



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Universidad de la República

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Magister en Ciencias Biológicas en el marco del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Evaluación de la secreción heteróloga de dos variantes hormonales por parte de exportadores ABC bacterianos

Valeria Flórez Cardona

Director de tesis: Dra. Ma. Fernanda Azpiroz, profesor adjunto Grado 3 de la Sección de Fisiología y Genética Bacterianas de la Facultad de Ciencias.

Co-director de tesis: Dra. Magela D. Laviña, profesor agregado Grado 4 de la Sección de Fisiología y Genética Bacterianas de la Facultad de Ciencias.

**Sección de Fisiología y Genética Bacterianas
Facultad de Ciencias
Montevideo, Uruguay
2022**

DEDICATORIA

A Josefina, Paula, Evelin y Ethel. Mujeres valientes.

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo de la sección de Fisiología y Genética Bacterianas: a mis tutoras, Fernanda Azpiroz y Magela Laviña, por sus años dedicadas a mi formación durante la maestría, por su dedicación, compromiso y paciencia en los momentos de frustración. Gracias por infundir, ante todo, el pensamiento crítico. A Eliana, Eloisa y Alicia por su apoyo, buena disposición y ayuda en los momentos más caóticos y decisivos. Gracias a la sección por hacerme sentir parte del equipo, por las horas de trabajo, almuerzos y consejos compartidos.

A Juan José Marizcurrena, por brindarme su conocimiento, por ayudarme en los momentos decisivos del proyecto. Gracias por todas las veces que me dio buenos ánimos, por tener una solución a la mano y por ayudarme a abrirme camino en el mundo de la Ciencia. Asimismo, gracias a todo el equipo del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, siempre bien dispuestos a solucionar dudas que surgen durante los experimentos.

A Paola Hernández, del laboratorio de Epigenética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, por enseñarme de manera muy empática nuevos conocimientos y por su paciencia cuando le arruiné un cultivo de células.

A mi familia. A mi padre y mis dos madres por siempre impulsarme en mis proyectos, por creer en mis locuras, por infundirme el amor al estudio, por mi crianza y por alentarme siempre a explorar el mundo.

A mi tía Ethel, madre de toda la familia Romero Gamarra, gracias por todo lo que has hecho por nuestra familia. Gracias por inculcarme la lectura desde que era una niña y por todos tus consejos de vida.

A Emilio, mi amor y mejor amigo. Gracias por ser incondicional, sin su apoyo esto ni hubiera sido posible.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y a la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, por otorgarme la oportunidad de realizar un posgrado en ciencias básicas.

Finalmente, a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) que brindaron el apoyo económico en forma de becas y proyectos que permitieron realizar esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes generales.....	1
1.1.1. Sistemas de secreción en bacterias Gram negativas	1
1.1.2. Sistemas de secreción tipo I	2
1.1.3. Secreción de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> empleando el sistema de secreción tipo I	7
1.1.4. Generalidades de la hormona paratiroidea humana (PTH)	8
1.2. Antecedentes específicos	9
2. HIPOTESIS	12
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo general	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1. Cepas	13
4.2. Plásmidos	13
4.3. Condiciones de cultivo	14
4.4. Construcción de <i>E. coli</i> K12 MC4100 $\Delta lon\Delta ompT::kan$	15
4.5. Manipulación del ADN	15
4.6. Transformación de cepas de <i>E. coli</i>	16
4.7. Ensayo de producción de ColV	17
4.8. Ensayo de réplica en placa	17

4.9.Ensayos de producción de las variantes hormonales	18
4.9.1. Análisis del crecimiento de las cepas	18
4.9.2. Cultivos para la producción de las variantes hormonales	18
4.9.3. Procesamiento de los sobrenadantes y las fracciones celulares	18
4.9.4. Determinación de la actividad β -galactosidasa	19
4.9.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida	19
4.9.6. Espectrometría de masas	20
4.9.7. Inmunoensayos	20
4.9.7.1.Dot Blot	20
4.9.7.2.Western Blot	20
5. RESULTADOS	22
5.1. Clonado de los genes codificantes para los transportadores AB y EF	23
5.1.1. Ensayo de estabilidad genética de los plásmidos pValAB y pValeF	28
5.2.Diseño de los plásmidos codificantes para los péptidos DS-PTH34 y DS-PTH84	33
5.3.Construcción de las cepas para la producción de las variantes de la hormona paratiroidea humana ..	
.....	36
5.4.Evaluación de la producción recombinante de las variantes hormonales	37
5.4.1. Análisis del crecimiento de las cepas control y experimentales	37
5.4.2. Análisis de los sobrenadantes	38
5.4.3. Análisis de las fracciones celulares	41
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES	49
8. BILIOGRAFÍA	50

