

UCH-FC  
Biotecnología  
C. 822  
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

## “Evaluación del efecto citotóxico del dominio periplasmático de FtsX”

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

**Daniela Coromer Calderón**

Director del Seminario de Título: Dr. Octavio Monasterio.  
Co-Director Dra. Rosalba Lagos.

Fecha, Agosto 2015

Santiago - Chile ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD  
DE CHILE



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

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

**DANIELA COROMER CALDERÓN**

### “Evaluación del efecto citotóxico del dominio periplásmico de FtsX”

Este Seminario ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Octavio Monasterio Opazo  
**Director Seminario de Título**

Handwritten signature of Octavio Monasterio Opazo in black ink, written over a horizontal line.

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

Handwritten signature of Rosalba Lagos Mónaco in blue ink, written over a horizontal line.



### **Comisión Revisora y Evaluadora**

Dr. Francisco Chávez Espinoza  
**Presidente Comisión**

Handwritten signature of Francisco Chávez Espinoza in black ink, written over a horizontal line.

Dr. Carlos Jerez Guevara  
**Evaluador**

Handwritten signature of Carlos Jerez Guevara in black ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, septiembre de 2015

## AUTOBIOGRAFÍA



Mi nombre es Daniela Coromer Calderón, nací en un lluvioso 2 de junio de 1992, he vivido toda mi vida en la florida, en la misma casa con mis padres y mis 2 hermanas. Cerca de mi casa había muchos niños cuando era chica así que pase mucho de mi infancia jugando afuera junto con mis hermanas.

Ingrese al sistema educativo a los 3 años cuando me matricularon en *pre-kinder* de un colegio cercano y seguí mi educación sin problemas en distintos colegios, siempre me gustaron las ciencias y las matemáticas, en parte por la facilidad con la que las entendía y en parte por mi desagrado con la lectura que involucraban otras asignaturas, cosa curiosa ya que hoy en día leer es uno de mis pasatiempos preferidos.

No apareció la idea de estudiar biotecnología hasta mis últimos meses en cuarto medio, luego de asistir a la charla de una egresada, momento en el cual se convirtió en mi opción más fuerte y a la que posteriormente postule cuando llego el momento.

Mis años en la universidad fueron muy buenos, conocí mucha gente nueva y muy distinta, aprendí mucho de la profesión científica en Chile y por supuesto a jugar todo tipo de juegos de cartas coleccionables: *Pokemon*, *Magic*, *Mitos*, de todo. Hoy me encuentro en las etapas finales de esta gran experiencia.

*Le dedico este trabajo a toda la gente que me apoyo y me tuvo  
paciencia sobre el proceso, que fue muy necesaria.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis primeros agradecimientos son a mis padres por la paciencia, el cariño y el trabajo que han entregado en cada aspecto de mi educación, no solo en el ámbito académico sino también en mi formación como persona, agradecimientos que obviamente también se extienden al resto de mi familia, mis hermanas, mis abuelos, todos.

Agradezco también la paciencia y animo de toda mi familia, de Jorge y de mis amigas Constanza y Francisca durante el proceso de este trabajo en particular.

También a la gente que lo hizo posible en el ámbito académico. Al Dr. Monasterio que me ofreció la oportunidad y tuvo siempre la mejor disposición para que este trabajo saliera adelante. A la gente del laboratorio que fue siempre muy amable, a Felipe que me hacía reír, a la Pauli por su increíble paciencia para mostrarme cómo funcionaba y donde estaba cada cosa las veces que fuera necesario y por la misma maravillosa paciencia a Don Pedro y a la Maca que a pesar de que yo nunca encontraba nada siempre me mostraban donde estaban las cosas.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Agradecimientos</b>	<b>IV</b>
<b>Tabla de contenidos</b>	<b>V</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>VII</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>IX</b>
<b>Resumen</b>	<b>X</b>
<b>Abstract</b>	<b>XII</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Péptido antimicrobiano humano II-37	2
1.2 Dipéptidos aromáticos	3
1.3 Bacteriocinas	4
1.4 Microcina E492 (MccE492)	7
1.5 ¿Por qué una proteína de la división celular?	9
1.6 Hipótesis y Objetivos	15
<b>2. Materiales y métodos</b>	<b>16</b>
2.1 Materiales	16
2.1.1 Cepas y plásmidos	16
2.1.2 Reactivos	17
2.2 Métodos	18
2.2.1 Generación de células electro-competentes	18
2.2.2 Electro-transformación	18
2.2.3 Generación de células quimio-competentes	18
2.2.4 Quimio-transformación	19
2.2.5 Expresión de la quimera XMCE	19
2.2.6 Purificación de XMCE	20

2.2.6.1	Extracto de proteínas solubles totales	20
2.2.6.2	Cromatografía de afinidad a cobalto	20
2.2.6.3	Cromatografía de exclusión molecular	21
2.2.7	Espectroscopia de masas	22
2.2.8	Ensayos de toxicidad de la quimera en céspedes	22
2.2.9	Ensayos de toxicidad de la quimera en esferoplastos	22
2.2.10	Cambio de vector	24
2.2.10.1	Reacciones de PCR	26
2.2.10.2	Digestión y ligación	26
2.2.11	Microscopias	27
<b>3.</b>	<b>Resultados</b>	<b>28</b>
3.1	Purificación de la quimera	28
3.2	Ensayos de toxicidad de la quimera en céspedes	32
3.3	Construcción de un vector compatible para la expresión de la quimera (pc2)	37
3.3.1	Digestión del vector pc2 con EcoRI.	40
3.4	Co-expresión de pJ053 y pc2	41
3.5	Determinación de la masa molecular de la quimera	44
<b>4.</b>	<b>Discusión</b>	<b>47</b>
4.1	Expresión, purificación y caracterización de la quimera.	48
4.2	Proyecciones	51
<b>5.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación y ejemplos de las clases de bacteriocinas	6
<b>Tabla 2.</b> Plásmidos utilizados	16
<b>Tabla 3.</b> Efecto de la concentración de XMCE en la sobrevivencia celular	35
<b>Tabla 4.</b> Largo promedio de las células en cada condición	43
<b>Tabla 5.</b> Diferencia en los picos observados en la espectrometría de masa de la quimera y Microcina E492	46



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b>	Estructura del dipéptido N-β-alanil-5-S-glutacionil-3,4-dihidrofénilalanina	4
<b>Fig. 2</b>	Esquema de los dominios de la microcina E492 y sus funciones	8
<b>Fig. 3</b>	Esquema de las proteínas esenciales del divisoma de <i>E. coli</i> y su ubicación referencial en el complejo	11
<b>Fig. 4</b>	Esquema del control de la actividad hidrolasa del complejo FtsEX	13
<b>Fig. 5</b>	Preparación de esferoplastos.	23
<b>Fig. 6</b>	Esquema del traspaso del gen XMCE al vector p33AM	25
<b>Fig. 7</b>	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la elución de la columna Talon HiTrap®	28
<b>Fig. 8</b>	SDS-PAGE de la purificación de XMCE en columnas Talon HiTrap®	29
<b>Fig. 9</b>	Cromatograma de exclusión molecular en columna SuperDex 75	31
<b>Fig. 10</b>	SDS-PAGE del concentrado purificado de XMCE	32
<b>Fig. 11</b>	Efecto del péptido sobre la viabilidad de los esferoplastos	34
<b>Fig. 12</b>	Efecto de la concentración de XMCE en la sobrevivencia celular	36
<b>Fig. 13</b>	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la reacción de PCR para amplificar el gen XMCE a partir de pDY138	38
<b>Fig. 14</b>	Electroforesis de la reacción de PCR de colonias de los transformantes obtenidos	39
<b>Fig. 15</b>	Electroforesis en geles de agarosa de los productos de digestión de p33AM y pc2 con EcoRI	40
<b>Fig. 16</b>	Microscopía de fase en campo claro de las células transformantes	42
<b>Fig. 17</b>	Ensayo en céspedes de la toxicidad de la quimera	44
<b>Fig. 18</b>	Espectroscopia de masa de XMCE	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

LB	Luria Broth.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanosulfónico.
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano.
dATP	Desoxiadenosina trifosfato.
dTTP	Desoxitimina trifosfato.
dGTP	Desoxiguanina trifosfato.
dCTP	Desoxicitocina trifosfato.
XMCE	Quimera con tag de 10 histidinas, FtsX (V94-R223) y los últimos 17 residuos de aminoácido de la Microcina E492.
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i> o masa molecular de corte.
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico.
MALDI-TOF	Desorción/ionización desde una matriz asistida por laser – tiempo de vuelo.

## RESUMEN

FtsX es una proteína del divisoma bacteriano que regula la hidrólisis del péptido glicano mediante su interacción con EnvC. Dada la conocida toxicidad de su sobre-expresión en *E.coli* y con el objetivo de explorar su posible uso como antibiótico, se trabajó con una quimera formada por el dominio periplasmático de FtsX (V94-R223), un tag de 10 histidinas en el amino terminal y los últimos 17 aminoácidos de la microcina E492 en el extremo carboxilo terminal. La quimera se expresó en *E.coli* C43 y se purificó mediante cromatografía de afinidad a cobalto y exclusión molecular. Se estimó una masa molecular de 17 kDa de acuerdo a su migración en SDS-PAGE y de 21 kDa a partir del volumen de elución observado en la cromatografía de exclusión molecular en estado nativo, de lo cual se dedujo que la proteína en estado nativo no sería globular como los estándares utilizados en la cromatografía de exclusión molecular. Se probó el efecto tóxico de la quimera no modificada sobre céspedes y esferoplastos de *E.coli* pero solo se observó actividad tóxica sobre esferoplastos con un  $I_{50}$  de 337 nM, por lo que se dedujo que la membrana externa impedía el ingreso de la quimera al periplasma donde debería ejercer su acción. Con el objetivo de permitir el ingreso de la quimera a la célula esta se co-expresó con el sistema de modificación post-traducciona de la microcina E492 para modificarla con enteroquelina en el extremo carboxilo terminal. La quimera resultante se purificó como se describió antes y se utilizó y probó sobre céspedes bacterianos y no se detectó ningún efecto tóxico. Para determinar si la ausencia de toxicidad se debía a defectos en la modificación de la quimera se realizó una espectroscopia de masa en la que se logró observar un pico en los 17.854 Da que correspondía a la quimera no modificada y algunos picos de mayor masa molecular que corresponderían a cationes o aniones unidos a la quimera y a modificaciones de menor

masa molecular que la de enteroquelina, por lo que se concluyó que la causa de la falta de actividad sería la ausencia de enteroquelina en el extremo C-terminal de la químera, indicando que los últimos 17 aminoácidos de la región carboxilo terminal de la Microcina E492 no serían suficientes para ser reconocidos en la químera y modificados por el sistema de modificación post-traducciona l de la microcina. En conclusión la químera es tóxica para la sobrevivencia de esferoplastos y no tiene efecto sobre las células de *E. coli* lo que indica que la membrana externa de la célula impide su paso al periplasma.

## ABSTRACT

FtsX is a protein of bacterial divisome that regulates the hydrolysis of glycopeptide cell wall through interaction with EnvC. Considering the toxicity of FtsX overexpression and with the objective to probe it as potential antibiotic, a chimera was constructed using FtsX periplasmic domain (V94-R223), flanked by a histidine tag of ten residues and the last 17 residues of microcin E492 at the amino and carboxyl peptide end respectively. This chimera was expressed on *E. coli* and purified through cobalt affinity chromatography and molecular exclusion. A value of 17 kDa for the chimera molecular mass was obtained by SDS-PAGE and a value of 21 kDa obtained by molecular exclusion chromatography in native state. This suggests a non globular shape for the chimera. Its toxic effect was tested on *E. coli* lawns and spheroplasts but activity was only observed over spheroplasts ( $I_{50} = 337$  nM). These results suggest that outer membrane prevented the chimera entry to periplasm where FtsX normally acts. Microcin "Trojan horse" strategy with enteroquelin was used in order to allow the chimera transport to periplasm. With this purpose the chimera was coexpressed with microcin E492 post-translational modification system to attach an enterochelin molecule to its carboxyl end. Modified chimera was purified as previously described and tested in *E. coli* lawns but no effect was observed. To determine if the lack of toxicity was due a fail in post-translational modification, the modified chimera molecular mass was determined. The products of modification showed a 17.854 Da pick that correspond to unmodified chimera and some bigger mass picks, that correspond to the chimera probably modified with bound cations or smaller parts of enteroquelin, suggesting that the last 17 residues of microcin E492 were not the correct substrate for the post-translational modification system of microcin. Thus, we conclude that the chimera shows toxicity over spheroplasts probably interfering the normal process

of FtsX, and the lack of activity against *E. coli* cells indicates that the transport through outer membrane of the cell is a requirement.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el uso indiscriminado de antibióticos en conjunto con ambientes altamente selectivos como hospitales han contribuido a crear resistencia a muchos de los antibióticos utilizados en medicina, generándose incluso bacterias multi-resistentes casi imposibles de erradicar y por consiguiente letales en la mayoría de los casos. A lo anterior se le debe sumar que la aprobación de nuevos agentes antibacterianos por la FDA (Food and Drug Administration) está disminuyendo, pues el desarrollo de nuevos antibióticos en la industria farmacéutica se ha visto disminuido por la producción de fármacos más lucrativos como aquellos dedicados a tratamientos crónicos, aunque aún se desarrollan algunos mayormente enfocados contra Gram positivos dada su mayor susceptibilidad (Williams & Bax, 2009).

Todo lo anterior nos enfrenta al problema actual de la generación de resistencia a los antibióticos existentes y al cada vez menor número de antibióticos disponibles contra bacterias Gram negativas, causantes de un gran número de infecciones que han producido alarma pública, como por ejemplo el brote infeccioso producido por *Echerichia coli* O157:H7 en Alemania en 2011, que causó la muerte de varias personas. Esto plantea un enorme desafío como es la búsqueda de nuevos antibióticos que eviten los mecanismos de resistencia bacterianos y presenten un grado de especificidad contra las bacterias patógenas que no afecte a toda la comunidad propia del individuo. Por esto, se requiere de una investigación que considere todos estos aspectos en su conjunto. En este momento hay una prometedora exploración con el uso de péptidos que pueden traspasar la(s) membrana(s) bacterianas y producir su acción en el interior de la célula o simplemente perforar la membrana citoplasmática (Pinto da Costa y col., 2015). Dada

la extensión de esta investigación solo consideraremos algunos ejemplos de péptidos y proteínas obtenidos de fuentes naturales que nos parecen relevantes.

### **1.1 Péptido antimicrobiano humano LL-37**

Los biofilms son agregados multicelulares de microorganismos asociados a una superficie y se estima que causan al menos el 65% de las infecciones en humanos. Las infecciones causadas por bacterias con este comportamiento son particularmente difíciles de tratar dada su resistencia a la mayoría de los antibióticos que en general son diseñados para tratar infecciones planctónicas (De la Fuente-Núñez & Hancock, 2015).

Un ejemplo de este tipo de infección se observa con *Acinetobacter baumannii* una bacteria Gram-negativa, que no fermenta, no esporula, es estrictamente aeróbica y es un patógeno asociado a una gran cantidad de infecciones en pacientes hospitalizados, inmuno-suprimidos, con quemaduras o traumatismos severos. Debido a la amplia resistencia a antibióticos de *Acinetobacter baumannii* las infecciones que causa son particularmente difíciles de tratar, por lo que en 2013 Feng y colaboradores decidieron probar la actividad antimicrobiana de los péptidos de defensa del huésped (HDP), que son péptidos cortos, catiónicos y con efecto antimicrobiano producidos por virtualmente todos los organismos, contra esta bacteria. En particular utilizaron la catelicidina LL-37 humana y sus fragmentos. La catelicidina LL-37 humana se deriva de la catelicidina hCAP-18, un péptido antibacteriano catiónico de 18 kDa que es producido por los epitelios en forma de un prepropéptido que luego es cortado por proteasas para liberar un segmento de 37 residuos del carboxilo terminal, que es el que se conoce como LL-37. Este péptido al interactuar con las membranas bacterianas adquiere estructura de helice- $\alpha$  y ha mostrado un gran espectro de actividad antibacteriana, antifúngica y



antiviral. Además puede procesarse nuevamente para liberar péptidos de actividad antimicrobiana mejorada (KS-30, KR-20 y KR-12) (Feng y col., 2013).

