



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área: Biología

Subárea: Genética

Diseño de una nueva estrategia para la secreción de interleuquina 15 en *Escherichia coli* K12

Tesis de Maestría

Estudiante: Aldana Ayelen Grimaldi Garuti

Orientador: Dra. María Gabriela Kramer Xavier

Co-orientador: Dra. María Fernanda Azpiroz Hernández

Setiembre 2018

Resumen

El cáncer es una de las enfermedades de mayor prevalencia y mortalidad a nivel mundial; por ello, es necesario mejorar tanto las terapias actuales como aquellas en desarrollo. Entre las mismas, las inmunoterapias han cobrado gran relevancia, siendo la administración local y/o sistémica de citoquinas inmunoestimuladoras una de las terapias más ensayadas. En este sentido, la interleuquina 15 (IL-15) es la citoquina que reporta resultados más prometedores en fase pre-clínica y clínica. Entre sus variadas funciones, colabora en el mantenimiento, activación y proliferación de linfocitos que inducen apoptosis en células tumorales. Además, estimula la supervivencia de linfocitos de memoria que participan en la respuesta inmune de larga duración, la cual puede disminuir recidivas tumorales. La obtención a gran escala de IL-15 recombinante enfrenta limitaciones, por lo que en este trabajo se apostó a diseñar un método alternativo para su producción que disminuya sus costos y permita así que esta citoquina sea utilizada en tratamientos contra el cáncer.

El objetivo de este trabajo fue construir una cepa de *Escherichia coli* K12 capaz de secretar IL-15, empleando el sistema de secreción de tipo I o exportador ABC bacteriano. Este tipo de sistemas es simple y exhibe gran versatilidad, reconociendo en el péptido a secretar un dominio N-terminal, denominado “de doble glicina”, que es procesado durante la exportación del sustrato al medio extracelular. En particular, se utilizaron los exportadores ABC de dos antibióticos peptídicos, colicina V (ColV) y microcina H47 (MccH47). En este trabajo, la estrategia consistió en adicionarle a IL-15 un dominio de doble glicina que, al ser procesado durante la exportación, produciría la citoquina en el medio extracelular.

Se construyó una fusión génica integrada por la secuencia codificante del dominio de secreción de ColV (ds_v) unida al gen que codifica para la porción madura de la IL-15 murina (*4ail15*), de modo de producir una proteína quimérica que contenga ambas secuencias. Se expresó la fusión en una cepa de *E. coli* K12 en presencia del exportador ABC de ColV o de MccH47, y se evaluó la secreción de 4AIL15 mediante Western Blot. Luego de ensayar distintos métodos de concentración proteica del sobrenadante del cultivo, no se logró detectar 4AIL15 en ningún caso, concluyendo que los dos sistemas de secreción ensayados no son capaces de secretarla. Sin embargo, el análisis de las fracciones celulares evidenció diferencias de funcionamiento entre los dos sistemas de secreción: el de ColV fue capaz de procesar el dominio de secreción de la quimera mientras que el de MccH47 no. Estos resultados fueron novedosos ya que, contrariamente a lo que se había observado, los sistemas de secreción de ColV y de MccH47 no fueron intercambiables. Otro hallazgo original fue que se observó el desacoplamiento entre el procesamiento y la secreción del sustrato por el exportador ABC de ColV. En base a esto, se plantea un modelo de secreción de tipo I donde el reconocimiento, procesamiento y secreción del sustrato serían etapas sucesivas y no concomitantes como se había propuesto. Además, la incapacidad de secretar 4AIL15 indicó que la secuencia del sustrato que sucede al dominio de secreción afecta la exportación. En su conjunto, este modelo serviría para avanzar en la caracterización de los sustratos de modo que puedan ser exportados.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Interleuquina 15 y su rol en el tratamiento del cáncer	1
Sistemas de secreción bacterianos de tipo I	5
OBJETIVOS.....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Cepas bacterianas y plásmidos	9
Cepas bacterianas	9
Plásmidos	9
Cultivo bacteriano.....	10
Transformación de células de <i>E. coli</i> K12	10
Obtención de bacterias quimiocompetentes.....	10
Transformación de bacterias competentes	11
Ensayo de producción de ColV.....	11
Manipulación y secuenciación del ADN	11
Electroforesis en geles de agarosa.....	12
Análisis de proteínas	13
Crecimiento y procesamiento del cultivo bacteriano	13
Obtención de la fracción celular	13
Concentración proteica del sobrenadante.....	13
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	14
Western Blot.....	14
RESULTADOS.....	16
Clonado del gen codificante para la porción madura de IL-15.....	16
Clonado de la secuencia codificante del dominio de secreción de ColV.....	18
Construcción de la fusión génica	19
Generación de las cepas portadoras de <i>ds_v-4ail15</i> y del sistema exportador de MccH47.....	21
Evaluación de la secreción de 4AIL15 por parte del exportador EF	22
Clonado de los genes codificantes del exportador ABC de ColV	24
Evaluación de la producción de la quimera y secreción de 4AIL15 por Western Blot	24
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXO.....	43
Medios de cultivo.....	43
Soluciones	43

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de nuevas estrategias para tratar diversas enfermedades surgen las terapias biológicas. Éstas emplean mayoritariamente proteínas recombinantes cuya producción requiere de un sistema biológico (ya sea una línea celular en cultivo o un organismo hospedero) que albergue un vector portador del gen heterólogo que se desea expresar. En este sentido, las bacterias son uno de los microorganismos más utilizados en la industria biotecnológica para producir proteínas recombinantes por las grandes ventajas que presentan: son de fácil manipulación genética, alcanzan una alta biomasa en corto tiempo, generan un alto rendimiento en la producción de proteínas y su cultivo es de relativo bajo costo [1–3]. Además, existe un vasto conocimiento de la fisiología y genética bacterianas en general [4].

Al día de hoy, entidades reguladoras como la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos han aprobado para su uso distintas proteínas recombinantes con diversos fines terapéuticos producidas en dichos microorganismos. Tal es el caso de "Humulin", una insulina humana recombinante producida en *Escherichia coli*, desarrollada en los años 70, que fue el primer biofármaco aprobado por la FDA en 1982 [5]. En esa misma década, otras proteínas producidas en *E. coli* como hormonas, citoquinas y anticuerpos fueron también aprobadas para uso humano por la misma organización [5]. Dentro de las áreas terapéuticas que se benefician de los biofármacos recombinantes se encuentran los desórdenes metabólicos, como la diabetes tipo 1; los desórdenes hematológicos, como la hemofilia A; y las enfermedades oncológicas, como el melanoma y el cáncer de mama [5–7].

En particular, el cáncer, en todas sus manifestaciones clínicas, es una de las enfermedades de mayor prevalencia a nivel mundial, estimándose que será la causa de muerte de más de 10 millones de personas en el año 2020 [8]. Por ello, es necesario mejorar tanto las terapias actuales, como aquellas en desarrollo, para conseguir atender la demanda que requiere actualmente la sociedad. Entre las diversas estrategias terapéuticas que se están ensayando en la clínica, las inmunoterapias han cobrado gran relevancia. En este sentido, se apuesta a generar terapias que aumenten la eficiencia que el mismo sistema inmune posee contra antígenos y células tumorales. Sin embargo, los costos asociados a estos tratamientos son muy elevados, limitando su previsión de uso global [9,10]. Entre las opciones inmunoterapéuticas más accesibles, la administración local y/o sistémica de citoquinas inmunoestimuladoras ha mostrado resultados muy prometedores en fase pre-clínica y clínica, siendo la interleuquina 15 (IL-15) una de las que reporta mayores beneficios [11].

Interleuquina 15 y su rol en el tratamiento del cáncer

La interleuquina 15 es una citoquina pleiotrópica de 114 aminoácidos y 14 kDa que forma parte de la familia de citoquinas de cuatro alfa hélices [12]. Esta citoquina fue simultáneamente descubierta por dos laboratorios en 1994 y caracterizada como un factor de crecimiento de células T [13,14]. IL-15 tiene dos isoformas: una con un

péptido señal corto (SSP) de 21 aminoácidos y otra con un péptido señal largo (LSP) de 48 aminoácidos. Mientras que la isoforma con el SSP es intracelular, estando limitada al citoplasma y al núcleo celular, la isoforma con el LSP es secretada y actúa como inmunomodulador. Una vez secretada, IL-15 tiene una vida media corta de aproximadamente 60 minutos en suero, necesitando ser co-expresada con su receptor alfa (IL-15R α) para aumentar su estabilidad *in vivo* [15–18].

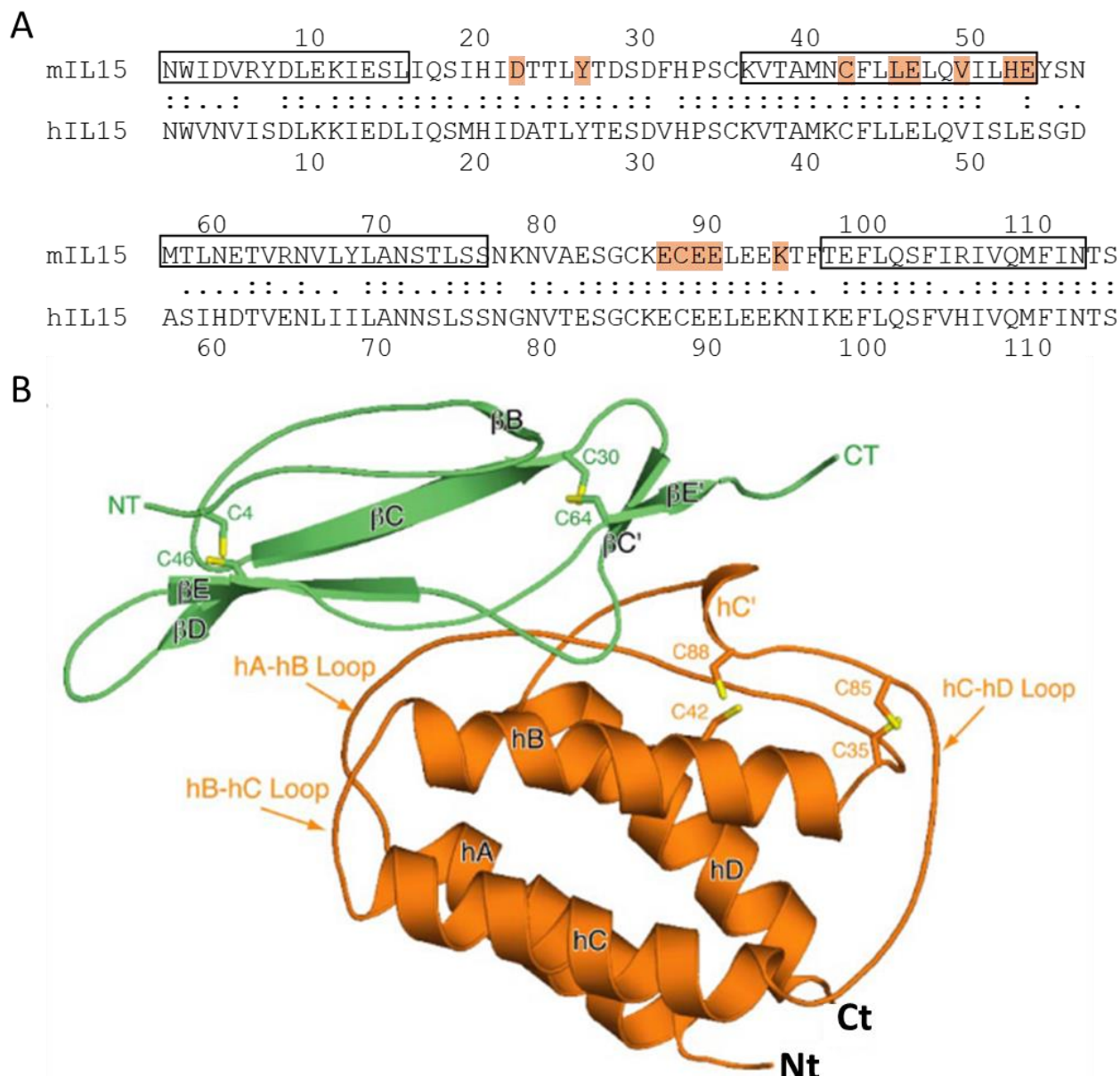


Figura 1. Interleuquina 15 murina. (A) Secuencia aminoacídica de interleuquina 15 murina (mIL15) madura alineada con la humana (hIL15) con el programa Lalign [19]. En recuadros, alfa hélices; en naranja, residuos que interactúan con el receptor IL15R α . (B) Estructura cristalográfica del complejo mIL15-IL15R α [12]. En verde, IL15R α ; en naranja, mIL15.

IL-15 posee variadas funciones; fundamentalmente participa de la estimulación inicial de la proliferación de las células T y B activadas, ayuda en el mantenimiento y activación de las células natural killer (NK), e induce la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL) y de factores de inflamación (TNF α e IL-1b). Además, estimula la supervivencia de las células T CD8 $^{+}$ de memoria y, en una función antagónica a IL-2, inhibe la muerte inducida por

activación de las células T autorreactivas promoviendo su supervivencia [17]. Cabe destacar que algunas de estas funciones son de vital importancia en la generación de una respuesta inmune contra el cáncer, ya que las células CTL y NK activadas inducen apoptosis en las células tumorales, y que la respuesta inmune de larga duración puede disminuir recidivas tumorales [17,20–23].

Estos hallazgos sobre el rol de IL-15 han auspiciado el análisis de su potencial terapéutico contra el cáncer. Es importante destacar que en varios ensayos realizados en modelos murinos de cáncer se utiliza IL-15 murina (mIL-15) en vez de la humana (hIL-15) para mantener una respuesta fisiológica y evitar la posible inmunogenicidad de hIL-15 a largo plazo. IL-15 murina, al igual que la humana, se sintetiza como un precursor proteico de 162 aminoácidos, donde los primeros 48 corresponden al péptido señal que luego de clivarse da lugar a IL-15 madura de 114 aminoácidos (Figura 1) [13]. Además, dichas citoquinas comparten un 73% de homología de secuencia y cumplen roles comparables [24,25]. Varios estudios en modelos animales demuestran que IL-15 puede activar la respuesta inmune contra las células cancerosas inhibiendo el crecimiento tumoral. Esto se ensayó en modelos murinos de adenocarcinoma pulmonar, de cáncer de próstata y de mama, entre otros [20,26–28]. Por ejemplo, en el trabajo de Klebanoff *et. al.* se demuestra que IL-15 humana es capaz de potenciar *in vivo* la actividad de las células T CD8+ reactivas contra tumores en ratones [20]. En cuanto a estudios en pacientes, se han realizado varios ensayos clínicos, habiendo algunos aún en marcha, utilizando como droga a la hIL-15 [29–31]. En particular, el grupo de Conlon ha llevado a cabo pruebas para determinar su seguridad y los posibles efectos adversos, determinándose la máxima dosis tolerable en 0.3 µg/kg por día. En este trabajo se utilizó IL-15 recombinante humana producida en *E. coli*, administrada de forma intravenosa por 12 días consecutivos en pacientes con melanoma maligno metastático o cáncer renal metastático. Los resultados preliminares muestran la regresión del 10-30% de las lesiones ocasionadas por las metástasis en los pulmones de cinco pacientes e incluso la recuperación completa de dicha lesión en otros dos. Sin embargo, si bien los resultados son alentadores, aún resta mejorar el tratamiento con el fin de reducir los efectos secundarios y mejorar la eficacia terapéutica [30].

Al ser un compuesto administrado de forma sistémica, la inoculación de IL-15 se enfrenta a ciertas limitaciones como su vida media corta en sangre y la dificultad para llegar al interior de tumores sólidos poco vascularizados [32,33]. Por lo tanto, se continúa requiriendo trabajo en la optimización de los sistemas de vehiculización y producción de esta citoquina para pensar en poder incorporarla en la clínica con alta eficacia. Es así que surgió la propuesta de utilizar bacterias como vectores de IL-15. Concretamente, el objetivo que consideramos al inicio del proyecto fue construir una cepa de *E. coli* K12 capaz de producir IL-15 con el fin de emplearla como agente antitumoral. En este sentido, existen numerosos estudios que dan cuenta de la acción antitumoral propia de las bacterias vivas inyectadas en modelos animales de cáncer, cuyos efectos terapéuticos mejoran cuando éstas expresan factores heterólogos como toxinas, inhibidores de angiogénesis y citoquinas [32,34,43–48,35–42]. Sin embargo, al día de hoy, las experiencias pre-clínicas y clínicas en pacientes con cáncer son aún limitadas y controversiales en relación a la eficacia y toxicidad de las bacterias [49–52]. Por ejemplo, en ensayos clínicos llevados a cabo en pacientes con melanoma tratados con una cepa de *Salmonella typhimurium* atenuada por

deleciones, no se logró la reversión del tumor en ninguno de los casos [50]. Otro caso es el del "Bacilo Calmette-Guerin" (BCG), una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* que es utilizada desde 1970 para el tratamiento del cáncer de vejiga superficial invasivo no muscular. Para este tratamiento no se ha definido aún la dosis eficaz, ni los factores predictivos de respuesta, ya que no se conocen los mecanismos antitumorales que operan, además presenta una toxicidad considerable [49,51,53]. Asimismo, queda aún por consensuar si el empleo de bacterias vivas en la clínica es realmente seguro en pacientes oncológicos, considerando que en general se trata de personas con inmunodepresiones severas que podrían sufrir una infección diseminada [52].