RESUMEN

La secreción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* continúa siendo un tema de investigación de gran interés para la industria biotecnológica, especialmente porque la bacteria es fácilmente cultivable y exporta naturalmente muy poca cantidad de proteínas al medio extracelular. En este trabajo se analiza un tipo de transportador ABC de *E. coli* encargado de la secreción de unos péptidos antibióticos denominados microcinas. Estos péptidos comparten un dominio de secreción (DS) en su extremo amino terminal. El DS es reconocido y cortado por el exportador ABC durante la secreción de modo que la microcina alcanza el medio extracelular sin este dominio. Previamente en el laboratorio se había determinado que estos transportadores, denominados AB y EF, pueden secretar de forma heteróloga algunas microcinas. En base a lo anterior, se eligió ensayar la secreción de dos variantes de la hormona paratiroidea humana usando estos dos transportadores.

La estrategia general consistió en construir péptidos híbridos formados por el DS de una microcina seguido del péptido hormonal, de modo que el transportador reconozca y procese el DS secretando el péptido recombinante en su forma nativa. La detección e identificación de las hormonas en el sobrenadante de los cultivos se efectuó por SDS-PAGE, Western Blot y espectrometría de masas.

Antes de iniciar los ensayos de producción, se evaluó la funcionalidad de los transportadores a lo largo de sucesivas generaciones celulares y sólo el transportador AB logró mantenerse funcional. Por ello, los ensayos de producción se realizaron sólo con este último. Se recuperaron en el sobrenadante los péptidos hormonales en su forma nativa, confirmando así la hipótesis del trabajo. Es así que el transportador AB surge como una nueva alternativa para la secreción de péptidos recombinantes en *E. coli*, ya que simplificaría el proceso de producción al poder purificar péptidos desde el medio extracelular en su forma nativa.

CONTENIDO DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Microcinas de mayor masa molecular con su respectivo transportador	5
Tabla 2. Secuencia aminoacídica de las variantes de la hormona paratiroidea	9
Tabla 3. Oligonucleótidos usados para las reacciones de amplificación	16
Tabla 4. Características de los péptidos hormonales	36
Tabla 5. Cepas empleadas para los ensayos de producción	37

Figuras

Figura 1. Sistemas de secreción en bacterias Gram negativas	2
Figura 2. Modelo teórico del sistema de secreción de tipo I de Colicina V	6
Figura 3. Modelo de producción de las variantes hormonales	22
Figura 4. Estructura genética de los plásmidos pValEF y pValAB	24
Figura 5. Sistema genético ColV y amplicones clonados	26
Figura 6. Ensayo de funcionalidad de los transportadores EF y AB	27
Figura 7. Diseño experimental del ensayo de estabilidad de los plásmidos pValAB y pValEF	28
Figura 8. Ensayo de estabilidad genética de los plásmidos codificantes de los transportadores AB y EF.	31
Figura 9. Análisis genético de la pérdida de funcionalidad del transportador EF	32
Figura 10. Ensayo de estabilidad genética del plásmido pValAB en BL21 (DE3)	33
Figura 11. Estructura genética de los plásmidos pET-PTH34 y pET-PTH84	34
Figura 12. Secuencia de las fusiones génicas clonadas en pET26b(+)	35
Figura 13. Crecimiento de las cepas que portan los plásmidos pET-PTH34 y pET-PTH84	37
Figura 14. Secreción de las variantes de PTH	39
Figura 15. Identificación por Western Blot de los péptidos hormonales secretados	41
Figura 16. Análisis de las fracciones celulares	43

1. INTRODUCCIÓN

La secreción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* ha sido estudiada a lo largo de estas últimas dos décadas. Si bien se han obtenido algunos resultados auspiciosos, aún no se pueden comparar con los altos estándares de producción intracelular. Es así que sortear la barrera de la envoltura celular y lograr obtener una proteína en el medio extracelular continúa siendo un desafío para la producción recombinante de proteínas en *E. coli*. Por lo tanto, es interesante profundizar en el estudio de los sistemas de secreción, ya sea mejorando las estrategias ya empleadas como analizando nuevos sistemas de secreción que denoten características útiles para la producción recombinante de proteínas.