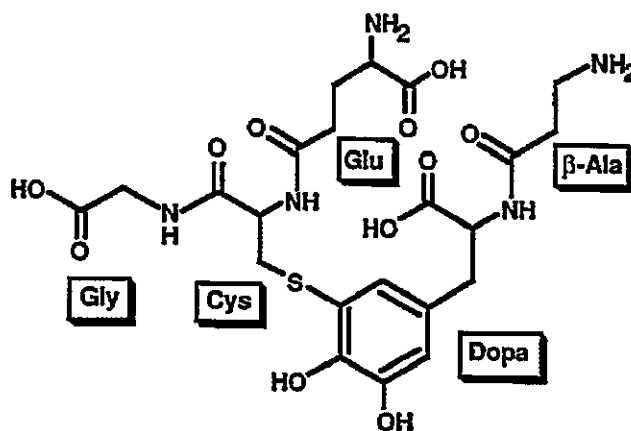
Cuando el grupo de Feng (2013) probó la catelicidina y sus derivados contra aislados clínicos multiresistentes de *Acinetobacter baumannii* encontró valores de concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de 16 a 32  $\mu\text{g/mL}$ , además de una fuerte actividad bactericida dentro de los primeros 30 minutos. Junto con lo anterior observaron que tanto LL-37 como sus fragmentos poseían una actividad antiadherente a mayores concentraciones (32-128  $\mu\text{g/mL}$ ) que contribuiría a la inhibición del crecimiento del patógeno y la erradicación del biofilm. Por lo que propuso a estos péptidos como potencial terapia contra las infecciones producidas por esta bacteria.

## 1.2 Dipéptidos aromáticos

Se sabe que dípteros y lepidópteros en respuesta a infecciones bacterianas o heridas sintetizan una amplia batería de proteínas de defensa entre las cuales se encuentran hemaglutininas y proteínas antimicrobianas de amplio espectro con actividad contra bacterias y hongos, que presentan en general una masa molecular inferior a 10 kDa y se codifican en genes independientes que se activan solo frente a una posible infección (Samakovlis y col., 1990).

En conocimiento de lo anterior Leem y col., (1996) realizaron una búsqueda de péptidos pequeños con actividad antimicrobiana en adultos inmunizados de la mosca *Sarcophaga peregrina*, y detectaron N- $\beta$ -alanil-5-S-glutacionil-3,4-dihidrofénilalanina (5-S-GAD), un dipéptido aromático correspondiente a la conjugación de Gly-Cys-Glu y  $\beta$ -Ala-Dopa mediante el azufre de la cisteína. Este dipéptido mostró una concentración inhibitoria media entre 11,4 y 17,2  $\mu\text{g/mL}$  en los microorganismos ensayados, entre los que se

encuentran *E. coli* K12 594, *Micrococcus luteus* FDA 16 y *Staphylococcus aureus*. No se apreció gran diferencia en su efecto entre bacterias Gram negativas y positivas, y si bien su mecanismo de acción no fue esclarecido se cree que tiene relación con la liberación de peróxido de hidrogeno, ya sea directamente desde el 5-S-GAD o por interacción de este con las oxidasas de la bacteria, esto porque su efecto desapareció en cultivos con adición de catalasa (Leem y col., 1996)



**Figura 1. Estructura del dipéptido N-β-alanil-5-S-glutathionil-3,4-dihidrofénilalanina.**

### 1.3 Bacteriocinas

Otra de las opciones que se ha explorado es el uso de péptidos producidos por microorganismos, pues estos poseen una gran variedad de sistemas de defensa entre los que se incluyen los antibióticos tradicionales de amplio espectro, subproductos metabólicos, agentes líticos, exotoxinas proteicas y bacteriocinas. Estas últimas están ampliamente definidas como proteínas de síntesis ribosomal biológicamente activas con acción bactericida, de amplia diversidad y abundancia en la naturaleza debido a que se han encontrado prácticamente en todas las bacterias en las que se han buscado hasta

la fecha y en muchas de ellas se encontraron varios tipos de bacteriocinas (Riley & Wertz, 2002).

Las bacteriocinas se diferencian de los antibióticos tradicionales en que tienen un espectro de acción mucho menor, siendo tóxicas solo para bacterias de grupos cercanos a la productora, dado que son producidas por una gran diversidad de bacterias el número de bacteriocinas es proporcional a ella. Más aun, la diversidad de las bacteriocinas no se encuentra solo en el número de bacterias que las producen sino que también en los distintos tamaños y métodos de acción por los que ejercen su efecto tóxico. De este modo pueden inhibir distintos procesos utilizando diversos métodos de ingreso a la célula, ya sea por acción propia o asistida por las proteínas de la célula blanco.

Dentro del grupo de las bacterias Gram negativas la mayoría de las bacteriocinas han sido caracterizadas en *E.coli* u otras enterobacterias y se les divide en microcinas (péptidos pequeños) o colicinas (proteínas de mayor tamaño). Las microcinas están divididas en 2 subgrupos, las de clase I relativamente pequeñas (menores a 5 kDa) con extensas modificaciones post-traduccionales y las de clase II de mayor tamaño y menos modificadas postraduccionalmente. Dentro de las bacterias Gram positivas las bacteriocinas se dividen en 2 grandes clases, los lantibióticos que son péptidos pequeños (19-38 residuos de aminoácido) con modificaciones post-traduccionales como anillos aromáticos con tioeter o aminoácidos dextrógiros sub-clasificados a su vez en otras 11 clases, y los no lantibióticos también pequeños de entre 25 y 60 residuos, catiónicos, termoestables, raramente modificados post-traduccionalmente y a su vez divididos en otras 4 clases (Hassan y col., 2012), algunos ejemplos de las diversas clases de bacteriocinas se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Clasificación y ejemplos de las clases de bacteriocinas.**

Bacterias	Clasificación		Ejemplo
Gram negativas	Microcinas	Clase I	<b>J25:</b> Péptido de 21 residuos con forma de lazo formado por una ciclación intramolecular, es altamente estable a la temperatura y a proteasas, tiene actividad contra bacterias Gram negativas. Entra a las células blanco mediante el transportador de hierro, FhuA y su principal blanco es la RNA polimerasa.
		Clase II	<b>E492:</b> Contiene 84 residuos (8.718 Da), y se aisló originalmente de <i>K. pneumoniae</i> , afecta a otras enterobacterias, se inserta en la membrana interna e inducir poros, posee una modificación tipo salmoquelina en el C- terminal que media su ingreso a través de los receptores de hierro.
	Colicinas		<b>Colicina E1:</b> Posee 522 residuos y se aisló inicialmente de <i>E. coli</i> , utiliza el receptor de membrana externa TolC para ingresar al periplasma, donde su dominio carboxilo terminal se inserta en la membrana interna para formar un poro.
Gram positivas	Lantibióticos		<b>Nisina:</b> Es un péptido de 34 residuos con varias modificaciones post-traduccionales que incluyen la adición de metil-lantionina, didehidroalanina y otros. Es una bacteriocina de amplio espectro dentro de las Gram positivas y su efecto tóxico es producido por la formación de poros en la membrana.
	No-lantibióticos		<b>Enterocina P:</b> Contiene 44 residuos y se aisló inicialmente de <i>Enterococcus faecium</i> , es una bacteriocina de amplio espectro dentro de las Gram positivas que ejerce su acción al formar poros específicos para potasio en la membrana celular y su inserción la hace por la unión del carboxilo terminal a la membrana.

De entre las bacteriocinas nombradas anteriormente la más relevante para el desarrollo de este trabajo es la Microcina E492, por lo que se profundizará en su modo de acción y entrada a la célula.

#### 1.4 Microcina E492 (MccE492)

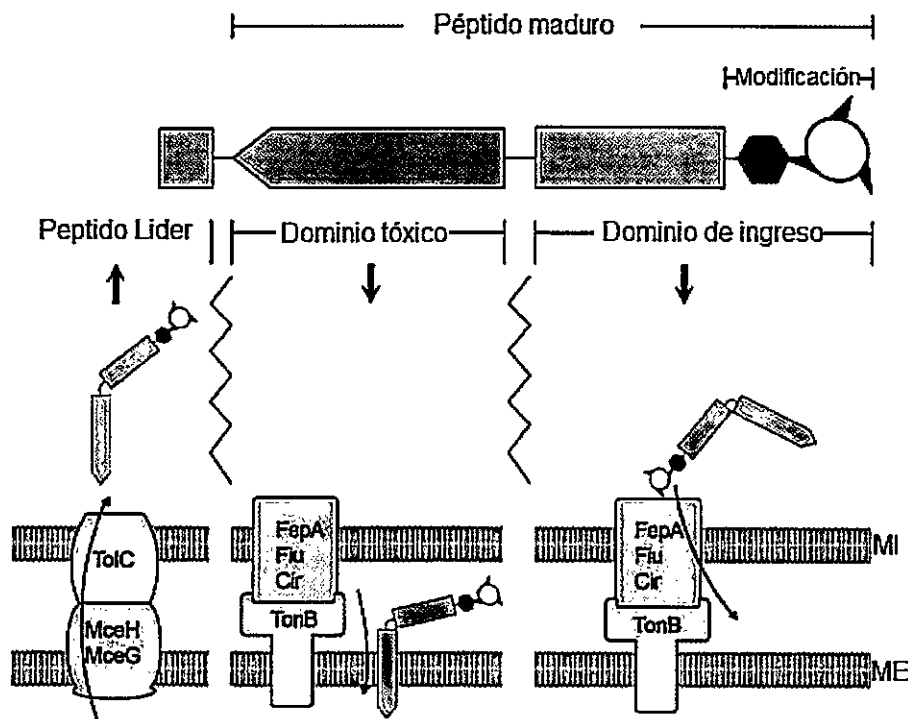
Es una proteína de baja masa molecular, aislada inicialmente de *K.pneumoniae*, formadora de poros y activa contra los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*. Para ejercer su efecto permeabilizador en la membrana interna de las cepas a las que afecta debe primero acceder al periplasma, esto lo consigue mediante una modificación post-traducciona tipo salmoquelina en el extremo carboxilo terminal, que le permite ser ingresada al periplasma mediante los transportadores de hierro de la célula blanco en una estrategia descrita como "Caballo de Troya".

Para la expresión y modificación de la MccE492 hacen falta más de 10 genes cuya función es conocida y otros cuya función aún no se conoce. Aquellos cuya función es conocida se denominan mce, entre los que se encuentra mceA que es el gen estructural de la microcina, mceB el gen de la inmunidad, mceC, mceI y mceJ están involucrados en la modificación post-traducciona y son respectivamente una glicosiltransferasa, una aciltransferasa y una proteína sin homología conocida, mceD es una esterasa que también participa en la modificación, mientras que mceG y mceH forman un transportador tipo ABC que junto con la proteína de membrana externa TolC están involucradas en la exportación de la mceE492 (Lagos y col., 2009).

Una característica interesante de la MccE492 es que es una proteína modular en la que en estado inmaduro la región N terminal contiene un péptido líder que marca a la proteína para ser exportada y es cortado durante el proceso, mientras el dominio carboxilo terminal es reconocido por las enzimas encargadas de la modificación post-traducciona para la adición de la enteroquelina en la serina 84, se ha visto que los últimos 17 aminoácidos del dominio carboxilo terminal son necesarios para este reconocimiento,

sin embargo no se sabe si son suficientes. Es esta misma región ya modificada en la proteína madura la que mediante su interacción con los receptores de hierro FepA, Fiu y Cir permite el ingreso de la proteína al periplasma de la célula blanco. A pesar de que solo la microcina modificada es activa se le encuentra de ambas formas, modificada (8.718 Da) y sin modificar (7.887 Da), además de otros dos estados en los que la modificación no está completa (8.272 Da y 8.495 Da).

Por su parte es el dominio N terminal de la microcina madura, el que determina la actividad antimicrobiana, mediando su interacción con TonB en la formación de poros en la membrana interna de la célula blanco (Figura 2).



**Figura 2. Esquema de los dominios de la microcina E492 y sus funciones.** En la parte superior se muestra el esquema de la microcina, dividido de izquierda a derecha, en péptido líder, dominio tóxico y dominio de ingreso con la modificación de enteroquelina. En la parte inferior (derecha) se muestran los receptores con los que interactúa la enteroquelina y en

un paso posterior (centro) la interacción del dominio N terminal con TonB para la formación del poro. A la izquierda aparecen los complejos responsables de la exportación. MI: membrana interna; ME: membrana externa.

El principal problema en el uso de antibióticos peptídicos es su ingreso a la célula, para soslayar este problema el uso del sistema de la microcina parece ser el más indicado debido a su modularidad que permite separar las regiones de exportación, toxicidad y de entrada a la célula. Más aún si todas las enzimas necesarias para la modificación post-traducciona del extremo carboxilo terminal reconocen esta región en forma desestructurada. Por lo que resulta atractivo el uso del extremo carboxilo terminal y del sistema de modificación para generar quimeras que contengan una región tóxica diferente a la de la microcina y puedan ser ingresadas a través de los receptores de hierro a la célula. La otra parte interesante de la construcción de la quimera es la identificación de una proteína que sea esencial para la sobrevivencia de la bacteria, específicamente en lo posible una que sea reguladora. En este trabajo se ha escogido una proteína de la división bacteriana que se encuentra en concentraciones limitantes y ejerce su acción en el periplasma.

### **1.5 ¿Por qué una proteína de la división celular?**

El crecimiento en microbiología se define como un incremento en el número de células y dado que todas las células viven por un tiempo finito el crecimiento es vital para mantener la especie, este proceso realmente complejo requiere de más de 200 reacciones de diversos tipos para llevarse a cabo, cosa que sucede en varias etapas, la última de las cuales es la formación de un tabique o septo que separa a las futuras

células hijas para que finalmente se dividan, proceso conocido como citoquinesis y que es llevado a cabo por un complejo de proteínas llamado divisoma (Madigan y col., 2003).

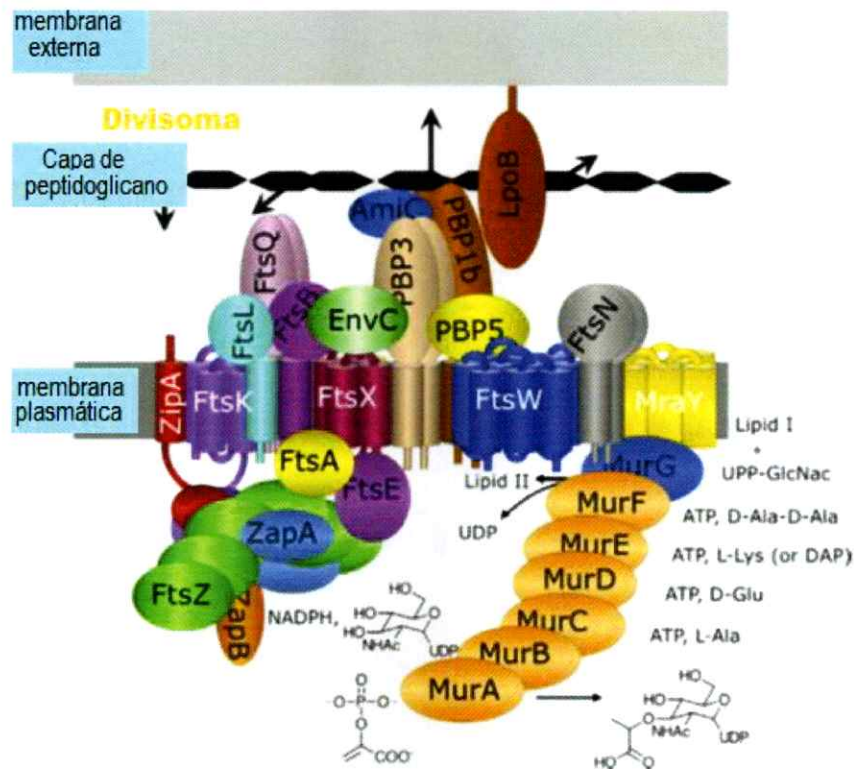
La citoquinesis en bacterias, particularmente el organismo modelo *Escherichia coli*, se puede dividir en al menos 3 etapas, siendo el primero de ellos el ensamblaje del anillo Z en la cara interna de la membrana citoplasmática, el cual está formado por FtsZ que es un análogo estructural de la tubulina eucarionte y al igual que esta posee actividad GTPasa autoactivable al polimerizar para formar protofilamentos (Fig. 3). En esta primera etapa es también fundamental la presencia en el anillo Z de FtsA y ZipA proteínas que lo anclan a la membrana, y sirven de anclaje para proteínas que participarán río abajo en la división (Adams & Errington, 2009).