De todas maneras, conseguir una cepa de *E. coli* K12 capaz de secretar IL-15 permitiría desarrollar un método alternativo de producción de esta citoquina en bacterias, que facilite su obtención y permita así disminuir el costo de su uso en tratamientos contra el cáncer. Si bien la producción de IL-15 se ha abordado desde distintos ángulos, en general ha sido costosa en relación al rendimiento [54]. En particular, su obtención en células eucariotas, tanto de mamíferos como de levaduras, resulta costosa a gran escala [27,55]. Es así que la estrategia de producción de IL-15 comercial es a través de su expresión en células de *E. coli* y su posterior purificación desde el medio intracelular. Dicho procedimiento presenta el gran inconveniente de la formación de cuerpos de inclusión que requieren de extensos tratamientos para solubilizarlos y desnaturalizar las proteínas que lo integran, purificarlas, y lograr su correcto plegamiento. Además, los cuerpos de inclusión generalmente se encuentran contaminados con polisacáridos bacterianos y proteínas de membrana externa [54,56,57]. Cabe mencionar que sólo hay un caso donde se logra obtener IL-15 soluble expresada en *E. coli*, en esta estrategia se utiliza un tag que posee dos grandes ventajas, por un lado aumenta la solubilidad de IL-15, por otro lado, mediante un cambio de PH se puede inducir el autoprocesamiento de dicho tag. Sin embargo, esta estrategia tendría un alto costo a gran escala [58].

Por otro lado, conseguir una cepa de *E. coli* K12 que secrete IL-15 también permitiría explorar el abordaje de nuevas terapias. Se podría pensar en la elaboración de un fármaco biológico a partir del medio de cultivo enriquecido con esta citoquina, sin necesidad de su purificación. Además, se podría idear un biofármaco que consista en cápsulas removibles conteniendo las bacterias productoras de IL-15, las cuales podrían implantarse en los tumores por el período de tiempo necesario para obtener concentraciones de IL-15 terapéuticas. Esta alternativa, empleando bacterias como agente secretor de IL-15, además del económico, tendría beneficios tales como localizar la producción de IL-15 en la zona tumoral, reduciendo así los posibles efectos adversos ectópicos asociados a la administración sistémica del producto y permitiría remover las cápsulas en caso de toxicidad o al finalizar el tratamiento. Cabe mencionar que esta alternativa terapéutica está en desarrollo para el caso de microcápsulas conteniendo células humanas productoras de citoquinas [59].

La elección de *E. coli* K12 se basa en que éste es un microorganismo no patógeno, ampliamente estudiado. De hecho, se dispone del genoma totalmente secuenciado de varias de sus cepas, lo que brindaría un contexto genético conocido pasible de ser manipulado para eventuales aplicaciones clínicas.

Sistemas de secreción bacterianos de tipo I

Dentro de las diversas proteínas sintetizadas por las bacterias, algunas son exportadas fuera del citoplasma para cumplir su función. Para ello, el mecanismo general que permite a la proteína atravesar la membrana citoplasmática es la denominada "vía Sec", que depende del reconocimiento de una secuencia específica en la proteína a exportar [60]. A diferencia de las bacterias Gram positivas, en las Gram negativas esta vía no es suficiente para que la proteína alcance el medio extracelular, ya que restaría atravesar la membrana externa. Es así que las bacterias Gram negativas poseen distintos sistemas de secreción, tanto dependientes como independientes de la vía Sec [61]. Dentro de los últimos, se encuentra el sistema de secreción de tipo I o "exportador ABC" (ATP-Binding Cassette), que se destaca por poseer características particulares. Concretamente, resalta por su composición simple y su capacidad de exportar una gran variedad de proteínas desde el citoplasma al medio extracelular en una única etapa. Están compuestos por tres proteínas: el transportador ABC, el segundo componente y el elemento de membrana externa (Figura 2) [62–64]. El transportador ABC integra una familia de proteínas presentes tanto en eucariotas como en procariotas involucradas en la importación y exportación de una gran variedad de sustratos. Se encuentra anclado a la membrana interna a través de un dominio transmembrana y expone al citoplasma un dominio de unión a nucleótidos (NBD) correspondiente a su porción C-terminal, encargado de unir e hidrolizar ATP. El segundo componente, también llamado proteína de fusión de membranas (MFP), se encuentra anclado a la membrana interna y se extiende en el periplasma formando un canal entre el transportador ABC y el elemento de membrana externa. Los genes del transportador ABC y de la MFP están generalmente ligados al de su sustrato. El tercer componente es una proteína de membrana externa (OMP) que forma el canal a través del cual el sustrato llega al medio extracelular. TolC es la OMP mejor caracterizada y, a diferencia de los otros dos elementos, se encuentra codificada fuera del sistema genético de los exportadores, integrando varios sistemas de secreción de tipo I y participando en la exportación de distintos sustratos [62–68].

Para que un sustrato de naturaleza proteica sea diana de un transportador ABC debe poseer una secuencia específica llamada dominio de secreción (DS), la cual varía según el sustrato a exportar. En el caso de las proteínas, el DS se localiza en el extremo carboxilo (C) terminal, posee una extensión de 50-60 aminoácidos y no es removido durante la exportación. Si bien no presentan alta homología en su secuencia primaria, estos dominios compartirían una estructura secundaria de similares características. [62–64]. En el caso de los péptidos, el DS se sitúa en el extremo amino (N) terminal y tiene una extensión de aproximadamente 15 aminoácidos. Estos DS conservan una alta homología en regiones hidrofóbicas e hidrofílicas y en ciertas posiciones aminoácidas, en particular la glicina en la posición -2 y en menor grado otra glicina en la -1, por lo que se denominan "tipo doble glicina". Los transportadores ABC que secretan este tipo de péptidos poseen una región N-terminal adicional donde reside un dominio catalítico que reconoce y procesa el DS durante la exportación. Hasta el momento, todos los péptidos secretados de esta manera conforman un grupo de antibióticos de síntesis ribosómica, denominados genéricamente bacteriocinas, ya sean producidos por bacterias Gram positivas o negativas [62,69–72].

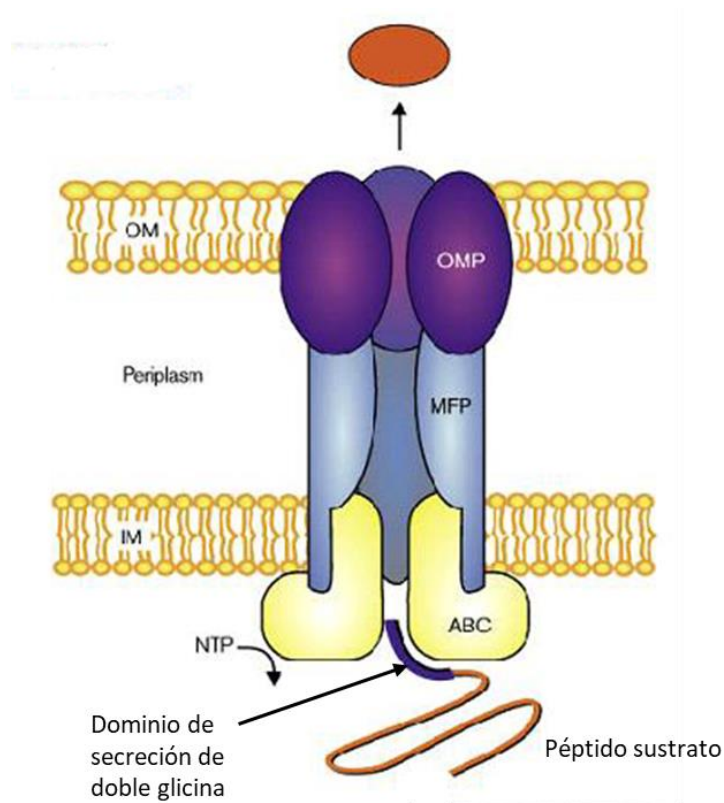


Figura 2. Esquema de un sistema de secreción de tipo I en una bacteria Gram negativa. ABC, proteína ABC; MFP, segundo componente; OMP, proteína de membrana externa.

En cuanto a la especificidad del exportador ABC, se ha comprobado que es posible la secreción heteróloga exitosa de proteínas relacionadas. El caso más estudiado es el del sistema de secreción de tipo I de la α -hemolisina, una toxina de 181 aminoácidos producida por cepas patógenas de *E. coli* [64,66,73–75]. Por otro lado, en cuanto a los péptidos antibióticos con DS de doble glicina, se ha descrito la secreción heteróloga tanto en bacterias Gram positivas como negativas. Para las primeras, existen varias descripciones de secreción heteróloga de bacteriocinas, donde esencialmente con el transportador ABC y una proteína accesoria se logra la exportación [70,76]. En efecto, se ha reportado que un exportador ABC puede secretar con diferente eficiencia más de una bacteriocina, reconociendo en ellas sus dominios de secreción [76–79]. En el caso de las bacterias Gram negativas, la secreción heteróloga de bacteriocinas se evidenció para cinco péptidos antibióticos que integran la familia de microcinas de mayor masa molecular. Ésta está conformada por péptidos de entre 60 y 90 aminoácidos que son sintetizados como precursores con un DS N-terminal de tipo doble glicina. Concretamente, se evidenció que un mismo exportador ABC es capaz de secretar no solo tres microcinas, M, H47, I47, de forma natural, sino que también las microcinas E492 (MccE492) y colicina V (ColV) de forma heteróloga. De igual manera, se demostró que el sistema de secreción de ColV puede secretar microcina H47 (MccH47). En todos los casos estas microcinas difieren en su porción madura, aunque son similares en tamaño y comparten alta homología a nivel del DS [72,80,81]. Asimismo, se ha visto que, tanto en bacterias Gram positivas como negativas, un exportador ABC es capaz de secretar péptidos híbridos compuestos por el DS específico de su bacteriocina o por el de otras fusionado a la porción madura de otro péptido antibiótico, ya sea que éste utilice o no el mismo tipo de exportación

[78,79,82,83]. Por ejemplo, el sistema de secreción de ColV es capaz de exportar al medio extracelular un péptido cuya porción madura corresponde a una bacteriocina que naturalmente se secreta por la vía Sec [82].

Tabla 1. Dominios de secreción de las microcinas de mayor masa molecular. La flecha roja indica el sitio de procesamiento y en rojo se subraya las glicinas altamente conservadas en la posición -1 y -2.

Microcina	Dominio de Secreción *
ColV	MRTLTLNELDSVSGG
H47	MREITESQLRYISGA
I47	MREISDNMLDSVKGG
M	MRKLSENEIKQISGG
E492	MREISQKDLNLAFGA

* Los aminoácidos idénticos o conservados se somborean en gris.

Todo lo anteriormente mencionado sugiere que las secuencias que suceden a los DS no estarían directamente involucradas en la exportación, así sustratos diferentes pueden ser secretados por el mismo exportador. En este sentido, la gran variedad de proteínas que pueden ser eficientemente secretadas si portan un DS resalta la versatilidad que los sistemas de secreción de tipo I poseen. Esto ha puesto a dichos sistemas en el foco de atención para utilizarlos en la secreción de distintas proteínas recombinantes, siendo el exportador ABC de la α -hemolisina (HlyA) el más utilizado [73,84]. Hasta el momento se reporta sólo un caso en el que a través de este sistema se logró exportar desde *S. enterica* una citoquina [85]. Cabe notar que, para utilizar este sistema de secreción de proteínas es necesario adicionarle el dominio de secreción C-terminal de HlyA a la proteína de interés, el cual al no procesarse puede inhibir la función de la proteína [73,86].

Considerando lo anteriormente mencionado, se eligió utilizar el sistema de secreción de tipo I de las microcinas de mayor masa molecular para secretar IL-15 expresada en *E. coli* K12. El motivo de dicha elección yace en la versatilidad que estos sistemas poseen y en que IL-15 (114 aa) es más similar en tamaño a estas microcinas (60-88 aa) que a proteínas mayores como la HlyA (181 aa). La estrategia consistió en adicionarle a dicha citoquina un DS de tipo doble glicina que al ser procesado durante la exportación permitiera producir IL-15 sin secuencias adicionales. Por su parte, se apostó a la producción de la IL-15 murina (mIL15) ya que, en caso de conseguir el objetivo, se continuaría el trabajo evaluando las bacterias productoras de mIL15 en un modelo murino de cáncer de mama metastásico [87]. En este sentido, la evaluación de inmunoterapias biológicas requiere de sistemas lo más homólogos posible. Concretamente, cuando se trabaja en modelos de cáncer *in vivo* es preciso emplear proteínas del huésped, en este caso mIL-15, para evitar desencadenar una respuesta inmune supresora frente a la proteína terapéutica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener células de *E. coli* K12 capaces de secretar IL-15 empleando un sistema de secreción de tipo I de las microcinas de mayor masa molecular.

Objetivos específicos

- Construir un plásmido que codifique para IL-15 murina (mIL15) fusionada al dominio de secreción de tipo doble glicina de ColV.
- Construir un plásmido que porte los genes codificantes para el sistema de secreción de tipo I de ColV.
- Evaluar la secreción de mIL15 mediada por el sistema de secreción de tipo I de ColV desde células de *E. coli* K12.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

Cepas bacterianas

Los genotipos y procedencia de las cepas de *E. coli* K12 utilizadas se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas bacterianas de *E. coli* K12

Cepas	Genotipo	Referencia
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80'<i>lacZ</i>ΔM15) <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i></i>	[88]
BW25113	<i>Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514</i>	[89]
MC4100	<i>araD139 ΔlacU169 rpsL thiA relA1</i>	[90]
JM83	<i>ara Δ(lac-proAB), rpsL, Φ80, lacZΔM15</i>	[91]
FGB103	MC4100 <i>Δ(ompT-fepC)267</i>	[92]

Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen a continuación:

pUCYC5. Vector plasmídico oligocopia (10-12 copias/cromosoma). Porta el gen codificante para la resistencia al antibiótico cloranfenicol, posee el sistema de detección por complementación en alfa para la β -galactosidasa y el origen de replicación p15A de pACYC184 [93].

pUC13. Vector plasmídico multicopia de la familia M13 (500-700 copias/cromosoma). Codifica para la resistencia al antibiótico ampicilina, posee el sistema de detección por complementación en alfa y el origen de replicación ColE1 (#50003 Addgene).

pORF9-mIL-15. Plásmido comercial de InvivoGen® (#porf-mil15). Codifica para la resistencia a ampicilina y contiene la secuencia codificante para IL-15 murina (mIL15) sin intrones, desde el codón inicial (ATG) hasta el codón de terminación (TGA).

pUY270. Contiene el sistema genético ColV clonado en pUC13 [80].

pUY271. Porta los genes *cvi* y *cvaC* que codifican para la inmunidad y actividad de ColV, respectivamente. Se obtuvo a partir de pUY270 mediante la delección del segmento que contiene los genes *cvaA* y *cvaB* para la exportación de ColV [81].

pMVD41. Porta los genes *mchE* y *mchF* para el sistema de exportación de McCH47, clonados en pACYC184. Codifica para la resistencia al antibiótico cloranfenicol [72].

pUY41. Porta los genes *mchE* y *mchF* clonados en pUC13. Codifica para la resistencia al antibiótico ampicilina [94].

Todos los plásmidos antes mencionados, a excepción del plásmido pORF9-mIL-15 que fue aportado por el Dr. Cristian Smerdou (Universidad de Navarra, España), se encontraban disponibles en el laboratorio de la Sección Fisiología y Genética Bacterianas de Facultad de Ciencias.

Cultivo bacteriano

Los medios de cultivo utilizados fueron: medio rico LB y medio mínimo M63 con glucosa y vitamina B1 agregada (MM) (Anexo). Se añadieron al medio los antibióticos ampicilina (Ap) y/o cloranfenicol (Cm) a 60 µg/mL y 100 µg/mL de concentración final, respectivamente.

Se utilizó X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) a 20 µg/mL de concentración final, como indicador cromogénico de la actividad β-galactosidasa. Este indicador se empleó en los experimentos de clonado para detectar los clones recombinantes, en base al fenómeno de complementación en α para la β-galactosidasa. En estos experimentos se debió utilizar vectores con el alelo *lacZ'*, que codifica para el fragmento α de la β-galactosidasa (pUCYC5 y pUC13) y estirpes de *E. coli* K12 portadoras del alelo *lacZΔM15*, que codifica para el fragmento 1-α de la β-galactosidasa (DH5α y JM83). En este tipo de sistemas, los clones recombinantes aparecen como colonias blancas (Lac⁻) y los que portan solo el vector como colonias azules (Lac⁺).

Las cepas sin plásmidos recombinantes se crecieron a 37°C, mientras que las que contenían estas construcciones se cultivaron a 30°C. Esto último se debió a la inestabilidad genética detectada en las estrías de los clones portadores de algunas construcciones recombinantes: se observó la aparición de colonias mutantes de tamaño y aspecto heterogéneos que predominaron por encima de una estría de crecimiento tenue y colonias pequeñas. Se optó entonces por cultivar estas cepas a una temperatura menor a la óptima para *E. coli*, ya que esta condición reduce el número de generaciones en los tiempos usuales de cultivo, limitando así la predominancia de los mutantes sobrecrecidos. De esta forma, la población original se mantuvo mayoritaria en los cultivos.

Transformación de células de *E. coli* K12

Obtención de bacterias quimiocompetentes

Las bacterias competentes se obtuvieron a partir de un cultivo de 50 mL en medio LB de la estirpe a transformar. El cultivo se creció hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de entre 0,2 y 0,3. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 5.000 rpm por 5 min. y las células se resuspendieron en 20 mL de CaCl₂ 100 mM estéril. Se dejó reposar dicha suspensión en hielo durante no más de 20 min., luego se volvió a centrifugar en las mismas condiciones antes mencionadas. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 500 µL de CaCl₂ 100 mM estéril y se almacenaron en hielo en la heladera por al menos 15 hs. previas a su uso.