En esta tesis, se plantea evaluar un sistema de secreción tipo I de enterobacterias como una nueva alternativa para la secreción de proteínas de interés biotecnológico en *E. coli*. Concretamente, los sustratos serán dos variantes de la hormona paratiroidea humana, que son moléculas de naturaleza peptídica, usadas como tratamiento de enfermedades óseas.

1.1. Antecedentes generales

1.1.1. Sistemas de secreción en bacterias Gram negativas

Las bacterias sintetizan una gran variedad de moléculas en el citoplasma; algunas deben ser secretadas en aras de ser eliminadas o de cumplir funciones en el medio extracelular. En bacterias Gram negativas, parte de estos metabolitos deben atravesar dos membranas celulares, la interna y la externa, para ser secretados. Es por ello que han evolucionado para desarrollar seis sistemas de secreción (hasta ahora descritos), que, mediante diferentes mecanismos, permiten el transporte de esos compuestos fuera de la célula. En el caso de las proteínas, su transporte puede ocurrir en un solo paso o en dos pasos consecutivos. Los sistemas de secreción tipo I, III, IV y VI forman canales que se expanden en ambas membranas, lo que les permite transportar sustratos directamente desde el citoplasma hasta el medio extracelular en un solo paso. Por su parte, los sistemas tipo II y V requieren que primero la proteína sea transportada hasta el periplasma para poder llevar a cabo la translocación a través de la membrana externa hacia el medio extracelular. El primer paso lo realizan las vías Sec o Tat, las cuales reconocen una señal de secreción en el extremo amino terminal de la proteína permitiéndole atravesar la membrana interna (Fig. 1) (1,2).

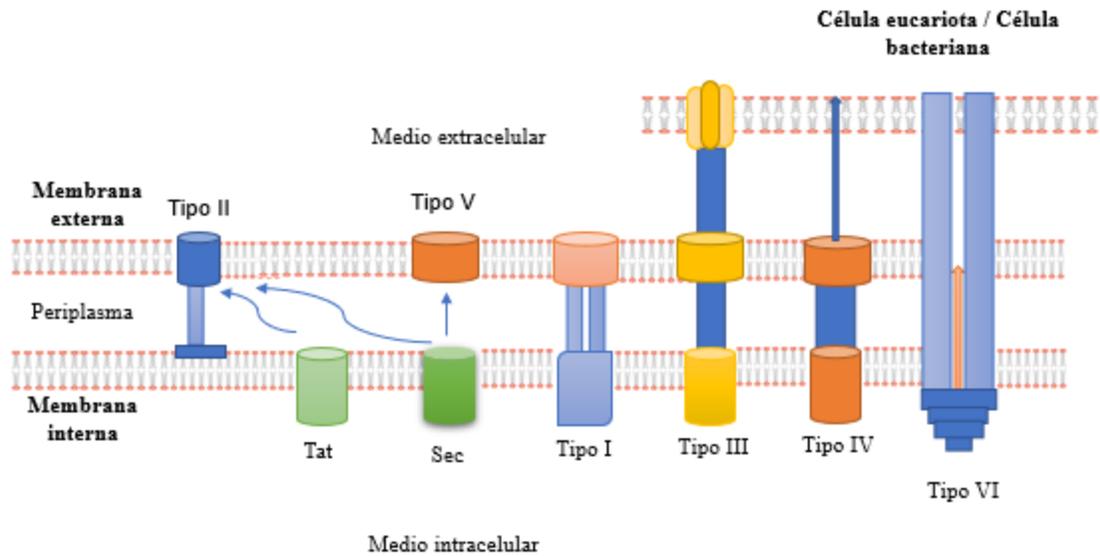


Figura 1. Sistemas de secreción en bacterias Gram negativas.