Esta primera etapa está finamente regulada temporal y espacialmente para asegurar que la formación del anillo Z ocurra entre los cromosomas segregados y que la célula tenga el tamaño adecuado para continuar el proceso de división.

En *Escherichia coli* la segunda etapa corresponde al reclutamiento de al menos otras nueve proteínas de la división al anillo Z para formar el divisoma completo (Fig. 3), muchas de estas proteínas tienen funciones esenciales para el correcto desarrollo del proceso, sin embargo también se encuentran aquellas que comparten funciones no esenciales, haciendo que su ausencia no sea letal. Muchas de estas pueden formar complejos aun cuando no están asociadas al anillo Z. La dependencia de la unión de las proteínas para el ensamblaje del divisoma es lineal. Entre las proteínas que lo conforman se encuentran FtsX y FtsE, que se unen a FtsA después que el anillo Z se ha fijado a la membrana. Estas proteínas forman un complejo dimerico que une ATP y recluta a EnvC para activar la amidasa de peptidoglicano AmiB. A continuación se une FtsK, una DNA translocasa, que segrega el cromosoma y lo aleja del área del septo.



FtsQ, FtsL y FtsB se unen a FtsK y tienen un papel netamente estructural para conectar el anillo Z en el citoplasma con la maquinaria de síntesis de peptidoglicano del periplasma. FtsI y FtsW son parte de la maquinaria dedicada a la síntesis de peptidoglicano en el sitio de septación y FtsN que es la última proteína esencial que se cree funciona como señal de que el complejo está completo y por lo tanto es posible iniciar la septación.



**Figura 3. Esquema de las proteínas esenciales del divisoma de *E. coli* y su ubicación referencial en el complejo.** En la parte inferior en verde se puede ver a FtsZ ensamblada formando el anillo Z del que solo se representa una porción, alrededor del cual se ensambla el resto del sistema, el centro en color morado se muestra el complejo FtsEX y sobre el mismo el regulador de las amidasas del péptido glicano EnvC. En la imagen también se pueden ver las proteínas de los sistemas Mur y PBP a las que no se hará referencia, Imagen tomada de Blaauwen y col., 2014.

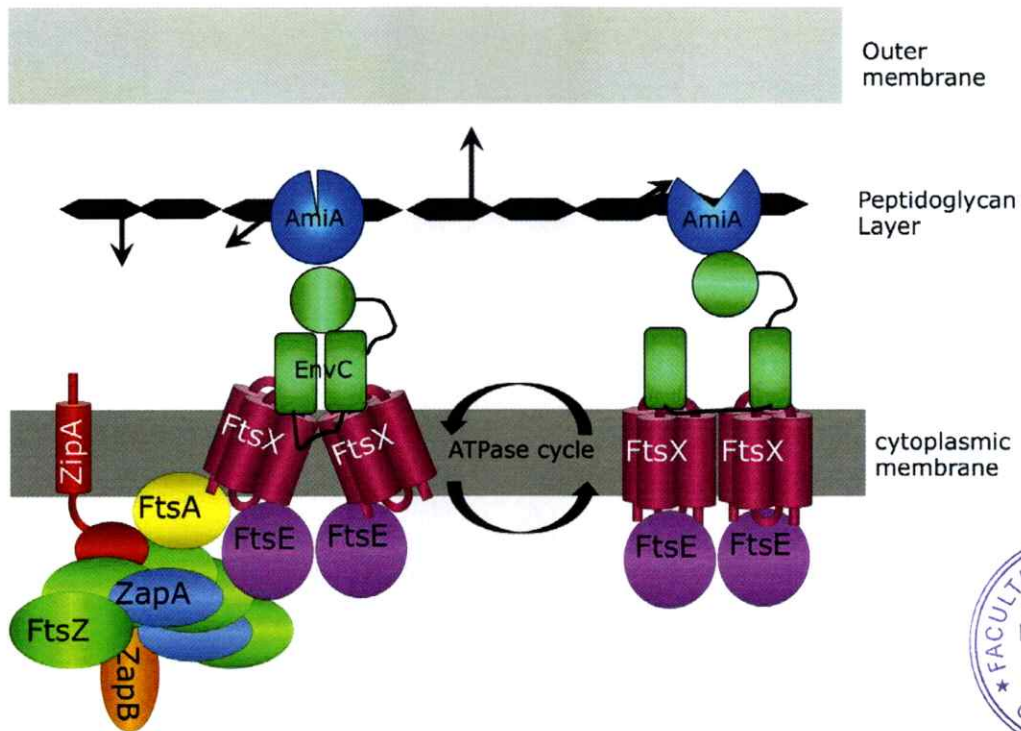
El tercer paso es la activación del divisoma para la síntesis de peptidoglicano en el anillo septal, punto en el cual la célula se debe dividir para dar paso a las 2 células hijas. Este último paso está bajo un complejo control espacial para asegurar que las enzimas encargadas de la degradación del peptidoglicano solo actúen en el anillo septal (Lutkenhaus y col., 2012).

Este trabajo se centra en FtsX, una proteína de 343 residuos de aminoácido, que en *Escherichia coli* forma cuatro segmentos transmembrana y un *loop* que se une a EnvC en el periplasma con alta afinidad ( $K_d = 0,182 \mu\text{M}$ ) y a FtsQ con menor afinidad ( $K_d = 4,03\mu\text{M}$ ). Esta proteína está codificada en un operon junto con los genes que codifican a las proteínas FtsE y FtsY, esta última es un receptor de señales de partícula única o *SRP*, mientras que FtsE es una proteína hidrofílica con tendencia a dimerizar y mediante su asociación con FtsX forma un complejo similar al de los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) en la membrana interna.

Si bien la mayoría de las proteínas del divisoma fueron identificadas en mutantes termosensibles la delección de FtsE solo es letal en bajas concentraciones de sal, menores a un 0,5% y su sobreexpresión no afecta la morfología de la célula y lleva a la formación de cuerpos de inclusión manteniéndose una fracción de la proteína en solución, mientras que la sobreexpresión de FtsX sola o junto a FtsE genera filamentación, inhibición del crecimiento y muerte celular (Leeuw y col., 1999).

La función específica de FtsEX, complejo tipo transportador ABC, en la división no fue dilucidada hasta el año 2011 cuando se descubrió su rol indirecto en la hidrólisis de la pared de peptidoglicano durante la división. En este proceso la región periplasmática de FtsX se une a EnvC que es un activador de la amidasa AmiA, sin embargo para activar a EnvC se requiere un cambio conformacional de FtsEX que sería mediado por la

hidrolisis del ATP unido al lado citoplasmático de FtsE, la que a su vez se ha reportado interactúa con el anillo Z (Fig. 4). Esta cadena de interacciones permiten ligar a las amidasas que hidrolizan al peptidoglicano en el periplasma al anillo Z en el citosol y activarlas específicamente en el sitio de división (Yang y col., 2011).



**Figura 4. Esquema del control de la actividad hidrolasa del complejo FtsEX.** El esquema refleja como el control de FtsX sobre envC esta mediado por cambios conformacionales del complejo inducidos por la hidrolisis del ATP de FtsE. El código de colores de las proteínas es el mismo que se utilizó en la figura 3. Imagen tomada de Blauwen y col 2014.

De este modo, el complejo FtsEX del organismo modelo *Escherichia coli* juega un importante rol en la división y como es de esperarse posee también un altísimo grado de conservación entre las enterobacterias e incluso con otras bacterias Gram negativas, la

comparación con proteínas procedentes de bacterias Gram positivas arroja un considerable grado de conservación aunque menor del observado en bacterias Gram negativas. Esto, en conjunto con todo lo anteriormente mencionado atraen la atención hacia el uso del conocimiento del divisoma y su funcionamiento para la creación de nuevos y mejores agentes antibacterianos que interrumpan un proceso clave, como la hidrólisis de la pared celular que evitaría su crecimiento y por ende la formación de las células hijas ejerciendo una actividad bacteriostática. En este contexto y dada su gran afinidad por las proteínas con las que interactúa es que un péptido del dominio periplasmático de FtsX surge como un excelente candidato para dicha interrupción.

## **Hipótesis**

Hipótesis 1: El dominio periplasmático libre de FtsX ejerce un efecto letal sobre bacterias cuando se encuentra en la región periplasmática.

Hipótesis 2: La adición de 17 residuos de aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la Microcina E492 al péptido del dominio periplasmático de FtsX de *E. coli* en presencia del cassette de expresión completo del sistema de la microcina causaría la modificación post traduccional de la quimera.

## **Objetivos**

Objetivo general: Desarrollo de péptidos bacteriostáticos dirigidos contra el divisoma.

Objetivo específico 1: Comprobar el efecto bacteriostático de la quimera con el dominio extracelular de FtsX sobre esferoplastos de *E. coli*.

Objetivo específico 2: Reconstrucción del vector de expresión de la quimera para permitir su modificación post-traduccional y evaluación del efecto tóxico de la quimera producida.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 MATERIALES

#### 2.1.1 Cepas y plásmidos

Durante este trabajo se trabajó con cepas de *Echerichia coli* DH5 $\alpha$  para la multiplicación y purificación de vectores y la cepa C43 se utilizó para la expresión de proteínas. Se trabajó además con los plásmidos detallados en la tabla 2.

**Tabla 2. Plásmidos utilizados.**

Nombre	Origen	Marcador de selección	Descripción
P33AM	P15A	Cloramfenicol	Vector vacío
pDY138	colE1	Ampicilina	Expresa el dominio periplasmático de FtsX (V94-R223) con un tag de 10 histidinas en el amino terminal y los últimos 17 amino ácidos de la mceE492 de bajo el promotor del fago T7.
pJ053	colE1	Ampicilina	Posee todo el <i>cassette</i> de expresión de la microcina E492 excepto el gen estructural mceA.
pc2	P15A	Cloramfenicol	Expresa el dominio periplasmático de FtsX (V94-R223) con un tag de 10 histidinas en el amino terminal y los últimos 17 residuos de aminoácidos de la mceE492 bajo el promotor del fago T7.

La quimera generada con el dominio periplasmático de FtsX (V94-R223), el tag de 10 histidinas en el amino terminal y los últimos 17 residuos de aminoácidos de la mceE492 se denominará en adelante XMCE y posee la siguiente secuencia:

MRGSHHHHHH HHHHASGSVY KNVNQAATQY YPSPQITVYL QKTLDDDDAAA GVVAQLQAEQ  
GVEKVNILSR EDALGEFRNW SGFGGALDML EENPLPAVAV VIPKLDFQGT ESLNTLRDRI  
TQINGIDEVR MDDSWFARLA ALTGLVGRGS GSGYNSATSS SGSGS

### 2.1.2 Reactivos

En este trabajo se utilizaron los siguientes reactivos de calidad proanálisis: Cloruro de calcio, cloruro de sodio, azul de bromofenol, sacarosa, glutaraldehído, glicina, propanol, azul de Coomassie R250, metanol y ácido acético glacial obtenidos de merk. Mientras que el ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanosulfónico (HEPES) se obtuvo de USbiological, el imidazol de Calbiochem, la acrilamida 40% de Bio-Rad, el inhibidor de proteasas libre de EDTA de Roche, agarosa de Lafken, EDTA de Winkler, tris(hidroximetil)aminometano de AMRESCO y lisozima de huevo de gallina de Sigma.

La enzima de restricción Sall y su *buffer* 10X fueron adquiridos a ThermoScientific, mientras que la enzima de restricción SmaI, T4DNA ligasa y sus correspondientes buffers 10X se obtuvieron de England Biolabs, el cloruro de magnesio, 5X Green Go taq flexi *buffer* y Go tag flexi DNA polimerasa de PROMEGA, medio Lura Broth de Difco, dATP, dTTP, dGTP y dCTP de Omega.

## **2.2 MÉTODOS**

### **2.2.1 Generación de células electro-competentes**

Se crecieron 50 mL de cultivo en medio LB hasta una densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) de 0,5 - 0,6, el cultivo luego se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 5856 xg, se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado 2 veces con 25 mL de glicerol 10% frio, finalmente el precipitado se suspendió en 500  $\mu$ L de glicerol 10%, se alicuotó en volúmenes de 50  $\mu$ L y se almaceno a -80°C.

### **2.2.2 Electro-transformación**

La electro-transformación se hizo en un equipo gene pulser Xcell marca Bio-Rad utilizando los protocolos pre-configurados en el equipo para la electroporación de bacterias. Se utilizaron cubetas de 2 mm, con un pulso de 2,5 kV. La solución a electroporar se componía por un mínimo de 50 ng de DNA en un volumen máximo de 10  $\mu$ L a los cuales se le agregan 50  $\mu$ L de bacterias electro-competentes.

Luego de ser electroporada la solución se diluyo en 1mL de medio LB y se incubo por 1 hora a 37°C, posteriormente las células fueron sembradas en placas de agar LB suplementadas con el antibiótico correspondiente.

### **2.2.3 Generación de células quimio-competentes**

Se centrifugaron 15mL de cultivo en medio LB con una  $OD_{600} = 0,6$  por 10 minutos a 4°C y a 5800 xg. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 5 ml de  $CaCl_2$  100 mM frio en los que se suspendió el precipitado y se incubó en hielo por 20 minutos. Posteriormente la solución se centrifugo por 5 minutos a 4° y a 3000 xg, se desechó el



sobrenadante y se suspendió el pellet en 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  100 mM frío y 500  $\mu\text{L}$  de glicerol, finalmente se alicuotó en volúmenes de 100  $\mu\text{L}$  para almacenarse a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **2.2.4 Químio-transformación**

A una alícuota de células químio-competentes de 50  $\mu\text{L}$  se le agregan entre 2 y 5  $\mu\text{L}$  de solución de DNA y se deja reposar en hielo por 20 minutos. Luego se les da un *shock* térmico a  $42^\circ\text{C}$  por 90 segundos y se incuban en hielo por 2 minutos. Posteriormente se diluyen en 1 mL de medio LB, se incuban por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  en agitación y se siembran en placas de agar LB suplementadas con el antibiótico correspondiente.

#### **2.2.5 Expresión de la químera XMCE**

Se transformaron células químio-competentes de *Escherichia coli* C43 con el plásmido pDY138, de las transformantes obtenidas se seleccionó una para la expresión de la proteína mediante inducción con Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Para lo cual se inoculó 1 L de medio de cultivo LB+ Ampicilina 1 mM y se creció hasta  $\text{OD}_{600} = 0,6$  luego de lo cual se indujo con IPTG 300  $\mu\text{M}$  por 3 horas.