Transformación de bacterias competentes

Se mezclaron 100 μL de bacterias competentes con ADN plasmídico de interés, disuelto en un volumen no superior a 25 μL , y se incubó en hielo durante 10 min. Inmediatamente después, se colocó la mezcla en un baño a 37°C por 5 min. para lograr el choque térmico que permitió el ingreso del ADN al interior celular. Luego se agregaron 2 mL de medio LB y se incubó por aproximadamente 2 hs. en baño con agitación (120 rpm) a 30°C para lograr la expresión del gen para la resistencia antibiótica portada por el plásmido. Para la selección de los clones transformantes se hizo una siembra en superficie de alícuotas de la mezcla (200 μL) en medio selectivo y se incubó a 30°C por 18 hs. Como control, paralelamente se realizó el mismo procedimiento utilizando 100 μL de las bacterias competentes solas.

Ensayo de producción de ColV

La producción de ColV por una cepa bacteriana se determinó mediante la aparición de halos de inhibición del crecimiento sobre una cepa sensible a este antibiótico. Se utilizó MC4100 como cepa indicadora, sensible a ColV, la cual se sembró en forma de tapiz sobre una placa de medio mínimo y se picó de forma perpendicular al agar con las cepas a ensayar. Luego de incubar la placa a 37°C por 18 hs., se logró observar un halo de inhibición del crecimiento alrededor de la picada de una cepa productora de ColV. Las cepas control fueron: MC4100(pUY270), productora de ColV, y MC4100(pUY271), no productora (Figura 3).

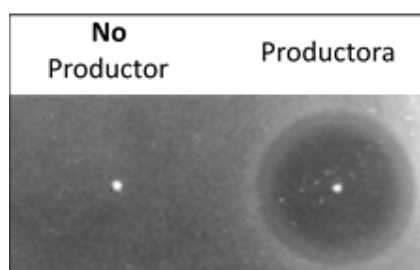


Figura 3. Ensayo de producción. A la izquierda, picada de una cepa no productora donde se puede ver a su alrededor el crecimiento confluyente del tapiz indicador. A la derecha, picada de una cepa productora, a su alrededor se observa un halo de inhibición del crecimiento del tapiz indicador.

Manipulación y secuenciación del ADN

La purificación de los plásmidos obtenidos se hizo a partir de cultivos en fase estacionaria en 5mL de LB suplementado con el antibiótico correspondiente, empleando el kit QIAprep Miniprep (QIAGEN®).

Para los ensayos de restricción se utilizaron las enzimas KpnI, PstI, HincII, HindIII y SacI, y para las ligaciones la enzima T4 ligasa, todas de New England Biolabs. En ambos casos se realizó el procedimiento estándar descrito en Sambrook *et. al.* 1989 [88].

Cuando fue necesaria la purificación de fragmentos de ADN a partir de una reacción de PCR o del gel de agarosa, se utilizó el kit MinElute PCR purification (#28006 QIAGEN®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para los experimentos de clonado de fragmentos de PCR se utilizaron las enzimas Vent® DNA Polimerasa (#M0254S) y Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (#M0530), ambas de New England Biolabs. Estas enzimas poseen actividad de prueba de error “proof-reading”. Además, producen amplicones con extremos romos, lo que permite clonarlos directamente en vectores linearizados con una enzima de restricción que también genere extremos romos. Para la detección por PCR de los clones de interés se utilizó la enzima Taq polimerasa de Bioron (#111105), usando como molde lisados bacterianos (suspensión de células en agua incubada a 80°C por 30 min.). En todos los casos se siguieron las indicaciones del fabricante. Los oligonucleótidos empleados para las reacciones se presentan en la Tabla 3.

La secuenciación del ADN se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo. Para ello, se utilizaron siempre los cebadores M13-fwd y M13-rv (Tabla 3) de modo de secuenciar ambas cadenas.

Para el análisis de las secuencias aminoacídicas se utilizaron los programas computacionales “BioEdit Sequence Alignment Editor” [95], “Protein Calculator v3.4” [96] y “LALIGN” version 36.3.5 [19].

Tabla 3. Lista de cebadores usados

Cebador	Secuencia 5'-3'	Largo	Contenido GC	Tm
CvaCFw	AAGGAGATCATATGAGAACTCTGA	24	37.5 %	60.1 °C
CvaCRv	GGTACCTGAAGCACCACCAGAA	22	54.55 %	64.0 °C
IL15Fw	CGGTACCAACTGGATAGATGTAAG	24	45.83 %	63.5 °C
IL15Rv	TTAGGACGTGTTGATGAACATTTG	24	37.5 %	60.1 °C
ABFw	TCCTGATAACTCTCCTATGTTGT	23	39.1 %	52.7 °C
ABRw	AACTATGCTGCGGGAAGATT	20	45 %	54.3 °C
M13-fwd	GTTGTAAAACGACGGCCAGT	20	50	58.4
M13-rv	CACAGGAAACAGCTATGACC	20	50%	58.4

Electroforesis en geles de agarosa

Se prepararon geles de agarosa al 2, 1 y 0.8% utilizando buffer Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) y las muestras a resolver se mezclaron con tampón de carga. Se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular (MP): HyperLadder™ 50bp (Biolane, #BIO-33039), 100pb DNA Ladder (#N3231S) y 1kb DNA Ladder (#N3232S) (New England BioLabs). Se realizó la corrida electroforética en tampón TAE 1X, entre 1-2 hs. a 65 V aproximadamente. Para lograr la visualización de los ácidos nucleicos con luz ultravioleta se tiñó el gel con bromuro de etidio.

Análisis de proteínas

Crecimiento y procesamiento del cultivo bacteriano

Se realizaron cultivos en LB o en MM, con sus respectivas presiones antibióticas para mantener los plásmidos, incubando 18 hs. a 30°C, inoculando a partir de una estría de no más de 3 días de realizada. Así los cultivos se encontraban en fase estacionaria de crecimiento (del orden de $1-2 \times 10^9$ ufc/mL), de acuerdo al recuento de viables. Para obtener cultivos en fase logarítmica avanzada, con un recuento de viables del orden de 1×10^8 ufc/mL, se hicieron diluciones 1/100 a partir de cultivos en fase estacionaria, incubando unas 2 hs. a 30°C. Alternativamente, al MM se le adiciona seroalbúmina bovina (BSA) (#B90015 New England Biolabs) a una concentración final de 0.1%. En todos los casos, se centrifuga el cultivo 10 min. a 5.000 rpm con el fin de separar las bacterias del sobrenadante. Dicho sobrenadante (SN) se pasa por filtros con poros de 0,45 µm de diámetro previo a su procesamiento.

Obtención de la fracción celular

Las bacterias, una vez separadas del sobrenadante, se lisaron mediante su resuspensión en buffer Laemmli 1X y posterior hervido de 1 min. Luego, se centrifugó 20 min. a 13.000 rpm, donde se recuperó el sobrenadante, es decir, la fracción celular (FC). Alternativamente, se siguió el mismo protocolo de lisis utilizando buffer STET (Anexo) y lisozima [97].

Concentración proteica del sobrenadante

Concentración por precipitación con TCA

Se procesó el sobrenadante bacteriano correspondiente a 4 mL de cultivo en LB. Se incubó con ácido tricloroacético (TCA) a 4% de concentración final, se dejó reposar en hielo por 1 hr. y luego se centrifugó a 13.000 rpm 15 min. [98]. El precipitado resultante se secó con acetona y se resolubilizó de tres maneras diferentes según los experimentos, siempre en un volumen de 40 µL: tampón Laemmli 1X, agua bidestilada o dimetilsulfóxido (DMSO).

Concentración por precipitación con DOC y TCA

Este protocolo se ensayó para optimizar la precipitación de proteínas. Se procesó el sobrenadante bacteriano correspondiente a 4 mL de cultivo en LB. Cada 1 mL de muestra se agregaron 150 µL de desoxicolato (DOC) 1% y se lo dejó reposar por 5 min. a temperatura ambiente. Se agregó 200 µL de TCA 50% y se colocó en baño de hielo por 15 min. Luego se centrifugó a 4.500 rpm por 5 min., se apartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 50 µL de agua bidestilada. A dicho sobrenadante se le adicionaron 200 µL de una solución de DOC al 0,25% en NaOH 0,1M, se calentó a 80°C por 5 min. y se lo resuspendió nuevamente en 50 µL de buffer Laemmli 1X.

Concentración por exclusión de tamaño

El sobrenadante se concentró con centricones Amicon® (#Z740186 Sigma) capaces de retener proteínas de más de 3 kDa. Se concentraron 12 mL de sobrenadante mediante sucesivas centrifugaciones de 40 min. a 7.500 g en un rotor de ángulo fijo, según se indica en el manual del usuario. El volumen retenido fue de unos 150-200 µL. Para lavar el concentrado proteico, fundamentalmente para eliminar sales, se añadieron 3 mL de tampón fosfato salino (PBS) y se volvió a centrifugar. El volumen final, con las proteínas concentradas, fue de unos 150-200 µL.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas obtenidas del procesamiento de cultivos celulares se separaron según su peso molecular aparente por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se prepararon geles de 1 mm de espesor con un gel concentrador al 5% y un gel separador al 18%, siguiendo las instrucciones de Sambrook *et. al* 1989 [88]. Las muestras preparadas en el tampón de carga Laemmli 1X se hirvieron por 1 min. y luego, o bien se cargaron en el gel o se almacenaron a -20°C. En este último caso, las muestras se calentaron previo al sembrado en el gel. Se utilizó como proteína control entre 5-15 ng de mL-15 pura producida en *E. coli* (Peprtech #210-15) y como marcador de peso molecular (MP), AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder (Maestrogen). Para su siembra en gel, mL-15 se sometió a las mismas condiciones que las muestras, no así el MP, que no lo requería. La corrida electroforética se realizó a una corriente constante de 20 mA por gel con el tampón de corrida Tris-glicina-SDS en la cuba ATTO Corporation (modelo AE-6450) con la fuente de poder E-C Apparatus Corporation (modelo EC 500).

Dependiendo del experimento, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa o se tiñó con azul de Coomassie R-250 o con azul de Coomassie coloidal G-250. Para ambos tipos de tinción se lavaron los geles dos veces en agua bidestilada durante 10 min. con agitación, de esta forma se eliminaron restos de SDS que pudieran interferir con la unión del colorante a las proteínas. Se fijaron las proteínas al gel incubando en una solución de ácido acético al 10% durante 1 hr. para luego incubar en la solución de Coomassie toda la noche con agitación. Posteriormente, se quitó el exceso de colorante con agua bidestilada y se lavó con la solución decolorante adecuada para cada tinción (Anexo) durante 1-3 hs. con agitación.

Western Blot

Las muestras resueltas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad) con el sistema de transferencia semi seca de ATTO (moledo AE-6675), utilizando una solución de transferencia. Las proteínas se transfirieron durante 1 hr. 10 min. a corriente constante de 1,2 mA por centímetro cuadrado de membrana. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se incubó en la solución de bloqueó durante 1 hr. a temperatura

ambiente con agitación. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario Anti-mIL-15 obtenido en conejo (Peprotech #500-P173) diluido 1/5000 en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C con agitación. Se lavó la membrana para retirar el exceso de anticuerpo (3 lavados de 15 min. con agitación en PBS 1X, Tween-20 0,05 %), y se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo Anti-conejo conjugado a peroxidasa (HRP) (A6154 Sigma) diluido 1/5000 en PBS 1X, Tween-20 0,05% durante 1 hr. a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, se repitieron los 3 lavados en PBS 1X, Tween-20 0,05%. La membrana se reveló con el kit para quimio-luminiscencia aumentada de Bio-rad (Clarity Max™ Western ECL Substrate, 100 ml #1705062) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se expuso la membrana en el equipo de quimioluminiscencia GBOX Chemi System (SynGene), haciendo 5 exposiciones seriadas de 1 min.

RESULTADOS

La propuesta del trabajo consistió en diseñar un sistema para la expresión y secreción de IL-15 en *E. coli* K12. Para ello, la estrategia fue utilizar el sistema de secreción de tipo I de las microcinas de mayor masa molecular que, a través del reconocimiento y procesamiento de un dominio de tipo doble glicina adicionado al extremo N-terminal de IL-15, hiciera posible la exportación de dicha citoquina al medio extracelular. El diseño experimental comprendió los siguientes pasos: construcción de una fusión génica integrada por la secuencia codificante de un dominio de doble glicina unida en fase al gen que codifica para la porción madura de la IL-15, de modo que se produzca una proteína quimérica que contenga ambas partes; expresión de la fusión génica en una cepa de *E. coli* K12 en presencia de un sistema de secreción de tipo I, y evaluación de la secreción de IL-15 por parte de dichas células.

La estrategia planteada comprendía necesariamente el acoplamiento de dos procesos sucesivos, la producción de la proteína quimérica y su exportación al medio extracelular. Esto implicaba que la funcionalidad celular debía mantenerse para asegurar el cumplimiento de las dos etapas. Es por ello que se eligió trabajar con sistemas de expresión génica moderada, descartando el uso de vectores de expresión con promotores inducibles que comprometerían la viabilidad celular.

El diseño experimental consistió en clonar por separado la secuencia codificante de cada parte de la quimera para posteriormente juntarlas de modo tal de obtener una fusión génica (Figura 4, 5 y 6). Concretamente, a cada fragmento de la fusión se le adicionó un sitio de corte único para la enzima KpnI en el extremo a fusionarse y se seleccionó el plásmido con el inserto clonado bajo el influjo transcripcional del promotor *lac* (*POlac*) del vector. Posteriormente, para obtener la fusión génica se realizó la digestión de los plásmidos portadores de cada fragmento con dos enzimas de restricción de corte único, PstI en el vector y KpnI en el inserto, de modo que tras la ligación se forma la molécula buscada.

Clonado del gen codificante para la porción madura de IL-15

Para clonar el gen codificante de la porción madura de la IL-15 murina (mIL15), se procedió a su amplificación PCR con la enzima Vent® DNA Polimerasa. Se utilizó como molde el plásmido pORF9-mIL-15 y se diseñaron oligonucleótidos de síntesis formados por secuencias complementarias a *mil15* más secuencias adicionales necesarias para obtener la fusión génica. El cebador IL15Fw hibrida con secuencias de *mil15* y contiene en su extremo 5' el sitio de corte para la enzima KpnI. El cebador IL15Rv hibrida con los últimos 24 nucleótidos de *mil15*, portando un cambio de secuencia que permitió modificar el codón de terminación original, TGA, por el codón TAA, más frecuente en *E. coli* K12 (Figura 4) [1].

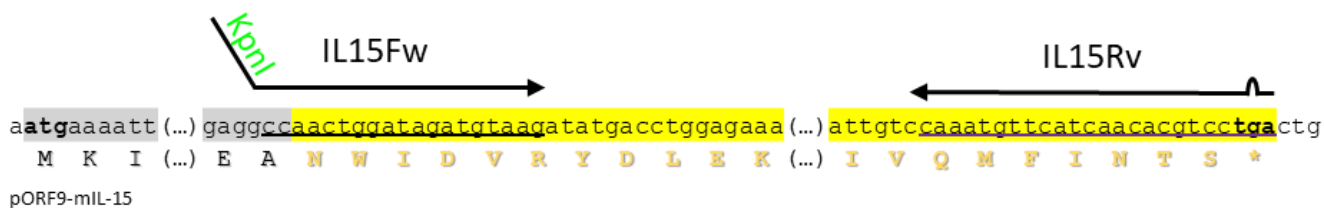


Figura 4. Diseño de amplificación de *mil15* a partir del plásmido pORF9-mIL-15. Secuencias nucleotídica y aminoacídica de segmentos de *mIL15* codificantes para el péptido señal propio (gris) y para su porción madura (amarillo). Subrayado, secuencia de *mIL15* que hibrida con los cebadores IL15Fw e IL15Rv. El sitio KpnI incluido en IL15Fw posee la secuencia GGTACC. El bucle en IL15Rv indica el cambio de un nucleótido para generar el codón de terminación TAA.

El amplicón obtenido, de 352 pb, se purificó por extracción de banda desde un gel de agarosa y se clonó en el sitio HincII (genera extremos romos) del vector plasmídico pUCYC5. Con la mezcla de ligación se transformó la estirpe DH5 α , que permite el clonado de fragmentos de PCR por ser deficiente para la restricción (HsdR⁻). Además, este contexto mantiene la capacidad de modificar el ADN por metilación (HsdM⁺), por lo que luego, el plásmido extraído de esta cepa ya puede ser introducido en cualquier otra cepa de *E. coli* K12 sin que sufra un fenómeno de restricción. Los clones transformantes se seleccionaron en LBCm, adicionado del indicador cromogénico X-gal, que permitió detectar los clones recombinantes por su fenotipo Lac. Se obtuvieron clones azules, blancos y celestes. Posteriormente, se procedió a identificar aquellos que portaban plásmidos recombinantes mediante amplificación con IL15Fw x IL15Rv. Dentro de los positivos, se buscaron los clones con el inserto clonado en la orientación deseada. Para ello, se diseñó una reacción de PCR con la pareja de cebadores IL15Fw x M13-fwd, que da lugar a un amplicón (405 pb) sólo si las regiones complementarias a dichos oligos están en sentidos opuestos, indicando entonces que el fragmento está clonado bajo el influjo transcripcional del *POlac* (Figura 6A). Primero, se realizó el relevamiento de varios clones blancos, no encontrando ninguno positivo. Se estudiaron entonces algunos clones celestes, los que resultaron portar los plásmidos buscados (Figura 6A y D). Este color se pudo explicar al analizar la secuencia de esta construcción, que evidenció la formación de una fusión génica que codificaría para la porción final del fragmento α , permitiendo la formación de una enzima β -galactosidasa semifuncional. Se extrajo el ADN plasmídico de alguno de los clones celestes para realizar su análisis físico mediante digestión con las enzimas PstI, KpnI y HindIII. Se confirmó que los plásmidos tenían el siguiente patrón de bandas: un fragmento único de 3.262 pb al ser digerido con PstI o KpnI y dos bandas, de 3.252 pb y 10 pb (estimado por la leve diferencia de migración de la banda de mayor tamaño con respecto al plásmido linearizado), producto de la digestión con ambas enzimas. Por su parte, HindIII tenía tres sitios de corte en el plásmido buscado, generando fragmentos de 1.758 pb, 1.177 pb y 327 pb (Figura 6E). Así se confirmó el clonado del segmento de ADN que codificaba para la porción madura de mIL15, que se denominó *4ail15*. Al plásmido recombinante correspondiente se le llamó pAG-4AIL15.