1.1.2. Sistemas de secreción tipo I

El sistema de secreción tipo I (SS1) tiene la capacidad de secretar una variedad de sustratos, en su mayoría de naturaleza proteica, desde el citoplasma al medio extracelular, según se postula en un único paso. Está compuesto por tres proteínas: el exportador ABC, el segundo componente y la proteína de membrana externa (3–5).

Un exportador ABC es una proteína que opera en forma dimérica. Se caracteriza por tener un dominio transmembranal donde se encuentra el sitio de reconocimiento de una señal de secreción en el sustrato, y un dominio de unión a nucleótidos, a través del que se une e hidroliza ATP, proveyendo de energía para la translocación. Este tipo de exportadores se encuentra en casi todas las especies y se distribuye en todos los dominios de la vida, mediando el transporte de diversos sustratos como: péptidos, ácidos grasos, azúcares, iones, entre otros. Por ejemplo, en *E. coli*, los exportadores ABC son la familia de transportadores más extensa (6). Pertenecen a la superfamilia ABC-ATPasa que se caracteriza por tener el motivo de Walker (7). Solo aquellas proteínas tipo ABC que se acoplan a una proteína de fusión de membranas y cuya función es secretar sustratos, son llamados exportadores ABC (7–9). Particularmente, los exportadores ABC que solo secretan proteínas contienen adicionalmente un dominio amino terminal de tipo cisteín-proteasa que pertenece a la superfamilia C39 peptidasa. Este dominio es necesario para el reclutamiento del sustrato y en algunos casos ejecuta el corte de la señal de secreción (3,10). El segundo

componente es una proteína monomérica de fusión de membranas conformada por dos dominios transmembranales que forman un canal a través del periplasma. Se extiende desde la membrana interna, donde se acopla con el exportador ABC, hasta la membrana externa, contactando con el tercer componente (11,12). El exportador ABC y la proteína de fusión de membranas se denominan en su conjunto transportador ABC, y están codificados en el mismo sistema genético junto con el gen para su sustrato. Por último, el tercer componente forma un canal que se ancla en el periplasma a la proteína de fusión y se extiende en la membrana externa formando un canal. Generalmente, esta función la cumple TolC. Ésta es una porina trimérica que pertenece a una familia de proteínas integrales de membrana externa muy conservada entre bacterias Gram negativas, especialmente en enterobacterias. Asimismo, tiene un papel importante en la secreción de toxinas como α -hemolisina y en la resistencia antibiótica (13). A diferencia de los primeros dos elementos, TolC se encuentra codificado fuera del sistema genético del transportador, integrando varios sistemas de secreción de tipo I y participando en la exportación de distintos sustratos (14,15).

En cuanto al mecanismo de secreción, existen algunos modelos basados fundamentalmente en el análisis estructural del exportador ABC. Se postula que inicialmente el exportador ABC une su sustrato a través del reconocimiento de la señal de secreción. A continuación, une una molécula de ATP y cambia su conformación estructural dando un giro de 90° sobre su eje que provoca la internalización del sustrato. Enseguida, éste atraviesa el canal que forma la proteína de fusión de membranas y la de membrana externa, alcanzando el medio extracelular. Posteriormente, el exportador ABC hidroliza la molécula de ATP y esto permite que regrese a su conformación original, para iniciar un nuevo ciclo de secreción (3,5,16,17). Los SS1 se encuentran principalmente en bacterias patógenas como *E. coli* patogénica, *Vibrio cholerae* y *Bordetella pertussis* (18–20). Se han relacionado, fundamentalmente, con la secreción de exotoxinas, péptidos antimicrobianos y procesos de resistencia antibiótica, funcionando como bombas de eflujo.

Entre los sistemas de secreción tipo I pueden distinguirse aquéllos que translocan proteínas o los que translocan péptidos. Además de la extensión, una de las principales diferencias radica en la señal o dominio de secreción (DS) presente en el sustrato. En el caso de proteínas, éste se encuentra en el extremo carboxilo (C) terminal y lo conforman, en promedio, 50 aminoácidos (21,22). Los exportadores ABC de proteínas tienen el dominio cisteín-proteasa no funcional; por lo tanto, reconocen la señal de secreción, pero son incapaces de efectuar la proteólisis de la misma. Se ha descrito que pueden secretar una amplia variedad de sustratos naturales, incluyendo toxinas, proteasas, lipasas, entre otras, con pesos moleculares que van desde los 19 kDa hasta los 900 kDa (23). El ejemplo más estudiado es el sistema de secreción de

la toxina α -hemolisina (HlyA, de 181 aa) producida por cepas patógenas de *E. coli*. Este transportador, denominado HlyBD, ha sido el paradigma de los estudios estructurales y funcionales de este tipo de sistemas (21). Asimismo, se ha demostrado su capacidad de secretar de forma heteróloga otros sustratos naturalmente secretados por transportadores ABC e incluso proteínas recombinantes a las que se les había añadido el DS de la toxina (24,25).