Análogamente para la co-expresión de la químera y el sistema de modificación MccE492 se electro-transformaron células de *Escherichia coli* C43 con los plásmidos pc2 y pJ053 simultáneamente, el resto del proceso se efectuó igual al anteriormente descrito con la excepción de que el medio de cultivo utilizado fue medio mínimo + ampicilina 1 mM + cloramfenicol 1 mM.

## **2.2.6 Purificación de XMCE**

Tanto la quimera producida para la prueba de concepto desde el plásmido pDY138 como la producida desde pc2 en co-expresión con el sistema de modificación de MccE492 se purificaron mediante el mismo procedimiento.

### **2.2.6.1 Extracto de proteínas solubles totales**

El cultivo ya pasado el tiempo de inducción se centrifugó a 7300 xg por 30 minutos, se desechó el sobrenadante, se suspendió el precipitado en 40 mL de *buffer A* (Hepes 50 mM pH 7,5 y NaCl 500 mM) y se añadió media tableta de inhibidor de proteasas libre de EDTA. La solución se sonicó en baño de hielo con un sonicador Misonix 3000 con una sonda de 1 cm de diámetro, con 5 pulsos de entre 45 y 50 Watts durante 20 segundos seguidos de 6 pulsos de 30 segundos de entre 65 y 75 Watts en ambos casos con intervalos de 1 minuto entre pulsos. Posteriormente el sonicado se centrifugó a 47.800 xg a 4°C por 2 horas para eliminar residuos de membrana y otros desechos rescatando el sobrenadante y descartando el precipitado.

### **2.2.6.2 Cromatografía de afinidad a cobalto**

El sobrenadante se cargó con una bomba peristáltica (1 mL/min) en 2 columnas HiTrap TALON® de 1 mL conectadas en serie y previamente equilibradas con el mismo *buffer A*. Posteriormente el sistema se lavó con 25 mL de *buffer A*, seguido de un segundo lavado con 25 mL de *buffer A* + 50 mM imidazol, se realizó un gradiente de imidazol por medio de un puente salino, de 50 mM a 300 mM imidazol en un volumen total de 40 mL. Durante el gradiente se colectaron fracciones de 1 mL, las cuales fueron analizadas mediante SDS-PAGE para determinar en cuáles se encontraba la proteína.

Las fracciones en que se detectó la proteína se juntaron en un *pool* y se dializaron por una noche contra *buffer* Hepes 50 mM + NaCl 100 mM en bolsas de diálisis de 3000 MWCO, el *pool* dializado se concentró en tubos centricon de 3000 MWCO hasta un volumen de aproximadamente 1 mL.

Se tomaron testigos de todos los pasos de la purificación para su posterior análisis mediante SDS-PAGE en 15% acrilamida a 40mA.

### **2.2.6.3 Cromatografía de exclusión molecular**

Se utilizó una columna *Super Dex 75 10/300* conectada a una bomba de *HPLC Merck Hitashi L-6200 intelligent pump* con un módulo detector UV- visible *L4000 UV*.

La columna se equilibró con *buffer* Hepes 50 mM ph 7,5 + NaCl 500 mM y para su calibración se cargaron 100 µL del estándar de peso molecular Bio-Rad (mezcla de tiroglobulina bovina, γ-globulina bovina, ovoalbúmina de pollo, mioglobina de caballo y vitamina B12) con un flujo de 1 mL/min. La elución de las proteínas se siguió registrando la absorbancia a 280 nm en tiempo real utilizando el detector UV del equipo.

Posteriormente y en las condiciones anteriormente mencionadas se eluyó el concentrado obtenido de la purificación por cromatografía de afinidad, se registró la absorbancia a 280 nm y se recogieron fracciones de 1 mL hasta los 45 mL.

Las fracciones en las que se detectó la proteína se concentraron en tubos AMICON 3000 MWCO hasta un volumen de 500 µL para la quimera obtenida desde pc2 y hasta 1mL en el caso de la quimera obtenida desde pDY138.

### **2.2.7 Espectroscopia de masas**

La muestra obtenida de la cromatografía de exclusión molecular, se envió al "Centro de estudios para el desarrollo de la química" (CEPEDEQ) de la universidad de Chile para hacer una espectroscopia de masas en la que la adquisición de datos se realizó en un equipo MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo ion positivo mediante detección lineal para muestras preparadas en una matriz ácido sinapínico.

El análisis de los datos se hizo con el programa mMass.

### **2.2.8 Ensayos de toxicidad de la quimera en céspedes**

Para la generación de los céspedes se mezclaron en proporción 5:4:1 agar MH duro, MH líquido y cultivo a densidad óptica de 0,3 en medio MH y se gelifico sobre una base de agar duro previamente gelificada. Las cepas utilizadas para generar los céspedes poseen resistencia a ampicilina y cloramfenicol.

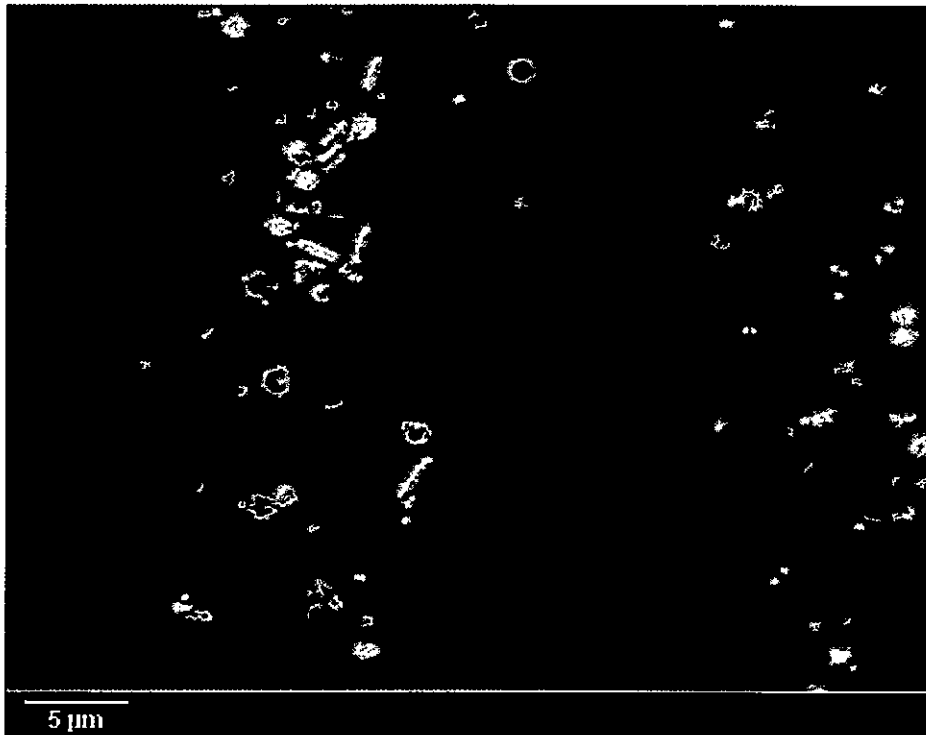
Para ensayar la toxicidad de XMCE purificada se probó sobre céspedes, para esto, se aplicaron gotas con un volumen final de 10  $\mu$ L sobre el césped, desde 20  $\mu$ M hasta 0,3  $\mu$ M en diluciones seriadas de 1:2. Como control negativo se utilizó el mismo *buffer* que contenía la quimera y Microcina E492 como control positivo.

### **2.2.9 Ensayos de toxicidad de la quimera en esferoplastos**

Se inocularon 100 mL de medio LB con *E.coli* C43, se crecieron las bacterias hasta OD<sub>600</sub> = 0,6, se centrifugaron a 3.000 xg por 15 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. El precipitado se suspendió en 15 mL de *buffer* TRIS 10 mM pH 8, se lavó 2 veces con el mismo *buffer* y se suspendió en 5 mL de *buffer* TRIS 100 mM pH 8 + 20% sacarosa estéril. A esta solución se le agregó lentamente 200  $\mu$ L de lisozima a 2mg/mL (en agua)

y se incubó por 15 minutos a 37°C con agitación (90 rpm). Luego se agregaron lentamente 1,2 mL de EDTA 0,1 M en *buffer* sacarosa y se incubó por 15 minutos a 37°C con agitación (90 rpm). Alícuotas de estas células son las que se utilizaron para los ensayos de toxicidad en esferoplastos.

Una vez terminado el proceso se espera que las células pierdan su membrana externa y pared celular volviéndose esféricas, por lo tanto al observarse en un microscopio de fase clara se ven como en la figura 5.



**Figura 5. Preparación de esferoplastos.** En la esquina inferior izquierda se muestra la barra de escala de 5 µm, la imagen se obtuvo utilizando el objetivo 63X.

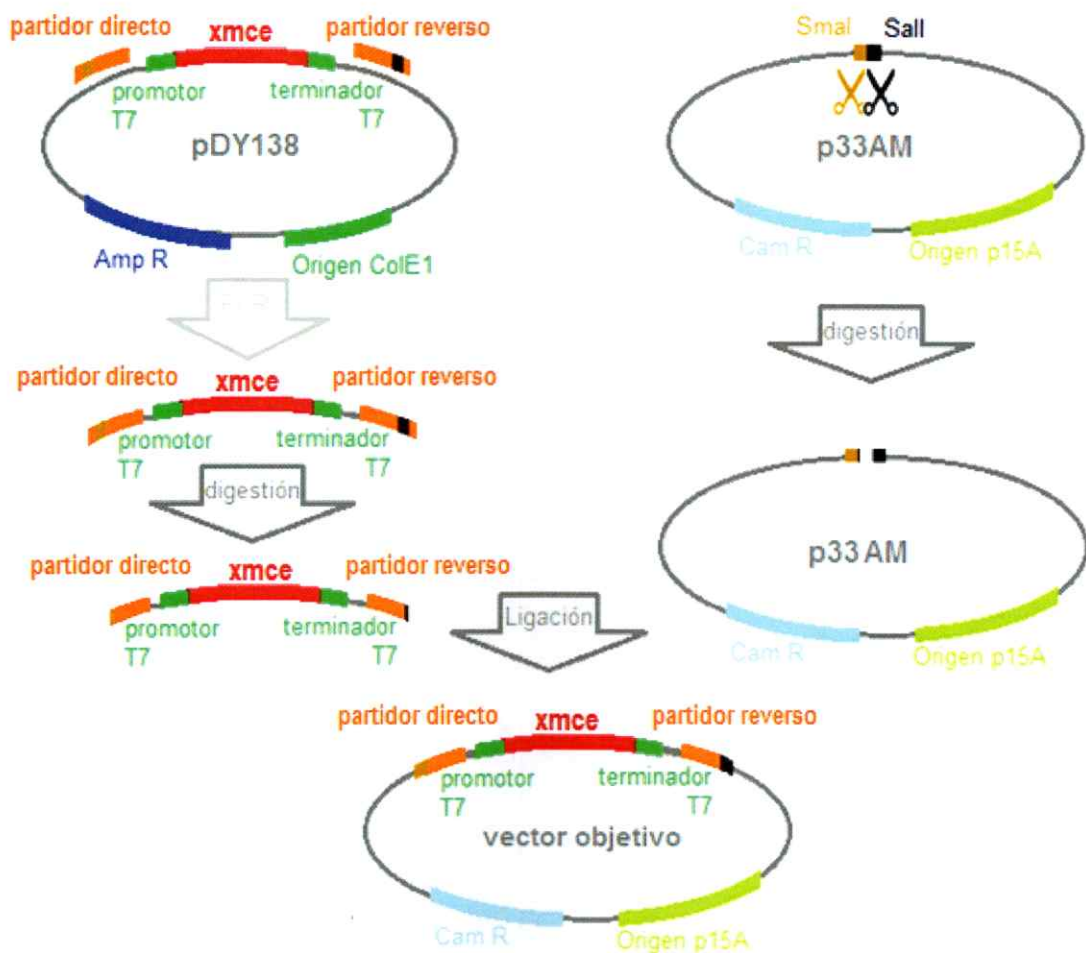
Los ensayos de toxicidad se realizaron diluyendo en serie la solución de XMCE en proporción 1:2 desde 28 µM a 50 nM, 50 µL de cada una de las diluciones se mezcló

con 50  $\mu$ L de esferoplastos, se incubaron por 30 minutos a 37°C. Para determinar el título celular mediante el ensayo de micro-gotas cada dilución se volvió a diluir 8 veces en serie 1:10. Como control negativo se utilizó *buffer*, en el que se determinó el número máximo de células sobrevivientes, como control positivo agua para poder establecer la fracción de las células sobrevivientes que correspondía a esferoplastos.

Para mantener la osmolaridad de la solución de esferoplastos en los ensayos de toxicidad, la alícuota más concentrada de XMCE se mezcló en partes iguales con *buffer* sacarosa 40% + TRIS 200 mM pH 8, mientras que las siguientes diluciones se hicieron en sacarosa 20% + TRIS 100 mM pH 8.

#### **2.2.10 Cambio de vector**

Dado que pDY138 y pJ053 no eran compatibles, pues ambos poseían orígenes de replicación *colE1* y como marcador de selección resistencia a ampicilina, no fue posible co-expresarlos directamente, por lo que se recurrió al cambio de vector del gen de XMCE hacia el vector p33AM, con origen *p15A* y resistencia a Cloramfenicol. Con este propósito se utilizaron las enzimas de restricción *SmaI* y *SalI* para cortar tanto a p33AM como al gen a insertarse, sin embargo el vector de origen no poseía sitios de corte para estas enzimas, por lo tanto se amplificó el segmento de interés de pDY138 con partidores que incluían en sus extremos sitios de corte para dichas enzimas, este procedimiento se ilustra en la figura 6.



**Figura 6. Esquema del traspaso del gen XMCE hacia el vector p33AM.** Se amplificó el gen de XMCE utilizando partidores con sitios de corte Sall y SmaI en los extremos, se cortaron tanto el producto de PCR como el vector p33AM con las enzimas de restricción SmaI y Sall, se ligaron con T4 DNA ligasa y se transformaron en *E.coli* DH5 $\alpha$  electro-competentes.

### **2.2.10.1 Reacciones de PCR**

Los siguientes partidores se utilizaron para la amplificación del gen XMCE:

*Primer foward:* 5' TTAACCCGGGCACGATGCGTCCGGCGTAGA 3'

*Primer reverse:* 5' ATATGTCGACTACAGGGCGCGTCCCATTTCG 3'

En la reacción de PCR estándar se utilizó como templado pDY138 purificado, se usaron temperaturas de 70°C para annealing y 72°C para elongación. Análogamente para el PCR de colonias se utilizó la misma reacción y condiciones con la excepción de que como templado se utilizaron colonias completas.

En los casos en los que se requería el producto de PCR para usos posteriores se cargó la reacción en una electroforesis en geles de agarosa, se extrajo las bandas de la masa molecular correspondiente al amplificado y se purificó el DNA.

### **2.2.10.2 Digestión y ligación**

Las enzimas de restricción se utilizaron en la cantidad y condiciones señaladas por el fabricante, dado que ambas enzimas requerían distintas condiciones, se realizaron digestiones y purificaciones secuenciales. En primer lugar se digirió con Sall, se hizo una electroforesis en gel de agarosa y se purificó el DNA desde la banda correspondiente a la masa molecular del vector lineal o el inserto con el gen XMCE según correspondía. Posteriormente se digirió con SmaI, se comprobó el corte mediante electroforesis en geles de agarosa y se purificó el DNA.

Una vez que se obtuvieron el vector y el inserto digeridos con ambas enzimas de restricción se ligaron en una reacción con proporciones molares 10:1 de inserto a vector vacío con DNA ligasa T4.



