, D., Thomas, X., Santamaría, M., Goulard, C., Barthélémy, M., Boscher, B., Bessin, Y., Molle, G., Pons A., Letellier, L., Perduzzi, J. y Rebuffat, S. (2003). Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **49**:1031-1041.

Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J. y Rebuffat, S. (2007) Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.*, **24**:708-734.

Fischbach, M., Lin, H., Liu, D. y Walsh, C. (2005) In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**:571-576.

Fischbach, M., Lin, H., Liu, D.R. y Walsh, C. (2006) How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat. Chem. Biol.*, **2**:132-138.

Gehring, A., Bradley, K. y Walsh, C. (1997) Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry*, **36**:8495-8503.

Gehring, A., Mori, I. y Walsh, C. (1998) Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE and EntF. *Biochemistry*, **37**:2648-2659.

Ghigo, M., y Beckwith, J. (2000). Cell division in *Escherichia coli*: role of FtsL domains in septal localization, function, and oligomerization. *J. Bacteriol.*, **182**:116-129.

González, M., y Beckwith, J. (2009) Divisome under Construction: distinct Domains of the small membrane protein FtsB are necessary for Interaction with multiple cell division proteins. *J. Bacteriol.*, **191**:2815–2825.

Reeves, P. (1965) The Bacteriocins. *Bacteriol. Rev.*, **29**:24-45.

Guilvout, I., Carniel, E., y Pugsley, AP. (1995). *Yersinia spp.* HMWP2, a Cytosolic Protein with a Cryptic Internal Signal Sequence Which Can Promote Alkaline Phosphatase Export. *J. Bacteriol.*, **177**:1780-1787.

Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. y Winkelmann, G. (2003) Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor Iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**: 3677-3682.

Holland, I., Schmitt, L. y Young, J. (2005) Type I protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol. Membr. Biol.*, **22**:29-39.

Kolter, R. y **Moreno, F.** (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**:141-163.

Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X. y **Monasterio, O.** (1993) Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.*, **321**:145-148.

Lagos, R., Villanueva, J.E. y **Monasterio, O.** (1999) Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.*, **181**:212-217.

Lagos, R., Baeza, M., Corsini, C., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J.A., Vergara, C. y **Monasterio, O.** (2001) Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.*, **42**:229-243.

Lagos, R., Tello, M., Mercado, G., García, V. y **Monasterio, O.** (2009) Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **10**:74-85.

Larsen, R., Thomas, M., Postle, K. (1999) Protonmotive force, ExbB and ligand bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.*, **31**:1809-1824.

LaPointe L., Taylor K, Subramaniam S., Khadria A., Rayment I. y **Senes A.** (2013) Structural Organization of FtsB, a Transmembrane Protein of the Bacterial Divisome. *Biochem.*, **52**:2574-2585.

Malcom, G. (2006) The Role of the Outer Membrane of Gram-negative Bacteria in Antibiotic Resistance: Ajax' Shield or Achilles' Heel?. *Handb Exp Pharmacol.* **211**:67-86.

Mercado, G., Tello, M., Marín, M., Monasterio, O. y Lagos, R. (2008) The production in vivo of microcin E492 with antibacterial activity depends on salmochelin and EntF. *J. Bacteriol.*, **190**:5464-5471.

Michiels, J., Dirix, G., Vanderleyden J. y Xi C. (2001) Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.*, **9**:164-168.

Goehring, N., y Beckwith, J. (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.*, **15**:514-526.

Neilands, J. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.*, **270**:26723-26726.

Nolan, E., Fischbach, M., Koglin, A. y Walsh, C. (2007) Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**:14336-14347.

O'Brien, I. y Gibson, F. (1970) The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **215**:393-402.

O'Brien, I., Cox, G. y Gibson, F. (1971) Enterochelin hydrolysis and iron metabolism in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **237**:537-549.

Patzer, S., Baquero, M., Bravo, D., Moreno, F. y Hantke, K. (2003) The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology*, **149**:2557-2570.

Pavlova, O. y Severinov, K. (2006). Posttranslationally modified microcins. *Rus. J. Genet.*, **42**:1380-1389.

Poch, A (2013) Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Pons, A., Zorn, N., Vignon, D., Delalande, F., Van Dorselaer, A. y Cottenceau, G. (2002) Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**:229-230.

Postle, K. y Kadner, R. J. (2003). Microrevision. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.*, **49**:869-882.

Pollack, J. y Neilands, J. (1970) Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**:989-992.

Pugsley, A. y Reeves, P. (1977) The role of colicin receptors in the uptake of ferrienterochelin by *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**:903-911.

Pugsley, A.P. (1985) *Echerichia coli* K-12 strains for use in the identification and characterization of colicins. *J. Gen. Microbiol.*, **130**:369-376.

Pugsley, A., Moreno, F. y de Lorenzo, V. (1986) Microcin E492 insensitive mutants of *E. coli* K-12. *J. Gen. Microbiol.*, **132**:3253-3259.

Riley, M. y Wertz, J. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**:117-137.

Strahsburger E., Baeza M., Monasterio O., Lagos R. (2005) Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**:3083-3086.

Thomas, X., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Alfonso, C., Blond, A., Birlirakis, N., Goulard, C., Dubost, L., Thai, R., Tabet, J. y Rebuffat, S. (2004) Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.*, **279**:28233-28242.

van Belkum, M., Worobo, R. y Stiles, M. (1997) Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.*, **23**:1293-1301.

Vicente, M., Rico, A., Martínez-Arteaga, R., Mingorance, J. (2006) Septum Enlightenment: Assembly of bacterial division proteins. *J. Bacteriol.*, **188**:19-27.

Villanelo, F., Ordenes, A., Brunet, J., Lagos, R., Monasterio, O. (2011) A model for the *Escherichia coli* FtsB/FtsL/FtsQ cell division complex. *BMC Struct. Biol.* **11**:28.

Weiss, R. (1976). Protoplast formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **128**:668-670.

Wilkens, M., Villanueva, J., Cofre, J., Chnaiderman, J. y Lagos, R. (1997) Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **179**:4789-4794.

Wu, K. y Tai, P. (2004) Cys32 and His105 are the critical residues for the calcium dependent cysteine proteolytic activity of CvaB, an ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* **279**:901-909.

Xue, B., DünBrack, R., Williams, R., Dunker, K., y Uversky, V. (2010) PONDR-Fit: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1804**:996-1010.

Zhang, N., y Li, L. (2002) Ammonium dodecyl sulfate as an alternative to sodium dodecyl sulfate for protein sample preparation with improved performance in MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **74**:1729-1736.