Por otro lado, los sustratos péptidos (hasta unos 100 aa-) portan un DS de generalmente 15 aminoácidos que se ubica en el extremo amino (N) terminal. Estos dominios de secreción conservan una alta homología en regiones hidrofóbicas e hidrofílicas y en ciertas posiciones aminoacídicas, en particular tienen un motivo de tipo “doble glicina” terminal (Gly-Gly, Gly-Ala, Gly-Ser). Los exportadores ABC de péptidos portan el dominio cisteín-proteasa funcional, pudiendo así efectuar el corte que separa el DS del resto del péptido durante la secreción (26). A éstos se les ha denominado exportadores ABC bifuncionales, porque ejecutan funciones de proteólisis y de secreción de manera concomitante. Hasta ahora los exportadores de péptidos que han sido descritos secretan bacteriocinas y algunas microcinas, antibióticos péptidos producidos por bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente. Algunos de estos péptidos antibióticos adquieren su funcionalidad cuando el exportador les retira el dominio de secreción (26–28). Cabe mencionar que los transportadores ABC de péptidos tienen cierto grado de versatilidad en cuanto a los sustratos que exportan, demostrándose la secreción heteróloga tanto en bacterias Gram positivas como negativas. Concretamente, se ha reportado que algunos de estos transportadores pueden secretar más de una bacteriocina o microcina (según sea el caso), reconociendo en ellas cualquiera de sus dominios de tipo doble glicina. Más aún, se ha visto que son capaces de secretar péptidos híbridos compuestos por el DS específico de su sustrato fusionado a la porción madura de otro péptido antibiótico, ya sea que éste último utilice o no el mismo tipo de sistema de secreción. Los niveles de secreción fueron variables y la funcionalidad en ningún caso fue abolida (27,29–33).

Los transportadores ABC de péptidos en bacterias Gram negativas se reducen a los que secretan un grupo de antibióticos llamados “microcinas de mayor masa molecular”. Hasta el momento se han descrito cinco microcinas: H47 (MccH47), I47 (MccI47), M (MccM), E492 (MccE492) y Colicina V (ColV); éstas son producidas por cepas patógenas de *E. coli* a excepción de E492 que es producida por *Klebsiella pneumoniae* (20,33,34). Estos péptidos se caracterizan por ser de síntesis ribosómica y tener tres dominios: i) uno de secreción, que tiene 15 aa en el extremo N-terminal (de tipo doble glicina); ii) uno tóxico, que le confiere la especificidad antibiótica, y iii) uno de captación en el extremo C-terminal, que determina su

espectro de acción (33). Cabe mencionar que estos péptidos alcanzan el medio extracelular en su forma madura gracias a la acción que ejecuta el dominio proteolítico de sus exportadores ABC al cortar el DS. La porción madura de estas microcinas consta de entre 60 a 90 residuos aminoacídicos, tiene una masa molecular menor a 10 kDa, exhibiendo una alta hidrofobicidad y un elevado contenido en serinas y glicinas (Tabla 1). Los determinantes para la producción de estas microcinas se organizan en sistemas genéticos que aseguran la síntesis del péptido antibiótico, su inmunidad específica y la secreción a través de su respectivo transportador ABC. A este último lo complementa TolC, que se encuentra codificado fuera del sistema genético en el cromosoma de la bacteria.