Clonado de la secuencia codificante del dominio de secreción de ColV

ColV es un péptido antibiótico bactericida, producido por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, que integra la familia de microcinas de mayor masa molecular. Su producción está determinada por un sistema genético, de localización plasmídica, conformado por cuatro genes: *cvaC*, *cvaA* y *cvaB*, involucrados en la síntesis y secreción de ColV, y *cvi*, cuyo producto confiere inmunidad a la célula productora contra ColV. Más precisamente, *cvaC* se traduce como un péptido precursor de 103 aa con un dominio de secreción (DS) de doble glicina de 15 aa. Luego del procesamiento por su exportador ABC, ColV resulta en un péptido de 88 aa en el medio extracelular. En efecto, ColV ha sido purificada e identificada por Western Blot desde el sobrenadante filtrado del cultivo de una cepa de MC4100 productora. Se ha secuenciado su porción N-terminal, comprobando que ésta carece del DS, lo que confirma que dicho dominio se procesa durante la secreción [99–101].

Las microcinas de mayor masa molecular son más pequeñas y menos cargadas que la IL-15, siendo ColV la más similar en extensión y carga. Por ello, se eligió utilizar el dominio de secreción de doble glicina de ColV (DS_V) para conformar la quimera. Para clonarlo, se siguió la misma estrategia experimental que para clonar el fragmento que codifica para la porción madura de *mil15*. Se amplificó por PCR con la enzima Vent® DNA Polimerasa, usando como molde el plásmido pUY271 y la pareja de cebadores CvaCFw y CvaCRv. El amplicón obtenido de 68 pb comprende, además de la secuencia codificante para el DS_V, 11 nucleótidos antes del inicio de *cvaC* que incluyen la secuencia Shine Dalgarno (de unión a ribosomas bacterianos) y dos codones que siguen al ds_v, más un sitio de corte para la enzima KpnI (Figura 5).

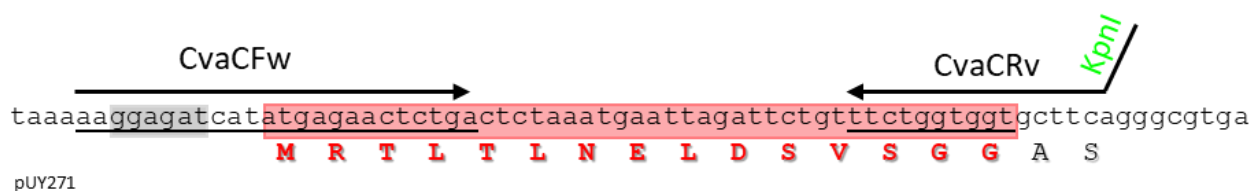


Figura 5. Diseño de amplificación del segmento codificante para DS_V a partir del plásmido pUY271. Secuencia nucleotídica de la región 5' de *cvaC*. En gris, Shine Dalgarno; en rojo, secuencia codificante para el dominio de doble glicina de ColV (DS_V); abajo, secuencia aminoacídica. Subrayado, secuencias que hibridan con los cebadores CvaCFw y CvaCRv. El sitio KpnI incluido en CvaCRv posee la secuencia GGTACC.

El amplicón se purificó por extracción de banda desde un gel de agarosa y se clonó en el sitio HincII del vector plasmídico pUC13. Con la mezcla de ligación se transformó la estirpe DH5α y los clones recombinantes se seleccionaron y detectaron en LBApXgal. Se confirmó la estructura recombinante en clones blancos mediante amplificación con la pareja de oligonucleótidos CvaCFw x CvaCRv, que generó un producto de 68 pb. De los clones positivos, se utilizó la pareja CvaCFw x M13-fwd para seleccionar aquellos portadores del plásmido con el inserto en la orientación deseada, los que dieron lugar a un amplicón de 121 pb (Figura 6B y F). Luego, se extrajeron algunos de estos plásmidos para su análisis físico con las enzimas KpnI y PstI. Efectivamente, el patrón de bandas fue el esperado: un fragmento único de 2.748 pb al cortar con cualquiera de las dos enzimas, y dos fragmentos, de 2.677 pb y 71 pb (estimado por la leve diferencia de migración de la banda de mayor tamaño con respecto a

la obtenida en la digestión simple), al digerir con ambas (Figura 6G). De esta manera, se obtuvo el plásmido recombinante derivado de pUC13 que codifica para el DS de ColV, denominado pUY-DS_v (Figura 6B).

Posteriormente, ambas construcciones, pAG-4AIL15 y pUY-DS_v, se extrajeron del contexto DH5α y se introdujeron en células de MC4100 dando lugar a clones de buen crecimiento.

Construcción de la fusión génica

Para obtener la fusión génica, el primer paso fue digerir con KpnI y PstI los plásmidos pAG-4AIL15 y pUY-DS_v. De esta manera, ambos resultaron en dos fragmentos. En el caso de pAG-4AIL15, el de interés fue aquél que abarcaba prácticamente la totalidad del plásmido, conteniendo la secuencia codificante para la porción madura de mIL15, *4ail15*, y en el caso de pUY-DS_v, fue aquél que portaba la secuencia codificante del DS de ColV, DS_v. Se juntaron ambas digestiones para ligar los fragmentos de interés y así conformar el plásmido recombinante portador de la fusión génica (*ds_v-4ail15*) buscada (Figura 6C). Con la mezcla de ligación se transformó MC4100, cepa mutante para la respuesta estricta (*relA1*), que no disminuye la expresión génica en fase estacionaria. Se seleccionaron los clones resistentes a cloranfenicol y de éstos se descartaron los sensibles a ampicilina. Algunos se analizaron por PCR. Primero, se detectaron con la pareja CvaCFw e IL15Rv los clones que portaban la fusión génica, generando un amplicón de 413 pb. Luego, con la pareja M13-fwd y M13-rv, se identificaron los que no contenían ningún fragmento adicional y por tanto formaban sólo la fusión génica *ds_v-4ail15*, dando lugar a un amplicón de 518 pb (Figura 6H). Posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico de algunos clones para llevar a cabo el análisis físico digiriendo con las enzimas KpnI, PstI y HindIII. El corte con PstI linearizó el plásmido, dando lugar a un fragmento de 3.323 pb, mientras que la digestión doble con PstI y KpnI resultó en dos fragmentos de 3.252 pb y 71 pb (estimado por la leve diferencia de migración de la banda de mayor tamaño con respecto a la obtenida en la digestión simple). Por su parte, HindIII tenía tres sitios de corte en el plásmido buscado, generando fragmentos de 1.758 pb, 1.177 pb y 388 pb. El patrón de bandas resultó ser el esperado (Figura 6I). Por último, se confirmó la fusión génica por secuenciación nucleotídica, verificando que el fragmento *ds_v* estaba unido por el sitio KpnI a *4ail15* y por el sitio PstI al vector oligocopia pUCYC5, quedando la fusión *ds_v-4ail15* bajo el influjo transcripcional de POLac (Figuras 6C y 7). La construcción recombinante se denominó pAG-DS_v-4AIL15. Cabe notar que la fusión génica codificaba para los 15 aa del DS_v, los 114 aa de mIL-15 y para 4 aa adicionales interpuestos entre ambas partes, de modo que la proteína fusión fue de 133 aa. En caso de ser procesada por el sistema de secreción de tipo I, perdería el DS_v y quedaría en 118 aa. Los dos primeros aminoácidos de 4AIL15 (A y S), que corresponden al inicio del péptido maduro de ColV, se conservaron para aumentar las probabilidades de reconocimiento y procesamiento por parte del transportador ABC. Los otros dos aminoácidos adicionales son codificados por el sitio de corte KpnI utilizado en esta estrategia. Cabe notar que los cuatro aminoácidos son pequeños y no tienen carga neta (Figura 7). Considerando que el dominio de unión de IL-15 con su receptor alfa no involucra el extremo N-terminal de la citoquina, se prevé que la adición de esos cuatro aminoácidos no interfiera en su funcionalidad [12].

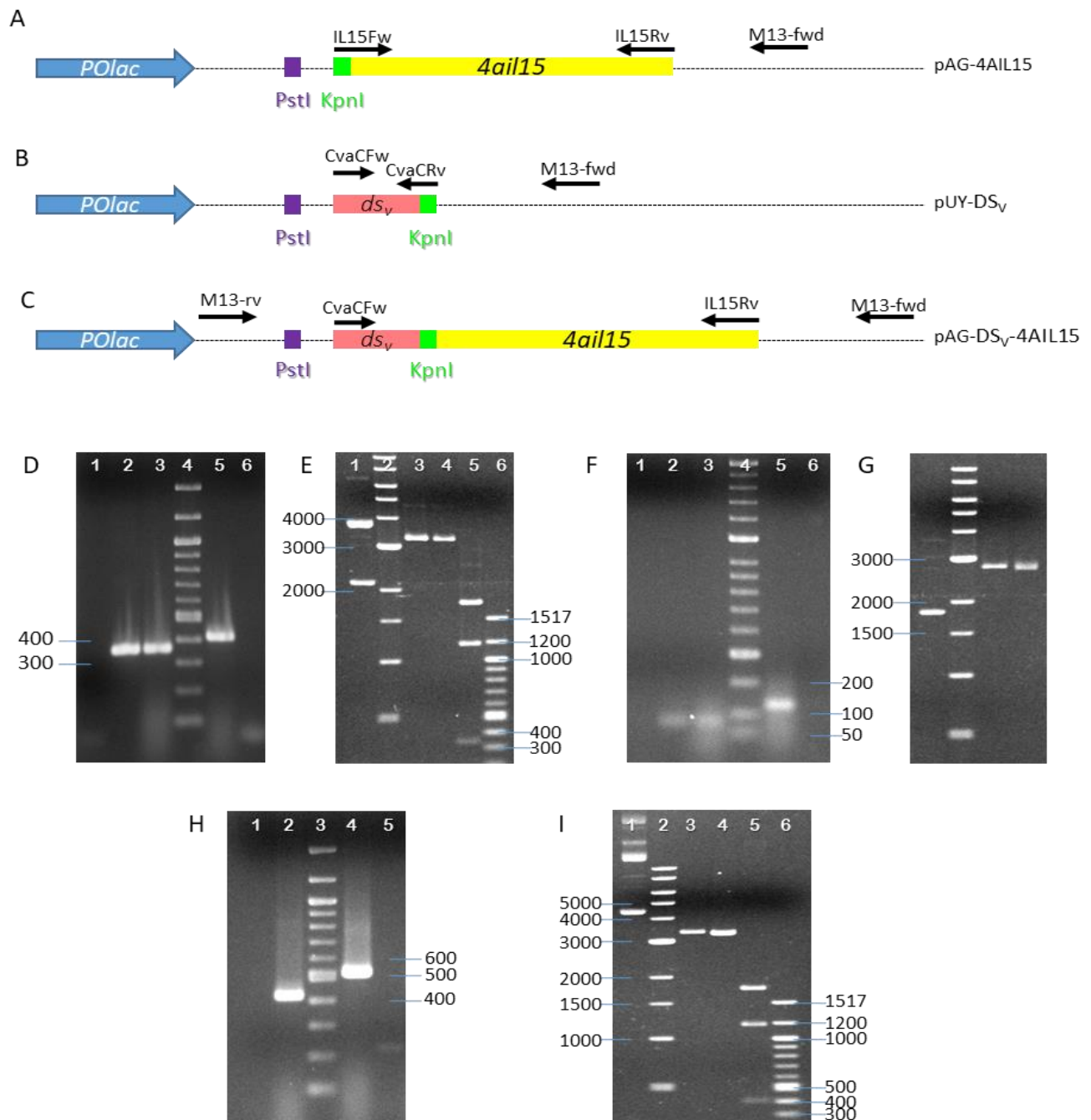


Figura 6. Construcción de la fusión génica DS_v-4AIL15. (A-C) Esquema de los plásmidos contruidos. (D-I) Comprobación de las construcciones plasmídicas por electroforesis en geles de agarosa al 2% (D, F y H) y 1% (E, G e I). (D) Análisis de pAG-4AIL15 mediante amplificaciones con IL15Fw x IL15Rv (carriles 1-3) y con IL15Fw x M13-fwd (carriles 5-6): 1 y 6, controles sin molde; 2, pORF9-mIL-15; 3 y 5, pAG-4AIL15; 4, MP 100pb. (E) Análisis físico de pAG-4AIL15: 1, pAG-4AIL15; 2, MP 1kb; 3, pAG-4AIL15/*PstI*; 4, pAG-4AIL15/*PstI*-*KpnI*; 5, pAG-4AIL15/*HindIII*; 6, MP 100pb. (F) Análisis de pUY-DS_v mediante amplificaciones con CvaCFw x CvaCRv (carriles 1-3) y con CvaCFw x M13-fwd (carriles 5-6): 1 y 6, controles sin molde; 2, pUY271; 3 y 5, pUY-DS_v; 4, MP 50pb. (G) Análisis físico de pUY-DS_v: 1, pUY-DS_v; 2, MP 1kb; 3, pUY-DS_v/*PstI*; 4, pUY-DS_v/*PstI*-*KpnI*. (H) Análisis de pAG-DS_v-4AIL15 mediante amplificaciones con CvaCFw x IL15Rv (carriles 1-2) y con M13-rv x M13-fwd (carriles 4-5): 1 y 5, controles sin molde; 2 y 4, pAG-DS_v-4AIL15; 3, MP 100pb. (I) Análisis físico de pAG-DS_v-4AIL15: 1, pAG-DS_v-4AIL15; 2, MP 1kb; 3, pAG-DS_v-4AIL15/*PstI*; 4, pAG-DS_v-4AIL15/*PstI*-*KpnI*; 5, pAG-DS_v-4AIL15/*HindIII*; 6, MP 100pb.



Figura 7. Fusión génica contenida en el plásmido pAG-DS_v-4AIL15 codificante para la quimera DS_v-4AIL15. Secuencia nucleotídica de la fusión génica con secuencias flanqueantes del vector pUCYC5. Debajo, secuencia aminoacídica deducida de la quimera; en rojo, DS_v más tres aminoácidos de ColV; en verde, aminoácido adicionado por el sitio KpnI; en amarillo, mIL15. La flecha señala el sitio de corte del dominio de doble glicina.

Para poder disponer de la fusión en mayor dosis génica, ésta se cambió al vector multicopia pUC13, siempre bajo el influjo transcripcional de *POlac*. Concretamente, se digirió el plásmido pAG-DS_v-4AIL15 y pUC13 con las enzimas PstI y SacI de forma que el fragmento que contenía la fusión se ligara a pUC13. En este caso se utilizó la cepa JM83 para el clonado, la cual se adecua al sistema de complementación en α . Se transformaron dichas células con la mezcla de ligación, seleccionando los clones recombinantes en LBapX-gal y detectando, para ser descartados, aquellos sensibles a cloranfenicol. Se identificaron los clones que albergaban la fusión génica utilizando el mismo diseño de PCR que para pAG-DS_v-4AIL15. Se obtuvo así el plásmido denominado pUY-DS_v-4AIL15, el que luego se introdujo en MC4100. Cabe destacar que las cepas MC4100(pAG-DS_v-4AIL15) y MC4100(pUY-DS_v-4AIL15) evidenciaron un buen crecimiento.

Generación de las cepas portadoras de *ds_v-4ail15* y del sistema exportador de MccH47

Una vez obtenida la fusión génica, se procedió a expresarla en presencia de un sistema de secreción de tipo I. En este sentido, se disponía en el laboratorio de plásmidos con el sistema exportador ABC de la MccH47. Este péptido antibiótico, al igual que ColV, pertenece al grupo de microcinas de mayor masa molecular. Su sistema genético contiene todos los genes necesarios para la síntesis (*mchB*), maduración (*mchA*, *mchS1*, *mchC* y *mchD*) y secreción

antibiótica (*mchE* y *mchF*), así como para conferir inmunidad (*mchI*) a la célula productora. En particular, el sistema de secreción de MccH47 está formado por MchF, que es el transportador ABC, MchE, que es el segundo componente, y la proteína de membrana externa TolC. Se ha visto que el sistema de secreción de MccH47 es capaz de secretar eficientemente ColV, lo que implica que el DS de ColV es reconocido y procesado por MchF y que las diferencias entre estas dos microcinas no afectan notoriamente el proceso. Cabe destacar que, no solo el transportador ABC y el MFP del sistema de secreción de MccH47 y de ColV comparten una alta homología de secuencia, sino que también ambos utilizan TolC como tercer componente [72,80,81]. En base a esto, se apostó que mediante el reconocimiento y procesamiento del DS de ColV de la quimera, el sistema de secreción de MccH47 también exportaría 4AIL15 al medio extracelular.