### **2.2.11 Microscopías**

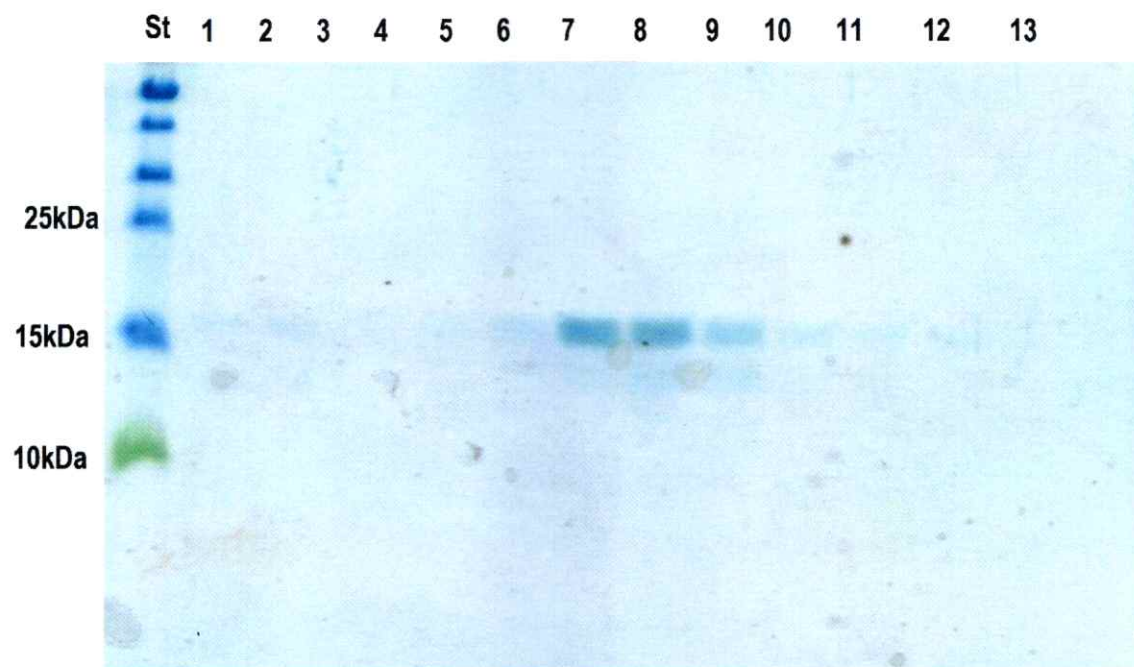
Cultivos de *E.coli* C43 se crecieron hasta  $OD_{600} = 0,6$ . se tomaron 97  $\mu\text{L}$  de cultivo, se les agregaron 3  $\mu\text{L}$  de glutaraldehido 25% para obtener una concentración final de 0,75%, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y se agregaron 10  $\mu\text{L}$  del cultivo fijado sobre una película de agarosa 9% previamente gelificada sobre un portaobjetos, finalmente se cubrió la muestra con un cubreobjetos.

Todas las microscopías se hicieron en un microscopio Zeiss Axiovert 200M conectado a una cámara AxioCam HRm con un aumento de 630x en fase clara, el análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ.

### 3. RESULTADOS

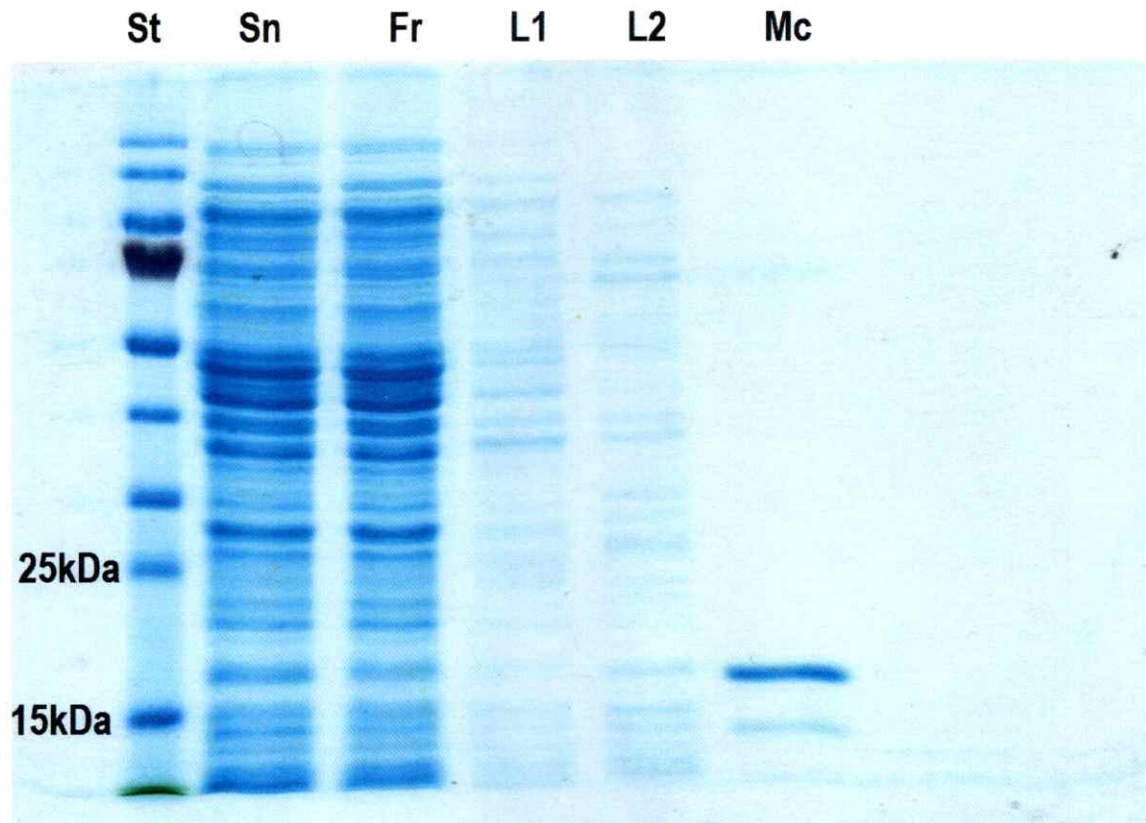
#### 3.1 Purificación de XMCE

Con el objetivo de purificar la quimera XMCE compuesta de un tag de 10 histidinas, el loop periplasmático de FtsX (V94-R223) y los últimos 17 residuos de la microcina E492 para el posterior análisis de su capacidad bacteriostática se siguió el protocolo señalado en la sección de métodos. A continuación se muestra un gel de SDS-PAGE de uno de los pasos más relevantes de la purificación, la elución en una columna de afinidad a cobalto.



**Figura 7. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la elución de la columna Talon HiTrap®.** El primer carril **St** corresponde a los marcadores de masa molecular y los demás carriles a las respectivas fracciones de elución de la columna, después de lavarla con 50mM imidazol y eluirla con un gradiente de 50 mM a 300 mM imidazol, ver sección de métodos.

En la figura 7 se observa que los carriles del 7 al 9 muestran bandas de la masa molecular relativa de XMCE, por lo que estas son las fracciones con las que se continuó a los siguientes pasos de la purificación.



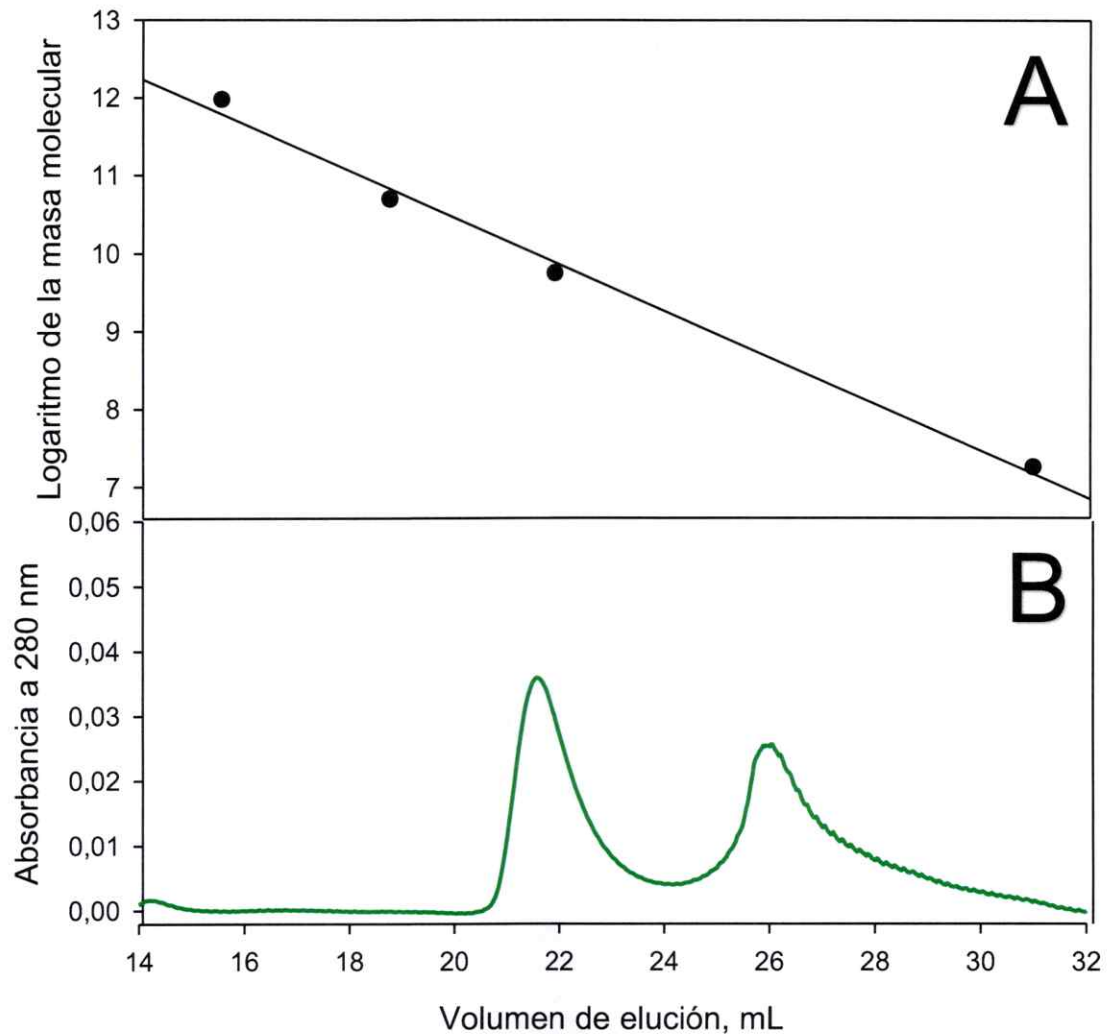
**Figura 8. SDS-PAGE de la purificación de XMCE en columnas Talon HiTrap®.** St corresponde a los marcadores de masa molecular, Sn al extracto de proteínas solubles totales, Fr al frente que no se retuvo en la columna, L1 al primer lavado con *buffer A*, L2 al lavado con 50 mM imidazol y Mc a la muestra concentrada de las fracciones 7, 8 y 9 mostadas en la figura 6.

Como se observa en la figura 8, el sobrenadante y el frente muestran patrones de bandas muy similares, pues la mayor parte de las proteínas del extracto total no se retuvieron en

la columna y por lo tanto se aparecen en el frente. En los lavados la cantidad y la intensidad de las bandas observadas disminuye notablemente.

Finalmente para el extracto concentrado solo es posible ver 2 bandas, una que coincide con la masa relativa de XMCE (17 kDa) y otra de menor masa molecular relativa, que corresponde a una contaminación que se buscó eliminar mediante cromatografía de exclusión en una columna SuperDex 75 como se indica en la sección métodos.

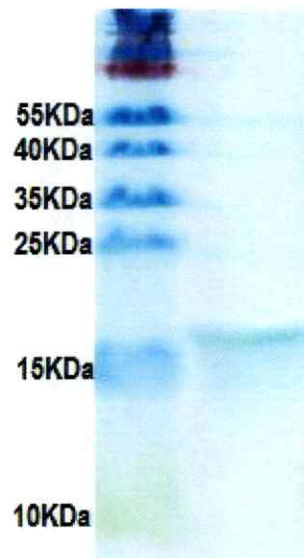
Con los tiempos de elución obtenidos para el marcador de masa molecular se construyó un gráfico del logaritmo de la masa molecular versus el tiempo de elución como se muestra en la figura 9A. A partir de este gráfico se calcularon las masas moleculares relativas de los picos observados en el cromatograma de la muestra, que presentan máximos en los volúmenes 21,5 y 26,5 mL, que permitió determinar sus masas moleculares correspondientes a 21 kDa y 4,7 kDa, respectivamente, por lo que XMCE correspondería al primer pico (21,6 mL). El segundo pico muestra una masa molecular mucho menor que la del péptido XMCE y el primer pico una mayor, probablemente debido a que la cromatografía se hizo en condiciones en que la proteína mantiene su estado nativo y por lo tanto su forma afectaría su volumen de exclusión respecto al de las proteínas globulares que sirven como estándar.



**Figura 9. Cromatograma de exclusión molecular en una columna SuperDex 75.** En A se muestra el gráfico del logaritmo de la masa molecular versus el volumen de elución de los estándares de masa molecular conocida que corresponden de derecha a izquierda a 1.350 Da, 17 kDa, 44 kDa y 158 kDa (●), mientras que la línea continua corresponde a la regresión lineal de los mismos datos. En B se muestra el cromatograma de la muestra XMCE.

Dado que ambos picos están bien separados, sin hombros u otro tipo de anomalías y que en el SDS-PAGE de la cromatografía solo se observó una banda en las fracciones

correspondientes a XMCE, se consideró la proteína como pura para proceder con los ensayos biológicos.



**Figura 10. SDS-PAGE del concentrado purificado de XMCE.** En el carril izquierdo se encuentran los marcadores de masa molecular, mientras que en el carril derecho está XMCE purificado.

### 3.2 Ensayos de toxicidad de la quimera

En el marco del trabajo con la quimera (XMCE) formada por un tag de 10 histidinas en el extremo amino terminal, el dominio periplasmático de FtsX (V94-R223) y los últimos 17 aminoácidos de la microcina E492 en el extremo carboxilo terminal se llevaron a cabo dos tipos de pruebas de toxicidad.

La primera consistió en un ensayo de toxicidad de la quimera no modificada sobre céspedes de E.coli que mostro que a ninguna de las concentración ensayadas hubo halo

de inhibición. Sin embargo se debe recordar que FtsX actúa en el periplasma y la quimera no podría acceder a esta localización desde el exterior en células *E.coli* sin atravesar la membrana externa.

Para ejercer su efecto toxico XMCE requiere estar en el periplasma, dado que las proteínas con las que interactúa se encuentran en dicha ubicación subcelular. Como no es posible que XMCE alcance el periplasma de las células al agregarlo de forma externa se decidió por un segundo ensayo para probar su efecto en esferoplastos, pues estos carecen de membrana externa y pared celular por lo que XMCE podría competir en el periplasma con el sistema FtsX-EnvC-AmiA necesario para la reparación y posterior división celular.