Tabla 1. Microcinas de mayor masa molecular con su respectivo transportador

Microcina	D.S. ^(a)	Porción madura ^(a)	Extensión	Transportador
H47	MR E IT E S Q L R YISGA	GGAPATSANAAGAAAIVGALAGIPGGPLGVVVGAVSAGLTTAIGSTVGSASSAGGGSS	60 aa.	EF
I47	MR E ISDNMLDSVKGG	MNLNGLPASTNVID L R G K D M G TY I DANGACWAP D T P S IIMYPGGSGPSYSMSSTSSANS	62 aa.	EF
M	MR K LS E NE I K Q ISGG	D G N D G QA E L I AIGSLAGTFISPGFGSIAGAYIG D K V H SWATTATVSPMSPSGIGLSSQFGSG R GTSSASSAGSGS	77 aa.	EF
ColV	MR T LT L NE L DSVSGG	AS G R D IAMAIGT L SGQFVAGGIGAAAGGVAGGAI D Y AST H K P N P AMSPSG L GGT I K Q K P E G IP S EAWNYA A GR LCN W SENNLS D V C L	90 aa.	AB
E492	MR E IS Q K D L N LAFGA	G E T D P N T Q L L N D LGNMAWGAALGAPGGLGSAALGAA GGAL Q T V G Q GL I D H G FPV N VP I P V L I G P SW N G S G S G Y N SATSSSGSGS	84 aa.	HG

^(a)Se indican en rojo y azul los aminoácidos con carga positiva y negativa, respectivamente.

Estos sistemas transportadores comparten un alto porcentaje de homología en la secuencia aminoacídica del exportador ABC y de la proteína de fusión de membranas. Las microcinas H47, I47 y M se encuentran codificadas en el mismo sistema genético, teniendo MccI47 y MccM una presencia mutuamente excluyente (se sintetiza conjuntamente MccH47 y MccM o MccH47 y MccI47). En ambos casos, la secreción es llevada a cabo por el mismo transportador, denominado EF. En cuanto a ColV y MccE492, cada una es secretada por un transportador ABC específico denominado AB y HG, respectivamente (Tabla 1) (20,32,35,36).

El transportador AB ha sido el más caracterizado dentro de los SS1 de las microcinas de mayor masa molecular. Sus genes forman parte del sistema genético ColV, que se organiza en dos operones convergentes: uno integrado por los genes *cvi* y *cvaC*, que codifican para la inmunidad específica y el péptido antibiótico, respectivamente; y el segundo contiene los genes codificantes para el transportador. Este último comprende a *cvaA*, con una extensión de 1.275 pb, que codifica para la proteína de fusión de

membranas (A); y a *cvaB*, con una extensión de 2.097 pb, que codifica para el exportador ABC (B). Es así que las proteínas B (698 aa) y A (424 aa) junto con TolC (493 aa) forman el sistema de secreción de tipo I de ColV (Fig. 2) (36).