Es así que se construyeron cepas portadoras de dos plásmidos compatibles, uno codificante para DS_V-4AIL15 y otro codificante para el conjunto exportador MchE y MchF (EF). Para ello, se utilizaron los plásmidos pMVD41 y pUY41, que codificaban para el exportador EF en distintas dosis génicas. Se construyeron por transformación las siguientes dos cepas: MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pMVD41) y MC4100(pAG-DS_V-4AIL15,pUY41). Así, la diferencia entre estas cepas residió en la estequiometría de las dosis génicas de quimera y exportador; en el primer caso, *ds_V-4ail15* está en exceso con respecto a *mchE* y *mchF*, mientras que en el segundo caso esa relación se invierte. Esto se realizó para buscar las condiciones de funcionalidad más adecuadas, tanto para el proceso de exportación como para la viabilidad celular. Paralelamente, se construyeron las cepas MC4100(pMVD41) y MC4100(pUY41). Para todas se evaluó el crecimiento a 30°C y 37°C, observándose mayor estabilidad genética al incubar a la temperatura menor. Aún así en todos los casos se evidenció un crecimiento pobre con inestabilidad genética, siendo más acentuado cuando las cepas portaban solamente el exportador. MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pMDV41) fue la que presentó un crecimiento menos inestable, siendo justamente la que contenía los genes para el exportador EF en el plásmido de menor número de copias. Dado que se postula que este tipo de sistema exportador forma canales que comunican el citoplasma bacteriano con el medio extracelular, se puede pensar que una elevada concentración de los mismos podría generar la desestabilización de la envoltura celular, volviendo a la bacteria más inestable. En virtud de dichos hallazgos, se corroboró la funcionalidad del exportador EF codificado en pMVD41 mediante el ensayo de producción de ColV, como se describe en Materiales y Métodos. La cepa MC4100 con el plásmido pUY271, incapaz de producir ColV por carecer de su sistema exportador, cuando fue transformada con pMVD41 generó un halo de antibiosis sobre un tapiz de células sensibles, indicando que el exportador EF reconocía el DS de ColV y secretaba esta microcina.

Evaluación de la secreción de 4AIL15 por parte del exportador EF

Una vez obtenidos los clones portadores de *ds_V-4ail15* y los genes para el exportador de MccH47, el siguiente paso fue evaluar la expresión de la fusión y la posterior secreción de 4AIL15. En primer lugar, se buscó encontrar la quimera en lisados celulares con el fin de determinar su expresión y estabilidad en el medio intracelular. En segundo lugar, se analizó la presencia de 4AIL15 en el medio extracelular a partir del procesamiento del

sobrenadante de los cultivos. Es así que se ensayaron dos protocolos de lisis celular y, con el fin de concentrar las proteínas del sobrenadante, distintos métodos de precipitación. Este análisis se realizó para tres contextos: las cepas portadoras de los plásmidos codificantes para sólo la quimera DS_V-4AIL15, sólo el exportador EF y ambos, DS_V-4AIL15 y EF, empleando todas las cepas presentadas en el apartado anterior.

Se evaluó la fracción celular (FC) de los lisados celulares obtenidos a partir de dos protocolos, uno utilizando el buffer Laemmli y otro el buffer STET junto con lisozima. Esta enzima degrada la pared celular bacteriana, mejorando la lisis. Posteriormente, los lisados obtenidos se visualizaron en geles de poliacrilamida, donde el perfil de bandas fue esencialmente el mismo para los tres contextos, no pudiéndose identificar una banda que correspondiera al peso esperado de 4AIL15 (ca. 13,6 kDa). De todas formas, no se puede descartar que 4AIL15 se encuentre en las células en cantidades tan bajas que no permitan detectarla como una banda. Es así que se siguió adelante analizando en el sobrenadante de los cultivos la presencia de 4AIL15. Para ello, se probaron dos métodos de concentración proteica: con DOC + TCA, para precipitar proteínas de amplio rango de peso molecular y con TCA al 4%, que favorece la precipitación de proteínas de bajo peso molecular. A su vez, se ensayaron distintos solventes para la resolubilización de proteínas como acetona, DMSO, agua bidestilada y tampón Laemmli. Tampoco fue posible visualizar por SDS-PAGE una banda que se correspondiera con 4AIL15, ya sea porque se esté secretando en una cantidad por debajo del límite de detección de esta técnica o porque el exportador EF sea incapaz de secretarla (Figura 8).

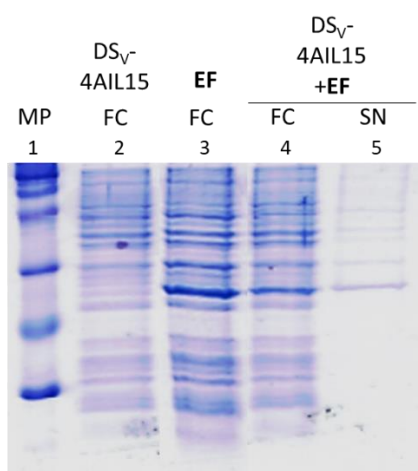


Figura 8. SDS-PAGE para evaluar la expresión de la fusión y la posterior secreción de 4AIL15. FC, fracción celular (carriles 2-4); SN, sobrenadante (carrile 5), de cultivos crecidos en LB hasta fase estacionaria de las siguientes cepas: 1, MP: marcador de peso molecular, se indica sobre la banda el peso en kDa; 2, MC4100 (pUY-DS_V-4AIL15); 3, MC4100(pMVD41); 4 y 5, MC4100 (pUY-DS_V-4AIL15,pMVD41). Los pellets se lisaron con tampón Laemmli y los sobrenadantes se concentraron mediante precipitación por TCA al 4 %.

En base a estos resultados, se continuó analizando las fracciones celulares y los sobrenadantes adicionando una técnica más sensible como es el Western Blot. Paralelamente, se realizó el clonado de los genes codificantes del exportador ABC de ColV.

Clonado de los genes codificantes del exportador ABC de ColV

Se apostó a clonar el sistema exportador de ColV, el cual naturalmente reconoce el DS_V adicionado a 4AIL15. Dentro del sistema genético de la colicina V, los genes de secreción forman un operón donde *cvaB* codifica para el transportador ABC (CvaB) y *cvaA* para el segundo componente (CvaA). Cabe recordar que este exportador también utiliza TolC al igual que el de McCH47 [100,102].

Los genes codificantes para el exportador ABC de ColV (*cvaA* y *cvaB*) se amplificaron por PCR con los cebadores ABFw y ABRv, empleando como molde el plásmido pUY270. En este caso, se utilizó la enzima Phusion® que amplifica fragmentos de hasta 20 kb. El amplicón obtenido, de 3.723 pb, contenía el operón *cvaAB*, con su secuencia promotora y de terminación. Éste se purificó y se clonó en el sitio de restricción HincII del vector pUCYC5. Luego, con la mezcla de ligación se transformó BW25113(pUY271), estirpe HsdR⁻ con un plásmido portador de los genes *cvl* y *cvaC* e incapaz de producir ColV por carecer del exportador. Los transformantes se seleccionaron en LBApCm y se evaluaron por un ensayo de producción de ColV. Los clones que generaron halos de antibiosis eran los que contenían el plásmido recombinante que codificaba para el exportador de ColV (AB). Se extrajo el ADN plasmídico de algunos clones productores y se digirió con XhoI, enzima que sólo corta a pUY271. De esta forma, pUY271 quedaría lineal y el plásmido portador de los genes *cvaAB* quedaría circular. Cuando la mezcla de digestión se usó para transformar células de MC4100, sólo este último plásmido podría transformar. Se seleccionaron los clones en LBCm y se corroboró que éstos no contenían pUY271 por ser sensibles a Ap. La nueva construcción plasmídica se analizó con las enzimas HpaI y PstI. El patrón de bandas resultó ser el esperado: una banda de 6.633 pb con HpaI y cuatro bandas de 4.765 pb, 877 pb, 778 pb y 213 pb con PstI. El plásmido recombinante, que codifica para el exportador de ColV, se denominó pAG-AB.

Para evaluar entonces la secreción de 4AIL15 por parte del exportador AB, se construyó la cepa MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB). Para ello, se tuvieron en cuenta los resultados de estabilidad genética de las cepas portadoras del exportador EF. Es así que, la estirpe porta los plásmidos codificantes para DS_V-4AIL15 y los exportadores AB en igual relación de dosis génica a la de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pMDV41). Con respecto al crecimiento, se observó el mismo fenómeno que para el exportador EF, es decir la incubación a 30°C fue más adecuada. La cepa MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB) presentó bajo crecimiento e inestabilidad genética, aunque no tan acentuado como MC4100(pAG-AB).

Evaluación de la producción de la quimera y secreción de 4AIL15 por Western Blot

Para determinar la producción de la proteína quimérica DS_V-4AIL15 y su eventual procesamiento y exportación por un sistema de secreción de tipo I, se recurrió a ensayos de Western Blot. Se realizaron en la Unidad de Biología Parasitaria del Instituto de Higiene con el asesoramiento de la Dra. Patricia Berasain. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-mIL-15 y la proteína mIL-15 pura que había sido empleada para generar el anticuerpo. Esta última

se utilizó como control en todos los ensayos; tiene adicionada una metionina en su extremo N-terminal y una masa molecular de unos 13,4 kDa. Asimismo, la masa molecular de la proteína quimérica DS_V-4AIL15 sería de 15,1 kDa y la del producto procesado 4AIL15 de 13,6 kDa. Se puso a punto la técnica de Western Blot para determinar las concentraciones de los anticuerpos y de la proteína control a utilizar. Fue allí donde se vio que esta última generaba en geles más de una banda específica, correspondiente a multímeros según el proveedor.

En primer lugar, se procesaron las fracciones celulares (FC) de las siguientes cepas: MC4100(pUY-DS_V-4AIL15), sólo portadora de la fusión; MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pMVD41), con la fusión y el exportador EF; MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB), con la fusión y el exportador AB, y MC4100(pAG-AB), sólo con el exportador AB. En dicho ensayo se identificaron bandas sólo a partir de las cepas portadoras de pUY-DS_V-4AIL15, lo que evidenció que el anticuerpo era capaz de reconocer específicamente los productos que contenían la secuencia de mL15 (Figuras 9). En la cepa que sólo expresaba *ds_V-4ail15* apareció una banda que migró en forma más retrasada que la proteína control mL-15. Este resultado era el esperado dado que DS_V-4AIL15 tiene 1,7 kDa más que mL-15. Considerando que se ha postulado que el procesamiento es concomitante con la secreción [69], en el caso de las FC procedentes de las cepas con la quimera y con exportadores, se esperaba dos resultados posibles: no ver nada si toda la quimera había sido procesada y exportada, o bien ver el exceso de precursor DS_V-4AIL15 que no había podido ser sustrato del exportador. Esto último fue lo que ocurrió con la cepa que expresaba la quimera en presencia del exportador de la MccH47 (EF). Sin embargo, en la cepa que expresaba la quimera en presencia del exportador de ColV (AB), apareció una banda con una migración similar a la de la proteína control. Esta migración sería la esperada para la quimera procesada 4AIL15 que, aunque tenía 0,2 kDa más que mL-15, no parecería probable que esta diferencia de tamaño se evidenciara en el gel (Figuras 9). Por lo tanto, el exportador AB habría sido capaz de reconocer y procesar el DS_V de la quimera aunque, contrariamente a lo esperado, 4AIL15 se encontró retenido en la fracción celular. Esto indicaría que el procesamiento del sustrato y su secreción no estarían necesariamente acoplados.

Una vez analizadas las fracciones celulares, se prosiguió con la evaluación de la presencia de 4AIL15 en el sobrenadante de los cultivos bacterianos mediante su precipitación con TCA al 4 %. Para las cepas MC4100(pAG-AB), MC4100(pMVD41) y MC4100(pUY-DS_V-4AIL15) no se obtuvo banda, lo cual era el resultado esperado ya que las primeras dos solo codifican para el sistema exportador, y la tercera, si bien expresa DS_V-4AIL15, al no codificar para el exportador no sería capaz de secretar la citoquina. En cambio, en el caso de los sobrenadantes de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pMVD41) y MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB) se esperaba encontrar una banda correspondiente a 4AIL15 dada la presencia de los sistemas de secreción de tipo I. Sin embargo, en ninguno de los dos se evidenció banda (Figura 9). Este resultado, sumado a las diferencias en la interacción de los dos tipos de exportadores con la quimera en las fracciones celulares, resultó llamativo. Concretamente, ya sea con o sin procesamiento del sustrato, en ambos casos no se detectó 4AIL15 en el sobrenadante, aún cuando se sabe que dichos exportadores comparten alta homología de secuencia y han sido descriptos como intercambiables [80,81]. Por ello, cabe mencionar que estos experimentos se hicieron varias veces, corroborando lo observado. Teniendo

en cuenta el conjunto de los resultados obtenidos, se consideró que el exportador EF no procesaría ni exportaría el sustrato, mientras que el exportador AB, el específico para el DS empleado, sí reconoció y procesó DS_V-4AIL15, aunque no se detectó 4AIL15 en el sobrenadante. Por lo tanto, se resolvió reevaluar la forma en la que se obtenían y procesaban los sobrenadantes, acotando los análisis a la cepa experimental MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB), acompañada de sus controles MC4100(pUY-DS_V-4AIL15) y MC4100(pAG-AB). Se ensayaron entonces una serie de variantes metodológicas que se presentan a continuación.

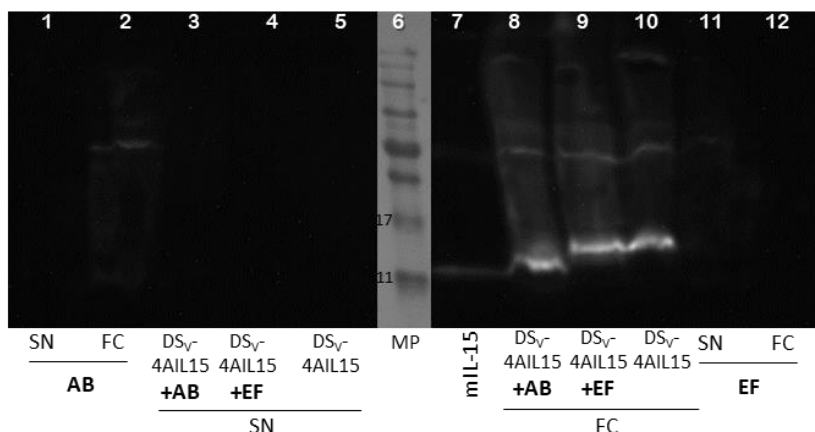


Figura 9. Western Blot para la identificación de proteínas que contienen la secuencia mIL15. FC, fracción celular (carriles 2, 8-10 y 12); SN, sobrenadante (carriles 1, 3-5 y 11), de cultivos crecidos en LB hasta fase estacionaria de las siguientes cepas: 1-2, MC4100(pAG-AB); 3 y 8, MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB); 4 y 9, MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pMVD41); 5 y 10, MC4100(pUY-DS_V-4AIL15); 6, MP: marcador de peso molecular, se indica sobre la banda el peso en kDa; 7, mIL-15 (10 ng). Los sobrenadantes se concentraron mediante precipitación por TCA al 4 %.

En primer lugar, se apostó a realizar un nuevo método de concentración proteica de los sobrenadantes con centricones Amicon®, basado en la exclusión de tamaño molecular. Este método permitió concentrar el sobrenadante unas 80 veces; aún así, no se evidenció banda alguna en el sobrenadante de la cepa experimental (Figura 10A). Todos los ensayos subsiguientes de concentración se realizaron utilizando centricones.

Se consideró la posibilidad de que el medio de cultivo LB interfiriera en la detección de 4AIL15. En efecto, se comprobó que al agregar proteína pura al sobrenadante concentrado de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB), la intensidad de la banda correspondiente a mIL-15 disminuyó notoriamente (Figura 10B). Por este motivo, se reemplazó el medio LB por medio mínimo (MM). Para ello, primero se evaluó el crecimiento de estas cepas en medio mínimo agar con sus respectivas presiones antibióticas a 30°C y 37°C. Se eligió la menor temperatura de incubación donde, si bien el crecimiento fue más lento, se observó mayor estabilidad genética. En un ensayo similar al descrito, agregando proteína pura al sobrenadante concentrado de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB) crecido en MM, se comprobó que este medio no interfería mayormente con la visualización de mIL-15 (Figura 10C). Sin embargo, nuevamente no fue posible identificar una banda en el sobrenadante de la cepa experimental. A partir de aquí, todos los ensayos que siguen se realizaron creciendo las cepas en MM.