Para calcular el título celular obtenido en cada concentración de quimera ensayada se utilizó el ensayo de microgotas, los datos del cual se resumen en la tabla 3, en la figura 11 se muestran como ejemplo las placas del ensayo de microgota correspondientes a los controles



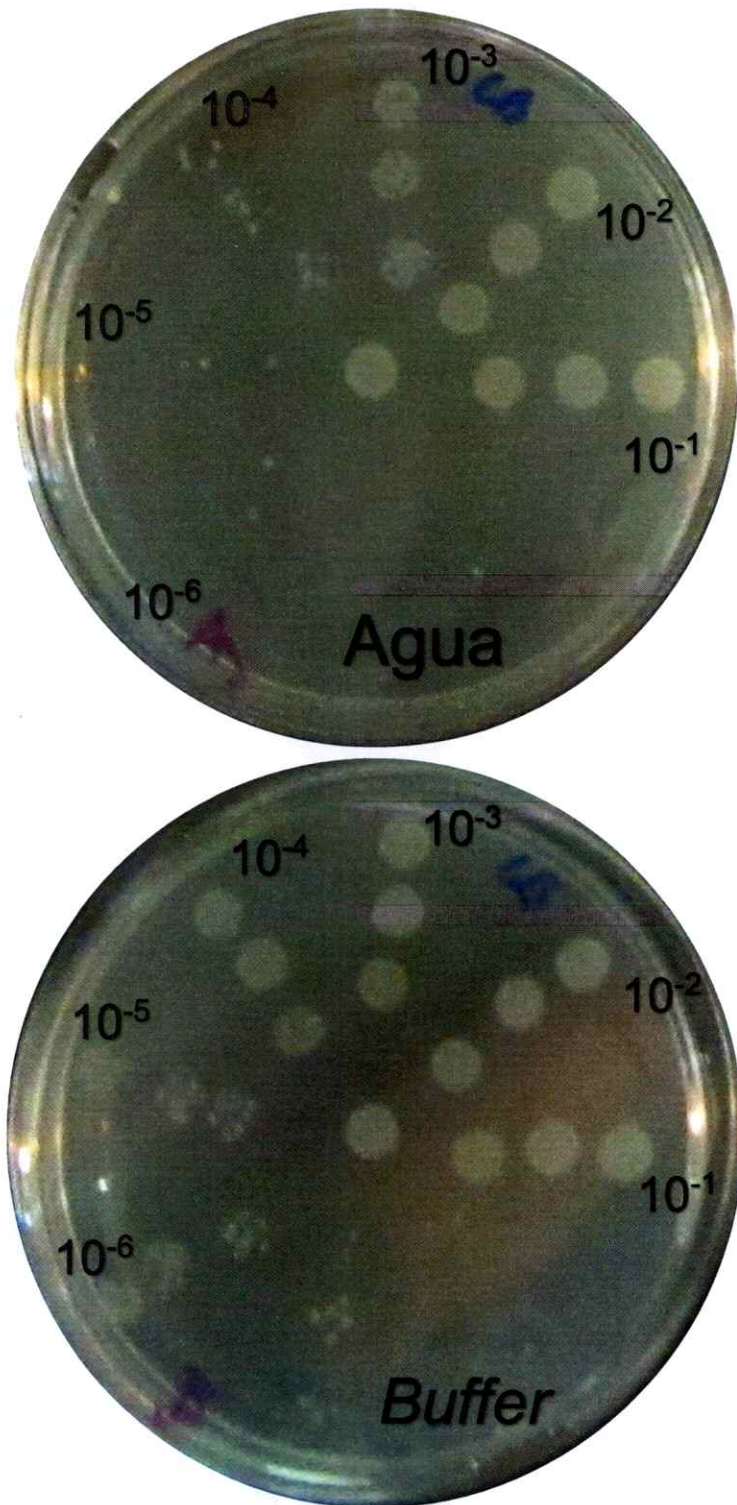


Figura 11. Muestra del ensayo de micro-gotas utilizado para la determinación de la sobrevivencia de los esferoplastos. Se utilizó el ensayo de micro-gota para determinar el título



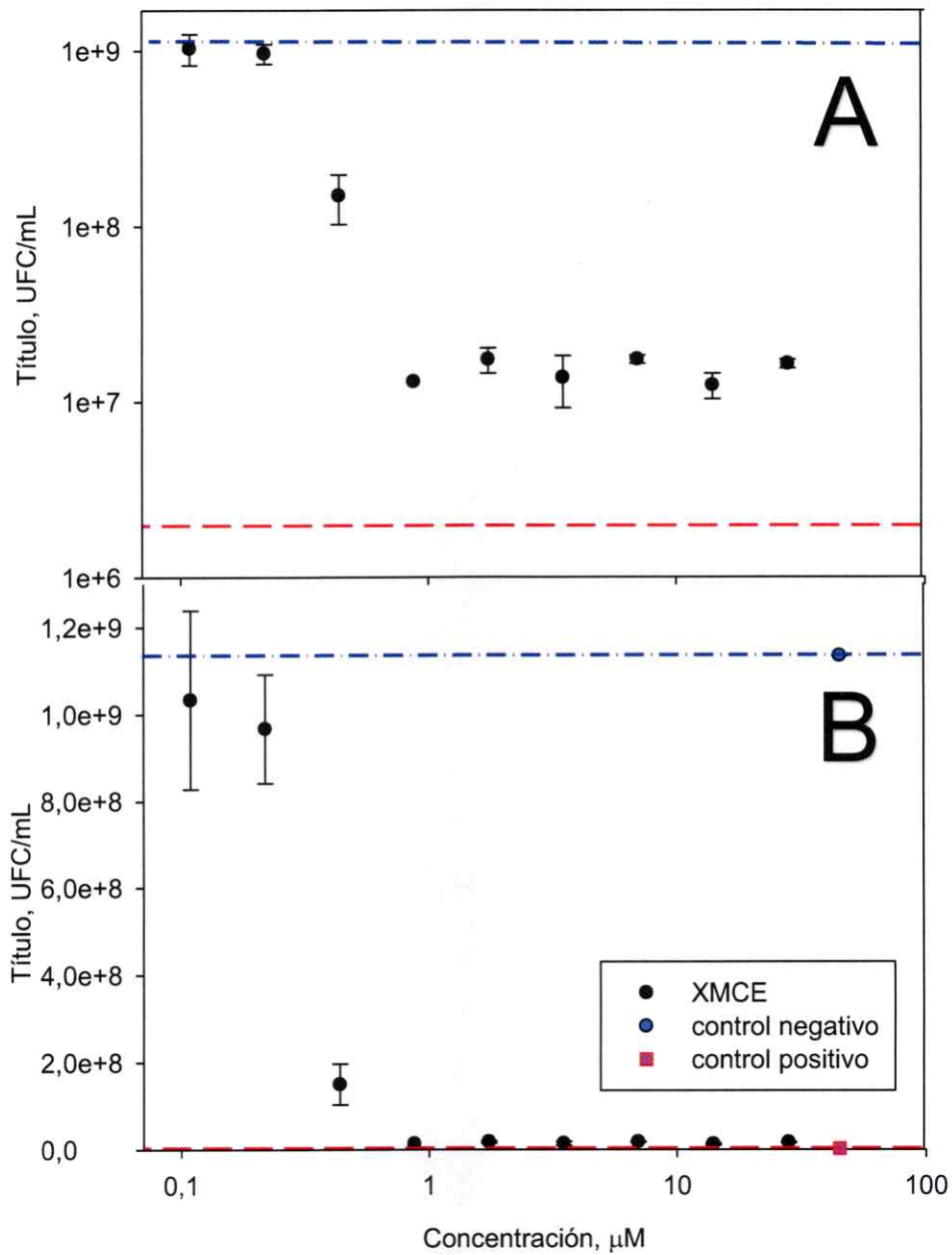
celular de cada una de las concentraciones de XMCE que se probaron en esferoplastos, en la figura respectivamente marcados como agua y buffer se muestran los controles como ejemplo, los números alrededor de cada placa señalan la dilución de cada gota respecto a la solución original, los datos correspondientes a las distintas concentraciones ensayadas de XMCE (imagen no mostrada) se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3. Efecto de la concentración de XMCE en la sobrevida celular.**

Condición	Concentración, $\mu\text{M}$	UFC contadas por gota			Dilución	Título
XMCE	28	15	17	17	$10^{-4}$	$1,63 \cdot 10^7$
XMCE	14	11	12	14	$10^{-4}$	$1,23 \cdot 10^7$
XMCE	7	15	17	20	$10^{-4}$	$1,73 \cdot 10^7$
XMCE	3,5	13	13	15	$10^{-4}$	$1,37 \cdot 10^7$
XMCE	1,75	12	17	23	$10^{-4}$	$1,73 \cdot 10^7$
XMCE	0,88	15	9	15	$10^{-4}$	$1,30 \cdot 10^7$
XMCE	0,44	15	15	15	$10^{-5}$	$1,50 \cdot 10^8$
XMCE	0,22	9	10	10	$10^{-6}$	$9,67 \cdot 10^8$
XMCE	0,11	12	10	9	$10^{-6}$	$1,03 \cdot 10^9$
<i>Buffer</i>	-	8	11	15	$10^{-6}$	$1,13 \cdot 10^9$
Agua	-	17	18	25	$10^{-3}$	$2,00 \cdot 10^6$

<sup>A</sup> Título celular calculado a partir del conteo de UFC por placa para cada una de las concentraciones de XMCE y sus respectivos controles (en duplicado)

A partir de los datos de la tabla se consideró *buffer* como la cantidad máxima de células y agua como el control negativo, la dependencia del título respecto a la concentración de XMCE se graficó en la figura 12, considerando los controles ya señalados.



**Figura 12. Efecto de la concentración de XMCE en la sobrevida celular.** En A en escala logarítmica y en B en escala normal. En cada caso el título celular máximo (*buffer*) se muestra con la línea punteada azul en la parte superior de la figura y el control negativo (agua) en línea punteada roja en la parte inferior.

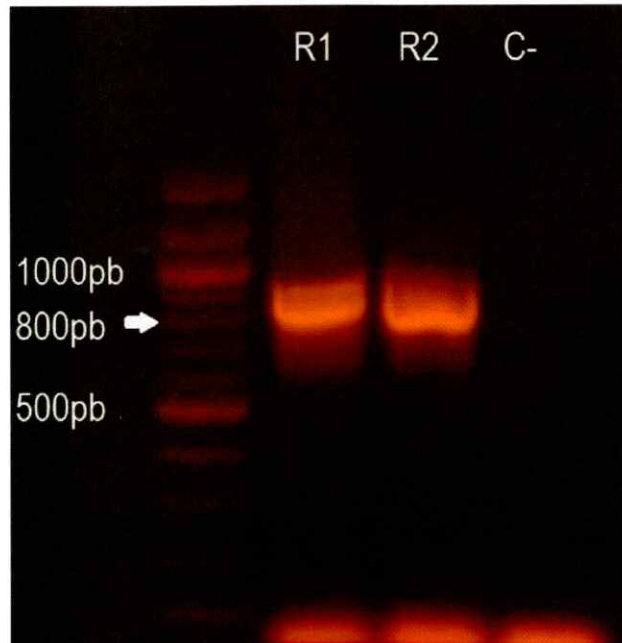


Como se observa en la figura 12A XMCE produce un efecto bacteriostático sobre los esferoplastos que es observable hasta una concentración de  $0,44 \mu\text{M}$ , del ajuste a una curva sigmoidea de los datos se calculó un  $I_{50}$  de  $337 \text{ nM}$ , sin embargo es destacable que incluso en las mayores concentraciones ensayadas no se elimina el total de los esferoplastos, como lo hace el agua. Aunque no se debe olvidar que el eje de las abscisas en la figura 12A se encuentra en escala logarítmica, lo que deforma la percepción del efecto observado por lo que en la figura 12B se presentan los mismos datos con un eje de las abscisas en escala lineal. En donde podemos observar lo cercanos a cero que son los efectos del agua y de XMCE sobre  $1 \mu\text{M}$ .

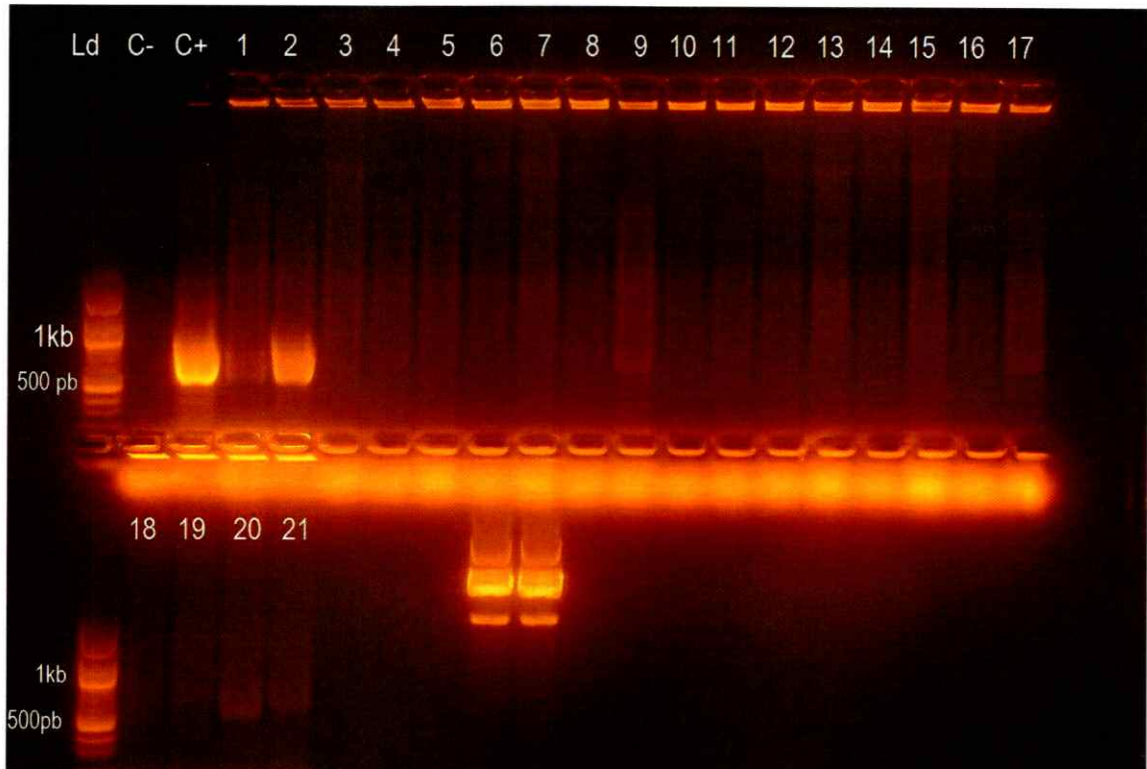
### **3.3 Construcción de un vector compatible**

Por motivos de compatibilidad entre los vectores utilizados, fue necesario cambiar el vector en que se expresaba XMCE, mediante la estrategia señalada en la sección de Materiales y Métodos.

En la figura 13 se observa que los dos partidores seleccionados que se muestran en Materiales y Métodos, amplifican el segmento esperado, debido a que el producto sintetizado corresponde a las  $\sim 890 \text{ pb}$  de XMCE (carriles R1 y R2). El DNA obtenido desde estas bandas junto con el vector vacío se digirió y ligó como se indica en Métodos. El producto ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Los transformantes obtenidos se analizaron mediante PCR de colonias como se muestra en la figura 14



**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la reacción de PCR para amplificar el gen XMCE a partir de pDY138.** El primer carril corresponde al marcador de número de pares de bases y los carriles R1 y R2 muestran, en duplicado, los productos de la reacción de PCR. C- es el control negativo sin DNA templado.



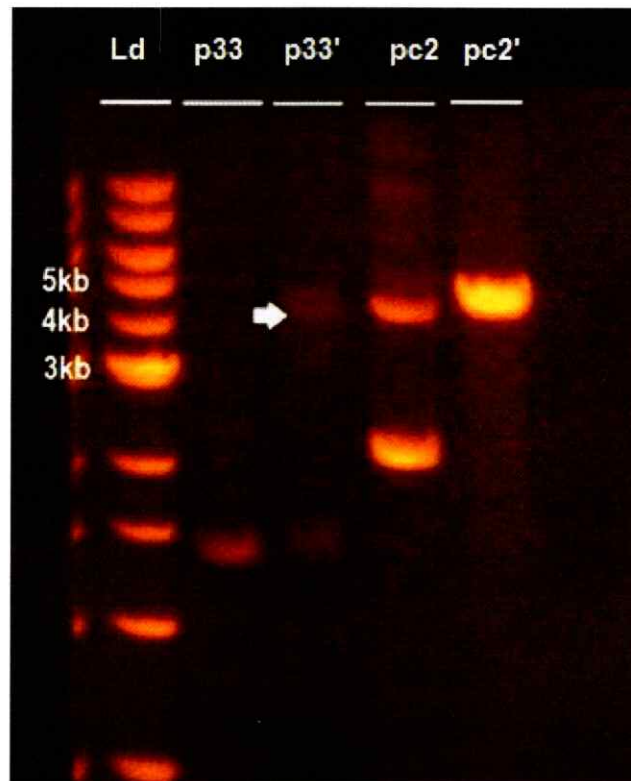
**Figura 14. Electroforesis de la reacción de PCR de colonias de los transformantes.**

**Ld** es el marcador del número de pares de bases, **C-** es el control negativo sin templado, **C+** el control positivo con pDY138 y los números subsecuentes corresponden cada uno a un transformante analizado.

Como se puede apreciar en la figura solo el transformante 2 mostró un amplificado que corresponde con el número de pares de bases del control positivo, lo que indica que se ligó como se esperaba, mientras que los otros transformantes no muestran un amplificado debido a que poseen p33AM que carece de la secuencia codificante de XMCE. Por lo tanto los pasos siguientes se realizaron con el plasmidio purificado desde el clon 2, en adelante referido como pc2.

### 3.3.1 Digestión del vector pc2 con EcoR1.

Se utilizó EcoR1 para comprobar la inserción de la secuencia que codifica XMCE en el vector p33AM.



**Figura 15. Electroforesis de los productos de digestión de p33AM y pc2 con EcoRI.**

**Ld** marcador de número de pares de bases, **p33** es p33AM sin digerir, **p33'** es p33AM digerido con EcoRI, **pc2** vector obtenido del clon 2 sin digerir y **pc2'** vector obtenido del clon 2 digerido con EcoRI.

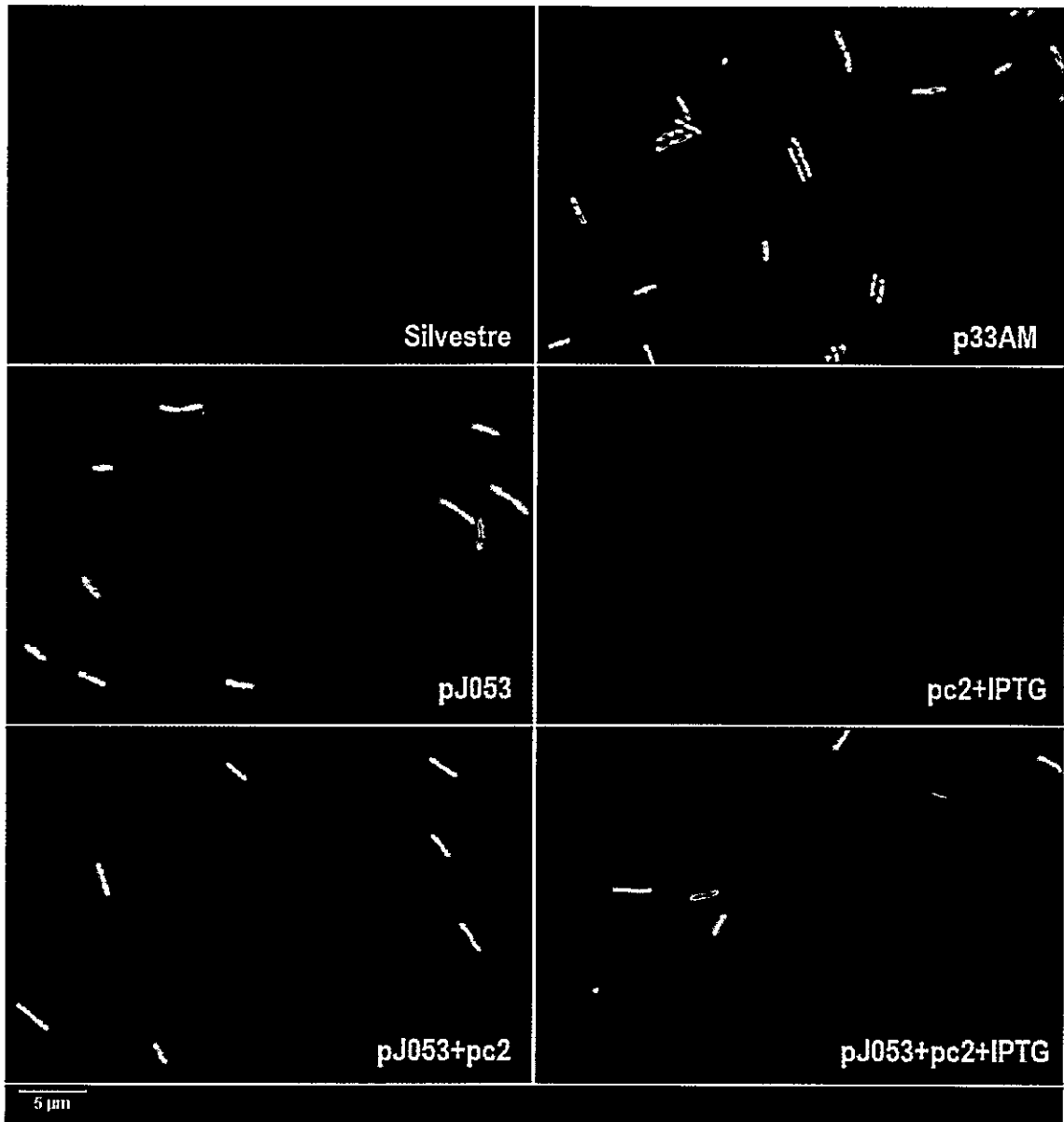
De la figura anterior se calcula el tamaño relativo de cada banda, el de p33AM digerido es de 3970 pb y el de pc2 que es mayor, 4600 pb, corroborando lo esperado para cada uno (3930 y 4760 respectivamente), pues el tamaño de p33AM debiera incrementar en

890 pb con el inserto. A la vez en pc2 se pueden ver 2 bandas, una de cerca de 4600 pb y otra de aproximadamente 2300 pb, en cambio p33AM sin digerir muestra una sola banda de 1420 pb.

Los resultados en su conjunto muestran que XMCE se encuentra insertado correctamente en el vector p33AM, formando el vector pc2.

### **3.4 Co-expresión de pJ053 y pc2**

La sobre-expresión de proteínas puede tener distintas consecuencias en la célula, entre las que se encuentran la formación de cuerpos de inclusión de la proteína sobre-expresada, su degradación por proteasas o que posea un efecto toxico sobre la célula, en cuyo caso podría causar cambios fenotípicos como filamentación o ausencia de septación, la detección de este último fenómeno se llevó a cabo mediante microscopia en campo claro.



**Figura 16. Microscopia de fase en campo claro de las transformantes.** En la leyenda de cada cuadro se indica el o los plásmidos y condiciones pertinentes, el aumento se mantiene en todas las imágenes y en la esquina inferior izquierda se puede observar la barra de escala de 5 µm. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 63X.

Como podemos ver en la figura 16 todas las combinaciones de vectores utilizadas, tanto en presencia como en ausencia del inductor tienen un fenotipo normal, un resumen del

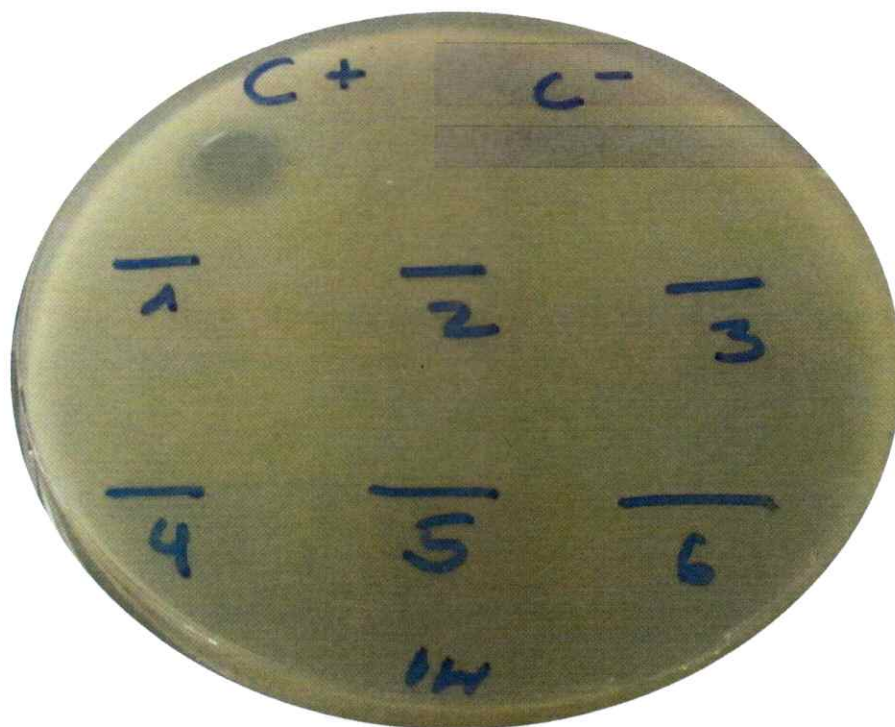


largo promedio de cada combinación se muestra en la tabla 4, donde no se pueden apreciar diferencias significativas entre ellas, por lo que su expresión no estaría teniendo efectos fenotípicos sobre las células productoras.

**Tabla 4- Largo promedio de las células en cada condición.**

Plásmidos	Tamaño, $\mu\text{m}$		
silvestre	2,23	$\pm$	0,33
pc2	2,20	$\pm$	0,59
p33am	1,90	$\pm$	0,40
pJ053	2,24	$\pm$	0,42
pJ053+pc2	2,39	$\pm$	0,42
pJ053+pc2+IPTG	2,42	$\pm$	0,52

A continuación se procedió a purificar la quimera obtenida de la co-expresión de pJ053 y pc2 con la misma metodología anteriormente utilizada para la quimera obtenida de pDY138 y con resultados similares. Posteriormente la toxicidad de la quimera obtenida fue probada en céspedes de *E. coli* C43 como se muestra en la figura 17. Como se puede observar en la figura, el uso de diferentes concentraciones de la quimera purificada desde del sistema en el que se co-expresan pJ053 y pc2 sobre céspedes de *E.coli*, indicó la ausencia de toxicidad de esta en todas las concentraciones ensayadas, que son al menos 2 órdenes de magnitud mayores respecto a las que se mostraron toxicidad en esferoplastos. Por lo que no se realizaron más estudios dirigidos a la evaluación de la toxicidad de la quimera *in vivo*.



**Figura 17. Ensayo en céspedes de la toxicidad de la quimera.** Donde el control positivo (C+) corresponde a microcina E492, el control negativo es el mismo *buffer* en el que se encuentra la quimera y los números corresponden a distintas diluciones seriadas 1:2 de la quimera, siendo la más concentrada el número 1 a 20  $\mu$ M.

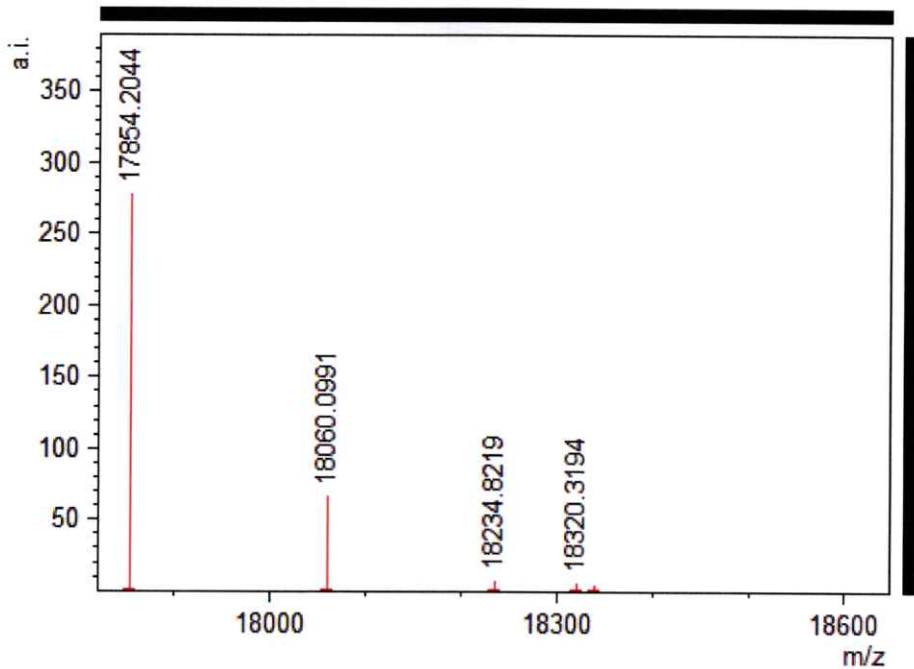
Debido a que la falta de toxicidad puede deberse a un ingreso fallido de la quimera a la célula blanco por ausencia de modificación post-traducciona l o por una falla en el reconocimiento de las modificaciones por la célula blanco se procedió a evaluar mediante espectroscopia de masa la modificación post-traducciona l de la proteína purificada.

### 3.5 Determinación de la masa molecular de la quimera

Para el análisis de datos de la espectroscopia de masa de XMCE purificado se utilizó el espectro de las masas identificadas por el programa mMass, pues los picos observados en el espectro sin tratar eran anchos, con una amplitud de hasta 100 Da, lo que

posiblemente se debió a la alta masa molecular de XMCE, que se encuentra cerca del límite de detección de la técnica utilizada. Una de las causas de la baja resolución es que la adquisición de datos se realizó por detección lineal lo que genera baja resolución de masa.

El espectro de las masas identificadas por el programa mMass se muestra en la figura 18, en el se observan 4 picos, el mayor de los cuales en 17.854 Da correspondería a XMCE sin modificar cuya masa teórica es de 17.863 Da en el pH ácido en que se realizó el espectro, la diferencia de la masa obtenida cae dentro del error experimental.



**Figura 18. Espectroscopia de masa de XMCE.** El eje de las ordenadas representa la relación ente masa y carga. Podemos observar un pico principal en 17.854 y otros tres picos más pequeños entre 18060 y 18320.

En el espectro aparecen otros picos con masas moleculares superiores al primero, y son exactamente 205, 380 y 466 Da mayores, pero en proporciones mucho menores a las del primero, los picos y las diferencias entre ellos y el pico correspondiente a la XMCE no modificada se encuentran en la tabla 5, análogamente en la columna derecha de la misma se encuentran las diferencias entre las masas moleculares de las formas total o parcialmente modificadas de la microcina E492 y su forma no modificada para comparación.

Como se puede observar en la tabla la diferencia entre los picos detectados en XMCE no corresponde con la masa molecular de la enteroquelina completa y esto descarta la presencia de la modificación con enteroquelina en XMCE y concuerda por lo tanto con la ausencia de actividad antibacteriana observada.

**Tabla 5. Diferencia en los picos observados en XMCE y Microcina E492.**

Picos en XMCE (Da)	Diferencia en XMCE (Da)	Diferencia en MccE492 (Da)
17.854,20	0	0
18.060,10	205,89	385
18.234,82	380,62	608
18.320,32	466,12	831

A pesar de lo anterior la presencia de picos de mayor masa que la de XMCE no modificada podría indicar asociación a sales o presencia de modificaciones post-traduccionales incompletas, lo que sería posible dada la similitud en masa de algunas de las diferencias encontradas, como la de 380 en XMCE y 385 en MccE492 que en esta última correspondería a una modificación incompleta, sin embargo no se puede diferenciar entre ambas posibilidades.



#### 4. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue la construcción de una quimera de FtsX para inhibir la división bacteriana. Dada la toxicidad al expresar FtsX completa en *E. coli* se trabajó solo con el "loop" periplasmático (V94-R223) de esta proteína, que es responsable de sus interacciones en el periplasma y se conocen sus constantes de disociación in vitro con otras proteínas del divisoma como FtsQ, FtsE, EnvC y consigo misma (Maturana y col., 2014). La quimera de 17.869 Da contenía el "loop" de FtsX, un tag de 10 histidinas en el extremo amino terminal y los últimos 17 residuos de la microcina E492 en el extremo carboxilo terminal.