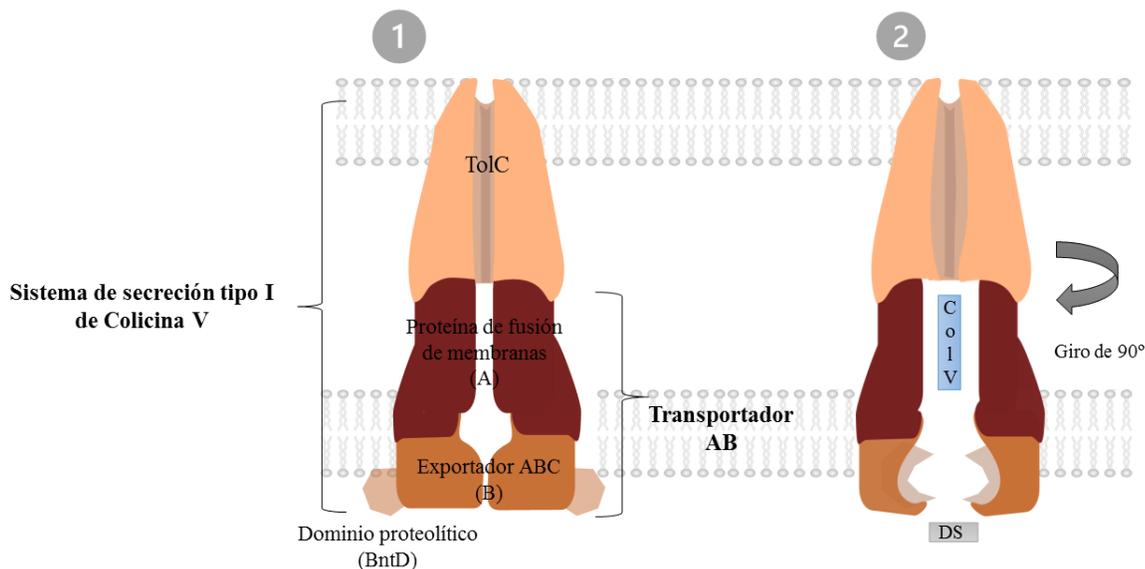


Figura 2. Modelo teórico del sistema de secreción de tipo I de Colicina V. 1) Conformación del sistema en ausencia de la microcina. 2) Conformación del sistema cuando une la microcina, corta su DS y prosigue la secreción.

En particular, se demostró que el exportador B tiene un dominio cisteín-proteasa en el extremo N-terminal que pertenece a la superfamilia de peptidasas C39. Tiene una actividad proteolítica dependiente de Ca^{2+} y su sitio activo recae sobre los residuos aminoácidos Cys³², His¹⁰⁵ y Asp¹²¹ (37,38). En efecto, ColV es sintetizada como un péptido de 103 aa, cuyo dominio de secreción es cortado por el exportador, saliendo al medio extracelular su porción madura de 88 aa (39,40). Dicho péptido maduro tiene un puente disulfuro entre sus dos cisteínas carboxilo terminales que se formaría en el periplasma durante la secreción, siendo esencial para su actividad tóxica (39, 41).

En el caso de los transportadores EF y HG, no hay estudios estructurales de sus componentes, pero los análisis genéticos sugieren que actuarían de manera similar al transportador AB (32,35). Más aún, las MccE492, MccM y MccH47 han sido purificadas desde el medio extracelular, corroborando que los péptidos maduros carecen del DS de tipo doble glicina en su extremo N-terminal (42,43). En este caso, las microcinas presentan una modificación postraduccional en su extremo C-terminal que consiste en la adición de una molécula del sideróforo salmoquelina, que define el espectro de acción antibiótica (43–

45). Al igual que el transportador AB, los determinantes genéticos para los transportadores EF y HG se organizan en un operón, siempre dentro del sistema genético de sus respectivas microcinas. En el caso del transportador EF, primero se encuentra el gen *mchE*, con una extensión de 1.275 pb, codificante para la proteína de fusión de membranas (E), seguido de *mchF*, con una extensión de 2.097 pb, que codifica para el exportador ABC (F). Es así que las proteínas F (698 aa) y E (424 aa) junto con TolC forman el sistema de secreción tipo I de las microcinas H47, I47 y M. En cuanto al transportador de la MccE492, se ha determinado que además de los genes *mceH* y *mceG*, que codifican para la proteína de fusión de membranas (H) y el exportador ABC (G), respectivamente, es necesario el producto de otro gen del sistema para la secreción de la microcina (35).

1.1.3. Secreción de proteínas recombinantes en *E. coli* empleando el sistema de secreción tipo I

La habilidad de entender y manipular el ADN condujo al desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, lo que conllevó a que se pudieran hacer modificaciones genéticas en los organismos, dando paso entre otras cosas, a la producción de proteínas recombinantes. Éstas son producidas mediante la modificación genética de organismos diferentes a los que las producen naturalmente. Esta estrategia ha sido de gran impacto especialmente en la producción de drogas terapéuticas, las que previamente eran difíciles de obtener y purificar porque los métodos de producción eran ineficientes. Los sistemas genéticos en los cuales se producen proteínas recombinantes dependen de la complejidad de cada una (modificaciones postraduccionales, estabilidad estructural, tamaño, entre otros), siendo la bacteria *E. coli* el organismo más usado para la producción. *E. coli* ofrece muchas ventajas, entre ellas que está bien caracterizada genéticamente, es de crecimiento rápido, sus requerimientos nutricionales no son complejos, y se alcanzan rendimientos de producción de hasta el 50% del total de proteínas sintetizadas (46,47).