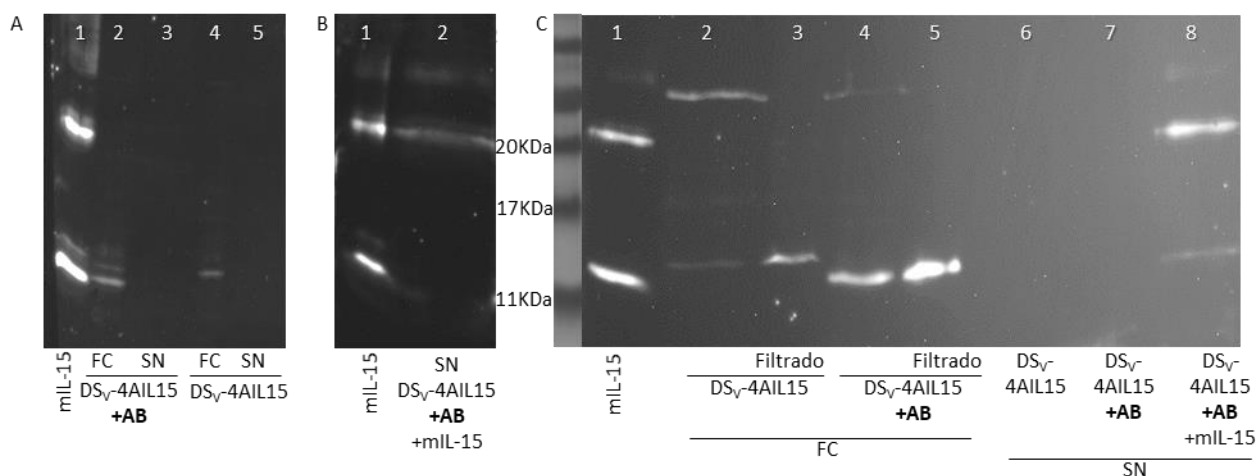


Figura 10. Análisis por Western Blot del efecto de las condiciones de crecimiento y procesamiento del cultivo sobre la identificación de 4AIL15 en el SN. (A) Identificación de 4AIL15 en la FC (carriles 2 y 4) y en el SN concentrado con Amicon (carriles 3 y 5) de cultivos crecidos en LB hasta fase estacionaria: 1, mL-15 (15ng); 2 y 3, MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB); 4 y 5, MC4100(pUY-DS_V-4AIL15). **(B)** Evaluación de la interferencia del medio LB en la detección de mL-15: 1, mL-15 (10 ng); 2, mL-15 (10 ng) en SN concentrado por Amicon de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB) crecida en LB hasta fase estacionaria. **(C)** Identificación de 4AIL15 en la FC no filtrada (carriles 2 y 4) y filtrada (carriles 3 y 5), y en el SN concentrado con Amicon (carriles 6 y 7) de cultivos crecidos en MM hasta fase estacionaria: 1, mL-15 (10ng); 2, 3 y 6, MC4100(pUY-DS_V-4AIL15); 4, 5 y 7, MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB); 8, mL-15 (10ng) en SN concentrado por Amicon de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB) crecida en MM.

También se corroboró que 4AIL15 no era retenida en el proceso de filtración de los sobrenadantes. Concretamente, al someter las fracciones celulares (FC) de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15) y MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB) al mismo proceso de filtrado que sus sobrenadantes, no hubo cambios en cuanto a la identificación de las bandas correspondientes a DS_V-4AIL15 y 4AIL15, respectivamente (10C). Por lo tanto, se descartó que la filtración interfiriera con la detección de 4AIL15 en los sobrenadantes.

Surgió entonces la hipótesis de que 4AIL15 efectivamente se estuviera secretando, pero que se degradara una vez en el medio extracelular ya sea por una acción proteolítica o por la labilidad propia de la proteína [15]. Por este motivo se realizaron tres aproximaciones experimentales distintas con el objetivo de disminuir la posible degradación de 4AIL15, evaluando siempre las fracciones celulares y los sobrenadantes de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB), MC4100(pUY-DS_V-4AIL15) y MC4100(pAG-AB).

Por un lado, se consideró la posibilidad de que en la fase estacionaria de crecimiento (en la que se había analizado hasta el momento la producción de 4AIL15), hubiera proteasas en el sobrenadante del cultivo producto de un cierto grado de lisis celular propia de dicha fase. Es así que se procesaron cultivos en fase logarítmica avanzada (con un recuento de viables un orden de magnitud menor que el de fase estacionaria). En este caso tampoco se logró visualizar 4AIL15 en el sobrenadante concentrado de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB), aunque sí claramente en su fracción celular (Figura 11A). Este resultado sugirió que no habría degradación de la proteína asociada al estado metabólico del cultivo.

Alternativamente, se consideró la posibilidad de que 4AIL15 fuera diana de la proteína OmpT al alcanzar el medio extracelular. Ésta es la proteasa de membrana externa más importante de *E. coli* K12, donde su dominio proteolítico se extiende al medio extracelular [103,104]. Por lo tanto, se utilizó la cepa FGB103, isogénica de MC4100 pero deficiente para la proteasa OmpT, para evaluar la secreción de 4AIL15. Se construyó la cepa experimental FGB103(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB) y sus controles FGB103(pAG-AB) y FGB103(pUY-DS_V-4AIL15); las tres exhibieron un crecimiento en medio mínimo sólido y líquido muy similar al del contexto MC4100. Se analizaron entonces las fracciones celulares y los sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria de crecimiento de las tres estirpes. El análisis por Western Blot exhibió el mismo resultado que antes: una banda correspondiente a DS_V-4AIL15 en la FC de FGB103(pUY-DS_V-4AIL15), una banda correspondiente a la quimera procesada 4AIL15 en la FC de FGB103(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB) y ninguna banda en la FC de FGB103(pAG-AB); no se observó ninguna banda en el sobrenadante concentrado de FGB103(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB) y su control FGB103(pUY-DS_V-4AIL15) (Figura 11B). Se dedujo entonces que la proteasa OmpT no sería responsable de la ausencia de 4AIL15 en el sobrenadante.

Considerando un antecedente en la literatura [105], se procuró aumentar la estabilidad de 4AIL15 adicionando seroalbumina bovina (BSA) al medio de cultivo en una concentración igual a la requerida para reconstituir la citoquina pura. Nuevamente, se obtuvo el mismo resultado negativo que en los casos anteriores.

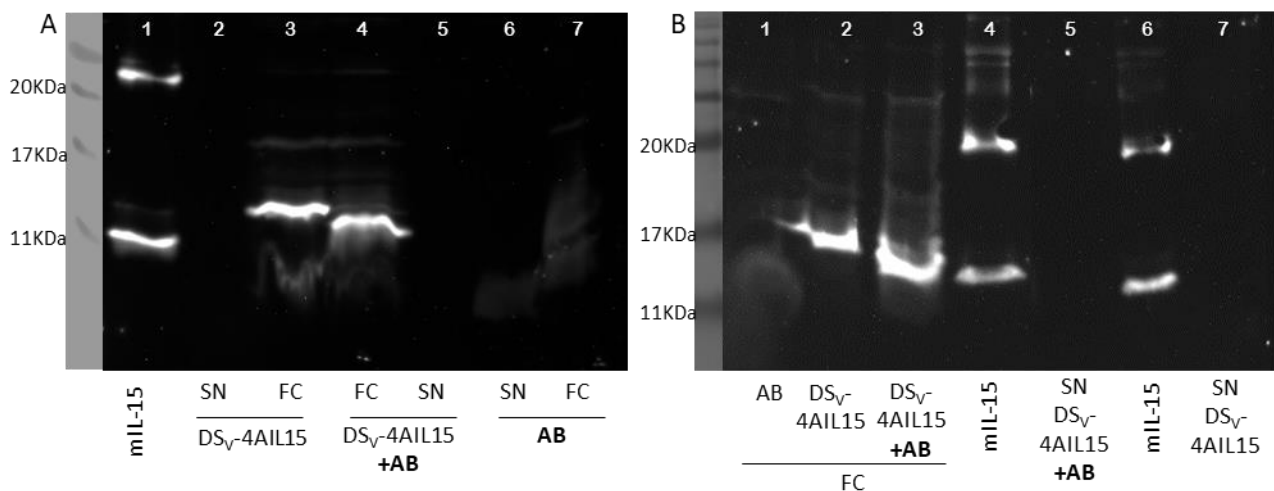


Figura 11. Evaluación mediante Western Blot de la posible degradación de 4AIL15 en el SN de los cultivos crecidos en MM. (A) Análisis de la FC (carriles 3, 4 y 7) y del SN (carriles 2, 5 y 6) de cultivos crecidos hasta fase logarítmica: 1, mL-15 (10ng); 2-3, MC4100(pUY-DS_V-4AIL15); 4-5, MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB); 6-7, MC4100(pAG-AB). **(B)** Análisis de la FC (carriles 1-3) y del SN (carriles 5 y 7) de cultivos crecidos hasta fase estacionaria en contexto deficiente para OmpT: 1, FGB103(pAG-AB); 2 y 7, FGB103(pUY-DS_V-4AIL15); 3 y 5, FGB103(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB); 4 y 6, mL-15 (10ng).

Es importante destacar que cada muestra analizada por Western Blot se ensayó en paralelo por SDS-PAGE, donde no fue posible identificar una banda que se correspondiera con DS_V-4AIL15 o 4AIL15 en la fracción celular ni en el sobrenadante de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15) y MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB), respectivamente.

Finalmente cabe señalar que, luego de varios repiques, las cepas MC4100(pAG-AB) y MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB) no siempre crecieron o no alcanzaron la turbidez usual al cabo de 18 hs de cultivo líquido. Es así que se interpretó este fenómeno como consecuencia de inestabilidad genética, por lo que se controló en varias oportunidades la estructura física de los plásmidos de estas cepas. Se comprobó así que en general los plásmidos tenían el tamaño esperado, lo que coincidió con la identificación de DS_V-4AIL15 procesada en la FC de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pAG-AB), indicando la funcionalidad del exportador. Sin embargo, se detectaron algunos casos donde los plásmidos tenían deleciones, lo que coincidió con resultados negativos en los Western Blots de las FC. En este sentido, se realizó un control adicional de tipo fisiológico del exportador, consistente en un ensayo de complementación para la producción de ColV, transformando MC4100(pUY271) con el plásmido pAG-AB de la cepa a controlar. Se dilucidó que el plásmido codificaba para un exportador funcional cuando los transformantes produjeron halos de antibiosis de ColV.

En suma, en ningún caso hubo una secreción detectable del producto 4AIL15. Considerando que la técnica de Western Blot revelada con “quimioluminiscencia aumentada” es muy sensible, cabe suponer que efectivamente 4AIL15 no fue exportado al medio extracelular. De todas formas, es importante resaltar dos resultados inesperados: que el procesamiento del sustrato se puede desacoplar de su secreción y que los exportadores AB y EF se comportan distinto frente al mismo sustrato, no siendo intercambiables como se había propuesto [80,81].

DISCUSIÓN

En este trabajo se apuntó a generar una alternativa para la producción de IL-15 recombinante más simple y económica que la actual, basada en la secreción de la citoquina desde la bacteria, con el propósito de utilizarla para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el sistema desarrollado no permitió cumplir el objetivo, puesto que, si bien la citoquina se pudo producir en un contexto bacteriano, no pudo ser secretada al medio extracelular. Aun así, este trabajo cobra interés en microbiología básica, aportando información novedosa sobre las características que subyacen a la secreción de péptidos con un dominio de secreción de tipo doble glicina por parte de un sistema exportador ABC. Concretamente, el análisis del derrotero de la proteína fusión DS_V-4AIL15 en *E. coli* K12 surge como modelo para estudiar los requerimientos que debe cumplir un sustrato peptídico para ser exportado por un sistema de secreción de tipo I. Por lo tanto, corresponde realizar un análisis comparativo de la porción madura de todos los péptidos que se intentaron secretar de forma heteróloga descriptos en la bibliografía.

En relación al tamaño del péptido a secretar, cabe notar que 4AIL15 posee 30 aa más que ColV (Tabla 4). Las descripciones que existen de secreción heteróloga por parte del exportador AB dan cuenta de la secreción de dos péptidos más pequeños que ColV, MccH47 y DivA (Tabla 4) [80,82]. Sin embargo, se puede deducir de otros trabajos que los exportadores ABC tienen una cierta flexibilidad, siendo capaces de secretar péptidos más extensos que su sustrato específico. Tal el caso del exportador EF, el cual puede secretar todas las microcinas de mayor masa molecular, donde la porción madura más corta es la de H47 (60 aa) y la más extensa es la de ColV (88 aa) (Tabla 4) [72,81]. Asimismo, el exportador de la leucocina A (LeuA) es capaz de mediar la secreción de otras dos bacteriocinas que superan en 18 y 21 aminoácidos a la propia [77,78]. Al analizar la secreción de péptidos híbridos que diferían en la porción madura y compartían el DS naturalmente reconocido por el exportador ABC, también se evidencia una cierta flexibilidad. Concretamente, el exportador de lactococcina A tiene la capacidad de secretar sustratos hasta 34 aa mayores al específico. Sin embargo, dicha tolerancia parece tener un límite dado que, por ejemplo, el exportador de LeuA no puede mediar la secreción de un péptido que excede en 52 aa a su sustrato específico [82]. Por lo tanto, si bien no se puede descartar que el tamaño de 4AIL15 sea un impedimento a la hora de la secreción, podrían también incidir otras características del sustrato.

Otro parámetro a considerar es la carga del péptido, dado que 4AIL15 contiene el doble de aminoácidos cargados que ColV. 4AIL15 porta en su secuencia 11 aa con carga positiva y 17 aa con carga negativa, resultando en una carga neta teórica (CNT) de -8,5 a pH 7 (Tabla 4). En contraparte, la porción madura de ColV posee 6 aa con carga positiva y 5 aa con carga negativa, dando cuenta de una CNT de 0,1 a pH 7. Esta diferencia podría ser relevante considerando los antecedentes de secreción heteróloga por parte del exportador AB, ya que la porción madura de los péptidos que secreta poseen una CNT de -0,1 (MccH47) y +2,8 (DivA) [80,82]. Asimismo, se observa un fenómeno similar en el caso de la secreción heteróloga por parte del exportador EF, donde la CNT de la porción madura de los péptidos que secreta (todas las microcinas de mayor masa molecular) va desde -3,8 hasta +0,1 a

pH 7 (Tabla 4). Por lo tanto, dicho parámetro podría ser relevante considerando que la CNT de 4AIL15 se encuentra muy por fuera del rango de cargas de los péptidos para los cuales ha sido exitosa la secreción.

Tabla 4. Comparación de las características de la secuencia aminoacídica de 4AIL15 con las de la porción madura de las bacteriocinas

Sustrato*	Porción madura				
	Secuencia aminoacídica#	Extensión	aa. con carga		CTN a pH 7
			+	-	
4AIL15	ASGTNWI D VRY D LEK I ESLIQSI H IDTTL T DS D FHP S CKVTAMNCFL L ELQVIL H EYSN MTLN E TV R NVLYLANSTLSSN K NVA E SG K E C EE L E K T F TEFLQSF I RIVQMFINTS	128	11	17	-8,5
ColV	ASGR D IAMAIGTL S GQFVAGGIGAAAGGVAGGAI D YAST H KPNPAMSPSGLGGTI K Q K P E GIP S EAWNYAAG R LCNWSPNNLS D VCL	88	6	5	+0,1
MccH47	GGAPATSANAAGAAAI V GALAGIPGGPLGVVVGAVSAGLT T AIGSTVGSGSASSSA GGGS	60	0	0	-0,1
MccI47	MNLNGLPASTN V I D L R G K DMGT I DANGACWAP D TPSIIMYPGGSGPSYSMSSTS SANS G S	62	2	4	-2,1
MccM	D GN D GQA E LIAIGSLAGTFISPGFGSIAGAYIG D K V HSWATTATVSPSMSPSGIGLSS QFGSG R GTSSASSSAGSGS	77	3	4	-1,8
MccE492	G ET D PNTQLLN D LGNNMAWGAALGAPGGGLGSAALGAAGGALQTVGQGL I D H GP VNVPIPV L IGPSWNGSGSGYNSATSSSGSGS	84	1	4	-3,8
DivA	AAP K IT Q K Q KNCVNGQLGGMLAGALGGPGGVVLGGIGGA I AGGC F N	46	3	0	2,8

*Microcinas de mayor masa molecular: ColV, H47, I47, M, E492; Divergicina A: DivA.

En rojo, aminoácidos ácidos; en celeste, aminoácidos básicos.

También se analizó el perfil de hidrofobicidad de los precursores peptídicos secretados por los exportadores AB y EF. Luego de comparar el perfil del precursor de ColV con el de DS_V-4AIL15 se observaron diferencias en las regiones posteriores al DS, no así en la región de proteólisis (Figura 12). En este sentido, al analizar los perfiles de hidrofobicidad de los dos péptidos secretados de forma heteróloga por el exportador AB, el precursor de MccH47 presenta un perfil de hidropatía muy parecido al del precursor de ColV, mientras que el péptido híbrido formado por el DS de ColV seguido de la bacteriocina divergicina (DS_V-DivA) se asemeja más en su primera porción a DS_V-4AIL15 (Figura 12). Cabe notar que este último tiene aproximadamente la mitad de extensión que ColV (Tabla 4). En cuanto a la secreción de péptidos mediada por el exportador EF se puede apreciar que no hay un requerimiento de hidropatía particular en la región del DS ni en la zona posterior de las microcinas H47, I47, M, E492 y ColV (Figura 13). Más aún, los perfiles presentados por las tres microcinas naturalmente secretadas por este exportador (MccH47, MccI47, MccM) son disimiles. Por lo tanto, si bien no se puede descartar que la hidropatía de los péptidos a secretar esté influyendo en la capacidad de los exportadores AB y EF de secretar la quimera, éste no parece ser tampoco un parámetro excluyente.