La toxicidad de la quimera se probó sobre esferoplastos de *E. coli* en los que se encontró un efecto tóxico con un  $I_{50}$  de 337 nM, al contrario sobre céspedes de *E. coli* no se encontró ninguna actividad tóxica. Este resultado claramente indica que la membrana externa impide la entrada de la quimera. Para hacer permeable la membrana a la quimera se utilizó el sistema de transporte de la microcina E492 a través de los receptores de hierro que reconocen la modificación post-traducciona con un sideróforo en esta proteína. Con este objetivo se utilizó el sistema genético de modificación de la microcina E492 y se obtuvo una quimera parcialmente modificada en su extremo carboxilo terminal. Al probar la actividad tóxica de esta quimera parcialmente modificada en céspedes de *E. coli* no se encontró actividad bacteriostática. Al determinar la naturaleza de las modificaciones por espectroscopia de masas no se detectó una modificación que correspondiera a enteroquelina, pero si algunas de menor masa molecular por lo que se concluyó que la falta de actividad se debía a la ausencia de la modificación completa con enteroquelina.

#### 4.1 Expresión, purificación y caracterización de la quimera.

La quimera se expresó en *E. coli* C43 bajo el promotor del fago T7 y se purificó mediante dos columnas de afinidad de cobalto en serie obteniéndola con un solo contaminante, el que fue posteriormente separado por exclusión molecular con HPCL, y el tiempo de retención de la quimera en estado nativo mostró una masa molecular relativa de 21kDa. La quimera purificada se analizó por SDS-PAGE y se confirmó la ausencia de contaminantes y se estimó una masa molecular de 17 kDa, que coincide con la masa esperada. Por lo tanto la mayor masa determinada por exclusión molecular con HPLC con estándares globulares sugiere que la quimera no sería globular en su estado nativo.

Ensayos sobre céspedes de bacterias Gram positivas y negativas mostraron que la quimera sin modificar no afectaba su crecimiento. La inocuidad de la quimera puede explicarse por dos razones principales, la primera es que no sea competitiva con la función del "loop" de FtsX en el divisoma y la segunda que es que no atraviese la membrana externa hacia el periplasma impidiendo su acción. Como se mencionó antes, para comprobar que la membrana externa de la bacteria actúa como una barrera para la entrada de la quimera, se utilizaron esferoplastos que permiten el acceso directo al periplasma. Los resultados de sobrevivencia de los esferoplastos en presencia de la quimera muestran que FtsX-MccE492 tiene un efecto tóxico sobre los esferoplastos, alcanzando un 2% de sobrevivencia a partir de 574 nM con un valor de  $I_{50\%}$  igual a 337 nM, que corroboraría la hipótesis inicial sobre su actividad bacteriostática y la concentración en la que se observa se encuentra en el mismo orden de magnitud que la  $K_d$  entre FtsX y EnvC que es de 186 nM.

Por lo tanto podemos concluir que la segunda opción planteada es decir, el paso a través de la membrana externa es el que limita la acción de la quimera. Para eliminar esta

barrera se requiere de un medio que permita la entrada de la quimera al periplasma. La estrategia de "Caballo de Troya" planteada en la Introducción fue el medio escogido en este caso. Como se describe en los resultados, para utilizar los transportadores hierro FepA, Fiu y Cir se utilizó el sistema de modificación postraducciona de microcina que utiliza enteroquelina y permite su entrada al periplasma (Strahsburger y col., 2005). Contrariamente a lo esperado no hubo actividad bacteriostática sobre las células de *E. coli* BL-21 al utilizar la quimera FtsX-MccE492 expresada en conjunto con el plasmidio PJ053 que contiene el sistema de modificación post-traducciona de la microcina E492. Explicaciones para esto son las siguientes: errores en el ingreso a la célula, falta de modificación post-traducciona o concentración insuficiente.

Los resultados de espectrometría de masas de la quimera post-traduccionalmente modificada con el sistema de la microcina mostraron que efectivamente la quimera no contenía enteroquelina y solo se encontraron modificaciones de menor masa molecular. Lo que negaría la segunda hipótesis ya que la adición de los últimos 17 residuos de la MccE492, de los cuales los últimos 10 poseen un motivo que se ha reportado necesario (Leiva, 2009), no serían suficientes para ser reconocidos y modificados por el sistema de modificación post-traducciona de la microcina.

Una causa a descartar es que la concentración de la quimera modificada no haya sido suficiente, pues el análisis de los resultados de espectrometría de masas muestra un 19,4% de la quimera modificada con un aumento de alrededor de 200 Da, que si hubiese sido reconocida por los receptores la concentración máxima ensayada de 20  $\mu$ M correspondería a 500 nM que está en el rango de concentraciones en que se observó el efecto en esferoplastos



En conocimiento de que los últimos 17 residuos de la microcina no son suficientes para el reconocimiento y posterior modificación de la quimera, la primera idea que surge es que exista algún tipo de reconocimiento estructural del resto de la proteína que claramente diferenciaría a la microcina de la quimera, sin embargo esta idea es poco probable, pues se sabe que la microcina E492 es una proteína mayormente desestructurada. Pero a su vez resalta otra de las diferencias que existe entre la microcina E492 y el dominio periplasmático de FtsX, y es que mientras la primera es mayormente desestructurada la segunda no y aunque no hay una estructura descrita para FtsX de *E.coli* si la hay para su homóloga en *Mycobacterium tuberculosis* (Mavrici y col., 2014). En dicha estructura se puede observar que aunque a la parte periplasmática de FtsX frecuentemente se le denomina "loop" esta correspondería en realidad a un dominio periplasmático que contiene principalmente estructura secundaria helicoidal en su espacio tridimensional. El modelo por homología (Swiss model) del "loop" de *E. coli*, basado en la estructura del loop de *M. tuberculosis*, muestra las mismas características estructurales. Así, la estructura del "loop" podría interferir en la modificación post-traducciona l de la quimera, pues al unir el carboxilo terminal de la microcina E492 al dominio periplasmático de FtsX la estructura del mismo podría disminuir la accesibilidad a la maquinaria de modificación post-traducciona l en el extremo carboxilo terminal, evitando su reconocimiento y modificación.

Al respecto, se ha reportado en proteínas desestructuradas que el reconocimiento se realiza por interacción con áreas específicas de las proteínas con las que interactúan y no hay necesariamente un reconocimiento de la secuencia, además se acompaña de un cambio estructural de la proteína inicialmente desestructurada para acomodarse a la interacción (Ubersky y col., 2000). Un ejemplo de esto es la colicina E9, una bacteriocina



que ingresa a la bacteria asistida por el receptor de hierro BtuB, con el que interacciona y forma un complejo, el que posteriormente recluta a la porina OmpF mediante la interacción de los extremos desestructurados de la colicina E9 con 2 de los poros de la OmpF trimérica y con esto permite que través de una sucesión de interacciones posteriores ingrese a la célula (Housden y col., 2005; Housden y col., 2013).

#### **4.2 Proyecciones**

A pesar que la estrategia abordada en este trabajo no permitió obtener las modificaciones post-traduccionales esperadas si fue posible realizar la *prueba de concepto*, que implica que el dominio periplasmático de FtsX interactúa con EnvC interfiriendo la función de esta, y por lo tanto posee un efecto bacteriostático sobre esferoplastos, por lo que se espera que dicho efecto sea transferible a células bacterianas al combinar el dominio periplasmático con algún transportador natural o artificial que medie en su ingreso al periplasma para ejercer su función.

Como continuación de este trabajo se podría perfeccionar la químera utilizada y su modificación post-traducciona l incluyendo variaciones al modelo aquí probado, como podría ser la adición de mayor cantidad de residuos de la microcina en el extremo carboxilo terminal de modo de evitar la interferencia del "loop" estructurado y obtener un mejor reconocimiento por el sistema de modificación.

Otra de las estrategias que se pueden abordar en la misma dirección y continuando con la estrategia de caballo de Troya, es la adhesión química de sideróforos tipo enteroquelina o salmoquelina para lograr el ingreso del dominio periplasmático completo a través de los transportadores de Fe (III) al periplasma, de un modo similar al de la entrada de la microcina E492 pero sin la utilización de su sistema de modificación post-

traduccional. Esta estrategia tiene buenos precedentes en moléculas pequeñas ya que Zheng y Nolan. (2014) lograron unir lantibióticos como ampicilina y amoxicilina a enterobactina (sideróforo) mediante un puente de polietilenglicol y observaron que esto no solo mejoraba el ingreso a la célula de los antibióticos sino que mejoraba su efectividad y disminuía hasta en 1000 veces su concentración mínima inhibitoria.

Una aproximación distinta para lograr el ingreso es el uso de *cell penetrating peptides* o CPP que son un grupo de péptidos pequeños, catiónicos que forman estructura helicoidal, los cuales poseen la capacidad, gracias a su estructura, de interactuar con las membranas eucariontes y atravesarlas sin dañarlas, estando solos o llevando grandes cargas. Para algunos derivados de la bacterenecina 7 (9 residuos) se ha reportado que son capaces de atravesar la membrana plasmática con grandes proteínas adosadas a ellos como estreptavidina (~60 kDa) y unidos a sondas específicas se ha reportado que pueden ingresar incluso a las mitocondrias (Sadler y col., 2002; Dmitriev y col., 2010). Todo esto los hace buenos candidatos para ingresar el dominio periplasmático de FtsX a la célula, pues pueden ingresar proteínas de hasta 3 veces la masa molecular de la de interés y atravesar incluso membranas mitocondriales cuya composición lipídica es más cercana a la de las bacterias que serían en este caso el blanco.

Finalmente y como una proyección en otra dirección a las anteriormente mencionadas sería de interés poder acotar aún más la región de FtsX requerida para la interacción con otras proteínas y la generación del efecto tóxico observado en esferoplastos, pues 165 residuos son suficientes para constituir un dominio estructurado que dificulta la búsqueda de un medio de ingreso a la bacteria. Un péptido más pequeño derivado del "loop" de FtsX, que conserve la misma afinidad para EnvC podría ser más fácil de modificar llegando incluso a no requerir de una entrada asistida.

## 5. CONCLUSIONES

- La quimera es efectiva para disminuir la sobrevivencia en esferoplastos, lo que sugiere una inhibición de la función de FtsX.
- La inocuidad de la quimera en bacterias indica que la membrana externa impide su paso al no estar modificada con enteroquelina.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. W., & Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Reviews Microbiology* 7, 642-653.
- Davies, E., & Adams, M. (1994). Resistance of *Listeria monocytogenes* to bacteriocin nisin. *International Journal of food microbiology*, 21, 341-347.
- De la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. (2015). Using anti-biofilm peptides to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *JPR* 2, 1-8.
- den Blaauwen, T., Monasterio, O., & Andreu, J. (2014). Bacterial cell division proteins as antibiotic targets. *Bioorganic Chemistry* 55, 27-38.
- Dmitriev, R. I., Ropiak, H. M., Yashunsky, D. V., Ponomarev, G. V., Zhdanov, A. V., & Papkovsky, D. B. (2010). Bactenecin 7 peptide fragment as a tool for intracellular delivery of a phosphorescent oxygen sensor. *The FEBS Journal* 277, 4651-4661.
- Feng, X., Sambanthamoorthy, K., Palys, T., & Paranaivitana, C. (2013). The human antimicrobial peptide LL-37 and its fragments possess both antimicrobial and antibiofilm activities against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 49, 131-137.
- Hammami, R., Bédard, F., Gomaa, A., Subirade, M., Biron, E., & Fliss, I. (2015). Lasso-inspired peptides with distinct antibacterial mechanisms. *Amino Acids* 47, 417-428.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I., Diep, D., & Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* 113, 723-736.
- Herranz, C., Cintas, L. M., Hernández, P. E., Moll, G. N., & Driessen, A. J. (2001). Enterocin P Causes Potassium Ion Efflux from *Enterococcus faecium* T136 Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 901-905.
- Housden, N. G., Hopper, J. T., Lukoyanova, N., Rodriguez-Larrea, D., Wojdyla, J. A., Klein, A., Kamiska, R., Bayley, H., Saibil, H., Robinson, C., Kleanthous, C. (2013). Intrinsically Disordered Protein Threads Through the Bacterial Outer-Membrane Porin OmpF. *Science* 340, 1570-1574.
- Housden, N. G., Loftus, S. R., Moore, G. R., James, R., & Kleanthous, C. (2005). Cell entry mechanism of enzymatic bacterial colicins: Porin recruitment and the thermodynamics of receptor binding. *PNAS* 102, 13849-13854.
- Lagos, R., Tello, M., Mercado, G., García, V., & Monasterio, O. (2009). Antibacterial and Antitumorigenic Properties of Microcin E492, a Pore-Forming Bacteriocin. *Curr Pharm Biotechnol* 10, 74-85.
- Leem, J. Y., Nishimura, C., Kurata, S., Shimada, I., & Kobayashi, A. (1996). Purification and Characterization of N-b-Alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a Novel Antibacterial Substance of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *The Journal of Biological Chemistry* 271, 13573-13577.

- Leeuw, E. d., Graham, B., Phillips, G. J., Hagen-Jongman, C. M., Oudega, B., & Luirink, J. (1999). Molecular characterization of *Escherichia coli* FtsE and FtsX. *Molecular biology* 31, 983-993.
- Leiva, M. (2009). El motivo glicina-x del carboxilo terminal es indispensable para la modificación post-traducciona de la Microcina E492. *Tesis de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile*.
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S., & Du, S. (2012). Bacterial Cytokinesis: From Z Ring to Divisome. *Cytoskeleton* 69, 778-790.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los microorganismos; 10° edición; Capítulo 6; p.139*. Pearson education.
- Maturana, D., Ordenes, A., Lagos, R., & Monasterio, O. (2014). FtsEX interaction network in the bacterial divisome. *Presentado en International Union of Microbiological Societies Congresses, Abstract book BAM-PW1009*, 807. Montreal, Canada.
- Mavrici, D., Marakalala, M., Holton, J., Prigozhin, D., Gee, C., Zhang, Y., Rubin, E., Alber, T. (2014). Mycobacterium tuberculosis ftsX extracellular domain activates the peptidoglycan hydrolase, ripC. *PNAS*, 8037- 8042.
- Pinto da Costa, J., Cova, M., Ferreira, R., & Vitorino, R. (2015). Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 2023-2040.
- Riley, M., & Wertz, J. (2002). BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review Microbiology*. 56, 117-37.
- Sadler, K., Eom, K. D., Yang, J.-L., Dimitrova, Y., & Tam, J. P. (2002). Translocating Proline-Rich Peptides from the Antimicrobial Peptide Bactenecin 7. *Biochemistry* 41, 14150-14157.
- Samakovlis, C., Kimbrell, D., Kylsten, D., Engström, Å., & Hultmark, D. (1990). The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO Journal* 9, 2969-2976.
- 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.
- Uversky, V. N., Gillespie, J. R., & Fink, A. L. (2000). Why Are "Natively Unfolded" Proteins Unstructured Under Physiologic Conditions? *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 41, 415-427.
- Vizioli, J., & Salzet, M. (2002). Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences* 3, 494-496.
- Williams, K., & Bax, R. P. (2009). Challenges in developing new antibacterial drugs. *Current opinion in Investigational drugs* 10, 157-163.

- Yang, D. C., Peters, N. T., Parzych, K. R., Uehara, T., Markoski, M., & Bernhart, T. G. (2011). An ATP-binding cassette transporter-like complex governs cell-wall hydrolysis at bacterial cytokinetic ring. *PNAS* *vol. 108*, E1052-E1060.
- Zheng, T., & Nolan, E. M. (2014). Enterobactin-Mediated Delivery of b-Lactam Antibiotics Enhances Antibacterial Activity Against Pathogenic *Escherichia coli*. *JACS* *136*, 9677–9691.