Otra ventaja que ofrece *E. coli* es que no secreta naturalmente grandes cantidades de proteínas. Varios estudios lo indican y esto supone una ventaja para recuperar del sobrenadante la proteína de interés sin la interferencia de otros contaminantes (48,49). En términos generales, la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* implica su purificación desde el medio intracelular. No obstante, esta estrategia de producción presenta inconvenientes como el riesgo de proteólisis, la formación de agregados proteicos o cuerpos de inclusión que inactivan las proteínas y la purificación desde un ambiente con alta carga de otras proteínas. Varias de estas dificultades pueden ser resueltas si las proteínas son exportadas al periplasma o al medio extracelular: (i) adquieren su correcto plegamiento en el ambiente oxidativo del periplasma con la consiguiente conservación de su actividad biológica, (ii) incrementan su estabilidad y

solubilidad, y (iii) se facilita el proceso de purificación desde un ambiente con un contenido proteico muy diluido (50).

En este sentido, se están desarrollando distintas estrategias de secreción en *E. coli*. Una de ellas se basa en el empleo de la vía Tat o Sec para que la proteína llegue al periplasma, y posteriormente alcance el medio extracelular gracias a los sistemas de secreción II o V, o a mecanismos que afecten o eliminen la membrana externa. En consecuencia, desde el punto de vista del proceso de producción, la externalización del sustrato se da en dos pasos. Particularmente, se alcanzan muy buenos rendimientos labilizando la membrana externa, lo que incluso está siendo usados industrialmente. La otra estrategia, consiste en usar un sistema de secreción de tipo I, prescindiendo de las vías Tat y Sec (50–52). El SS1 de la toxina α -hemolisina ha sido el más ensayado para la secreción de proteínas recombinantes en *E. coli* y *Salmonella* sp (24,53–57). Una gran variedad de proteínas fusionadas con el DS de la α -hemolisina han logrado ser secretadas por el transportador HlyBD; por ejemplo, β -galactosidasa de *E. coli* (56), cutinasa de *Termophilidia busca* (55), proteínas de unión a ácidos grasos (IFABP) de mamíferos (58), interleuquina 6 humana (59), entre otras. También se han usado otros SS1 de distintos géneros bacterianos para secretar proteínas recombinantes en *E. coli*. Por ejemplo, la secreción de fosfatasa alcalina por el transportador LipBCD de lipasas de *Serratia marcesens* (60), y la proteína “GFP” por los SS1 de lipasas TliDEF de *Pseudomonas fluorescens* y PrtDEF de *Erwinia chrysanthemi* (61). En suma, se ha demostrado la versatilidad de los sistemas de secreción tipo I, teniendo al parecer como único requisito reconocer el dominio de secreción de su sustrato natural. No obstante, la eficiencia de la secreción varía según la naturaleza del sustrato y no se han alcanzado altos niveles de secreción. Más aún, en la mayoría de los casos la funcionalidad de la proteína híbrida se ve afectada por el DS que permanece añadido, debiéndose adicionar un procedimiento de corte del mismo posterior a la secreción (23).

1.1.4. Generalidades de la Hormona Paratiroidea Humana (PTH)

Las glándulas paratiroideas forman un complejo endocrino encargado de regular el metabolismo del calcio y del fósforo en el organismo humano. Están formadas por “células principales” que secretan mayormente hormona paratiroidea y en menor medida calcitonina. La paratohormona es sintetizada como un precursor polipeptídico de 115 aa llamado prepro-PTH, que posteriormente sufre dos modificaciones postraduccionales en su extremo N-terminal. Inicialmente, ocurre la proteólisis de sus primeros 25 aa durante su recorrido hacia el retículo endoplasmático rugoso y, una vez en éste, son removidos los siguientes 6 aa, dando como resultado la hormona paratiroidea madura de 84 aa. La hormona madura es

empaquetada en el Aparato de Golgi en vesículas y gránulos secretores para su liberación al torrente sanguíneo. Dentro de las vesículas, algunas moléculas pueden sufrir proteólisis en su extremo carboxilo terminal, quedando el fragmento reconocido por el receptor que es la fracción 1-34 aa de la hormona madura (Tabla 2) (62–64). Esta fracción ha sido cristalizada, revelando que presenta una estructura relativamente sencilla, conformada por una corta α -hélice en el extremo N-terminal que se une, por una interacción hidrofóbica, con otra α -hélice un poco más larga en el extremo C-terminal (65). En general, la hormona exhibe un comportamiento hidrofílico. