

UCH-FC
Biotecnología
F632
C.1

ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



“Función del extremo C-terminal de la proteína TonB en la sensibilidad a la microcina E492”

Memoria de Título

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

Por

Jorge Andrés Flores Palma

Agosto, 2009
Santiago - Chile



Directora de la Memoria de Título: Dra. Rosalba Lucía Lagos Mónaco

ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que la Memoria de Título, presentada por el Sr. Jorge Andrés Flores Palma:

“Función del extremo C-terminal de la proteína TonB en la sensibilidad a la microcina E492”

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Rosalba Lagos Mónaco
Directora Memoria de Título

Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Dr. Francisco Chávez Espinosa
Evaluador

Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, 4 de agosto de 2009

Autobiografía



Jorge Andrés Flores Palma. Soy un rancagüino, nacido el día 13 de diciembre de 1984, previo al solsticio estival. Durante mi niñez fui criado por mis abuelos maternos hasta la edad de 3 años en una bella localidad campestre de la sexta región, Loreto. En esta humilde pero ilustre cuna comencé a preguntarme sobre el mundo, el origen y el por qué de las cosas.

Mi mundo cambió vertiginosamente al irme a vivir con mis padres a la segunda región, al campamento minero de Chuquicamata. Al poco tiempo recibí a mi hermana Laura, la cual pasó a ser mi primer tubo de ensayo y fuente de conflictos durante toda mi infancia. Posteriormente me trasladé hasta la ciudad de Calama, tierra de sol y cobre, en donde viviría por casi 13 años.

En la escuela fui el primero de mi curso en aprender a leer y a escribir, tal vez impulsado por mis ganas de estudiar y por mis ganas de entender la información que me brindaba el mundo. Siempre lleno de amigos y una que otra vicisitud, mi infancia fue placentera, musical y llena de emociones que hasta el día de hoy siento.

Como preadolescente recibí a mi segunda hermana, Camila. Ella pasaría a ser mi segundo tubo de ensayo y mi primera alumna hasta finales de mi adolescencia. Ya en mi enseñanza media, en algún momento misterioso decidí ser biólogo, quizás porque el universo conspiró a mi favor.

No me arrepiento de haber hecho caso omiso a las recomendaciones de mis parientes y familiares en el momento de entrar a la universidad. Creo que mi decisión final fue un gran paso, ya que pude ingresar al mundo de los seres científicos, los cuales son inmensamente críticos, destructivos, intolerantes y pensantes. Es enorme el cambio entre joven y joven universitario, dejándome marcado por el resto de mi vida. Con momentos tanto felices como tristes, pude sobrellevar 5 años de pregrado con grandes amigos y amigas que a diario siguen haciéndome reír a carcajadas.

En un día de aquellos, el universo conspiró nuevamente para que entrara al Laboratorio de Biología Estructural y Molecular. Ahora me pregunto si el universo es embustero, ya que heme aquí, estresado, insomne, enfermo, viejo, gruñón, feo, etc. No obstante, hasta ahora no me han arrebatado mi felicidad.



Agradecimientos

Quiero agradecer a todos los seres vivientes que hicieron posible el desarrollo de esta memoria. Agradezco primeramente a mi tutora, la Dra. Rosalba Lagos, por brindarme la oportunidad de trabajar en su línea de investigación, por su estricta pero a la vez humana formación científica y por permitir que tanto mi mente como mis ideas divagaran en la búsqueda de los resultados.

Agradezco a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por brindarme el mejor plantel de profesores y ayudantes, los cuales fueron fundamentales en mi formación académica. Agradezco al Dr. Octavio Monasterio por las críticas constructivas a mi trabajo y sobre todo, por ser un educador antes de un científico. Agradezco a la tía Ema y a la tía Anita Valdés, cuyo afecto y entendimiento pudieron ayudarme en los momentos de máxima presión universitaria. También agradezco a todos mis compañeros y amigos que me acompañaron durante mis estudios universitarios, de los cuales rescato su simpatía, entendimiento y camaradería.

Quiero expresar mis agradecimientos a todos los miembros del laboratorio de Biología Estructural y Molecular (BEM), por compartir, enseñar y por hacer más amena la estadía en el laboratorio. Especialmente, quiero referirme a aquellos que influyeron tanto en este trabajo como en mi manera de ver las cosas: agradezco a Verónica García, por ser mi profesora y gran guía; a Macarena Marín, por los momentos de máximo jolgorio y por supuesto, el traspaso de conocimientos; a Gíssela Araya y a M. Felipe Leiva, por ser mis amigos entrañables y la fuente de alboroto, pelambres y risotadas; a Daniela Muñoz y Bea (Beatriz González), por ser en un comienzo dos buenas ayudantes en mi trabajo, y posteriormente, por reír, cantar y/o llorar; a Roselyn Orellana, por hacer que el laboratorio tenga pies y cabeza, y por supuesto, por

compartir su humor y agrado en todo momento; a Jonathan Arias, Paula Maldonado y Felipe Hurtado, por su simpatía y compañerismo; a Coté (María José Gallardo), David Weinstein, Gabriela Mercado y Sergio Gutiérrez, por tener una gran voluntad y siempre buena disposición cuando requerí de ellos; a Don Pedro y a Macarena Collao, por hacer andar el laboratorio y por estar siempre prestos a ayudar a quien lo necesite. Finalmente, agradezco sinceramente a mi madre (Meny), a mis dos hermanas (Laura y Camila) y a Fufi, por ser los únicos entes en la faz de la tierra con la capacidad de entenderme tal como soy.



Tabla de contenidos



Agradecimientos	ii
Tabla de contenidos	iv
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen	x
Summary	xii
1. Introducción	1
1.1 Las bacteriocinas	1
1.2 La microcina E492	3
1.2.1 El mecanismo de acción de la MccE492	4
1.3 La translocación a través de la membrana externa y TonB	6
1.4 La permeasa de manosa	9
1.5 La inmunidad a la MccE492	10
Hipótesis	14
Objetivos	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
2. Materiales y métodos	16
2.1. Materiales	16

2.1.1	Reactivos.....	16
2.1.2	Las cepas bacterianas y los plásmidos.....	17
2.2	Métodos.....	19
2.2.1	Métodos de biología molecular, de secuenciación de ADN y de análisis..	19
2.2.2	Purificación de la MccE492, PAGE e Inmunoblot.....	19
2.2.3	Preparación de las muestras de la MccE492 para el ensayo sobre cultivos celulares.....	22
2.2.4	Ensayos de formación de halos de inhibición de crecimiento.....	22
2.2.5	Ensayo de sensibilidad a la MccE492 en los cultivos líquidos.....	22
2.2.6	Preparación de los esferoplastos y de los ensayos con la MccE492.....	23
2.2.7	Análisis estadístico de los resultados.....	24
3.	Resultados.....	25
3.1	Estudio de la participación del dominio C-terminal de TonB en la actividad bactericida de la MccE492.....	25
3.1.1	Generación de una proteína TonB carente del dominio C-terminal.....	25
3.1.2	Las cepas que expresan la proteína mutante TonBA109-239 ^P presentan insensibilidad a la MccE492.....	26
3.1.3	Las cepas que expresan las proteínas mutantes en el extremo C-terminal de TonB son insensibles a distintas concentraciones de MccE492.....	33
3.1.4	Los esferoplastos de una cepa que expresa una proteína TonB mutante en el extremo C-terminal son insensibles a la MccE492.....	33
3.1.5	Estudio de la participación del dominio C-terminal de TonB en la inmunidad a la MccE492.....	35

3.1.6	El extremo C-terminal de TonB no es necesario en el mecanismo de inmunidad de la MccE492.....	38
3.2	Participación de la proteína ExbB en la actividad bactericida de la MccE492 .	40
3.2.1	La MccE492 presenta una menor actividad bactericida sobre un césped de una cepa mutante <i>exbB</i> ⁻	40
3.2.2	La sensibilidad parcial a la MccE492 de una cepa mutante <i>exbB</i> ⁻ es dependiente de la concentración	42
3.2.3	La actividad de la MccE492 disminuye en un césped de una cepa mutante en <i>exbB</i> que expresa la proteína de la inmunidad	42
3.2.4	Una cepa mutante en <i>exbB</i> es inmune a la MccE492 cuando expresa el gen de la inmunidad a MccE492.....	44
4.	Discusión	47
4.1	La actividad bactericida de la MccE492 es dependiente del extremo C-terminal de la proteína TonB.....	47
4.2	La actividad de la MccE492 y el mecanismo de inmunidad son independientes de la proteína ExbB	51
5.	Conclusiones	54
6.	Análisis estadístico	56
6.1	Comparaciones entre dos medias muestrales	56
6.2	Docimasia o pruebas de hipótesis.....	58
7.	Referencias bibliográficas	76

Lista de tablas

Tabla 1. Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo.....	18
Tabla 2. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y de secuenciación	20
Tabla 3. Ensayos de actividad bactericida por el método del método de la dilución crítica para las cepas mutantes en TonB	32
Tabla 4. Ensayo de sobrevivencia a la MccE492 sobre esferoplastos que expresan mutantes en TonB.....	36
Tabla 5. Caracterización fenotípica de la mutante TonB Δ 109-239 ^h mediante el ensayo de inmunidad a la MccE492 por el método de la dilución crítica.....	37
Tabla 6. Ensayos de inmunidad de esferoplastos en las cepas que portan las mutantes de TonB y el gen de la inmunidad a la MccE492.....	39
Tabla 7. Caracterización fenotípica de la mutante HE1 (<i>exbB::Tn10</i>) mediante el método de la dilución crítica.....	41
Tabla 8. Caracterización fenotípica mediante el método de la dilución crítica de la mutante HE1 (<i>exbB::Tn10</i>) que expresa la proteína de la inmunidad.....	45
Tabla 9. Ensayos de inmunidad de esferoplastos en mutante ExbB ⁻ portando el gen de la inmunidad a la MccE492	46

Lista de figuras

Figura 1. El modelo de translocación de la MccE492.....	5
Figura 2. Las topologías y el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas MceB, ExbB y TolQ.	12
Figura 3. Estrategia de la mutación dirigida sobre el gen <i>tonB</i>	27
Figura 4. Analisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas de las mutantes en <i>tonB</i>	28
Figura 5. Mapa de restricción de los productos de PCR de las diferentes construcciones.	29
Figura 6. Descripción y comparación de secuencias de las proteínas TonB mutantes.	30
Figura 7. Tratamiento de las mutantes en <i>tonB</i> con distintas concentraciones de MccE492.	34
Figura 8. Viabilidad celular de la mutante en ExbB a distintas concentraciones de MccE492.	43
Figura 9. Modelos propuestos para el mecanismo de acción de la MccE492	49

Lista de abreviaturas

A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
A ₄₅₀	Absorbancia a 450 nm
Amp	Ampicilina
ATP	Trifosfato de adenosina
pb	Pares de bases
Cm	Cloramfenicol
min	Minuto(s)
h	Hora (s)
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Kan	Kanamicina
MccE492	Microcina E492
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
O.D. ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamino
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidades formadoras de colonias
kpb	Pares de kilobases
fpm	Fuerza protón-motriz
rpm	Revoluciones por minuto
U.A.	Unidades arbitrarias

Resumen

La microcina E492 es una bacteriocina que forma canales iónicos en la membrana citoplasmática de las células sensibles, e *in vitro* en membranas artificiales. Los determinantes genéticos necesarios para su producción, presentes en un segmento de 13 kb en el genoma de *Klebsiella pneumoniae* cepa RYC492, fueron clonados y expresados en *Escherichia coli*, obteniéndose una microcina recombinante de idénticas propiedades bioquímicas y biológicas.

El mecanismo de acción de esta microcina involucra traspasar la membrana externa por medio de la interacción con los receptores de sideróforos catecólicos FepA, Fiu y Cir. La inserción de la microcina E492 en la membrana citoplasmática produciría su despolarización y sería un proceso dependiente de la proteína de membrana citoplasmática TonB.

En este trabajo se generó una construcción que codifica para una proteína TonB trunca que carece del extremo C-terminal (TonB Δ 109-239) para averiguar su participación en la actividad bactericida de la microcina E492. Una cepa que expresa esta proteína trunca es insensible a la microcina E492 y conserva esta resistencia en células cuya membrana externa ha sido permeabilizada (esferoplastos), lo cual permite concluir que se requiere del extremo C-terminal de TonB para la actividad bactericida de MccE492.

Para ejercer su acción fisiológica, la proteína TonB se asocia con 2 proteínas de la membrana interna: ExbB y ExbD. En este trabajo se analizó si ExbB es importante para la acción de la proteína de la inmunidad. Una cepa mutante ExbB⁻ presenta un fenotipo parcialmente sensible a la microcina E492, indicando que se requiere del funcionamiento de TonB para el ingreso de la microcina E492 al espacio

periplasmático. Sin embargo, los esferoplastos de las células mutantes en ExbB que expresan la proteína de la inmunidad MceB son completamente inmunes a la microcina E492, indicando que ExbB es dispensable en el mecanismo de inmunidad.

Summary

Microcin E492 is a channel-forming bacteriocin that forms ion channels into the inner membrane of the target cell, and *in vitro* into artificial membranes. The genetic determinants necessary for its production, located in the chromosome of *Klebsiella pneumoniae* strain RYC492, were cloned and expressed in *Escherichia coli*, obtaining a recombinant microcin E492 with identical biochemical and biological properties.

The action mechanism of microcin E492 involves the recognition of the outer membrane receptors for catechol siderophores FepA, Fiu and Cir. The insertion into the cytoplasmic membrane would produce its depolarization, in a process that is dependent on TonB, an inner membrane protein.

In order to investigate the role of TonB in the mechanism of action of microcin E492, a construction that codifies for a TonB protein lacking its C-terminal domain (TonB Δ 109-239) was generated. A strain that expresses this gene is insensitive to microcin E492. These cells conserved the resistance to microcin E492 when their outer membrane was permeabilized (spheroplasts), indicating that the C-terminal domain of TonB is required for the bactericidal activity of microcin E492.

TonB associates with two proteins of the inner membrane to achieve its biological function: ExbB and ExbD. In this work, ExbB was analyzed regarding its role in the immunity to microcin E492. An ExbB⁻ mutant is partially sensitive to microcin E492, and probably is required for the passage of the microcin E492 toward the periplasmic space. Nevertheless, spheroplasts of cells lacking ExbB and expressing the immunity protein MceB are totally immune to microcin E492, indicating that ExbB is not essential for the immunity mechanism.

1. Introducción

1.1 Las bacteriocinas

Las bacteriocinas corresponden a una clase natural de antibióticos que se distinguen meritoriamente de otros debido a sus propiedades. Son de naturaleza proteica y son producidas por casi todas las especies bacterianas, tanto Gram-negativas como Gram-positivas. En contraste con otros antibióticos, sólo actúan sobre la misma especie o sobre especies que están relacionadas cercanamente (Reeves, 1965). Incluyen proteínas de diversos tamaños, blancos microbianos, modos de acción, y mecanismos de inmunidad. Dentro de una especie se han podido identificar decenas o centenas de diferentes tipos de bacteriocinas. Actualmente, muchas bacteriocinas están siendo estudiadas por su potencial utilidad en salud animal y humana, y en uso agrícola (Riley y Chavan, 2007).

Las bacterias Gram-negativas producen una amplia variedad de bacteriocinas y son llamadas específicamente de acuerdo al género de la bacteria productora. Esta diversidad de bacteriocinas puede ser dividida en tres grupos de acuerdo a sus tamaños: (1) grande, tipo-colicina (bacteriocinas de 25 - 80 kDa), (2) pequeñas, llamadas microcinas (<10 kDa) y (3) bacteriocinas del tipo cola de bacteriófago, que corresponden a ensamblajes peptídicos multiméricos de alto peso molecular y son el grupo menos caracterizado de los tres (Riley y Chavan, 2007).

Las colicinas corresponden a las bacteriocinas producidas por algunas cepas de *Escherichia coli* y son letales para las cepas relacionadas a *E. coli*. Sus tamaños varían entre los 25 y 80 kDa, están codificadas en plásmidos y presentan diversos modos de acción general (enzimático o formador de poros) y de ingreso a la célula blanco (sistemas cosechadores de energía Ton o Tol). Se sabe que los mecanismos

de ingreso por ambos sistemas son muy distintos, a pesar de ser poco comprendidos. Sus blancos celulares pueden ser la membrana citoplasmática (colicinas formadoras de poros), los ácidos nucleicos (colicinas tipo DNasa, RNasa y t-RNasa) y el péptidoglicano (colicinas inhibidoras de la síntesis de mureína) (Cascales y cols., 2007).

Las microcinas corresponden a un grupo de bacteriocinas generalmente hidrofóbicas que muestran una alta estabilidad al calor, a los valores de pH extremos y a las proteasas, además de una gran solubilidad en metanol (de Lorenzo, 1984; Baquero y Moreno, 1984). A diferencia de las colicinas, las microcinas son excretadas al medio extracelular en vez de ser liberadas mediante la lisis celular (Braun y cols., 2002). Habitualmente se producen en la fase estacionaria de crecimiento bacteriano y poseen una gran actividad bactericida, con concentraciones inhibitorias mínimas en el rango de concentración nanomolar. A la fecha se han identificado 14 microcinas, sin embargo, sólo 7 de ellas han sido caracterizadas a un nivel estructural (Duquesne y cols., 2007). Dentro de los blancos celulares de las microcinas podemos mencionar 2 tipos hasta la fecha: las enzimas intracelulares responsables de la estructura o la síntesis de ADN/ARN y la membrana citoplasmática (Braun y cols., 2002; Duquesne y cols., 2007).

Las microcinas pueden ser clasificadas dentro de dos clases: la clase I, cuyas microcinas presentan tamaños menores a los 5 kDa, genes de modificación postraduccional y al menos un gen implicado tanto en el proceso de exportación al medio extracelular como en el mecanismo de inmunidad; la clase II, cuyas microcinas presentan al menos dos genes involucrados en la exportación y el requerimiento de la funcionalidad del gen cromosómico *tolC*. A su vez, la clase II puede dividirse en dos subclases, la subclase IIa y la subclase IIb, con la diferencia que a esta última subclase

pertenece a las microcinas modificadas postraduccionalmente (Braun y cols., 2002; Duquesne y cols., 2007).

1.2 La microcina E492

La microcina E492 (MccE492) es una bacteriocina de bajo peso molecular, producida y excretada naturalmente por *Klebsiella pneumoniae* cepa RYC492 y que es activa sobre diversas cepas de la familia Enterobacteriaceae (de Lorenzo y Pugsley, 1985). Entre sus características destacan la particularidad de ser producida en forma activa sólo durante la fase exponencial de crecimiento (Orellana y Lagos, 1996), la capacidad de inducir la apoptosis en líneas celulares humanas (Hetz y cols., 2002) y la capacidad de agregarse en forma de fibras de tipo amiloide tanto *in vivo* como *in vitro* (Bieler y cols., 2005).

Los determinantes genéticos implicados en la producción, el procesamiento, la exportación y la inmunidad de la MccE492 se encuentran en un segmento de 13 kb que se localiza en el cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492, el cual fue clonado y expresado en *E. coli* (Wilkens y cols., 1997). La MccE492 producida en *E. coli* conserva las mismas propiedades de la producida por *K. pneumoniae* RYC492 (Wilkens y cols., 1997). Al caracterizar este segmento de 13 kb por medio de la secuenciación, la construcción de un mapa de restricción, el análisis bioinformático y la mutagenización de sitio específico y al azar con el transposón Tn5, se identificaron al menos 10 marcos de lectura abiertos (denominados *mceABCDEFGHIJGF*) (Lagos y cols., 2001). Las funciones de las proteínas correspondientes a estos 10 marcos de lectura abiertos han sido parcialmente caracterizadas: las proteínas MceG y MceH están involucradas en la exportación, en tanto que las proteínas MceC, MceI y MceJ están involucradas en la modificación postraducciona que es importante para el reconocimiento por parte de los receptores de sideróforos catecólicos en la membrana

externa en la célula blanco (Lagos y cols., 2001; Strahsburger y cols., 2005; Nolan y cols., 2007). El gen estructural de la MccE492 codifica para MceA, y se ha comprobado que es la única proteína necesaria para matar a la célula productora sin la proteína de la inmunidad, MceB (Bieler y cols., 2006).

1.2.1 El mecanismo de acción de la MccE492

La actividad bactericida de la MccE492 radica en su capacidad de formar canales de iones en la membrana citoplasmática de las células sensibles, lo cual se ha estudiado *in vitro* en membranas artificiales (Lagos y cols., 1993). Su mecanismo de acción involucra una etapa de translocación a través de la membrana externa por medio de la interacción con los receptores de sideróforos catecólicos FepA, Fiu y Cir, los cuales reconocerían la modificación postraduccional de la MccE492 en el extremo C-terminal (Strahsburger y cols., 2005). Una vez dentro del espacio periplasmático, se insertaría en la membrana citoplasmática y produciría la despolarización, la pérdida del potencial de membrana y una reducción drástica del ATP (Destomieux-Garzón y cols., 2003; Baeza, 2003). Existe evidencia que apunta a la participación del extremo C-terminal de la proteína TonB para la acción bactericida (Figura 1). De esta manera, las células que expresan una proteína TonB trunca o que son carentes de TonB son resistentes a la acción de la MccE492. Lo mismo ocurre cuando estas células son tratadas para formar esferoplastos (células cuya membrana externa ha sido permeabilizada) (Baeza, 2003; García, 2008; M. Tello, comunicación personal). Por otro lado, la MccE492 aislada a partir de algunas cepas que portan el sistema de expresión con mutaciones en los genes de maduración, y que por lo tanto no presenta actividad sobre la célula bacteriana, resulta ser activa sobre los esferoplastos de las células que expresan TonB (Lagos y cols., 2001).

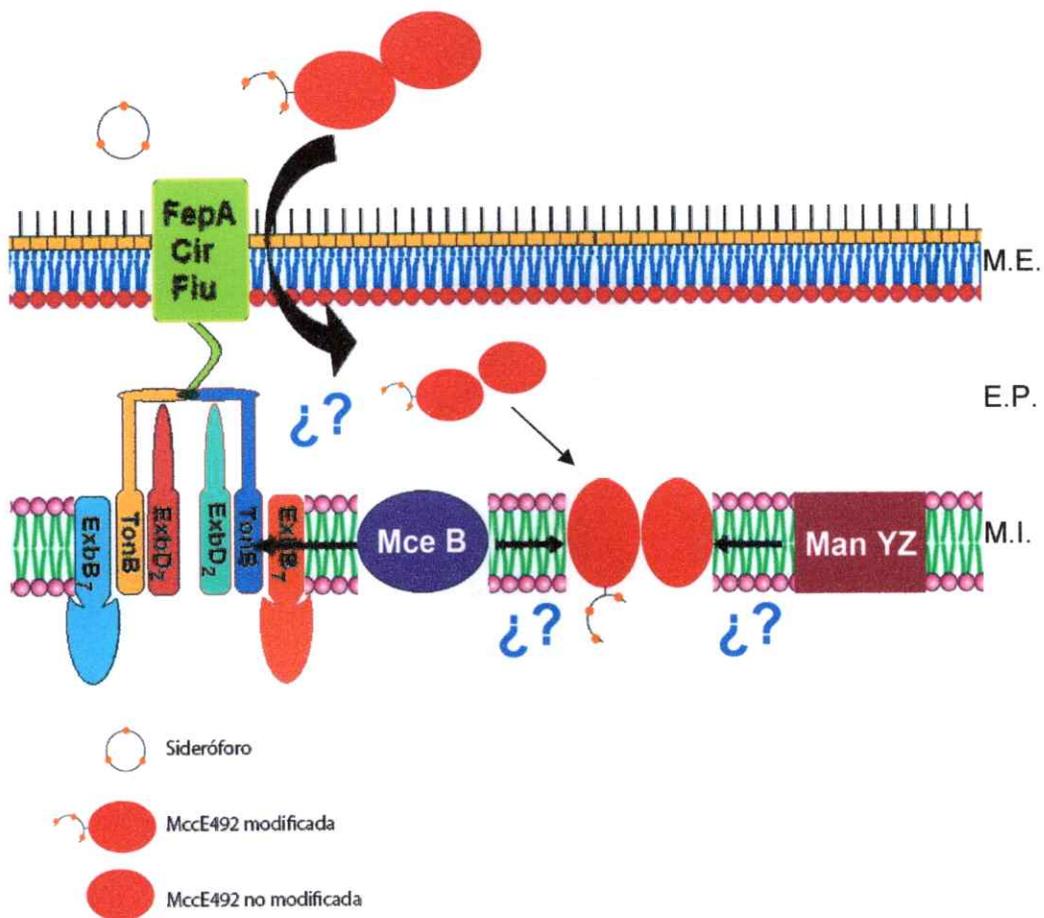


Figura 1. El modelo de translocación de la MccE492.

La MccE492 interactúa con los receptores de sideróforos catecólicos FepA, Cir y Fiu, mediante un mecanismo desconocido y se translocaría hasta el espacio periplasmático de una manera dependiente de TonB. Posteriormente, formaría un poro en la membrana citoplasmática. La MccE492 insertada en la membrana puede interactuar con los complejos TonB-ExbB-ExbD y ManYZ. La proteína de la inmunidad, MceB, interactuaría con TonB. M.E., membrana externa; E.P., espacio periplasmático; M.I., membrana interna.

1.3 La translocación a través de la membrana externa y TonB

Debido a su importancia fisiológica, TonB es una proteína muy estudiada. En *E. coli*, TonB es una proteína de 239 residuos aminoacídicos, 17% de los cuales corresponden a residuos de prolina (Postle y Good, 1984). Su propósito parece ser la transducción de la energía proveniente de la fuerza protón-motriz (fpm) generada en la membrana interna hasta la membrana externa, en donde se necesita para el transporte activo de diversos sideróforos, metales, vitamina B₁₂ y muchos nutrientes con pesos moleculares que superan los 600 Da (Postle y Kadner, 2003; Wiener, 2005; Koebnik, 2005; revisado por Schauer y cols., 2008).

TonB es una proteína que interactúa con componentes tanto de la membrana interna como de la externa (Higgs y cols., 2002a) y puede dividirse en tres dominios: dominios N-terminal (residuos 1 al 65) y C-terminal (103 al 239), separados por una región rica en residuos de prolina (66 al 102) (revisado por Postle y Kadner, 2003). El dominio N-terminal contiene una secuencia señal hidrofóbica estándar que depende del sistema de secreción Sec para su inserción en la membrana citoplasmática y además presenta una región de transmembrana (1 al 33) importante para las interacciones con las proteínas que forman el complejo productor de energía, ExbB y ExbD (Larsen y Postle, 2001). La región rica en residuos de prolina está conformada por repetidos de residuos Pro-Glu y Pro-Lys, es altamente estructurada según algunos estudios de resonancia magnética nuclear y parece formar un bastón de 10 nm. Su función genera controversia, pues, algunos estudios indican que su remoción no influiría significativamente en la actividad de TonB (Postle y Kadner, 2003) y otros más recientes indican que la remoción impediría la formación del complejo entre FhuA (un receptor de sideróforos de tipo hidroxamato en *E. coli*) y TonB (Khursigara y cols., 2005). Finalmente, el dominio C-terminal es el que interactúa con los receptores de la membrana externa, y por ende, sería el encargado de la transducción de la energía (Postle y Kadner, 2003).

En *E. coli*, el residuo Gln¹⁶⁰ se ha identificado como esencial para la interacción entre TonB y los receptores de la membrana externa implicados en el transporte de nutrientes y la internalización de las bacteriocinas dependientes de TonB, ya que estas proteínas poseen un motivo denominado caja TonB, el cual permitiría la interacción que finaliza en la transducción de energía. De la misma manera, las bacteriocinas que dependen de TonB para su internalización presentan el mismo motivo. En este residuo se han identificado supresores genéticos para las mutaciones de la caja TonB, tanto en los transportadores de membrana externa dependientes de TonB como en las bacteriocinas dependientes de TonB (Postle y Kadner, 2003; Koebnik, 2005; Vakharia-Rao y cols., 2007). En nuestro laboratorio se ha determinado que la MccE492 no presenta una caja TonB como tal en su estructura primaria, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en los experimentos de competencia con un pentapéptido sintético del tipo caja TonB (Glu-Thr-Val-Ile-Val), en donde no se observa una disminución de la actividad bactericida (Baeza, 2003).

Con respecto al complejo de transducción de energía en el cual participan las proteínas TonB, ExbB y ExbD, se conoce la topología de membrana de cada proteína, pero se desconocen hasta ahora sus interacciones, al igual que la estequiometría exacta del complejo. Esta última ha sido estimada a través de estudios de entrecruzamiento *in vivo* y estudios cristalográficos como 14 a 15 moléculas de ExbB, 4 a 5 de ExbD y el transductor, TonB, probablemente como dímero (Held y Postle, 2002; Brinkman y Larsen, 2008). Queda mucho por entender sobre el funcionamiento del complejo TonB y el rol de las proteínas ExbB y ExbD, las cuales están ancladas en la membrana citoplasmática y participan necesariamente en el proceso de transducción energética para convertir a TonB a un estado sensible a la fpm (Held y Postle, 2002; Postle y Kadner, 2003). Estas proteínas participarían además en la estabilidad y la funcionalidad de TonB (Ahmer y cols., 1995) y posiblemente como proteínas de tipo

chaperona: ExbB durante la síntesis y la localización de TonB en la membrana citoplasmática (Karlsson y cols., 1993), y ExbD al conducir las transiciones de orden-desorden de TonB que ocurren durante el ciclo de transducción energética (Brinkman y Larsen, 2008). La ausencia de una de estas proteínas disminuiría la cantidad de TonB localizada en la membrana citoplasmática (Karlsson y cols., 1993), y se provocaría una transducción de energía ineficiente (Held y Postle, 2002; Postle y Kadner, 2003). Esto generaría un complejo TonB inestable y transitorio, de modo que las proteínas parálogas de ExbB y ExbD, TolQ y TolR respectivamente, suplirían imperfectamente sus funciones (Braun, 1989; Brinkman y Larsen, 2008). Cabe destacar que las cepas *exbB*⁻ son altamente insensibles a la MccE492 (Pugsley, 1984) y muestran una resistencia cruzada entre varias colicinas, lo cual implicaría un rol de ExbB en la translocación de la MccE492 al espacio periplasmático, o el requerimiento de un estado conformacional específico de TonB. Sin embargo, estas características fenotípicas fueron descritas a una concentración de 20 µg/mL de MccE492, distinto a lo utilizado en este trabajo (hasta 1.000 µg/mL).

Las mutaciones que inactivan a TonB generan un déficit en todos los procesos que requieren de energía a nivel de la membrana externa: el transporte de alta afinidad de los sideróforos de hierro y de la vitamina B12, las infecciones de los bacteriófagos T1 y Φ 80 y la actividad de algunos tipos de bacteriocinas. El tratamiento de las células con protonóforos que desacoplan la fpm en la membrana citoplasmática puede prevenir los mismo procesos anteriores, a pesar de que los ligandos sean capaces de unirse con alta afinidad a sus transportadores en la membrana externa (Postle y Kadner, 2003). Estos procesos sí pueden llevarse a cabo en la ausencia de las funciones de las proteínas ExbB y ExbD.

Con respecto al posible mecanismo de translocación a la membrana citoplasmática dependiente de TonB, aún se mantienen sin resolver las vías de importación que terminan en la internalización de la MccE492 (Destoumieux-Garzón y cols., 2003), el mecanismo de protección de la proteína de la inmunidad, MceB (Baeza, 2003) y la implicancia de cada uno de los dominios de TonB y de la MccE492 en esta posible interacción. Los estudios de nuestro laboratorio reportan que una cepa de *E. coli* que expresa la proteína TonB trunca en *trans* presenta una menor sensibilidad a la MccE492 (Baeza, 2003). Sin embargo, estas mutaciones corresponden a mutaciones sin sentido que fueron obtenidas mediante experimentos de mutagénesis al azar con hidroxilamina sobre un plásmido que expresa TonB (Baeza, 2003), la cual en consecuencia tendría el dominio de transmembrana de TonB y parte del dominio periplasmático. Otros resultados de nuestro laboratorio indican que una cepa que expresa esta proteína TonB trunca presenta un fenotipo rezumante. Por tal razón, en esta memoria se generará una mutante por remoción del ADN, para comprobar si el dominio C-terminal de TonB se requiere para la actividad bactericida de la MccE492.

1.4 La permeasa de manosa

En un trabajo reciente se ha demostrado que el transportador de manosa del sistema fosfoenol-piruvato:azúcar fósfotransferasa (la permeasa de manosa) es esencial y está directamente relacionado con en el efecto bactericida de la MccE492 (Bieler y cols., 2006; comentado por Erni, 2006), pues, bacterias mutantes obtenidas por transposición en este sistema son resistentes a la MccE492. El complejo de la manosa permeasa se compone de tres subunidades: IIA^{Man} (ManX), IIC^{Man} (ManY) y IID^{Man} (ManZ). Estas proteínas catalizan el transporte de la manosa a través de la membrana citoplasmática mediante un mecanismo que acopla el transporte del

sustrato con la fosforilación de éste (Erni y cols., 1987). Las cepas resistentes a la MccE492 resultaron ser mutantes en las proteínas de membrana IIC^{Man} y IID^{Man}, las cuales forman un complejo funcional sólo si ambas proteínas están presentes (Erni y cols., 1987), por lo tanto las subunidades que forman el complejo de la permeasa de manosa en la membrana interna son necesarias y suficientes para la acción bactericida de la MccE492.

1.5 La inmunidad a la MccE492

La inmunidad a la MccE492 es otorgada por la proteína MceB. Esta proteína tiene una masa de 11,5 kDa, se encuentra asociada a la membrana interna y filogenéticamente su gen pertenece a la misma familia de la proteína de la inmunidad para la microcina 24 (*mtfI*) (Lagos y cols., 1999). La organización de los genes que codifican para la proteína estructural y para la proteína de la inmunidad de la MccE492 sugiere que son expresados coordinadamente (Lagos y cols., 1999). Su perfil de hidropatía, calculado mediante el método de Kyte y Doolittle, indica que MceB es una proteína integral de membrana con tres regiones de transmembrana, que comprenden los residuos aminoacídicos 1 al 21, 35 al 55 y 66 al 90 (Lagos y cols., 1999). Se estudió la orientación de estos segmentos mediante fusiones de MceB con la proteína fosfatasa alcalina (Baeza, 2003), sin embargo, no se sabe aún con certeza la orientación exacta. Su modo de actuar aún es desconocido, pero se esgrimen dos posibles mecanismos: una interacción directa con la MccE492 y/o una interacción con el aparato translocador de la MccE492, posiblemente el complejo TonB/ExbB/ExbD (Baeza, 2003). El alineamiento de las secuencias peptídicas de MceB, ExbB y TolQ (parálogo de ExbB) indica que existen patrones de residuos conservados entre las tres proteínas, lo cual permite especular sobre una posible interacción entre MceB y TonB a

nivel de las hélices de transmembrana (Figura 2B). Las tres proteínas tienen una topología similar (Figura 2A), poseen tres hélices de transmembrana y coinciden en ellas 7 residuos aminoacídicos perfectamente conservados.

En la literatura podemos encontrar que el reemplazo del residuo Glu¹⁷⁶, el único residuo cargado en la tercera hélice de transmembrana de ExbB, por alanina (ExbBE176A) es capaz de abolir todas las funciones dependientes de ExbB en *E. coli* (Braun y Herrmann, 2004). Los residuos vecinos, Ile¹⁷⁴ y Leu¹⁷⁸ son compartidos por las tres proteínas (Figura 2B). El alineamiento de las tres secuencias indica que el residuo Phe¹⁸ de MceB está presente en las tres proteínas, y que el residuo Ala¹⁷ de MceB está presente en TolQ (Ala¹⁵²). El residuo Thr¹⁴⁸ se reporta como importante tanto en ExbB como en TolQ (Braun y Herrmann, 2004), y coincidentemente se encuentra entre dos residuos conservados en las tres proteínas, ExbB Phe¹⁴⁶ y Val¹⁴⁹ (Figura 2B).