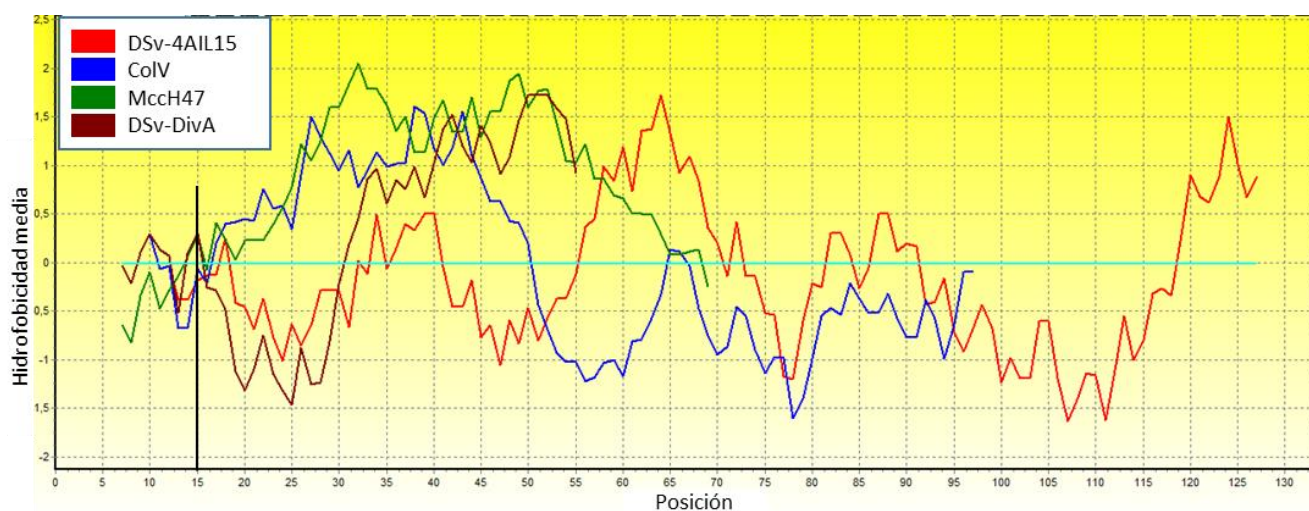


Figura 12. Perfiles de hidrofobicidad de DSv-4AIL15 y de los precursores peptídicos secretados por el exportador AB. Se indica con una línea vertical el sitio de procesamiento del dominio de secreción. Se analizaron las secuencias con una ventana de 13 residuos según la escala de Kyte & Doolittle del programa “Bioedit Sequence Alignment Editor” [95].

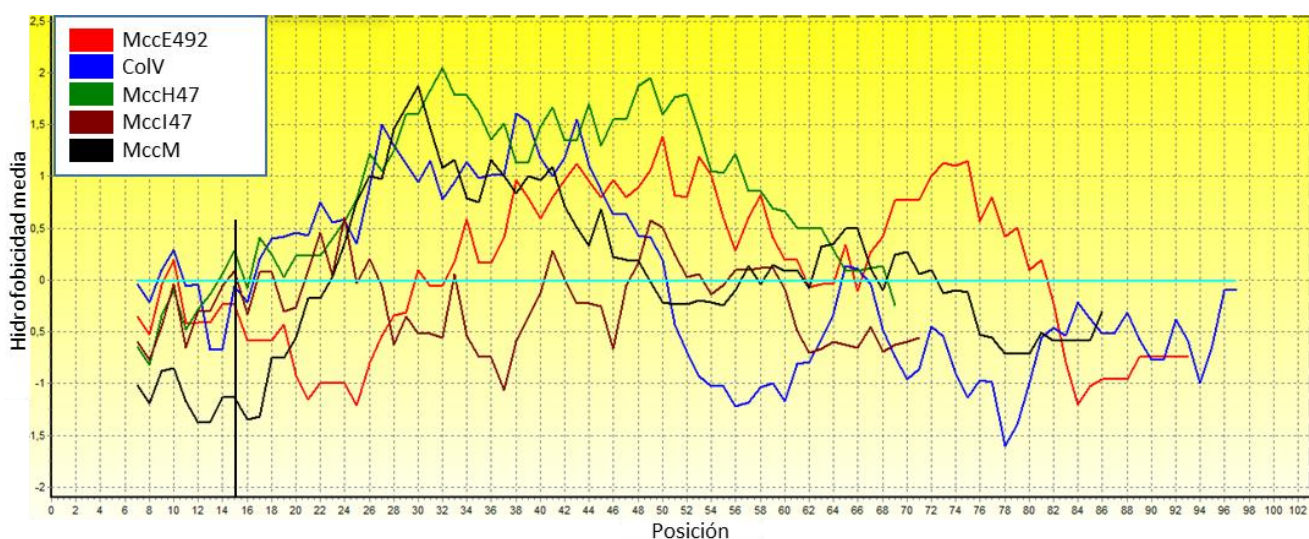


Figura 33. Perfiles de hidrofobicidad de los precursores peptídicos secretados por el exportador EF. Se indica con una línea vertical el sitio de procesamiento del dominio de secreción. Se analizaron las secuencias con una ventana de 13 residuos según la escala de Kyte & Doolittle del programa “Bioedit Sequence Alignment Editor” [95].

Por último, no se descarta que exista una restricción relativa a la estructura secundaria que adopta la porción 4AIL15 en la proteína híbrida. En este sentido, se conoce que IL15 presenta cuatro hélices α [12] mientras que las microcinas de mayor masa molecular carecerían de una estructura tridimensional específica por su gran riqueza en aminoácidos pequeños como glicina y alanina. Además, si bien se dispone de numerosas estructuras tridimensionales de distintos transportadores ABC, solo hay tres donde se co-cristalizó el transportador unido a su sustrato. Cabe mencionar que ninguno de estos sustratos es un péptido con dominio de tipo doble glicina [106].

En suma, a la luz de los resultados obtenidos, este análisis aporta nueva información sobre la influencia de los atributos de la porción madura de los péptidos sustrato en la secreción mediada por los sistemas de tipo I.

Cabe mencionar que los trabajos que reportan el fracaso en la secreción heteróloga evalúan al exportador como un todo, es decir, no discriminan cuál de los tres componentes impide la secreción. En este trabajo si bien 4AIL15 no fue secretada por AB, sí se pudo evidenciar la interacción del transportador ABC con DS_V-4AIL15 a través del procesamiento de DS_V. En este sentido, existe un sólo antecedente con este mismo exportador donde también se detectó el procesamiento de proteínas híbridas que no se secretaron. Estas quimeras estaban formadas por la fusión de distintas extensiones del precursor de ColV a la fosfatasa alcalina, enzima que solo adquiere actividad cuando se expone al periplasma. Dado que las células portadoras de estas fusiones tuvieron actividad fosfatasa alcalina, se dedujo que estas quimeras fueron traslocadas al periplasma [100]. Considerando que la fosfatasa alcalina (450 aa) es unas cinco veces más grande que ColV (88 aa), se puede pensar que 4AIL15 podría ser también traslocada hacia el periplasma. Esto apuntaría a que existan restricciones en el pasaje por el canal formado por el sistema exportador o en la estructuración del mismo. En este sentido, se han planteado varios modelos, incluyendo el que requiere la interacción con el sustrato para que los tres componentes se ensamblen en un canal [63]. Considerando que TolC es una proteína de membrana externa común a varios sistemas de secreción de tipo I, tanto de péptidos como de algunas proteínas, no parece probable que la restricción de la secreción de 4AIL15 esté en este componente [67,72]. Por lo tanto, parece probable que exista un defecto en la interacción entre el transportador ABC unido a 4AIL15 y el segundo componente. No existen antecedentes de sistemas de secreción híbridos de péptidos con DS de doble glicina, es decir compuestos por un transportador ABC y un segundo componente provenientes de distintos sistemas.

En el caso del exportador EF no se descarta que exista un impedimento por parte del segundo componente MchE, dado que comparte una homología de secuencia del 98% con el correspondiente del sistema de secreción de ColV, CvaA [80]. Sin embargo, el problema parece suscitarse desde la interacción del transportador ABC MchF con DS_V-4AIL15, ya que no se observó el procesamiento de la quimera en la FC de MC4100(pUY-DS_V-4AIL15,pMVD41). El hecho de que el exportador EF secrete eficientemente ColV, indica que MchF efectivamente reconoce el DS de ColV [81]. Por lo tanto, en el caso de la quimera, se presume que también se estaría dando este reconocimiento. Sin embargo, al estar el DS de ColV sucedido de 4AIL15, MchF no fue capaz de procesarlo.

Hasta el momento, la hipótesis ampliamente aceptada, aunque no probada experimentalmente, plantea que el reconocimiento y procesamiento del dominio de secreción es concomitante con la exportación del sustrato al medio extracelular [69]. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo permiten plantear un nuevo modelo de secreción de sustratos con dominio de tipo doble glicina por exportadores ABC, donde el reconocimiento, procesamiento y secreción del sustrato serían etapas sucesivas y no concomitantes. Por un lado, los datos obtenidos con el exportador EF sugieren que el reconocimiento del DS del sustrato no implica necesariamente su procesamiento. Por otro lado, los resultados obtenidos con el exportador AB evidencian el desacoplamiento entre el procesamiento del DS y la secreción del sustrato maduro. En suma, en las condiciones artificiales generadas en este trabajo por ingeniería genética, se logró identificar y separar las tres etapas del

proceso de secreción ABC -reconocimiento, procesamiento y secreción-, las cuales en condiciones fisiológicas se sucederían necesariamente.

Por último, este trabajo aporta información sobre aspectos poco explorados de los sistemas de secreción de tipo I, sirviendo de base para el desarrollo de nuevas líneas de investigación en el tema. Comprender mejor el funcionamiento de este sistema de secreción permitirá utilizarlo como herramienta en la producción de proteínas recombinantes de importancia biotecnológica. En este sentido, no se descarta lograr eventualmente la secreción de IL-15 ensayando otros exportadores ABC.

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró producir en *E. coli* K12 el péptido híbrido DSv-4AIL15, conformado por el dominio de secreción de ColV y la secuencia madura de la IL-15 murina.

La quimera se enfrentó *in vivo* a los sistemas de secreción de tipo I de las microcinas ColV y H47, aunque en ninguno de los casos se logró secretar 4AIL15. La ausencia de secreción de 4AIL15 evidenció que las características del sustrato maduro influyen en la capacidad de un sistema de secreción de tipo I de mediar la exportación.

Las diferencias observadas en la interacción entre DSv-4AIL15 y los dos sistemas de secreción utilizados demuestran que estos exportadores no son totalmente intercambiables.

Las condiciones artificiales creadas en este trabajo mediante ingeniería genética permitieron separar las tres etapas de reconocimiento, procesamiento y secreción del sustrato en el proceso de secreción de tipo I. Esto permitió reconocer dichas etapas como sucesivas y no concomitantes, como se había planteado hasta ahora.

Surge así un modelo de estudio donde el cumplimiento de cada una de las tres etapas de la secreción depende de las características del sustrato. Esto permitiría el diseño de distintos sustratos modificados con el fin de determinar los requisitos de cada una de dichas etapas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.-A.A., et al., **"Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*,"** *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **35** (2002) 91–105. doi:10.1042/BA20010099.
- [2] Ferrer-miralles, N., Domingo-espín, J., Corchero, J.L., et al., **"Microbial factories for recombinant pharmaceuticals,"** *Microbial Cell Factories*. **8** (2009) 1–8. doi:10.1186/1475-2859-8-17.
- [3] Assenberg, R., Wan, P.T., Geisse, S., et al., **"Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research,"** *Current Opinion in Structural Biology*. **23** (2013) 393–402. doi:10.1016/j.sbi.2013.03.008.
- [4] Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A., **"Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges,"** *Frontiers in Microbiology*. **5** (2014) 1–17. doi:10.3389/fmicb.2014.00172.
- [5] Walsh, G., **"Biopharmaceutical benchmarks 2014,"** *Nature Biotechnology*. **32** (2014) 992–1000. doi:10.1038/nbt0910-917.
- [6] Walsh, G., **"Second-generation biopharmaceuticals,"** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **58** (2004) 185–196. doi:10.1016/j.ejpb.2004.03.012.
- [7] Lagassé, H.A.D., Alexaki, A., Simhadri, V.L., et al., **"Recent advances in (therapeutic protein) drug development,"** *F1000Research*. **6** (2017). doi:10.12688/f1000research.9970.1.
- [8] Bray, F., Ren, J.S., Masuyer, E., et al., **"Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008,"** *International Journal of Cancer*. **132** (2013) 1133–45. doi:10.1002/ijc.27711.
- [9] Machado, N.P., Téllez, G.A., and Castaño, J.C., **"Anticuerpos monoclonales : desarrollo físico y perspectivas terapéuticas,"** *Infectio*. **10** (2006) 186–197.
- [10] Mirzaei, H.R., Rodriguez, A., Shepphird, J., et al., **"Chimeric antigen receptors T cell therapy in solid tumor: Challenges and clinical applications,"** *Frontiers in Immunology*. **8** (2017). doi:10.3389/fimmu.2017.01850.
- [11] Mac Cheever, M.A., **"Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers,"** *Immunological Reviews*. **222** (2008) 357–368. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00604.x.
- [12] Olsen, S.K., Ota, N., Kishishita, S., et al., **"Crystal structure of the interleukin-15-interleukin-15 receptor α complex: Insights into trans and cis presentation,"** *Journal of Biological Chemistry*. **282** (2007) 37191–37204. doi:10.1074/jbc.M706150200.
- [13] Burton, J.D., Bamford, R.N., Peters, C., et al., **"A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells,"** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91** (1994) 4935–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8197160> (accessed March 26, 2018).
- [14] Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., et al., **"Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor,"** *Science*. **264** (1994) 965–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8178155> (accessed March 26, 2018).
- [15] Stoklasek, T.A., Schluns, K.S., and Lefrancois, L., **"Combined IL-15/IL-15R Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo,"** *The Journal of Immunology*. **177** (2006) 6072–6080. doi:10.4049/jimmunol.177.9.6072.
- [16] Onu, A., Pohl, T., Krause, H., et al., **"Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms,"** *The Journal of Immunology*. **158** (1997) 255–262.

- [17] Waldmann, T.A., "IL-15 in the life and death of lymphocytes: Immunotherapeutic implications," *Trends in Molecular Medicine*. **9** (2003) 517–521. doi:10.1016/j.molmed.2003.10.005.
- [18] Patidar, M., Yadav, N., and Dalai, S.K., "Interleukin 15 : A key cytokine for immunotherapy," *Cytokine and Growth Factor Reviews*. **31** (2016) 49–59. doi:10.1016/j.cytogfr.2016.06.001.
- [19] Huang, X. and Miller, W., "A time-efficient, linear-space local similarity algorithm," *Advances in Applied Mathematics*. **12** (1991) 337–357. doi:10.1016/0196-8858(91)90017-D.
- [20] Klebanoff, C.A., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., et al., "IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T Cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101** (2004) 1969–1974.
- [21] Steel, J.C., Waldmann, T.A., and Morris, J.C., "Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer," *Trends in Pharmacological Sciences*. **33** (2012) 35–41. doi:10.1016/j.tips.2011.09.004.
- [22] Wu, J., "IL-15 agonists: The cancer cure cytokine," *Journal of Molecular and Genetic Medicine*. **15** (2014) 1–6. doi:10.4172/1747-0862.1000085.IL-15.
- [23] Waldmann, T.A., "The shared and contrasting roles of interleukin-2 (IL-2) and IL-15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy," *Cancer Immunology Research*. **3** (2015) 219–227. doi:10.1080/10937404.2015.1051611.INHALATION.
- [24] Anderson, D.M., Johnson, L., Glaccum, M.B., et al., "Chromosomal assignment and genomic structure of IL15," *Genomics*. **25** (1995) 701–706. doi:10.1016/0888-7543(95)80013-C.
- [25] Eisenman, J., Ahdieh, M., Beers, C., et al., "Interleukin-15 interactions with interleukin-15 receptor complexes: Characterization and species specificity," *Cytokine*. **20** (2002) 121–129. doi:10.1006/cyto.2002.1989.
- [26] Tang, F., Zhao, L., Jiang, Y., et al., "Activity of recombinant human interleukin-15 against tumor recurrence and metastasis in mice," *Cellular & Molecular Immunology*. **5** (2008) 189–196.
- [27] Morris, J.C., Ramlogan-Steel, C.A., Yu, P., et al., "Vaccination with tumor cells expressing IL-15 and IL-15R α inhibit murine breast and prostate cancer," *Gene Therapy*. **21** (2014) 393–401. doi:10.1038/gt.2014.10.
- [28] Gillgrass, A.E., Chew, M. V, Krneta, T., et al., "Overexpression of IL-15 promotes tumor destruction via NK1.1+ cells in a spontaneous breast cancer model," *BMC Cancer*. **15** (2015) 1–15. doi:10.1186/s12885-015-1264-3.
- [29] Miller, J., "Recombinant interleukin-15 in treating patients with advanced melanoma, kidney cancer, non-small cell lung cancer, or squamous cell head and neck cancer," *ClinicalTrials.Gov*. (2016). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01727076?term=il-15&cond=cancer&rank=5> (accessed March 28, 2018).
- [30] Conlon, K.C., Lugli, E., Welles, H.C., et al., "Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer," *Journal of Clinical Oncology*. **33** (2015) 74–82. doi:10.1200/JCO.2014.57.3329.
- [31] Conlon, K.C., "Continuous infusion of rhIL-15 for adults with advanced cancer," *ClinicalTrials.Gov*. (2022). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01572493?term=il-15&cond=cancer&rank=10> (accessed March 28, 2018).
- [32] Forbes, N.S., "Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy," *Nature Reviews Cancer*. **10** (2010) 785–794. doi:10.1038/nrc2934.
- [33] Stoklasek, T.A., Schluns, K.S., and Lefrançois, L., "Combined IL-15/IL-15R α immunotherapy maximizes IL-15

activity *in vivo*,” *Journal of Immunology*. **177** (2006) 6072–6080. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

- [34] Jain, R.K. and Forbes, N.S., “Can engineered bacteria help control cancer?,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98** (2001) 14748–14750. doi:10.1073/pnas.261606598.
- [35] Forbes, N.S., Munn, L.L., Fukumura, D., et al., “Sparse initial entrapment of systemically injected *Salmonella typhimurium* leads to heterogeneous accumulation within tumors,” *Cancer Research*. **63** (2003) 5188–5193.
- [36] Wouters, B.G., Koritzinsky, M., Chiu, R.K., et al., “Modulation of cell death in the tumor microenvironment,” *Seminars in Radiation Oncology*. **13** (2003) 31–41. doi:10.1053/srao.2003.50004.
- [37] Hoffman, R.M., “Tumor-seeking *Salmonella* amino acid auxotrophs,” *Current Opinion in Biotechnology*. **22** (2011) 917–923. doi:10.1016/j.copbio.2011.03.009.
- [38] Hoffman, R.M., “The preclinical discovery of bacterial therapy for the treatment of metastatic cancer with unique advantages,” *Expert Opinion on Drug Discovery*. **7** (2012) 73–83. doi:10.1517/17460441.2012.644534.
- [39] Kim, J.-E., Phan, T.X., Nguyen, V.H., et al., “*Salmonella typhimurium* Suppresses Tumor Growth via the Pro-Inflammatory Cytokine Interleukin-1 β ,” *Theranostics*. **5** (2015) 1328–1342. doi:10.7150/thno.11432.
- [40] Lemmon, M.J., van Zijl, P., Fox, M.E., et al., “Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment,” *Gene Therapy*. **4** (1997) 791–6. doi:10.1038/sj.gt.3300468.
- [41] Gentschev, I., Fensterle, J., Schmidt, A., et al., “Use of a recombinant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice,” *BMC Cancer*. **5** (2005) 1–9. doi:10.1186/1471-2407-5-15.
- [42] Fensterle, J., Bergmann, B., Yone, C.L.R.P., et al., “Cancer immunotherapy based on recombinant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B,” *Cancer Gene Therapy*. **15** (2008) 85–93. doi:10.1038/sj.cgt.7701109.
- [43] Ganai, S., Arenas, R.B., and Forbes, N.S., “Tumour-targeted delivery of TRAIL using *Salmonella typhimurium* enhances breast cancer survival in mice,” *British Journal of Cancer*. **101** (2009) 1683–1691. doi:10.1038/sj.bjc.6605403.
- [44] Jiang, S.-N., Phan, T.X., Nam, T.-K., et al., “Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of *Escherichia coli*-mediated cytolytic therapy and radiotherapy,” *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. **18** (2010) 635–642. doi:10.1038/mt.2009.295.
- [45] Zhu, X., Zhou, P., Cai, J., et al., “Tumor antigen delivered by *Salmonella* III secretion protein fused with heat shock protein 70 induces protection and eradication against murine melanoma,” *Cancer Science*. **101** (2010) 2621–2628. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01722.x.
- [46] Cheadle, E.J. and Jackson, A.M., “Bugs as drugs for cancer,” *Immunology*. **107** (2002) 10–19. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01498.x.
- [47] Hoffman, R.M., “Bugging Tumors,” *Cancer Discov*. **2** (2013) 588–590. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0227.Bugging.
- [48] Roberts, N.J., Zhang, L., Janku, F., et al., “Intratumoral injection of *Clostridium novyi*-NT spores induces antitumor responses,” *Science Translational Medicine*. **6** (2015). doi:10.1126/scitranslmed.3008982.Intratumoral.
- [49] Kim, J.C. and Steinberg, G.D., “The limits of bacillus Calmette-Guerin for carcinoma in situ of the bladder,”

Journal of Urology. **165** (2001) 745–756. doi:10.1016/S0022-5347(05)66518-4.

- [50] Toso, J.F., Gill, V.J., Hwu, P., et al., “Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma,” *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **20** (2002) 142–52. doi:10.1038/nature11130.Reduced.
- [51] Zlotta, A.R., Fleshner, N.E., and Jewett, M.A., “The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: An update,” *Journal of the Canadian Urological Association*. **3** (2009) 199–205.
- [52] Kramer, M.G., Masner, M., Ferreira, F.A., et al., “Bacterial therapy of cancer : promises , limitations , and insights for future directions,” *Frontiers in Microbiology*. **9** (2018) 1–9. doi:10.3389/fmicb.2018.00016.
- [53] Gontero, P., Bohle, A., Malmstrom, P., et al., “The role of Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer,” *European Urology*. **57** (2010) 410–429. doi:10.1016/j.eururo.2009.11.023.
- [54] Ward, A., Anderson, M., Craggs, R.I., et al., “*E. coli* expression and purification of human and cynomolgus IL-15,” *Protein Expression and Purification*. **68** (2009) 42–48. doi:10.1016/j.pep.2009.05.004.
- [55] Han, K., Zhu, X., Liu, B., et al., “IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: High-level co- expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization,” *Cytokine*. **56** (2012) 804–810. doi:10.1016/j.cyto.2011.09.028.
- [56] Nishimura, B.H., Yajima, T., Naiki, Y., et al., “Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo,” *The Journal of Experimental Medicine*. **191** (2000) 157–169.
- [57] Chen, H., Li, N., Xie, Y., et al., “Purification of inclusion bodies using PEG precipitation under denaturing conditions to produce recombinant therapeutic proteins from *Escherichia coli*,” *Applied Microbiology and Biotechnology*. **101** (2017) 5267–5278. doi:10.1007/s00253-017-8265-x.
- [58] Shi, S., Chen, H., Jiang, H., et al., “A novel self-cleavable tag Zbasic-ΔI-CM and its application in the soluble expression of recombinant human interleukin-15 in *Escherichia coli*,” *Applied Microbiology and Biotechnology*. **101** (2017) 1133–1142. doi:10.1007/s00253-016-7848-2.
- [59] Cirone, P., Shen, F., and Chang, P.L., “A multiprong approach to cancer gene therapy by coencapsulated cells,” *Cancer Gene Therapy*. **12** (2005) 369–380. doi:10.1038/sj.cgt.7700786.
- [60] Pugsley, A.P., “The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria,” *Microbiological Reviews*. **57** (1993) 50–108.
- [61] Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., et al., “Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights,” *Nature Reviews Microbiology*. **13** (2015) 343–359. doi:10.1038/nrmicro3456.
- [62] Fath, M.J. and Kolter, R., “ABC transporters: bacterial exporters,” *Microbiological Reviews*. **57** (1993) 995–1017. doi:10.1016/S0005-2736(99)00158-3.
- [63] Delepelaire, P., “Type I secretion in gram-negative bacteria,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. **1694** (2004) 149–161. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.05.001.
- [64] Holland, I.B., Schmitt, L., and Young, J., “Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (Review),” *Molecular Membrane Biology*. **22** (2005) 29–39. doi:10.1080/09687860500042013.
- [65] Higgins, C.F., “ABC transporters: from microorganisms to man,” *Annual Review of Cell Biology*. **8** (1992) 67–113. doi:10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.

- [66] Binet, R., Létoffé, S., Ghigo, J.M., et al., "**Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters - A review,**" *Gene*. **192** (1997) 7–11. doi:10.1016/S0378-1119(96)00829-3.
- [67] Thanassi, D.G. and Hultgren, S.J., "**Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane,**" *Current Opinion in Cell Biology*. **12** (2000) 420–430. doi:10.1016/S0955-0674(00)00111-3.
- [68] Koronakis, V., Eswaran, J., and Hughes, C., "**Structure and function of TolC: The bacterial exit duct for proteins and drugs,**" *Annual Review of Biochemistry*. **73** (2004) 467–489. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074104.
- [69] Havarstein, L.S., Diep, D.B., and Nes, I.F., "**A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export,**" *Molecular Microbiology*. **16** (1995) 229–240. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02295.x.
- [70] Klaenhammer, T.R., "**Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria,**" *FEMS Microbiology Reviews*. **12** (1993) 39–85. doi:10.1016/0168-6445(93)90057-G.
- [71] Havarstein, L.S., Holo, H., and Nes, I.F., "**The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria,**" *Microbiology*. **140** (1994) 2383–2389. doi:10.1099/13500872-140-9-2383.
- [72] Poey, M.E., Azpiroz, M.F., and Laviña, M., "**Comparative Analysis of Chromosome-Encoded Microcins,**" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50** (2006) 1411–1418. doi:10.1186/gb-2006-7-4-r30.
- [73] Blight, M.A. and Holland, I.B., "**Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator,**" *Trends in Biotechnology*. **12** (1994) 450–455. doi:10.1016/0167-7799(94)90020-5.
- [74] Delepelaire, P. and Wandersman, C., "**Protein Secretion in Gram-negative Bacteria. The extracellular metalloprotease B from *Erwinia chrysanthemi* contains a C-terminal secretion signal analogous to that of *Escherichia coli* α -hemolysin,**" *The Journal of Biological Chemistry*. **265** (1990) 17118–17125.
- [75] Guzzo, J., Duong, F., Wandersman, C., et al., "**The secretion genes of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease are functionally related to those of *Erwinia chrysanthemi* proteases and *Escherichia coli* α -haemolysin,**" *Molecular Microbiology*. **5** (1991) 447–453. doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb02128.x.
- [76] Rodriguez, J.M., Martinez, M.I., Horn, N., et al., "**Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria,**" *International Journal of Food Microbiology*. **80** (2003) 101–116.
- [77] Allison, G.E., Ahn, C., Stiles, M.E., et al., "**Utilization of the leucocin-A export system in *Leuconostoc gelidum* for production of a *Lactobacillus* bacteriocin,**" *FEMS Microbiology Letters*. **131** (1995) 87–93. doi:10.1016/0378-1097(95)00241-V.
- [78] van Belkum, M. and Stiles, M.E., "**Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*,**" *Applied and Environmental Microbiology*. **61** (1995) 3573–3579.
- [79] Horn, N., Martínez, M.I., Martínez, J.M., et al., "**Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcal A secretory apparatus,**" *Applied and Environmental Microbiology*. **64** (1998) 818–823.
- [80] Azpiroz, M.F., Rodríguez, E., and Laviña, M., "**The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V,**" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45** (2001) 969–972. doi:10.1128/AAC.45.3.969-972.2001.
- [81] Azpiroz, M.F. and Laviña, M., "**Modular structure of microcin H47 and colicin V,**" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51** (2007) 2412–2419. doi:10.1128/AAC.01606-06.
- [82] Van Belkum, M.J., Worobo, R.W., and Stiles, M.E., "**Double-glycine-type leader peptides direct secretion of**

- bacteriocins by ABC transporters: Colicin V secretion in *Lactococcus lactis*,** *Molecular Microbiology*. **23** (1997) 1293–1301. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.3111677.x.
- [83] Axelsson, L., Katla, T., Bjornslett, M., et al., “**A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*,**” *FEMS Microbiology Letters*. **168** (1998) 137–143. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13266.x.
- [84] Hahn, H.P. and Von Specht, B.U., “**Secretory delivery of recombinant proteins in attenuated *Salmonella* strains: Potential and limitations of Type I protein transporters,**” *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **37** (2003) 87–98. doi:10.1016/S0928-8244(03)00092-0.
- [85] Li, Y., Hess, C., Von Specht, B.U., et al., “**Molecular analysis of hemolysin-mediated secretion of a human interleukin-6 fusion protein in *Salmonella typhimurium*,**” *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **27** (2000) 333–340. doi:10.1016/S0928-8244(99)00211-4.
- [86] Kenny, B., Haigh, R., and Holland, I.B., “**Analysis of the haemolysin transport process through the secretion from *Escherichia coli* of PCM, CAT or β -galactosidase fused to the Hly C-terminal signal domain,**” *Molecular Microbiology*. **5** (1991) 2557–2568. doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb02102.x.
- [87] Kramer, M.G., Masner, M., Casales, E., et al., “**Neoadjuvant administration of Semliki Forest virus expressing interleukin-12 combined with attenuated *Salmonella* eradicates breast cancer metastasis and achieves long-term survival in immunocompetent mice,**” *BMC Cancer*. **15** (2015) 620–635. doi:10.1186/s12885-015-1618-x.
- [88] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., “**Molecular cloning,**” 1989, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, .
- [89] Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., “**One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products,**” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97** (2000) 6640–5. doi:10.1073/pnas.120163297.
- [90] Casadaban, M.J., “**Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu,**” *Journal of Molecular Biology*. **104** (1976) 541–555. doi:10.1016/0022-2836(76)90119-4.
- [91] Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J., “**Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors,**” *Gene*. **33** (1985) 103–119. doi:10.1016/0378-1119(85)90120-9.
- [92] Azpiroz, M.F. and Laviña, M., “**Involvement of Enterobactin Synthesis Pathway in Production of Microcin H47,**” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48** (2004) 1235–1241. doi:10.1128/AAC.48.4.1235-1241.2004.
- [93] Azpiroz, M.F., Poey, M.E., and Laviña, M., “**Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*,**” *Microbial Pathogenesis*. **47** (2009) 274–280. doi:10.1016/j.micpath.2009.09.003.
- [94] Azpiroz, M.F., “**Análisis genético del sistema de secreción del antibiótico peptídico microcina H47,**” Universidad de la República, 1996.
- [95] Hall, T.A., “**BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT,**” *Nucleic Acids Symposium Series*. **41** (1999) 95–98. doi:citeulike-article-id:691774.
- [96] “**Protein Calculator v3.4,**” (2013). <http://protecalc.sourceforge.net/>.
- [97] Gaggero, C., Moreno, F., and Laviña, M., “**Genetic Analysis of Microcin H47 Antibiotic System,**” *American Society for Microbiology*. **175** (1993) 5420–5427.

- [98] Ngo, A.N., Ezoulin, M.J.M., Ibrahima, Y., et al., "Optimal Concentration of 2,2,2-Trichloroacetic Acid for Protein Precipitation Based on Response Surface Methodology," *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. **5** (2014). doi:10.4172/2155-9872.1000198.
- [99] Gilson, L., Mahanty, H.K., and Kolter, R., "Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity," *Journal of Bacteriology*. **169** (1987) 2466–2470. doi:10.1128/jb.169.6.2466-2470.1987.
- [100] Gilson, L., Mahanty, H.K., and Kolter, R., "Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V," *The EMBO Journal*. **9** (1990) 3875–84. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=552155&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [101] Fath, M.J., Zhang, L.H., Kolter, R., et al., "Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants," *Biochemistry*. **33** (1994) 6911–6917. doi:10.1021/bi00188a021.
- [102] Hong Zhang, L., Fath, M.J., Mahanty, H.K., et al., "Genetic analysis of the Colicin V secretion pathway," *Genetics Society of America*. **141** (1995) 25–32.
- [103] Sugimura, K. and Higashi, N., "A novel outer-membrane-associated protease in *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*. **170** (1988) 3650–3654. doi:10.1128/JB.170.8.3650-3654.1988.
- [104] Gottesman, S., "Proteases and their targets in *Escherichia coli*," *Annual Review of Genetics*. **30** (1996) 465–506. doi:10.1146/annurev.genet.30.1.465.
- [105] Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., et al., "Characterization of Leucocin-a-Ual-187 and Cloning of the Bacteriocin Gene From *Leuconostoc-Gelidum*," *Journal of Bacteriology*. **173** (1991) 7491–7500.
- [106] Romano, M., Fusco, G., Choudhury, H.G., et al., "Structural Basis for Natural Product Selection and Export by Bacterial ABC Transporters," *ACS Chemical Biology*. **13** (2018) 1598–1609. doi:10.1021/acscchembio.8b00226.

ANEXO

Medios de cultivo

Medio completo Luria-Bertani (LB)

Bactotripton.....10 g
Extracto de levadura.....5.0 g
NaCl.....10 g
Agua destilada.....c.s.p. 1 L.

El medio LB sólido se prepara añadiendo 15g de agar por litro de medio de cultivo. Se esteriliza por autoclave (30 min. a 121°C).

Medio mínimo M63 (MM)

K₂HPO₄.....9,8 g
KH₂PO₄.....4,5 g
(NH₄)₂SO₄.....2 g
Agua destilada.....c.s.p. 1 L

El MM sólido se prepara añadiendo 15g de agar por litro de medio de cultivo. Se esteriliza por autoclave (30min. a 121°C) y posteriormente se agrega 1 mL de MgSO₄·7H₂O (1M), 10 mL de Glucosa al 20% y 1 mL de Vitamina B1 (1 mg/ml).

Soluciones

Soluciones tampón

TAE 1X

Tris-base pH 7.6.....40 mM
Ácido acético glacial.....20 mM
EDTA (0.5M) (pH 8).....1 mM
Se utiliza como solvente agua destilada.

Tampón de carga Laemmli 6X

Glicerol.....40%,
Azul de bromofenol.....0.25%,
Xylene cyanol FF0.25%
B-mercaptoetanol.....10%
Agua destilada.....47.5%
SDS..... 2%

Tampón STET

Tris-HCl 1 M pH 8.....5 mL
EDTA 250 mM pH 8.....20 mL
Tritón 100X.....5 mL
Sacarosa.....8 g
Agua destilada.....c.s.p. 100 mL

PBS 10X

KCL.....2g
NaCl.....80g
NaH₂PO₄ anhidro..... 2g
Na₂HPO₄·12H₂O.....28.9g
Agua destilada.....c.s.p. 1 L

Tis-glicina-SDS

Tris25 mM
Glicina192 mM
SDS1%
Se utiliza como solvente agua destilada.

Soluciones para tinción

Azul de Coomassie R-250

Azul brillante de coomassie R-250.....0.25%
Ácido acético.....10%
Metanol.....50%
Agua.....39.75%

Solución decolorante

Ácido acético.....7.5%
Metanol.....5%
Agua.....87.5%

Azul de Coomassie coloidal G-250

Azul Brillante de Coomassie G-250.....0.2%
Sulfato de aluminio-(14-18 hidrato).....5%
Etanol.....10%
Ácido ortofosfórico.....2%
Agua destilada.....82,8%

Solución decolorante

Etanol10%
Ácido ortofosfórico.....2%
Agua destilada.....88%

Soluciones para Western blot

Solución de bloqueo

Tween 200.05%
Leche descremada..... 6%
PBS.....93.95%

Solución de transferencia: Tampón Tris-glicina pH 8,3.

Tris-base25 mM
Glicina192 mM
Metanol.....20%