Los estudios en nuestro laboratorio indican que las mutaciones puntuales asociadas a la pérdida de la funcionalidad en MceB (MceBA17V y MceBA77V) son capaces de compensar las mutaciones sin sentido en TonB generadas con hidroxilamina, que no cumplen con su función biológica normal (Baeza, 2003): TonBA Δ 43-239 y TonBA Δ 109-239 son compensatorias de MceBA77V; TonBS16L es compensatoria de MceBA17V. La proteína mutante MceBA17V presenta una sensibilidad mayor a la MccE492 que la proteína mutante MceBA77V, sensibilidad que es similar a la presente en el control sin MceB (TonB⁺). Esto indica que la hélice I de MceB presenta un efecto mayor sobre la acción protectora de MceB (Baeza, 2003). En la literatura se puede encontrar información acerca de la importancia de los residuos Ser¹⁶ e His²⁰ y sus respectivas ubicaciones espaciales en TonB, los cuales estarían implicados en la interacción con ExbB, la actividad de TonB y la transducción energética (Larsen y Postle, 2001). La proteína mutante TonBS16L es

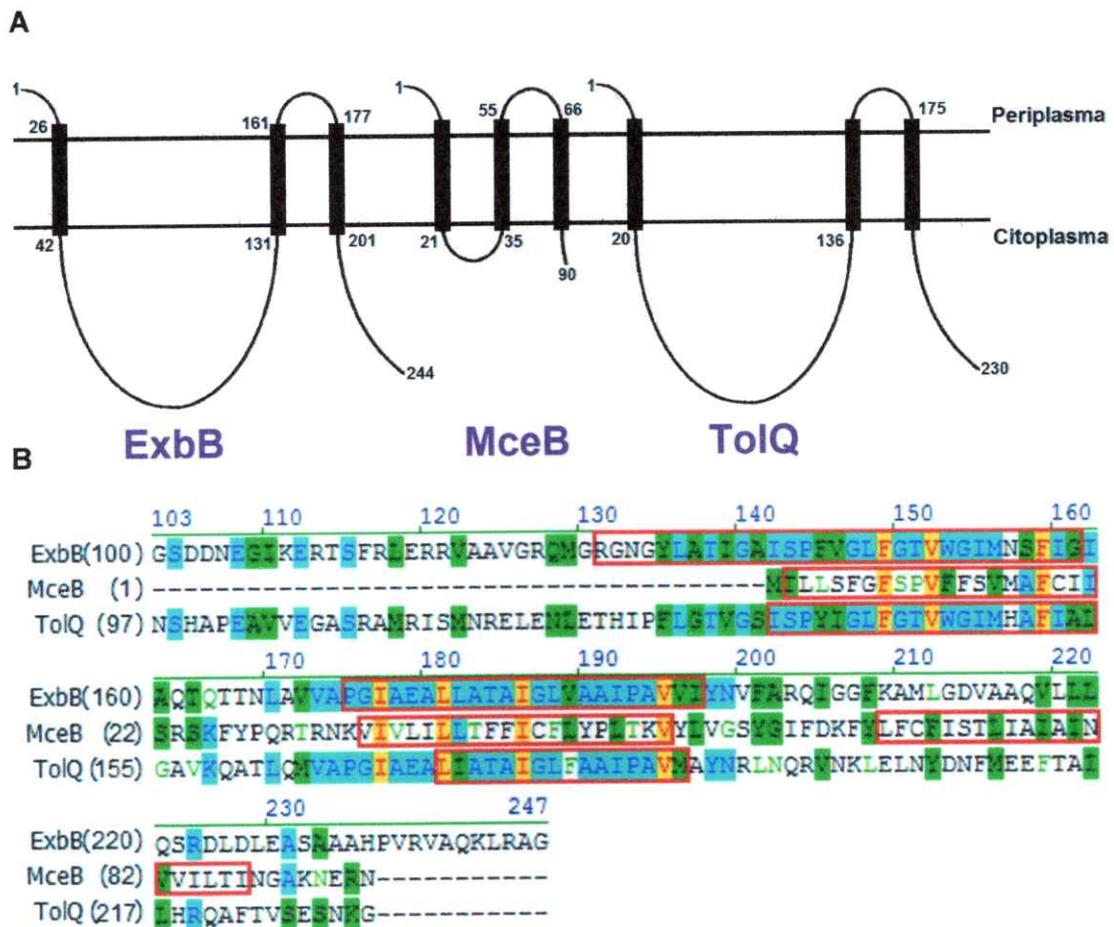


Figura 2. Las topologías y el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas MceB, ExbB y TolQ.

A) Las topologías predichas de ExbB (Kadner y Postle, 2003), de MceB (Baeza, 2003) y de TolQ (Vianney y cols., 1994), en la membrana citoplasmática. Se indica las localizaciones del periplasma y del citoplasma. B) El alineamiento de las secuencias aminoacídicas. Se ha comprobado que las tres proteínas interactuarían con el dominio de transmembrana de TonB. Se observa que entre las tres proteínas hay ciertos residuos muy conservados a distancias equivalentes en los dominios de transmembrana (amarillo: idéntico en las tres proteínas; celeste: conservativo; verde: similar). Las cajas rojas indican la ubicación de los dominios de transmembrana.

de especial interés tanto en el mecanismo de acción de la MccE492 como en el de su inmunidad, pues, los esferoplastos de las cepas que expresan esta proteína son parcialmente sensibles a la MccE492 (Baeza, 2003; García, 2008). Debido a la topología de MceB, se espera que interactúe con TonB a nivel de los dominios de transmembrana. Las otras proteínas TonB mutantes ocasionarían una compensación de las mutaciones en MceB por la falta de función de TonB, pues, habría una pérdida del extremo C-terminal (Baeza, 2003). En este trabajo se analizará el rol del extremo C-terminal de TonB en la actividad bactericida de la MccE492. Además, se examinará el rol que cumple ExbB en el mecanismo de acción bactericida y en el mecanismo de la inmunidad a la MccE492.

Hipótesis

Sobre la base de los antecedentes presentados, se puede postular que la MccE492 requiere del dominio C-terminal de TonB para poder ejercer su acción bactericida. Es probable que la proteína de la inmunidad ejerza su función a partir de una interacción directa con TonB, sin excluir una posible interacción con las proteínas ExbB y ExbD.

Esta hipótesis de trabajo será sometida a una confirmación experimental.

Objetivos

Objetivo general

Establecer si el dominio C-terminal de TonB es indispensable para la actividad bactericida de la MccE492 y el papel que juega la proteína ExbB en esta actividad.

Objetivos específicos

1. Generar una construcción para la expresión de la proteína TonB sin el dominio C-terminal, TonB Δ 109-239, mediante el uso mutagénesis dirigida con partidores específicos.
2. Determinar la actividad bactericida y la inmunidad a la MccE492 en una cepa mutante ExbB⁻.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

2.1.1 Reactivos

La bis-acrilamida, el SDS, el patrón de bajo peso molecular para péptidos, la glucosa, la tricina, los L-aminoácidos, la tiamina, la lisozima de huevo y el ácido p-cumárico se compraron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

Las membranas de nitrocelulosa VSWP02500 para remover las sales de los ácidos nucleicos antes de la electroporación y los filtros de tipo *low binding* con poros de 2 μm para la esterilización de soluciones se obtuvieron en Millipore (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos).

Las membranas de nitrocelulosa para los ensayos de *Western blot*, la acrilamida, el persulfato de amonio, el TEMED y las cubetas para la electroporación se compraron en BioRad Laboratories Inc. (Hercules, California, Estados Unidos).

El azul de bromofenol, el cloroformo, el alcohol isoamílico, el isopropanol, el etanol, el metanol, el acetonitrilo, el cloruro de calcio, la sacarosa y el carbonato ácido de sodio se compraron en Merck (Darmstadt, Alemania).

El cloruro de sodio, el agar, el cloruro de magnesio hexahidratado, el TRIS, el glicerol, el EDTA, el fenol, el fosfato ácido de sodio, el citrato de sodio, la agarosa, el acetato de amonio y los marcadores de peso molecular para los fragmentos de ADN a escalas de 100 pb y 1 Kpb se compraron en Winkler Ltda. (Santiago, Chile).

El sulfato de magnesio y el cloruro de calcio se obtuvieron de Fluka Chemie AG (Buchs, Suiza).

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

Los casaminoácidos y el extracto de levadura se compraron en DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, Estados Unidos).

El hidróxido de sodio se compró en J. T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México).

La Kanamicina y el cloramfenicol se compraron en Bestpharma S.A. (Santiago, Chile).

La ampicilina se compró en U.S. Biological (Swampscott, Massachusetts, Estados Unidos).

El anticuerpo primario policlonal de conejo preparado contra los últimos 20 aminoácidos de la MccE492 se obtuvo en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, Estados Unidos).

El anticuerpo de cabra anticonejo unido a la peroxidasa del rábano picante se compró en Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois, Estados Unidos).

La resina Silica Gel 100-C18 para la purificación de la MccE492 en *batch* se compró en Waters (Milford, Massachusetts, Estados Unidos).

La película autoradiográfica HR-U30 Super Medical X-Ray film, se compró en Fujifilm Corporation (Tokio, Japón).

2.1.2 Las cepas bacterianas y los plásmidos

La fuente externa y el fenotipo de los microorganismos y los plásmidos usados en este trabajo se muestran en la Tabla I.

Tabla 1. Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo

Cepas	Genotipo/Fenotipo	Fuente
BL21	F <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻)	Novagen
BL21λ(DE3)	BL21 con DE3, un profago λ que porta el gen de la polimerasa del bacteriófago T7.	Novagen
X8605	F <i>trpR</i> Δ (lac)U169 <i>strA</i> Δ (<i>tonB-lacP</i>)	Guarente y Beckwith, 1978
HE1	<i>ara</i> Δ(lac pro) thi F' lac pro <i>exbB::Tn10</i>	Braun, 1989

Plásmidos	Genotipo/Fenotipo	Replicón	Copias por célula	Fuente
pJEM15	Portador de los determinantes genéticos para la MccE492 y la proteína de la inmunidad. Duplicación de un fragmento <i>Sal</i> I de 2,5 kb (gen <i>mceF</i>). Amp ^r .	colE1	15 - 20	Wilkens y cols., 1997
p157	pT7-7 portando un fragmento de 0,3 kb <i>Nde</i> I - <i>Eco</i> RI del sistema de la MccE492 (gen <i>mceB</i>), Amp ^r .	colE1	15 - 20	Lagos y cols., 1999
pIM91	pSU2718 portando el gen <i>tonB</i> , Cm ^r .	p15A	18 - 22	Traub y cols., 1993
pIM108 ^h	pIM91 portando la mutación TonBΔ109-239 generada por hidroxilamina.	p15A	18 - 22	Baeza, 2003

2.2 Métodos

2.2.1 Métodos de biología molecular, de secuenciación de ADN y de análisis

Los procedimientos de biología molecular, como el aislamiento del ADN plasmidial, la preparación de las células electrocompetentes, la transformación por electroporación, la digestión con enzimas de restricción, la autoligación de fragmentos de ADN, la PCR y la PCR mutagénica se realizaron acorde a los métodos previamente estandarizados (Sambrook y Russell, 1989). La proteína trunca TonB Δ 109-239 se obtuvo mediante la PCR inversa del plásmido pIM91 (*tonB*, Cm^r) con los partidores TonBP1, que proporciona dos codones de término en las posiciones de los codones 109 y 110 del gen *tonB* y un sitio de corte *Xho* I, y TonBP2, que amplifica en una posición fuera del gen *tonB* y proporciona otro sitio de corte *Xho* I (Tabla 2). Mediante la digestión del producto de la PCR inversa con *Xho* I, la autoligación, la electrotransformación en *E. coli* X8605 (*tonB*⁻, Kan^r) y la selección en placas de medio LB suplementadas con antibióticos (Cm y Kan), se obtuvieron las células que expresaban el gen de la mutante trunca de TonB. Las secuencias de ADN fueron determinadas en Macrogen (Korea del sur). El gen *tonB* mutagenizado fue secuenciado usando los partidores MP18 y M13-F (Tabla 2). Las secuencias de ADN fueron analizadas con el software Vector NTI Advance 10.3 (Invitrogen Corporation).

2.2.2 Purificación de la MccE492, PAGE e Inmunoblot

El método de purificación empleado fue desarrollado en nuestro laboratorio (García, 2008). Se activaron 50 g de la resina Silica Gel 100-C18 (Waters) con 300 mL de acetonitrilo al 100% y se agitó durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se decantó la resina por 30 min, se retiró el acetonitrilo y se hidrató con 300 mL de agua nanopura en agitación durante 30 min. La MccE492 se extrajo a partir de los

Tabla 2. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y de secuenciación

Partidor	Secuencia (5' → 3')
TonBP1	CGGGTTTGACATCCTCGAGT CACTACT CCTGTACCTTTTTCACCG
TonBP2	CACCGAAATTCTCGAGGCAGAAAGTCAAAAGCCTCC
M13-F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
MP18	AGCGGATAACAATTTCACACAGGAT

Subrayado, sitio de restricción *Xho* I; negrita, secuencia complementaria a los codones de término TAG y TGA.

sobrenadantes de los cultivos correspondientes a *E. coli* BL21 λ (DE3)pJEM15. Las células fueron crecidas a 37 °C en medio mínimo M9 suplementado con citrato y glucosa (Miller, 1972) a 220 rpm durante 20 hr en agitación orbital, y el sobrenadante fue colectado mediante centrifugación a 5.000 x g por 10 min. Éste fue filtrado y mezclado con la resina activada. Esta mezcla fue agitada por 20 min a 4 °C. Posteriormente se lavó con 100 mL de metanol al 40% y luego con 100 mL de acetonitrilo al 25%. Las eluciones se hicieron con 50 mL de acetonitrilo a concentraciones crecientes (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%). De esta forma se obtuvieron 8 eluciones de 50 mL cada una, y se determinó que las eluciones al 50, 60 y 70% de acetonitrilo fueron las que presentaron la mayor actividad bactericida. Las muestras sometidas a PAGE en condiciones denaturantes fueron concentradas por evaporación al vacío (Centrivac, Labconco) a 65 °C para retirar el acetonitrilo.

El PAGE en condiciones denaturantes se llevó a cabo bajo las condiciones descritas por Schägger y von Jaggow (1987) y las membranas de nitrocelulosa (Millipore) se utilizaron en la transferencia del Inmunoblot (1 h 30 min, 100 V a -20°C, usando como amortiguador de transferencia 25 mM Tris-HCl, 190 mM glicina frío). La MccE492 fue detectada con un anticuerpo policlonal preparado en conejo contra los últimos 20 aminoácidos de la proteína (suero antisérico en dilución 1:500) y con un anticuerpo de cabra anticonejo unido a la peroxidasa del rábano picante (Pierce Biotechnology) (dilución 1:20.000). La reacción de quimioluminiscencia fue llevada a cabo en 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 1,25 mM luminol, 0,2 mM ácido p-cumárico. La reacción fue iniciada con la adición de una alícuota de 3 μ L de H₂O₂ (concentración final 0,01%). La membrana fue expuesta a la película autoradiográfica durante un 1 min.

Se determinó la concentración de la MccE492 de cada elución mediante el método de Warburg y Christian (1942). Se midió directamente la absorbancia a 260 y 280 nm y luego se calculó la concentración utilizando la siguiente fórmula:

$$[\mu\text{g/ml}] = 1.000 \times [(A_{280} \times 1,55) - (A_{260} \times 0,76)]$$

2.2.3 Preparación de las muestras de la MccE492 para el ensayo sobre cultivos celulares

Cada vez que se ensayó la actividad de la MccE492 en los cultivos celulares, el acetonitrilo de la muestra fue evaporado al vacío a 35 °C y la MccE492 fue diluida en agua hasta alcanzar la concentración deseada.

2.2.4 Ensayos de formación de halos de inhibición de crecimiento

Para determinar si las cepas presentan sensibilidad a la MccE492, se hicieron céspedes con alícuotas entre 50 y 100 μL de los cultivos celulares líquidos crecidos en medio LB (suplementados con el antibiótico correspondiente) sobre placas de agar LB y se incluyeron en 3 mL de agar blando. Se ensayó sobre éstos la actividad bactericida de 5 μL de una dilución seriada en base 2 de la MccE492 purificada con una concentración inicial de 1.000 $\mu\text{g/mL}$. Después de una incubación a 37 °C por 20 h, la actividad bactericida fue visualizada como un halo de inhibición de crecimiento.

2.2.5 Ensayo de sensibilidad a la MccE492 en los cultivos líquidos

Para los ensayos de sensibilidad se centrifugó 1 mL de cultivo líquido a ensayar ($D.O_{600} = 0,3 - 0,4$) a 9.800 x g durante 5 min. El precipitado obtenido fue lavado dos veces con 1 mL de medio líquido LB fresco, y posteriormente fue homogeneizado en 1 mL de medio líquido LB. Las alícuotas de 100 μL de esta homogeneización se mezclaron con 100 μL de MccE492 purificada (hasta concentraciones finales de 20,

500 y 1.000 µg/mL) y luego se incubaron a 37 °C por 20 min. La sobrevivencia de las células se determinó mediante el conteo de las células viables sembradas en las placas de agar LB.

2.2.6 Preparación de los esferoplastos y de los ensayos con la MccE492

Los esferoplastos se prepararon de acuerdo a una modificación de lo descrito por Weiss (1976). Los cultivos se crecieron durante toda la noche, sin agitación, en medio líquido LB (suplementado con el antibiótico correspondiente) hasta una D.O.₄₅₀ cercana a 0,9. Las células fueron obtenidas por centrifugación a 940 x g por 10 min, lavadas dos veces con 10 mL de amortiguador Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0 y homogeneizadas suavemente en Tris-HCl, 100 mM pH 8,0, 20% p/v de sacarosa usando la siguiente fórmula de acuerdo a las convenciones de Osborn (1972): $X \text{ mL de cultivo} \times D.O._{450} = 10$ unidades de densidad óptica (U.D.O.), donde X es el volumen de células centrifugado y posteriormente es homogeneizado hasta un valor de 10 U.D.O./mL. Luego, al cultivo en agitación se le agregaron 2 mL de una solución EDTA 0,1 M, pH 8,0, hasta alcanzar una concentración final cercana a EDTA 10 mM. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min para luego agregarle lentamente 1 mL de una solución de lisozimá de huevo (Sigma) 2 mg/mL, hasta alcanzar una concentración final cercana a 0,6 mg/mL. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Los esferoplastos obtenidos en este paso estaban listos para los ensayos de sensibilidad a la MccE492. La cantidad de esferoplastos por preparación se determinó por la disminución del título celular después de incubar por 20 min en agua nanopura.

2.2.7 Análisis estadístico de los resultados

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizaron dos estadígrafos: el test de F de Snedecor, para comparar las varianzas muestrales y así clasificar el análisis estadístico posterior, y el test t de Student como la prueba final para comparar las medias de sobrevivida entre las cepa o para una misma cepa con distintos tratamientos de MccE492. Todos los ensayos se llevaron a cabo en triplicado y los datos se procesaron con el programa Microsoft Office Excel 2007.

3. Resultados

3.1 Estudio de la participación del dominio C-terminal de TonB en la actividad bactericida de la MccE492

3.1.1 Generación de una proteína TonB carente del dominio C-terminal

En nuestro laboratorio se han caracterizado distintas mutantes de la proteína TonB. Se aislaron dos clones con una mutación sin sentido en el gen *tonB*. Una de ellas se localiza en el codón 43, por lo que generaría una proteína sin dominio C-terminal (TonB Δ 43-239) y la otra que se localiza en el codón 108 (TonB Δ 109-239^h). Las cepas que expresan estas proteínas truncas presentan un fenotipo intermedio entre las cepas *tonB*⁺ y *tonB*⁻ (fenotipo rezumante) y fueron obtenida tras la búsqueda de posibles mutaciones compensatorias en TonB que fueran capaces de suplir la pérdida de la funcionalidad de las proteínas mutantes de la inmunidad MceBA17V y MceBA77V. El fenotipo intermedio que presentan ambas mutantes llevó a pensar que ambas mutaciones sin sentido podrían ser sobrepasadas en el proceso de traducción. Por esta razón, se decidió construir nuevas mutantes truncas de TonB, pero esta vez mediante la remoción de una parte del gen *tonB*. Por consiguiente, uno de los objetivos de esta memoria es generar una construcción para la expresión de la proteína TonB sin el dominio C-terminal (TonB Δ 109-239).

Mediante mutagénesis dirigida con partidores se generó una mutación en el gen *tonB* portado por el plásmido pIM91 (Traub y cols., 1993) de manera tal que se generaran dos codones de término adyacentes y posteriores al codón 108 (codones de término ámbar y ópalo, TAG y TGA respectivamente), seguidos de un sitio de corte para la enzima *Xho* I, con el objetivo de remover la secuencia codificante del dominio

C-terminal (codones 109-239), lo que conlleva a la expresión de una proteína trunca (Figura 3).

Como resultado se obtuvo una construcción que expresa una proteína trunca (TonB Δ 109-239^P, p por partidor) (Figura 3C). Mediante un experimento similar, en este trabajo se logró obtener una mutante de la proteína TonB con una remoción de la secuencia aminoacídica 109-239, pero que incorporó una secuencia nucleotídica distinta a la esperada por la estrategia, agregándose una secuencia con 13 codones codificantes para aminoácidos sin homología a los de la proteína TonB. Ésta fue denominada TonB Δ 109-239¹³ (13 por la secuencia aminoacídica aberrante de 13 aminoácidos) (Figura 4C). Las tres proteínas mutantes fueron analizadas y comparadas durante el transcurso de este trabajo.

Para verificar el éxito de la metodología, se hizo un mapa de restricción de los productos de PCR específicos (Figura 5) y una secuenciación de los plásmidos mutagenizados (Figura 4 y 6). Se verificó tanto la inserción de los dos codones de término como la remoción del segmento de ADN deseado.

3.1.2 Las cepas que expresan la proteína mutante TonB Δ 109-239^P presentan insensibilidad a la MccE492

La proteína TonB interactúa con los receptores de la membrana externa, desencadenando translocación de los sideróforos acomplejados con hierro al espacio periplasmático. Para que esta actividad se lleve a cabo, es necesario que los dominios N- y C-terminales de TonB estén presentes (Larsen y cols., 1993; Khursigara y cols., 2005). El dominio C-terminal interactúa con la caja TonB localizada en el extremo N-terminal de todos los receptores dependientes de TonB, en tanto que el dominio N-

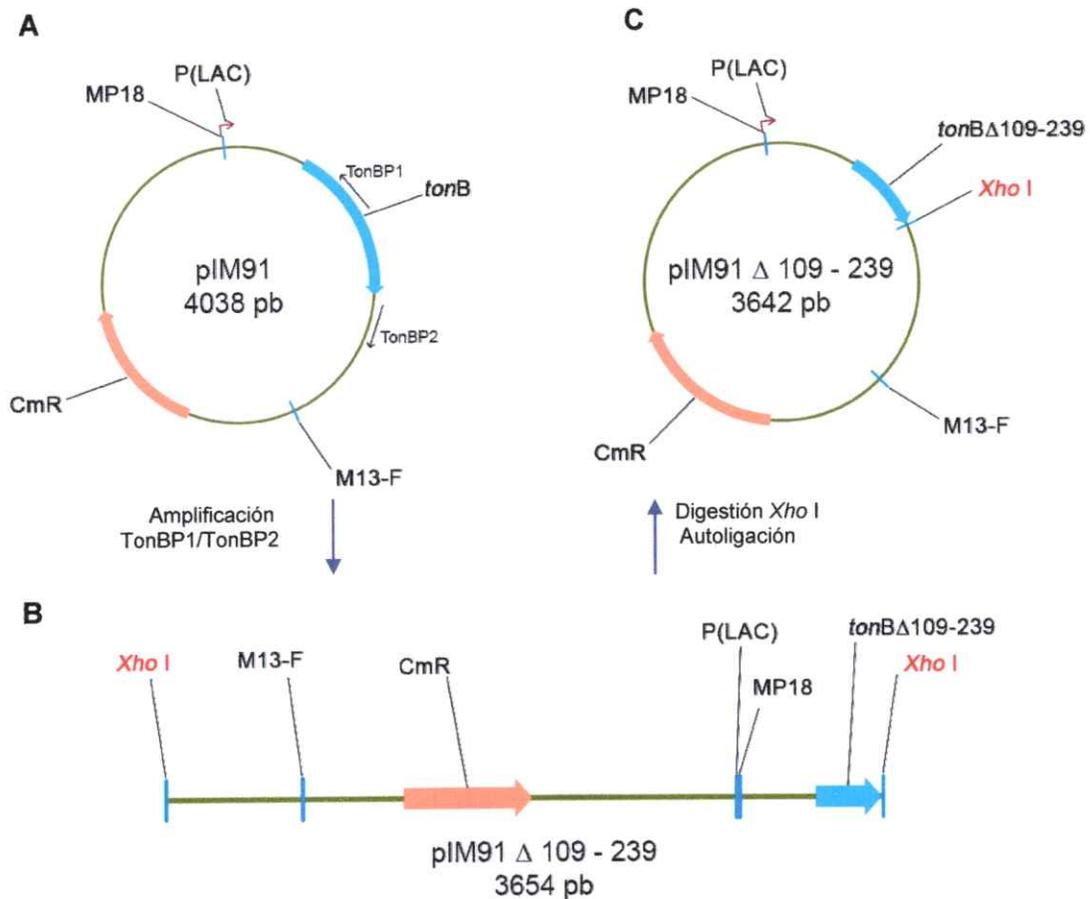


Figura 3. Estrategia de la mutación dirigida sobre el gen *tonB*.

A) Se usó un partidor que insertara dos codones de término distintos y consecutivos después del codón que codifica para el aminoácido 108 de la proteína TonB (codones ámbar y ópalo), y adyacente a estas mutaciones, se introdujo un sitio de restricción *Xho* I (TonBP1). Se usó como molde el plásmido pIM91 (pSU2718 portando *tonB*, Cm^r) (Traub y cols., 1993). El otro partidor utilizado hibrida en un sitio distal al gen *tonB* y genera un sitio de corte *Xho*I (TonBP2). B) Se generaron amplicones mediante PCR inversa sin los codones codificantes para los residuos aminoacídicos 109 - 239 del gen *tonB* y con un sitio de corte *Xho* I en ambos extremos. C) Posteriormente por digestión y autoligación se generó un plásmido con el gen *tonB* truncado. Se transformó mediante electroporación el producto de ligación en la cepa X8605 ($\Delta tonB$, Kan^r) y la selección se llevó a cabo por resistencia a antibióticos. MP18 y M13-F, partidores usados para la secuenciación.

A	<i>tonB</i>	AAGCCGGTGAAAAAGGTACAGGAGCAGCCAAAACGCGATGTCAAACCCGTAGAGTCCG
B	<i>tonB</i> Δ109 – 239 ^P	AAGCCGGTGAAAAAGGTACAGGAGTAGTGACTCGAGGCAGAAAGTCAAAGCCTCCG
C	<i>tonB</i> Δ109 – 239 ¹³	AAGCCGGTGAAAAAGGTACAGGAGTA-----TCGAGGCAGAAAGTCAAAGCCTCCGA
D	TonBP1c	-----CGGTGAAAAAGGTACAGGAGTAGTGACTCGAGGATGTCAAACCCG-----
E	TonBP2	-----CACCGAAATTCTCGAGGCAGAAAGTCAAAGCCTCC-

Figura 4. Análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas de las mutantes en *tonB*.

Se obtuvieron dos mutantes truncas tipo TonBΔ109-239. A) Secuencia nucleotídica del gen *tonB*, B) secuencia nucleotídica del gen que expresa la proteína mutante TonBΔ109-239^P, C) secuencia nucleotídica del gen que expresa la proteína mutante TonBΔ109-239¹³, D) secuencia nucleotídica complementaria al partidor mutagénico TonPB1, E) secuencia nucleotídica del partidor mutagénico TonBP2. El procedimiento para la mutación dirigida se explica en los Materiales y Métodos. Enmarcado en rojo, mutación ámbar y ópalo; enmarcado en verde, sitio de corte *Xho* I; en amarillo, secuencia correspondiente a los codones 100 - 108 del gen *tonB*. Se utilizó el programa Vector NTI advance 10.3 para generar estos alineamientos.

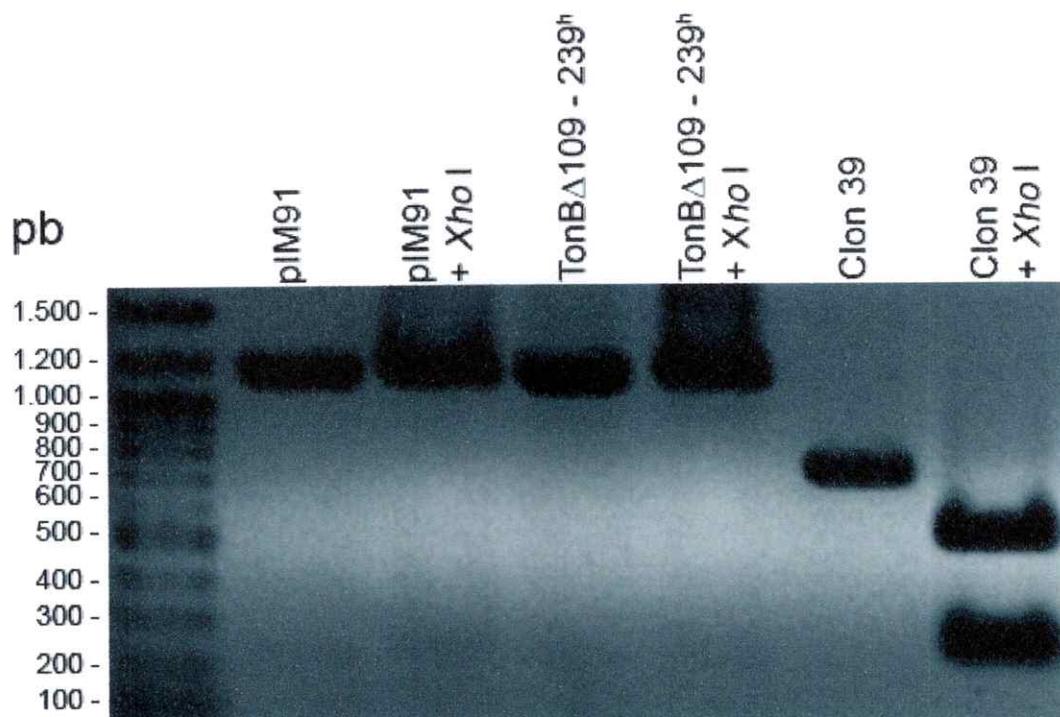


Figura 5. Mapa de restricción de los productos de PCR de las diferentes construcciones.

Para la amplificación sobre los respectivos plásmidos como molde se utilizaron los partidores MP18 y M13-F. El producto de PCR se trató con la enzima *Xho* I para ver diferencias en el patrón de digestión. Se observa que el clon 39 ($\text{TonB}\Delta 109\text{-}239^{\text{P}}$) presenta una remoción parcial en el gen *tonB* y la inserción de un sitio *Xho* I (fragmentos esperado de amplificación: 700 pb aproximadamente; digestión: 500 y 200 pb aproximadamente).

Plásmido	Vector de origen → Mutante	Descripción
pIM108 ^P	pIM91 → TonBΔ109-239 ^P	pIM91 portando la mutación <i>tonB</i> Δ109-239 generada por mutagénesis dirigida.
pIM108 ¹³	pIM91 → TonBΔ109-239 ¹³	Como pIM108 ^P , pero que lleva además un conjunto de 13 codones después del codón 108 del gen <i>tonB</i> , sin homología con la secuencia del gen.

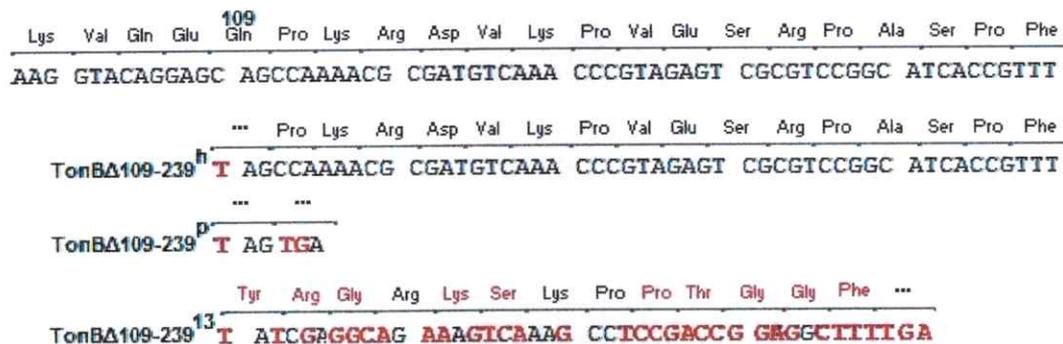


Figura 6. Descripción y comparación de secuencias de las proteínas TonB mutantes.

Se compara el gen *tonB* con las mutantes obtenidas por mutación dirigida con partidores (TonBΔ109-239^P y TonBΔ109-239¹³) y por hidroxilamina (TonBΔ109-239^h). Se muestran las diferencias en rojo.

terminal de TonB posee una hélice de transmembrana que está insertada en la membrana citoplasmática.

La MccE492 utiliza los receptores de la membrana externa FepA, Cir y Fiu para su ingreso al espacio periplasmático y para ejercer así su acción bactericida, por lo tanto, una cepa sin ninguno de estos receptores es resistente a la MccE492. Sin embargo, los esferoplastos de esta cepa sin los receptores son sensibles a la acción de la MccE492, lo cual indica que no se requiere de la interacción entre TonB y los receptores para ejercer su acción bactericida (Strahsburger y cols., 2005).

Se utilizó la cepa X8605 ($\Delta tonB$, Kan^r) para probar la funcionalidad de todas las proteínas mutantes de TonB de este trabajo. Se complementó en *trans* mediante la electroporación de los plásmidos que portan los genes *tonB* que derivan del plásmido pIM91 (*tonB*, Cm^r). En todos los ensayos, como control de resistencia se utilizó la cepa X8605 y como control de sensibilidad se utilizó la cepa X8605 que porta el plásmido pIM91.

La actividad bactericida de la MccE492 fue determinada cuantitativamente mediante el método de formación de halos de inhibición de crecimiento (Materiales y Métodos) sobre los céspedes de una cepa sensible y sobre las cepas que expresan las proteínas TonB mutantes, en triplicado (Tabla 3). Los resultados indican que las cepas que expresan las proteínas TonB Δ 109-239^p y TonB Δ 109-239¹³ presentan insensibilidad en las condiciones experimentales. La cepa que expresa la proteína TonB Δ 109-239^h presenta una sensibilidad muy reducida con formación de halos difusos en el césped, lo que corresponde a la dilución 1/2 de la muestra. Estos resultados indican que la actividad bactericida de la MccE492 requiere de la proteína TonB, como se ha descrito para colicinas dependientes de TonB (Cascales y cols., 2007).

Tabla 3. Ensayos de actividad bactericida por el método del método de la dilución crítica para las cepas mutantes en TonB

Cepa de <i>E. coli</i>	Actividad ^a (U.A.)
X8605 TonB ⁺	256
X8605 TonB ⁻	0
X8605 TonBΔ109-239 ^p	0
X8605 TonBΔ109-239 ^h	2 ^b
X8605 TonBΔ109-239 ¹³	0

^aLos números corresponden al recíproco de la potencia en base 2 del último número de la dilución que presenta un halo de inhibición de crecimiento sobre céspedes de la cepa analizada (triplicado).

^bHalo de inhibición de crecimiento difuso.

El control negativo corresponde a la cepa X8605 TonB⁻ (Δ*tonB*), el control positivo corresponde la misma cepa complementada con *tonB* en *trans* (X8605 *tonB*⁺). Las distintas mutantes ensayadas corresponden a X8605 portando los distintos plásmidos mutantes. El título bactericida de la MccE492 utilizada en este ensayo fue estandarizado en la cepa BL21 y corresponde a 1024 U.A.^a.

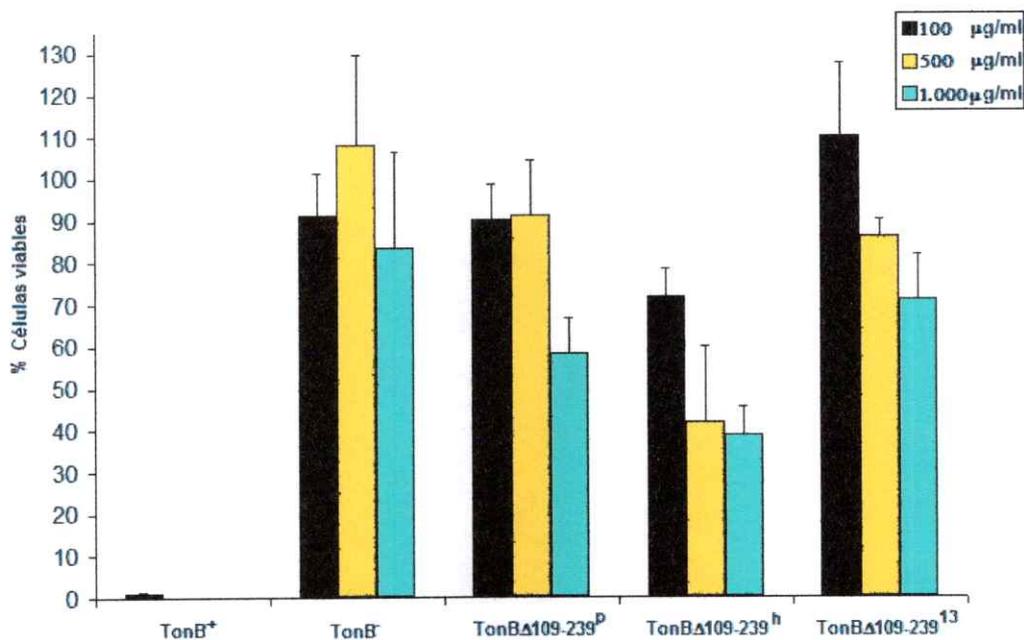
3.1.3 Las cepas que expresan las proteínas mutantes en el extremo C-terminal de TonB son insensibles a distintas concentraciones de MccE492

Se cuantificó la actividad bactericida de la MccE492 mediante el conteo de las células viables de un cultivo líquido, sembradas en placas LB, para establecer si la insensibilidad a la MccE492 es dependiente de la concentración de la MccE492 usada. Se realizaron los ensayos a tres concentraciones (100, 500 y 1.000 µg/mL) de MccE492. Los resultados muestran que las cepas que expresan las tres proteínas mutantes de TonB en el extremo C-terminal presentan diferencias pequeñas en la sensibilidad a la MccE492 (Figura 7). La sensibilidad se ve levemente aumentada a mayor concentración de la MccE492. El control positivo (cepa X8605 complementada en *trans*) fue sensible a todas las concentraciones ensayadas.

Una cepa que expresa la proteína mutante TonBΔ109-239^h presenta la mayor sensibilidad a la MccE492 entre todas (Figura 7), pues, como ya se mencionó, se genera un fenotipo rezumante, con una sensibilidad intermedia entre una cepa *tonB*⁺ y una *tonB*⁻. Su sensibilidad es similar la cepa control *tonB*⁻ sólo a la más baja concentración de MccE492 utilizada (el análisis estadístico de los resultados de esta memoria se adjuntan en el Apéndice). La sensibilidad a la MccE492 de las cepas que expresan las proteínas mutantes TonBΔ109-239^p y TonBΔ109-239¹³ es comparable a la de la cepa en todas las concentraciones de MccE492 ensayadas.

3.1.4 Los esferoplastos de una cepa que expresa una proteína TonB mutante en el extremo C-terminal son insensibles a la MccE492

Con el objetivo de examinar la posibilidad de que las cepas que expresan mutantes de TonB trucas en el C-terminal fueran insensibles a MccE492 debido a una pérdida de la interacción con los receptores de la membrana externa, y por lo tanto



Cepa <i>E. coli</i>	% de células viables		
	MccE492 (µg/mL)		
	100	500	1.000
X8605 TonB ⁺	1,13 ± 0,22	0,16 ± 0,049	0,018 ± 0,0008
X8605 TonB ⁻	91,39 ± 9,93	108,16 ± 21,50	83,33 ± 22,96
X8605 TonBΔ109-239 ^P	90,24 ± 8,45	91,3 ± 13,04	58,18 ± 8,33
X8605 TonBΔ109-239 ^h	71,65 ± 6,82	41,88 ± 18,01	38,94 ± 6,68
X8605TonBΔ109-239 ¹³	110,17 ± 17,31	86,05 ± 4,03	71,03 ± 10,61

Figura 7. Tratamiento de las mutantes en *tonB* con distintas concentraciones de MccE492.

Los resultados son representativos de tres ensayos realizados en un cultivo líquido. En el gráfico se incluye el error en unidades de porcentaje. La cantidad de células utilizada para este ensayo se estandarizó en 100 µL de cultivo a una D.O.₆₀₀ = 0,3-0,4. El 100% de sobrevivencia corresponde a las células sin tratamiento con MccE492. Análisis estadístico *t* de Student, $\alpha/2 = 0,025$.

resultaran ser deficientes en el paso de translocación al espacio periplasmático, se hicieron ensayos de sensibilidad sobre esferoplastos, los cuales son preparaciones de células que tienen permeabilizada la membrana externa (Weiss, 1976). En este ensayo las cepas que expresan las mutantes en el extremo C-terminal de TonB presentan una membrana citoplasmática que es accesible para la MccE492, y por tanto se pueden eliminar las variables membrana externa (funcionalidad de los receptores membrana externa) y actividad de TonB, dejando que la MccE492 entre al periplasma.

Los resultados que se muestran en la Tabla 4 indican que los esferoplastos de la cepa X8605 ($\Delta tonB$) que expresan las tres mutantes en TonB son resistentes a la MccE492, con viabilidades similares a los ensayos de sensibilidad sobre las células sin tratamiento. De todas las cepas ensayadas, la cepa X8605 $\Delta tonB$ complementada en *trans* con *tonB* es la única que presenta una sensibilidad total a MccE492. Las diferencias observadas entre las mutantes no son significativas y todas son comparables al control $\Delta tonB$ (Tabla 4). Estos resultados sugieren fuertemente que la actividad bactericida de la MccE492 necesita de la presencia del extremo C-terminal de TonB y que es independiente de la interacción de esta región de TonB con los receptores de la membrana externa.

3.1.5 Estudio de la participación del dominio C-terminal de TonB en la inmunidad a la MccE492

Con el objetivo de verificar si la proteína mutante TonB Δ 109-239^h, que presenta una sensibilidad muy reducida a la MccE492 (Tabla 3) adquiere el fenotipo inmune (*inm*⁺) cuando expresa el gen de la proteína de la inmunidad, *mceB*, presente en el plasmidio p157, se realizó un ensayo de sensibilidad a la MccE492 con esta cepa complementada en *trans* con el gen *mceB* (Tabla 5). Los resultados obtenidos indican

Tabla 4. Ensayo de sobrevivencia a la MccE492 sobre esferoplastos que expresan mutantes en TonB

Cepa de <i>E. coli</i>	Porcentaje de sobrevivencia
X8605 TonB ⁺	0,027±0,011
X8605 TonB ⁻	85,0±11,5
X8605 TonBΔ109-239 ^p	76,5±7,9
X8605 TonBΔ109-239 ^h	70,83±13,01
X8605 TonBΔ109-239 ¹³	103,08±13,32

Los ensayos se llevaron a cabo con una concentración de 100 µg/mL de MccE492. Los resultados usados en esta Tabla son representativos de tres ensayos. El 100% corresponde a la sobrevivencia de células sin tratamiento con MccE492. La cantidad de células usadas en este ensayo se explica en la sección Materiales y Métodos. Análisis estadístico *t* de Student, $\alpha/2 = 0,025$.

Tabla 5. Caracterización fenotípica de la mutante TonBΔ109-239^h mediante el ensayo de inmunidad a la MccE492 por el método de la dilución crítica

Cepa de <i>E. coli</i>	Actividad^a (U.A.)
X8605 TonBΔ109-239 ^h	2 ^b
X8605 TonBΔ109-239 ^h / MceB	0

^aLos números corresponden al recíproco de la potencia en base 2 del último número de la dilución que presenta un halo de inhibición de crecimiento sobre céspedes de la cepa analizada (triplicado).

^bHalo de inhibición de crecimiento difuso.

La mutante TonBΔ109-239^h adquiere un fenotipo inmune a MccE492 cuando porta el gen de la proteína de la inmunidad a la MccE492. El título bactericida de la MccE492 utilizada en este ensayo fue estandarizado en la cepa BL21 y corresponde a 1024 U.A.^a.

que una cepa que expresa esta proteína mutante con sensibilidad disminuida adquiere el fenotipo inm⁺ frente a la MccE492. Este resultado sugiere que la proteína MceB podría prescindir del dominio C-terminal de TonB para ejercer su acción protectora, pero debido al carácter rezumante de la mutante, se diseñaron los experimentos que se detallan a continuación.

3.1.6 El extremo C-terminal de TonB no es necesario en el mecanismo de inmunidad de la MccE492

Una de las posibilidades que se esgrimen en el mecanismo de inmunidad a MccE492 es la capacidad que tendría MceB de interactuar con TonB, evitando una posible interacción con la MccE492. Para complementar los estudios iniciales de la proteína de la inmunidad con la proteína mutante TonB Δ 109-239ⁿ, se transformó mediante electroporación con el plásmido p157, portador del gen *mceB*, las cepas que expresan las otras dos mutantes en el dominio C-terminal de TonB y se realizaron ensayos de sobrevivencia sobre esferoplastos (Tabla 6). La cepa TonB Δ 109-239ⁿ/MceB, como ya se ha observado por el ensayo de formación de halos de inhibición de crecimiento, es completamente inmune a la MccE492 y aumenta significativamente su sobrevivencia cuando expresa el gen *mceB* (Tabla 5), así como todas las cepas probadas (TonB Δ 109-239^p y TonB Δ 109-239¹³), las que incluso mejoraron levemente la sobrevivencia en esferoplastos al expresar la proteína MceB, pero sin una diferencia significativa (Tabla 6).

Tabla 6. Ensayos de inmunidad de esferoplastos en las cepas que portan las mutantes de TonB y el gen de la inmunidad a la MccE492

Cepa de <i>E. coli</i>	Porcentaje de sobrevivencia
X8605 TonB ⁺ /MceB	90,2 ± 6,79
X8605 TonBΔ109-239 ^P /MceB	117,24 ± 21,54
X8605 TonBΔ109-239 ^h /MceB	106,45 ± 9,68
X8605 TonBΔ109-239 ¹³ /MceB	100,00 ± 10,83

Los ensayos se llevaron a cabo con una concentración de 100 µg/mL de MccE492. Los resultados usados en esta Tabla son representativos de tres ensayos. El 100% corresponde a la sobrevivencia de células sin tratamiento con MccE492. La cantidad de células usadas en este ensayo se explica en la sección Materiales y Métodos. Análisis estadístico *t* de Student, $\alpha/2 = 0,025$.

3.2 Participación de la proteína ExbB en la actividad bactericida de la MccE492

3.2.1 La MccE492 presenta una menor actividad bactericida sobre un césped de una cepa mutante *exbB*⁻

Se ha observado que en ausencia de la función de las proteínas ExbB y ExbD, los procesos que dependen de TonB pueden llevarse a cabo, pero en forma muy reducida. Esto resulta de la complementación imperfecta con las proteínas TolQ y TolR del sistema Tol (Brinkman y Larsen, 2008), parálogas de ExbB y ExbD respectivamente. Debido a que la MccE492 depende de TonB para su acción bactericida, es importante caracterizar las cepas mutantes en el complejo transductor de energía de TonB, a modo de verificar si la MccE492 requiere que TonB esté en un estado conformacional sensible a la fpm.

Los reportes de ensayos sobre cepas mutantes *exbB*⁻ indican que son altamente resistentes a la MccE492 (Pugsley, 1984). Sin embargo, estas características fenotípicas fueron descritas a una concentración de 20 µg/mL de MccE492, la cual es bastante inferior a las utilizadas en este trabajo (hasta 1.000 µg/mL). Se determinó la actividad bactericida de la MccE492 en un césped de la cepa HE1 (*exbB::Tn10*) (Tabla 7). Los resultados indican que presenta una sensibilidad intermedia (32 U.A.), pues el control $\Delta tonB$ fue resistente, en tanto que las cepas sensibles X8605 *tonB*⁺ (256 U.A.) y BL21 (1024 U.A., control no-isogénico), presentan una mayor sensibilidad (Tabla 7).

Estos resultados sugieren que la actividad bactericida de la MccE492 se ve afectada de forma moderada cuando disminuye la funcionalidad del complejo TonB, la cual afecta a los receptores de membrana externa involucrados en la translocación de la MccE492 al espacio periplasmático.

Tabla 7. Caracterización fenotípica de la mutante HE1 (*exbB::Tn10*) mediante el método de la dilución crítica

Cepa de <i>E. coli</i>	Actividad ^a (U.A.)
BL21	1024
X8605 TonB ⁻	0
X8605 TonB ⁺	256
HE1 ExbB ⁻	32

^aLos números corresponden al recíproco de la potencia en base 2 del último número de la dilución que presenta un halo de inhibición de crecimiento sobre céspedes de la cepa analizada (triplicado).

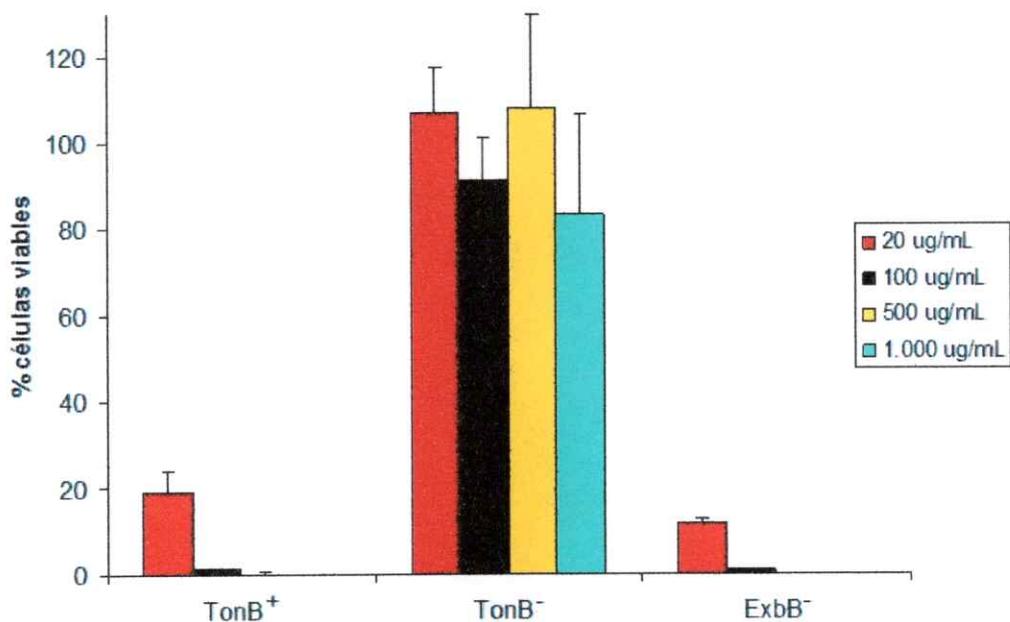
El control negativo corresponde a la cepa X8605 TonB⁻ ($\Delta tonB$), el control positivo corresponde a la misma cepa complementada con *tonB* en *trans* (X8605 TonB⁺). La MccE492 presenta una actividad intermedia frente a la mutante *E. coli* HE1; como control no-isogénico, *E. coli* BL21. El título bactericida de la MccE492 utilizada para este ensayo fue estandarizado en la cepa BL21 y corresponde a 1024 U.A.^a.

3.2.2 La sensibilidad parcial a la MccE492 de una cepa mutante *exbB*⁻ es dependiente de la concentración

Con el objetivo de establecer si la resistencia parcial de la cepa HE1 (*exbB::Tn10*) a la MccE492 sufre un efecto dependiente de la concentración de la MccE492, se realizaron ensayos de viabilidad empleando cuatro concentraciones (20, 100, 500 y 1.000 µg/mL) de la MccE492. Los resultados que se muestran en la Figura 8 indican que la cepa mutante por transposición en *exbB* presenta sensibilidad a la MccE492 en todas las concentraciones de MccE492 ensayadas y no presenta diferencias significativas con la cepa control *tonB*⁺. La sobrevivida aumenta en el ensayo con la menor concentración de MccE492 (11,7% de sobrevivida), pero es comparable al control de sensibilidad *tonB*⁺ (19,3% de sobrevivida). Este resultado indica que la MccE492 es capaz de ejercer su actividad bactericida en ausencia de ExbB, por ende, en presencia de un complejo TonB imperfecto y poco funcional.

3.2.3 La actividad de la MccE492 disminuye en un césped de una cepa mutante en *exbB* que expresa la proteína de la inmunidad

Estudios con mutantes compensatorias sugieren que existiría una interacción entre la proteína de la inmunidad MceB y TonB (Baeza, 2003). Esta interacción sería a nivel del dominio de transmembrana de TonB y la hélice I de MceB. Mediante análisis bioinformático se ha visto que las proteínas ExbB y MceB presentan patrones de residuos aminoácidos conservados en sus hélices de transmembrana, lo cual permite especular sobre una posible interacción de MceB con TonB a nivel de dominios de transmembrana, la cual sería análoga a la interacción entre TonB y ExbB. Esta inferencia se basa en los estudios de entrecruzamiento y de mutaciones compensatorias, que han demostrado que ExbB y ExbD interactúan con TonB a nivel



% de células viables				
MccE492 (µg/mL)				
Cepa <i>E. coli</i>	20	100	500	1.000
X8605 TonB ⁺	19,31 ± 4,78	1,13 ± 0,22	0,16 ± 0,049	0,018 ± 0,0008
X8605 TonB ⁻	106,85 ± 10,87	91,39 ± 9,93	108,16 ± 21,50	83,33 ± 22,96
HE1 ExbB ⁻	11,67 ± 1,26	0,87 ± 0,0144	0,03 ± 0,0038	0,00128 ± 0,0003

Figura 8. Viabilidad celular de la mutante en ExbB a distintas concentraciones de MccE492.

Los resultados son representativos de tres ensayos. En el gráfico se incluye el error en unidades de porcentaje. La cantidad de células utilizadas para este ensayo se se estandarizó en 1 mL de cultivo a D.O.₆₀₀ = 0,3 - 0,4. El 100% de sobrevivencia corresponde a las células sin tratamiento con MccE492. Análisis estadístico *t* de Student, $\alpha/2 = 0,025$.

de dominios de transmembrana (Higgs y cols., 2002b; Larsen y cols., 1999; Ghosh y Postle, 2005).

Se determinó la actividad bactericida de la MccE492 mediante el ensayo de formación del halo de inhibición de crecimiento sobre céspedes de la cepa HE1 (*exbB::Tn10*) que expresa la proteína de la inmunidad (Tabla 8). Los resultados muestran que esta cepa mutante disminuye notablemente la sensibilidad a la MccE492, pero no se vuelve completamente insensible o inmune.

3.2.4 Una cepa mutante en *exbB* es inmune a la MccE492 cuando expresa el gen de la inmunidad a MccE492

Debido a que una cepa mutante *exbB*⁻ es parcialmente resistente a la MccE492, es importante determinar el grado de inmunidad otorgado por la proteína MceB. Para ello se hicieron ensayos de sensibilidad a la MccE492 sobre esferoplastos de HE1 que expresan la proteína MceB. Los resultados indican que una cepa que presenta el complejo TonB incompleto es capaz de adquirir una alta inmunidad a la MccE492 en esferoplastos y sin diferencias significativas al comparar con la cepa control de inmunidad X8605 TonB⁺/MceB (Tabla 9). Los esferoplastos de la cepa HE1 son sensibles a la MccE492 y adquieren un fenotipo inm⁺ al estar presente la proteína MceB. Estos resultados sugieren fuertemente que el mecanismo de la inmunidad puede llevarse a cabo en presencia de un complejo TonB imperfecto, en el cual no sería necesaria la presencia de ExbB. La resistencia a la acción bactericida de la mutantes ExbB sin el tratamiento para formar esferoplastos sería posiblemente una consecuencia de un complejo TonB no funcional, y necesario para el paso de translocación de la MccE492 al periplasma.

Tabla 8. Caracterización fenotípica mediante el método de la dilución crítica de la mutante HE1 (*exbB::Tn10*) que expresa la proteína de la inmunidad

Cepa de <i>E. coli</i>	Actividad^a (U.A.)
HE1	32
HE1/MceB	1 ^b

^aLos números corresponden al recíproco de la potencia en base 2 del último número de la dilución que presenta un halo de inhibición de crecimiento sobre céspedes de la cepa analizada (triplicado).

^bHalo de inhibición de crecimiento difuso visto en todas las diluciones.

La MccE492 presenta una actividad intermedia frente a la mutante *E. coli* HE1; como control no-isogénico, *E. coli* BL21. El título bactericida de la MccE492 utilizada para este ensayo fue estandarizado en la cepa BL21 y corresponde a 1024 U.A.^a.

Tabla 9. Ensayos de inmunidad de esferoplastos en mutante ExbB⁻ portando el gen de la inmunidad a la MccE492

Cepa de <i>E. coli</i>	Porcentaje de sobrevivencia
X8605 TonB ⁺ /MceB	90,2 ± 6,79
HE1 ExbB ⁻	0,0772 ± 0,00273
HE1 ExbB ⁻ /MceB	98,9 ± 4,3

Los ensayos se llevaron a cabo con una concentración de 100 µg/mL de MccE492. Los resultados usados en esta Tabla son representativos de tres ensayos. El 100% corresponde a la sobrevivencia de células sin tratamiento con MccE492. La cantidad de células usadas en este ensayo se explica en la sección Materiales y Métodos. Análisis estadístico *t* de Student, $\alpha/2 = 0,025$.

4. Discusión

4.1 La actividad bactericida de la MccE492 es dependiente del extremo C-terminal de la proteína TonB

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de defensa en la competencia por nichos ecológicos y recursos. Entre los más renombrados destaca la capacidad de producir bacteriocinas, que corresponden a antibióticos proteicos sintetizados por casi todas las bacterias Gram-negativas o Gram-positivas descritas a la fecha. Más de treinta bacteriocinas han sido identificadas en *E. coli*, e indudablemente muchas más quedan por descubrirse. La diversidad presente en las otras especies Gram-negativas, y que incluye otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, es casi inexplorada (Riley y Chavan, 2007).

En términos evolutivos, parece ser que la gran diversidad de las bacteriocinas se ha desarrollado en el escenario de máxima competencia entre cepas con requerimientos nutricionales y nichos similares (Riley y Chavan, 2007; Cascales y cols., 2007), y dentro de sus nichos ecológicos las bacterias han desarrollado las bacteriocinas para el control de las poblaciones cuyos requerimientos ambientales son similares, en vez de dirigir la competencia a géneros diferentes. Existe un número acotado de blancos celulares para la acción de éstas, entre los cuales están la formación de poros en la membrana citoplasmática, la actividad nucleasa contra ADN, ARN y t-ARN y la actividad inhibidora de la biosíntesis de la mureína (Cascales y cols., 2007).

La MccE492 es un ejemplo de una bacteriocina formadora de poros en la membrana citoplasmática. Al igual que muchas bacteriocinas, ha parasitado el sistema TonB para ejercer su actividad bactericida en la célula blanco. Pero a diferencia de

muchos casos descritos de este tipo de bacteriocinas, los mecanismos de la acción bactericida, de la inmunidad y de la interacción con TonB son pobremente entendidos.

Como se mencionó anteriormente, se determinó que la actividad bactericida de la MccE492 es independiente de una interacción entre TonB y los receptores de membrana externa, cuando se ha permeabilizado la membrana externa de la célula blanco. En la secuencia primaria de la MccE492 no se encuentra un motivo del tipo caja TonB, y los estudios de este laboratorio sugieren fuertemente que el sitio de interacción con la caja TonB no es requerido para una interacción con la MccE492 (Baeza, 2003).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que se requiere del dominio C-terminal de TonB para la actividad bactericida. Sin embargo, aunque resulta plausible, no permiten afirmar que ocurra una interacción entre el C-terminal de TonB y los receptores para promover la entrada de la MccE492. Por otro lado, los experimentos con esferoplastos permiten afirmar que es necesaria la presencia del dominio C-terminal de TonB para la actividad bactericida de la MccE492 una vez que está en el espacio periplasmático. Estos resultados son importantes para establecer el mecanismo de acción bactericida de la MccE492, y se generan dos potenciales explicaciones para este fenómeno: que la MccE492 requiera una interacción directa con el extremo C-terminal de TonB o que la MccE492 requiera de una interacción con una proteína TonB funcional, la cual oscilaría entre la membrana interna y la membrana externa, de modo que el dominio N-terminal quedaría expuesto en el espacio periplasmático (Figura 9).

El primer mecanismo propuesto se basa en parte en el mecanismo usado por algunas colicinas y bacteriófagos dependientes de TonB, como la colicina B y el bacteriófago H8, que son capaces de interactuar con TonB a nivel de sus respectivas

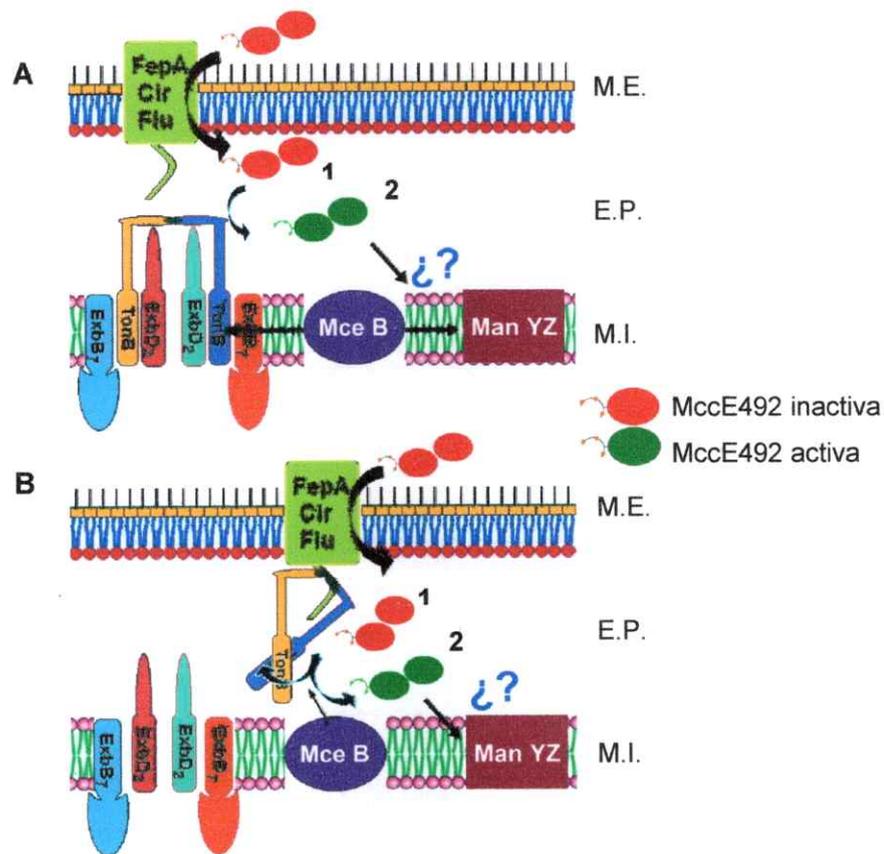


Figura 9. Modelos propuestos para el mecanismo de acción de la MccE492.

En A) la MccE492 ingresa al periplasma a través de un proceso mediado por los receptores de membrana externa FepA, Cir y Fiu (1) y luego mediante una interacción con el extremo C-terminal de TonB, es capaz de adquirir actividad bactericida (2). MceB impediría que la MccE492 formara el poro o que interactuara con el extremo C-terminal de TonB. En algún punto habría una participación del complejo ManYZ. En B) la MccE492 una vez dentro del espacio periplasmático interactuaría con el dominio N-terminal de TonB, probablemente el que guarda energía conformacional, para llevar a cabo un cambio conformacional y adquirir actividad bactericida y así formar el poro. MceB impediría que se insertara en la membrana citoplasmática (3) o que interactuara con el extremo N-terminal de TonB (4). La formación del poro sería un proceso que involucraría más de una molécula de MccE492. M.E., membrana externa; E.P., espacio periplasmático; M.I., membrana interna.

cajas TonB. En el caso de la MccE492, habría una interacción necesaria para adquirir una conformación activa (Figura 9 A).

Esta interacción entre la MccE492 y TonB sería independiente de una interacción entre TonB y uno de los receptores de la membrana externa como ya se ha descrito (Strahsburger y cols., 2005) o tal vez serían procesos que ocurren en paralelo.

El segundo mecanismo se basa en la capacidad que tienen los dominios N- y C-terminal de funcionar independientemente para que TonB sea sensible a la fpm y para que se genere la oscilación entre las membranas. En la literatura se reporta que una proteína trunca TonB Δ 168-239 es capaz de acoplar la fpm para el transporte activo en la membrana externa de *E. coli*, posiblemente debido a un cambio estructural, pero es incapaz de exponer su extremo N-terminal al espacio periplasmático (Larsen y cols., 2003). Se ha demostrado que los esferoplastos de las cepas que expresan la proteína mutante TonBS16L son parcialmente sensibles a la acción bactericida de la MccE492 (Baeza, 2003; García, 2008). Se ha reportado en la literatura que esta proteína mutante es incapaz de transducir la energía, pero que es capaz de generar una oscilación de la proteína entre las membranas. Por otro lado, una cepa que expresa la proteína mutante TonB Δ 109-239 es completamente resistente a la MccE492 y esta proteína sería incapaz de oscilar entre las dos membranas, por lo tanto no expondría su extremo N-terminal al espacio periplasmático.

Se han propuesto muchos modelos para explicar el mecanismo por el cual TonB transduce la fpm desde la membrana interna a los receptores de membrana externa. Uno de los más actuales propone que la energía capaz de generar un cambio conformacional en los receptores de transmembrana estaría retenida en el extremo N-terminal de TonB, específicamente en los primeros 66 residuos aminoacídicos. Este dominio viajaría hasta los receptores, guiado por la unión del extremo C-terminal unido

a los receptores mediante una interacción del tipo caja TonB, pues, se ha probado que por sí solo es capaz de unirse a los receptores de la membrana externa, pero sin la transducción de energía (Larsen y cols., 2003). Los resultados presentados en este trabajo indican que el extremo C-terminal de TonB sería fundamental para la acción bactericida de la MccE492, una vez que está en el espacio periplasmático y que esta interacción no se relacionaría a la actividad transductora de energía de TonB, sino más bien a la presencia necesaria de este dominio para que la MccE492 pueda ejercer su acción bactericida. No obstante, esto no excluye la posibilidad de que en forma paralela, tanto la región C-terminal de TonB como el complejo TonB activo sean necesarios para la etapa previa de translocación.

4.2 La actividad de la MccE492 y el mecanismo de inmunidad son independientes de la proteína ExbB

El sistema Ton incluye a las proteínas TonB, ExbB y ExbD. Mucho menos se sabe de estas dos últimas que de TonB y los transportadores en la membrana externa. La hipótesis que se maneja actualmente es que estas dos proteínas integrales de membrana citoplasmática de algún modo cosechan la energía desde la fpm generada en la membrana citoplasmática y la utilizan para energizar a TonB (Ahmer y cols., 1995; Held y Postle, 2002; Brinkman y Larsen, 2008). La función de estas proteínas puede ser complementada en forma imperfecta por las proteínas TolQ y TolR del sistema homólogo Tol (Braun, 1989; Braun y Hermann, 2004; Brinkman y Larsen, 2008).

Los resultados de otro laboratorio indican que las cepas mutantes en ExbB presentan insensibilidad a la acción bactericida de la MccE492 a una concentración final de 20 µg/mL (Pugsley y cols., 1986). En esta memoria se demostró que la cepa

HE1 (*exbB::Tn10*) muestra sensibilidad a la MccE492 en casi todas las concentraciones probadas, excepto a 20 µg/mL, en la cual se observa una sobrevida parcial sin diferencias significativas al control positivo, alrededor del 10%. Esta discrepancia con el trabajo publicado puede deberse a lo siguiente: i) la forma de purificación de la MccE492 a gran escala con alto título bactericida, la que podría marcar una gran diferencia entre los resultados obtenidos en ambos trabajos, ii) las cepas *exbB*⁻ usadas, pues, se sabe que hay una complementación imperfecta de parte del sistema homólogo Tol, y que podría ser mayor para la cepa utilizada en este trabajo.

Con respecto al mecanismo de la inmunidad a la MccE492, se ha demostrado en este trabajo que los esferoplastos de la cepa HE1 (*exbB1::Tn10*) adquieren una inmunidad total a la MccE492 cuando expresan la proteína de la inmunidad y muestran diferencias estadísticamente significativas al comparar con los esferoplastos de la misma cepa sin la proteína de inmunidad. Esto es de gran importancia para esclarecer cómo es la acción protectora de MceB. Se ha demostrado la interacción de esta proteína con TonB mediante la obtención de mutaciones compensatorias entre ambas proteínas (Baeza, 2003), y mediante el análisis informático se propone en esta memoria que interactuaría con TonB de una forma similar a ExbB y TolQ.

Existen dos mecanismo posibles por los cuales la proteína de la inmunidad inhibiría la acción de la MccE492 a través de una interacción con TonB (Baeza, 2003): i) la unión de MceB a TonB inhibiría la interacción de la MccE492 con TonB e impediría que la MccE492 pueda alcanzar la membrana citoplasmática; ii) MceB no impediría la interacción entre la MccE492 y TonB, sino que la unión con TonB únicamente le permitiría a la proteína de la inmunidad posesionarse en el lugar adecuado para evitar que la MccE492 forme el canal. El primero impediría una

interacción de la MccE492 a nivel de dominio N-terminal, y el segundo impediría la formación del canal de la MccE492. El primer mecanismo es compatible con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio a la fecha, y explica por qué hay una interacción entre TonB y MceB, y por qué MceB a muy bajas concentraciones es capaz de otorgar inmunidad a través de un mecanismo altamente eficiente (Lagos y cols., 1999).

Finalmente se estableció que MceB es independiente de la presencia de ExbB para ejercer su acción protectora contra la MccE492, sin embargo, se necesita profundizar en este estudio para esclarecer el mecanismo de la inmunidad. Sería importante realizar experimentos con las cepas mutantes en todas las proteínas que son capaces de cosechar la fpm para energizar a TonB, y encontrar otras mutaciones compensatorias entre TonB y MceB para avalar esta interacción u otras entre MceB y una de las proteínas del complejo Ton.

5. Conclusiones

- El dominio carboxilo terminal de TonB es fundamental para la actividad bactericida de la MccE492 en dos etapas: primero, para el ingreso de la MccE492 al espacio periplasmático y segundo, para la inserción de ésta en la membrana interna.
- La actividad bactericida y el mecanismo de inmunidad contra la MccE492 no estarían mediados por una interacción directa con la proteína ExbB.

Apéndice

6. Análisis estadístico

6.1 Comparaciones entre dos medias muestrales

En este trabajo se utilizaron dos estadígrafos para probar si la media de la sobrevida en cada ensayo realizado presenta diferencias que son significativas estadísticamente entre cada cepa o entre cada tratamiento con la MccE492. Para ver diferencias en las medias poblacionales (\bar{x}_i) obtenidas se utilizó la distribución t y el test de t de Student, y para establecer si se cumplen la homocedasticidad entre las medias comparadas y elegir así el test de t de Student adecuado, se utilizó el criterio de la distribución F y el test de F de Snedecor.

En el caso de las hipótesis referidas a dos medias, es necesario distinguir dos situaciones: La primera es que son a) dos muestras independientes y b) son muestras relacionadas por una misma situación experimental. En el caso de esta memoria, se compararon medias de muestras independientes, es decir, se comparó uno es a uno las distintas cepas y el criterio de comparación se basó en la semejanza entre los tratamiento con la MccE492 y el número de tratamientos (n_i).

Por razones estadísticas, la comparación entre dos muestras independientes depende de si las varianzas muestrales (S_i^2) cumplen el principio de homocedasticidad (similitud de varianzas) o bien si son diferentes. Se considera el test de F de Snedecor como el adecuado para estimar si dos varianzas son iguales o no, con un nivel de significancia del 95% y grados de libertad (n_1-1) y (n_2-1) (Ecuación 1):

$$F_{(n_1-1),(n_2-1)} = \frac{S_{mayor}^2}{S_{menor}^2}$$

Ecuación 1

Si las varianzas se consideran iguales (principio de homocedasticidad), entonces se utiliza el test de t de Student para muestras con varianzas sin diferencias estadísticamente significativas (Ecuación 2):

$$t_{n_1+n_2-2} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_c^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Ecuación 2

donde,

$$S_c^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Ecuación 3

Si no se cumple el principio de homocedasticidad, entonces se utiliza el test de t de Student para varianzas diferentes (Ecuación 4):

$$t_{gl} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2} \right)}}$$

Ecuación 4

,donde:

$$gl = \frac{\left[\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2} \right]^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 - 1}}$$

Ecuación 5

6.2 Docimasia o pruebas de hipótesis

Para simplificar el análisis de estos datos, la estrategia estadística se destina al rechazo de la hipótesis de nulidad, H_0 , y esto nos permitirá sostener la hipótesis alternativa, H_1 . Por este motivo, ambas hipótesis son estrictamente complementarias.

Hipótesis para la comparación de las medias:

- $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$, las medias de los ensayos de sobrevida son iguales, pues, no muestran diferencias estadísticas significativas.
- $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$, las medias de los ensayos de sobrevida son diferentes y muestran diferencias estadísticas significativas.

Para el planteamiento inicial sobre la igualdad o la desigualdad de las varianzas (principio de homocedasticidad) es fundamental plantear una docimasia más estricta.

Hipótesis para la comparación de las varianzas:

- $H_0: S_1^2 = S_2^2$, las varianzas analizadas son similares y no muestran diferencias significativas estadísticamente.
- $H_1: S_1^2 \neq S_2^2$, las varianzas analizadas son diferentes y muestran diferencias significativas estadísticamente.

Ambos tipos de hipótesis (para la comparación de medias y de varianzas) serán utilizadas en todas las comparaciones.

6.3 Análisis de las diferencias en la sobrevida de los cultivos líquidos sometidos a tratamientos de distintas concentraciones de MccE499

6.3.1 Análisis de la sobrevida de los cultivos líquidos de las cepas X8605 TonB⁻, X8605 TonB⁺, X8605 TonBΔ109-239^P, X8605 TonBΔ109-239^h y X8605 TonBΔ109-239¹³

6.3.1.1 Tratamiento con la MccE492 a una concentración final de 100 µg/mL

Ensayos/Cepa	X8605 TonB ⁺	X8605 TonB ⁻	X8605 TonBΔ109-239 ^P	X8605 TonBΔ109-239 ^h	X8605 TonBΔ109-239 ¹³
Ensayo 1	1,58300	77,00000	121,50000	55,55000	136,23000
Ensayo 2	1,12000	121,84000	83,30000	77,12500	110,20000
Ensayo 3	0,05700	91,39000	90,17000	92,86000	88,40000
Promedio μ	0,92000	96,74333	98,32333	75,17833	111,61000
Varianza S^2	0,61217	524,15003	414,66763	350,85116	573,41830

Test de F de Snedecor

- Hipótesis para la estimación de las varianzas

$H_0: S_1^2 = S_2^2$

$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$

- Criterio de contraste de F

$\alpha = 0,05$

$gl_1 = 2; gl_2 = 2$, debido a que cada todas las muestras tiene 3 repeticiones

Valor F crítico= 19,0

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
TonB ⁺	TonB ⁻	856,21786	≠
TonB ⁺	TonBΔ109-239 ^P	677,37444	≠
TonB ⁺	TonBΔ109-239 ^h	573,12794	≠
TonB ⁻	TonBΔ109-239 ¹³	936,69934	≠
TonB ⁻	TonBΔ109-239 ^P	1,26402	=
TonB ⁻	TonBΔ109-239 ^h	1,49394	=
TonB ⁻	TonBΔ109-239 ¹³	1,09400	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ^h	1,18189	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ¹³	1,38284	=
TonBΔ109-239 ^h	TonBΔ109-239 ¹³	1,63436	=

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
TonB+	TonB-	2,00467	7,24520	-	4,30300	Rechazo	\neq
TonB+	TonB Δ 109-239 ^p	2,00591	8,27873	-	4,30300	Rechazo	\neq
TonB+	TonB Δ 109-239 ^h	2,00698	6,86065	-	4,30300	Rechazo	\neq
TonB+	TonB Δ 109-239 ¹³	2,00427	8,00205	-	4,30300	Rechazo	\neq
TonB-	TonB Δ 109-239 ^p	4,00000	-	0,08932	2,77600	Aceptación	=
TonB-	TonB Δ 109-239 ^h	4,00000	-	1,26272	2,77600	Aceptación	=
TonB-	TonB Δ 109-239 ¹³	4,00000	-	0,77725	2,77600	Aceptación	=
TonB Δ 109-239 ^p	TonB Δ 109-239 ^h	4,00000	-	1,44890	2,77600	Aceptación	=
TonB Δ 109-239 ^p	TonB Δ 109-239 ¹³	4,00000	-	0,73212	2,77600	Aceptación	=
TonB Δ 109-239 ^h	TonB Δ 109-239 ¹³	4,00000	-	2,07558	2,77600	Aceptación	=

6.3.1.2 Tratamiento con la MccE492 a una concentración final de 500 μ g/mL

Ensayos/Cepa	X8605 TonB+	X8605 TonB-	X8605 TonB Δ 109-239 ^p	X8605 TonB Δ 109-239 ^h	X8605 TonB Δ 109-239 ¹³
Ensayo 1	0,20100	74,90000	126,00000	32,86000	89,83000
Ensayo 2	0,16000	108,18000	91,26000	42,88000	88,37000
Ensayo 3	0,03950	110,07000	133,30000	97,82000	88,19000
Promedio μ	0,13350	97,71667	116,85333	57,85333	88,79667
Varianza S ²	0,00705	391,34323	504,58653	1223,10093	0,80893

Test de F de Snedecor

- Hipótesis para la estimación de las varianzas

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

- Criterio de contraste de F

$\alpha = 0,05$

gl₁ = 2; gl₂ = 2, debido a que cada una de las muestras tiene 3 repeticiones

Valor F crítico = 19,0

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
TonB+	TonB-	55531,33965	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ^P	71600,48719	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ^h	173557,1937	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ¹³	114,7870919	≠
TonB-	TonBΔ109-239 ^P	1,289370788	=
TonB-	TonBΔ109-239 ^h	3,125391802	=
TonB-	TonBΔ109-239 ¹³	483,7768667	≠
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ^h	2,423966659	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ¹³	623,76776	≠
TonBΔ109-239 ^h	TonBΔ109-239 ¹³	1511,992253	≠

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
TonB+	TonB-	2,00007	8,54383	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ^P	2,00005	8,99983	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ^h	2,00002	2,85859	-	4,30300	Aceptación	Intermedio
TonB+	TonBΔ109-239 ¹³	2,03484	170,00588	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB-	TonBΔ109-239 ^P	4,00000	-	1,10736	2,77600	Aceptación	=
TonB-	TonBΔ109-239 ^h	4,00000	-	2,43017	2,77600	Aceptación	Intermedio
TonB-	TonBΔ109-239 ¹³	2,00826	0,78018	-	4,30300	Aceptación	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ^h	4,00000	-	2,45855	2,77600	Aceptación	Intermedio
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ¹³	2,00641	2,16162	-	4,30300	Aceptación	=
TonBΔ109-239 ^h	TonBΔ109-239 ¹³	2,00264	1,53197	-	4,30300	Aceptación	=

6.3.1.3 Tratamiento con la MccE492 a una concentración final de 1.000 µg/mL

Ensayos/Cepa	X8605 TonB+	X8605 TonB-	X8605 TonBΔ109-239 ^P	X8605 TonBΔ109-239 ^h	X8605 TonBΔ109-239 ¹³
Ensayo 1	0,24500	83,33000	58,20000	25,82000	78,62000
Ensayo 2	0,10200	94,44000	87,51000	65,00600	48,88000
Ensayo 3	0,18100	77,94000	88,40000	38,94000	71,04000
Promedio μ	0,17600	85,23667	78,03667	43,25533	66,18000
Varianza S^2	0,00513	70,78903	295,31803	397,85223	238,83160

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

$gl_1 = 2; gl_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
TonB+	TonB-	13796,34249	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ^P	57555,64867	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ^h	77538,92523	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ¹³	46546,79400	≠
TonB-	TonBΔ109-239 ^P	4,17180	=
TonB-	TonBΔ109-239 ^h	5,62025	=
TonB-	TonBΔ109-239 ¹³	3,37385	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ^h	1,34719	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ¹³	0,80872	=
TonBΔ109-239 ^h	TonBΔ109-239 ¹³	1,66582	=

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
TonB+	TonB-	2,00028	17,51018	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ^P	2,00006	7,84748	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ^h	2,00005	3,74081	-	4,30300	Aceptación	=
TonB+	TonBΔ109-239 ¹³	2,00008	7,39742	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB-	TonBΔ109-239 ^P	4,00000	-	0,65176	2,77600	Aceptación	=
TonB-	TonBΔ109-239 ^h	4,00000	-	3,35890	2,77600	Rechazo	≠
TonB-	TonBΔ109-239 ¹³	4,00000	-	1,87583	2,77600	Aceptación	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ^h	4,00000	-	2,28816	2,77600	Aceptación	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ¹³	4,00000	-	0,88857	2,77600	Aceptación	=
TonBΔ109-239 ^h	TonBΔ109-239 ¹³	4,00000	-	1,57363	2,77600	Aceptación	=

6.3.2 Comparación por cepa entre los tratamientos a distintas concentraciones de la MccE492

6.3.2.1 Comparación entre los tratamientos de la cepa X8605 TonB⁺

Ensayos/Cepa	100 µg/mL	500 µg/mL	1.000 µg/mL
Ensayo 1	1,58300	0,20100	0,24500
Ensayo 2	1,12000	0,16000	0,10200
Ensayo 3	0,05700	0,03950	0,18100
Promedio μ	0,92000	0,13350	0,17600
Varianza S^2	0,61217	0,00705	0,00513

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

$gl_1 = 2$; $gl_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
100 µg/mL	500 µg/mL	86,83262	≠
100 µg/mL	1.000 µg/mL	119,33138	≠
500 µg/mL	1.000 µg/mL	1,37426	=

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
100 µg/mL	500 µg/mL	2,04605	1,73115	-	4,30300	Aceptación	=
100 µg/mL	1.000 µg/mL	2,03351	1,64015	-	4,30300	Aceptación	=
500 µg/mL	1.000 µg/mL	4,00000	-	0,66700	2,77600	Aceptación	=

6.3.2.2 Comparación entre los tratamientos de la cepa X8605 TonB

Ensayos/Cepa	100 µg/mL	500 µg/mL	1.000 µg/mL
Ensayo 1	77,00000	74,90000	83,33000
Ensayo 2	121,84000	108,18000	94,44000
Ensayo 3	91,39000	110,07000	77,94000
Promedio μ	96,74333	97,71667	85,23667
Varianza S^2	524,15003	391,34323	70,78903

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

$g_1=2$; $g_2=2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
100 µg/mL	500 µg/mL	1,33936	=
100 µg/mL	1.000 µg/mL	7,40439	=
500 µg/mL	1.000 µg/mL	5,52830	=

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	g_i	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
100 µg/mL	500 µg/mL	4,00000	0,05572	2,77600	Aceptación	=
100 µg/mL	1.000 µg/mL	4,00000	0,81710	2,77600	Aceptación	=
500 µg/mL	1.000 µg/mL	4,00000	1,00552	2,77600	Aceptación	=

6.3.2.3 Comparación entre los tratamientos de la cepa X8605 TonBΔ109-239^P

Ensayos/Cepa	100 µg/mL	500 µg/mL	1.000 µg/mL
Ensayo 1	121,50000	126,00000	58,20000
Ensayo 2	83,30000	91,26000	87,51000
Ensayo 3	90,17000	133,30000	88,40000
Promedio μ	98,32333	116,85333	78,03667
Varianza S^2	414,66763	504,58653	295,31803

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

$gl_1 = 2$; $gl_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
100 µg/mL	500 µg/mL	1,21685	=
100 µg/mL	1.000 µg/mL	1,40414	=
500 µg/mL	1.000 µg/mL	1,70862	=

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
100 µg/mL	500 µg/mL	4,00000	1,05856	2,77600	Aceptación	=
100 µg/mL	1.000 µg/mL	4,00000	1,31870	2,77600	Aceptación	=
500 µg/mL	1.000 µg/mL	4,00000	2,37716	2,77600	Aceptación	=

6.3.2.4 Comparación entre los tratamientos de la cepa X8605 Ton Δ 109-239^h

Ensayos/Cepa	100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1.000 $\mu\text{g/mL}$
Ensayo 1	55,55000	32,86000	25,82000
Ensayo 2	77,12500	42,88000	65,00600
Ensayo 3	92,86000	97,82000	38,94000
Promedio μ	75,17833	57,85333	43,25533
Varianza S^2	350,85116	1223,10093	397,85223

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

$g_1 = 2$; $g_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	3,48610	=
100 $\mu\text{g/mL}$	1.000 $\mu\text{g/mL}$	1,13396	=
500 $\mu\text{g/mL}$	1.000 $\mu\text{g/mL}$	3,07426	=

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	g_i	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	4,00000	0,75638	2,77600	Aceptación	=
100 $\mu\text{g/mL}$	1.000 $\mu\text{g/mL}$	4,00000	2,02074	2,77600	Aceptación	=
500 $\mu\text{g/mL}$	1.000 $\mu\text{g/mL}$	4,00000	0,62801	2,77600	Aceptación	=

6.3.2.5 Comparación entre los tratamientos de la cepa X8605 TonBΔ109-239¹³

Ensayos/Cepa	100 µg/mL	500 µg/mL	1.000 µg/mL
Ensayo 1	136,23000	89,83000	78,62000
Ensayo 2	110,20000	88,37000	48,88000
Ensayo 3	88,40000	88,19000	71,04000
Promedio μ	111,61000	88,79667	66,18000
Varianza S^2	573,41830	0,80893	238,83160

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

$gl_1 = 2$; $gl_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
100 µg/mL	500 µg/mL	708,86022	≠
100 µg/mL	1.000 µg/mL	2,40093	=
500 µg/mL	1.000 µg/mL	295,24384	≠

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas Iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
100 µg/mL	500 µg/mL	2,00564285	2,760949931	-	4,303	Aceptación	=
100 µg/mL	1.000 µg/mL	4	-	2,760949931	2,776	Aceptación	=
500 µg/mL	1.000 µg/mL	2,013547968	2,530516381	-	2,776	Aceptación	=

6.3.3 Análisis de la sobrevida de los esferoplastos de las cepas X8605 TonB⁻, X8605 TonB⁺, X8605 TonBΔ109-239^P, X8605 TonBΔ109-239^h y X8605 TonBΔ109-239¹³

Ensayos/Cepa	X8605 TonB ⁺	X8605 TonB ⁻	X8605 TonBΔ109-239 ^P	X8605 TonBΔ109-239 ^h	X8605 TonBΔ109-239 ¹³
Ensayo 1	0,00027	83,33000	85,74000	70,81300	107,33000
Ensayo 2	0,02668	75,06600	86,35000	75,57000	77,96000
Ensayo 3	0,00179	91,52000	70,00000	58,25000	103,20000
Promedio μ	0,00957	83,30533	80,69667	68,21100	96,16333
Varianza S^2	0,00022	67,68399	85,90703	80,07340	252,78523

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$H_0: S_1^2 = S_2^2$

$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$

Criterio de contraste de F

$\alpha = 0,05$

$gl_1 = 2; gl_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$F = 19,0$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
TonB ⁺	TonB ⁻	308320,69253	≠
TonB ⁺	TonBΔ109-239 ^P	391332,09843	≠
TonB ⁺	TonBΔ109-239 ^h	364758,17647	≠
TonB ⁺	TonBΔ109-239 ¹³	1151511,95397	≠
TonB ⁻	TonBΔ109-239 ^P	1,26924	=
TonB ⁻	TonBΔ109-239 ^h	1,18305	=
TonB ⁻	TonBΔ109-239 ¹³	3,73479	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ^h	1,07285	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ¹³	2,94254	=
TonBΔ109-239 ^h	TonBΔ109-239 ¹³	3,15692	=

Test de t de Student

- **Hipótesis para la estimación de medias**

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

- **Criterio de contraste de t**

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
TonB+	TonB-	2,00001	17,53637	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ^P	2,00001	15,07820	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ^h	2,00001	13,20107	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB+	TonBΔ109-239 ¹³	2,00000	10,47492	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB-	TonBΔ109-239 ^P	4	-	0,36458	2,77600	Aceptación	=
TonB-	TonBΔ109-239 ^h	4	-	2,15079	2,77600	Aceptación	=
TonB-	TonBΔ109-239 ¹³	4	-	1,24405	2,77600	Aceptación	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ^h	4	-	1,67858	2,77600	Aceptación	=
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ¹³	4	-	1,45564	2,77600	Aceptación	=
TonBΔ109-239 ^h	TonBΔ109-239 ¹³	4	-	2,65368	2,77600	Aceptación	=

6.3.4 Análisis de la sobrevida de los cultivos líquidos de las cepas X8605 TonB⁺, X8605 TonBΔ109-239^P, X8605 TonBΔ109-239^h y X8605 TonBΔ109-239¹³ que expresan la proteína de inmunidad a la MccE492

Ensayos/Cepa	X8605	X8605	X8605	X8605
	TonB ⁺ /MceB	TonBΔ109-239 ^P /MceB	TonBΔ109-239 ^h /MceB	TonBΔ109-239 ¹³ /MceB
Ensayo 1	90,22000	116,90000	100,00000	93,20000
Ensayo 2	88,37200	137,70000	87,43000	100,00000
Ensayo 3	66,17600	77,78000	106,49000	130,08000
Promedio μ	81,58933	110,79333	97,97333	107,76000
Varianza S ²	179,03191	925,57013	93,90143	385,19680

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

gl₁ = 2; gl₂ = 2, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
TonB ⁺	TonB ⁺ /MceB	815543,61788	≠
TonBΔ109-239 ^P	TonBΔ109-239 ^P /MceB	10,77409	=
TonBΔ109-239 ^h	TonBΔ109-239 ^h /MceB	1,17269	=
TonBΔ109-239 ¹³	TonBΔ109-239 ¹³ /MceB	1,52381	=

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
TonB+	TonB+ MceB	2,00000	7,46728	-	4,30300	Rechazo	\neq
TonB Δ 109-239 ^P	TonB Δ 109-239 ^P /MceB	4,00000	-	1,63908	2,77600	Aceptación	=
TonB Δ 109-239 ^b	TonB Δ 109-239 ^b /MceB	4,00000	-	3,90827	2,77600	Rechazo	\neq
TonB Δ 109-239 ¹³	TonB Δ 109-239 ¹³ /MceB	4,00000	-	0,79522	2,77600	Aceptación	=

6.3.4 Análisis de la sobrevivencia de los cultivos líquidos de las cepas X8605 TonB⁻, X8605 TonB⁺ y HE1 ExbB⁻

6.3.4.1 Tratamiento con la MccE492 a una concentración final de 20 μ g/mL

Ensayos/Cepa	X8605 TonB ⁺	X8605 TonB ⁻	HE1 ExbB ⁻
Ensayo 1	20,46000	106,86000	11,67000
Ensayo 2	19,00000	150,00000	5,20000
Ensayo 3	14,09000	107,40000	12,41000
Promedio μ	17,85000	121,42000	9,76000
Varianza S ²	11,13610	612,68520	15,73210

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

$gl_1 = 2$; $gl_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
TonB+	TonB-	55,01793	\neq
TonB+	ExbB-	1,41271	=
TonB-	ExBB+	38,94490	\neq

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas iguales	Valor de f crítico	Decisión de hipótesis	Medias
TonB+	TonB-	2,07267	5,07866	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB+	ExbB-	4,00000	-	2,70327	2,77600	Aceptación	=
TonB-	ExBB+	3,88628	5,45530	-	2,77600	Rechazo	≠

5.3.4.2 Tratamiento con la MccE492 a una concentración final de 100 µg/mL

Ensayos/Cepa	X8605 TonB+	X8605 TonB ⁻	HE1 ExbB ⁻
Ensayo 1	1,58300	77,00000	1,75000
Ensayo 2	1,12000	121,84000	0,86600
Ensayo 3	0,05700	91,39000	0,10900
Promedio μ	0,92000	96,74333	0,90833
Varianza S^2	0,61216	524,15003	0,67456

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

$gl_1 = 2; gl_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
TonB+	TonB-	856,21786	≠
TonB+	ExbB-	1,10192	=
TonB-	ExBB+	777,02008	≠

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
TonB+	TonB-	2,00467	5,12313	-	4,30300	Rechazo	≠
TonB+	ExbB-	4,00000	-	0,01781	2,77600	Aceptación	=
TonB-	ExBB+	2,00467	5,12345	-	4,30300	Rechazo	≠

6.3.4.3 Tratamiento con la MccE492 a una concentración final de 500 µg/mL

Ensayos/Cepa	X8605 TonB+	X8605 TonB-	HE1 ExbB-
Ensayo 1	0,20100	74,90000	1,17E-07
Ensayo 2	0,16000	108,18000	0,01200
Ensayo 3	0,03950	110,07000	0,03000
Promedio μ	0,13350	97,71667	0,01400
Varianza S^2	0,00705	391,34323	0,00022

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

$gl_1 = 2; gl_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
TonB+	TonB-	55509,67801	≠
TonB+	ExbB-	30,92127	≠
TonB-	ExBB+	1716430,00700	≠

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
TonB+	TonB-	2,00007	6,05793	4,30300	Rechazo	≠
TonB+	ExbB-	2,12922	2,11754	4,30300	Aceptación	=
TonB-	ExBB+	2,00000	6,05058	4,30300	Rechazo	≠

6.3.4.4 Tratamiento con la MccE492 a una concentración final de 1.000 µg/mL

Ensayos/Cepa	X8605 TonB+	X8605 TonB-	HE1 ExbB-
Ensayo 1	0,24500	83,33000	4,50E-09
Ensayo 2	0,10200	94,44000	0,05000
Ensayo 3	0,18100	77,94000	3,74E-05
Promedio μ	0,17600	85,23667	1,67E-02
Varianza S^2	0,00513	70,78903	8,3271E-04

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F:

$$\alpha = 0,05$$

$gl_1 = 2$; $gl_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
TonB+	TonB-	13799,03119	\neq
TonB+	ExbB-	6,16060	=
TonB-	ExBB+	85010,38386	\neq

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
TonB+	TonB-	2,00029	17,510184	-	4,30300	Rechazo	\neq
TonB+	ExbB-	4,00000	-	3,57364	2,77600	Rechazo	\neq
TonB-	ExBB+	2,00004	12,40513	-	4,30300	Rechazo	\neq

6.3.4.5 Comparación entre los tratamientos de la cepa HE1 ExbB

Ensayos/Cepa	20 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL	1.000 µg/mL
Ensayo 1	11,67000	1,75000	1,17E-07	4,50E-09
Ensayo 2	5,20000	0,86600	0,01200	0,05
Ensayo 3	12,41000	0,10900	0,03000	3,74E-05
Promedio µ	9,76000	0,90833	0,01400	1,67E-02
Varianza S ²	15,73210	0,67456	0,00022	8,32E-04

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

gl₁= 2; gl₂=2, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
20 µg/mL	100 µg/mL	23,32201731	≠
20 µg/mL	500 µg/mL	71509,54545	≠
20 µg/mL	1.000 µg/mL	18892,6517	≠
100 µg/mL	500 µg/mL	3066,18182	≠
100 µg/mL	1.000 µg/mL	810,077938	≠
500 µg/mL	1.000 µg/mL	0,26419762	=

Test de t de Student

- **Hipótesis para la estimación de medias**

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- **Criterio de contraste de t**

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Test de Varianzas iguales	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
20 µg/mL	100 µg/mL	2,17120	3,78509	-	4,30300	Aceptación	=
20 µg/mL	500 µg/mL	2,00006	4,25589	-	4,30300	Aceptación	≠
20 µg/mL	1.000 µg/mL	2,00021	4,25463	-	4,30300	Aceptación	≠
100 µg/mL	500 µg/mL	2,00130	1,88572	-	4,30300	Aceptación	=
100 µg/mL	1.000 µg/mL	2,00494	1,87917	-	4,30300	Aceptación	=
500 µg/mL	1.000 µg/mL	4,00000	-	47,59824	2,77600	Rechazo	≠

6.3.5 Análisis de la sobrevida de los esferoplastos de las cepas X8605 TonB⁺, HE1 ExbB⁻ y HE1 ExbB⁻/MceB

Ensayos/Cepa	X8605 TonB ⁺ /MceB	HE1	HE1 MceB
Ensayo 1	90,22000	0,08740	98,80000
Ensayo 2	88,37200	0,76000	73,52000
Ensayo 3	66,17600	8,02E-04	107,10000
Promedio μ	81,58933	0,282734	93,14000
Varianza S^2	179,03190	0,17271	305,9308

Estimación de varianzas

Hipótesis:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

Criterio de contraste de F

$$\alpha = 0,05$$

$gl_1 = 2$; $gl_2 = 2$, debido a que cada muestra tiene 3 repeticiones.

$$F = 19,0$$

Variable nominal 1.	Variable nominal 2	Valor F	Decisión de varianzas
TonB	TonB ⁺ /MceB	815543,61800	≠
HE1	HE1 MceB	1771,33566	≠

Test de t de Student

- Hipótesis para la estimación de medias

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Criterio de contraste de t

$\alpha/2 = 0,025$ como nivel de significancia

Variable nominal 1	Variable nominal 2	gl	Test de Varianzas diferentes	Valor de t crítico	Decisión de hipótesis	Medias
TonB ⁺	TonB ⁺ MceB	2,00000	7,46728	4,30300	Rechazo	≠
HE1	HE1 MceB	2,00226	6,50021	4,30300	Rechazo	≠

7. Referencias bibliográficas

- Ahmer, B. M. G. Thomas, R.A. Larsen y K. Postle. 1995. Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB y ExbD in TonB function and stability. *J. Bacteriol.* **177**: 4742 - 4747.
- Baquero, F. y F. Moreno. The microcins. 1984. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 117 - 124.
- Baeza, M. 2003. Mecanismo de inmunidad, de traslocación y de conversión tipo príon de la MccE492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Bieler, S., L. Estrada, R. Lagos, M. Baeza, J. Castilla y C. Soto. 2005. Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *J. Biol. Chem.* **280**: 26880 - 26885.
- Bieler, S., F. Silva, C. Soto y D. Belin. 2006. Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted Microcin E492 requires the mannose permease. *J. Bacteriol.* **188**: 7049 - 7061.
- Braun, V., S. Patzer y K. Hantke. 2002. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie.* **84**: 365 - 380.
- Braun V. 1989. The structurally related *exbB* and *tolQ* genes are interchangeable in conferring *tonB*-dependent colicin, bacteriophage, and albomycin sensitivity. *J. Bacteriol.* **171**: 6387 - 6390.
- Braun V. y C. Herrmann. 2004. Point mutations in transmembrane helices 2 and 3 of ExbB and TolQ affect their activities in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **186**: 4402 - 4406.

- Brinkman K. y R. Larsen. 2008. Interactions of the energy transducer TonB with noncognate energy-harvesting complexes. *J. Bacteriol.* **190**: 421 - 427.
- Brinkman K. 2007. Using chimeras to evaluate cross-talk, energy transfer, and protein-protein interactions in the TonB and TolA systems. Tesis PhD. College of Bowling Green State University.
- Cascales, E., S. Buchanan, D. Duché, C. Kleanthous, R. Loubès, K. Postle, M. Riley, S. Slatin y D. Cavard. 2007. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 158 - 229.
- Devanathan, S. y K. Postle. 2007. Studies on colicin B translocation: FepA is gated by TonB. *Mol. Microbiol.* **65**: 441 - 453.
- Drieder, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. McMullen y H. Prévost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 564 - 582.
- Duquesne S., D. Destoumieux-Garzón, J. Perducci y S. Rebuffat. 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from Enterobacteria. *J. Nat. Prod. Rept.* **24** : 708 - 734.
- Destoumieux-Garzón D., X. Thomas, M. Santamaría, C. Goulard, M. Barthélémy, B. Boscher, Y. Bessin, G. Molle, A. Pons, L. Letellier, J. Perduzzi y S. Rebuffat. 2003. Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**: 1031 - 1041.
- Erni, B., B. Zanolari y H. Kocher. 1987. The mannose permease of *Escherichia coli* consists of three different proteins: amino-acid sequence and function in sugar

- transport, sugar phosphorylation, and penetration of phage lambda DNA. *J. Biol. Chem.* **262**: 5238 - 5247.
- Erni, B. 2006. The mannose transporter complex: an open door for the macromolecular invasion of bacteria. *J. Bacteriol.* **188**: 7036 - 7038
 - García, V. 2008. La agregación espontánea de la mutante Q8H de la microcina anula la actividad bactericida y aumenta el efecto citotóxico en células tumorales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
 - Ghosh, J. y K. Postle. 2005. Disulphide trapping of an *in vivo* energy-dependent conformation of *Escherichia coli* TonB protein. *Mol. Microbiol.* **55**: 276 – 288.
 - Guarente, L., y J. Beckwith. 1978. A mutant RNA polymerase of *E. coli* which terminates transcription in strains making defective rho factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 294 - 297.
 - Held K. y K. Postle. 2002. ExbB and ExbD do not function independently in TonB-dependent energy transduction. *J. Bacteriol.* **184**: 5170 - 5173.
 - Hetz, C., M. Bono, L. Barros y R. Lagos. 2002. Microcin E492, a channel forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**: 2696 - 2701.
 - Higgs, P., T. Letain, K. Merriam, N. Burke, H. Park, C. Kang y K. Postle. 2002a. TonB interacts with nonreceptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 1640 - 1648.

- Higgs, P., R. Larsen y K. Postle. 2002b. Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol. Microbiol.* **44**: 271 - 281.
- Karlsson, M., K. Hannavy y F. Higgins. 1993. ExbB acts as a Chaperone-like protein to stabilize TonB in the cytoplasm. *Mol. Microbiol.* **8**: 389 - 396.
- Koebnik R. 2005. TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception of the rule?. *TRENDS Microbiol.* **13**: 343 - 347.
- Khursigara, C., G. de Crescenzo, P. Pawelek y J. Coulton. 2005. Deletion of the proline-rich region of TonB disrupts formation of the 2:1 complex with FhuA, an outer membrane receptor of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **14**: 1266 - 1273.
- Larsen R. y K. Postle. 2001. Conserved residues Ser(16) and His(20) and their relative positioning are essential for TonB activity, cross-linking of TonB with ExbB, and the ability of TonB to respond to proton motive force. *J. Biol. Chem.* **276**: 8111 - 8117.
- Larsen, R., G. Wood y K. Postle. 1993. The conserved proline-rich motif is not essential for energy transduction by *Escherichia coli* TonB protein. *Mol. Microbiol.* **10**: 943 - 953.
- Larsen R., M. Thomas y K. Postle. 1999. Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* **31**: 1809 -1824.
- Larsen R., T. Letain y K. Postle. 2003. *In vivo* evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**: 211 - 218.

- Lagos, R., M. Wilkens, C. Vergara, X. Cecchi y O. Monasterio. 1993. Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**: 145 - 148.
- Lagos, R., J. Villanueva y O. Monasterio. 1999. Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.* **181**: 212 - 217.
- Lagos, R., M. Baeza, G. Corsini, C. Hetz, E. Strahsburger, J. A. Castillo, C. Vergara y O. Monasterio. 2001. Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**: 229 - 243.
- de Lorenzo, V. 1984. Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **139**: 72 - 75.
- de Lorenzo, V. y A. Pugsley, 1985. Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization on the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **27**: 666 - 669.
- Miethke, M., y M. Marahiel. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 413 - 451.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory press (eds.).
- Orellana, C. y R. Lagos. 1996. The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcin antagonist. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**: 297-303.

- Osborn, M. J., J. E. Gander, E. Parisi, y J. Carson. 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem.* **247**: 3962 - 3972.
- Postle K. y R. Good. 1984. DNA sequence of the *Escherichia coli* tonB gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **80**: 5235 - 5239.
- Postle K. y R. J. Kadner. 2003. Microrevisión. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**: 869 - 882.
- Pugsley A., F. Moreno y V. de Lorenzo. 1986. Microcin-E492-insensitive mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3253 - 3259.
- Reeves, P. 1965. The Bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **29**: 24 - 45.
- Riley M y M. Chavan. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer-Verlag (eds.), pp. 1 - 2.
- Sambrook, J. Y D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory Manual. 3ra edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press (eds.).
- Schägger, H. y G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368 - 379.
- Schauer, K., D. A. Rodionov y H. de Reuse. 2008. Revisión. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends Biochem. Sci.* **33**: 330 - 338.

- Steel, R. y J. Torrie. 1988. Bioestadística. Principios y procedimientos. McGraw-Hill (eds.), pp 83 – 117.
- Strahsburger, E., M. Baeza, O. Monasterio y R. Lagos. 2005. Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu, and Cir and inhibition by siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **49**: 3083 - 3086.
- Traub, I., S. Gaisser y V. Braun. 1993. Activity domains of the TonB protein. *Mol. Microbiol.* **8**: 409 - 423.
- Vakharia-Rao, H., K. Kastead, M. Savenkova, C. Bulathsinghala K. Postle. 2007. Deletion and substitution analysis of the *Escherichia coli* TonB Q160 region. *J. Bacteriol.* **189**: 4662 - 4670.
- Vianney, A., T. Lewin, W. Beyer, J. Lazzaroni, R. Portalier, R. Webster. 1994. Membrane topology and mutational analysis of the TolQ protein of *Escherichia coli* required for the uptake of macromolecules and cell envelope integrity. *J. Bacteriol.* **176**: 822 - 829.
- Warburg, O. y W. Christian. 1941. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Zschr.* **29**: 589 - 590.
- Weiss, R. Protoplast formation in *Escherichia coli*. 1976. *J. Bacteriol.* **128**: 668 - 670.
- Wilkens, M., J. Villanueva, J. Cofré, J. Chnaiderman, y R. Lagos. 1997. Cloning and expresion in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4789 - 4794.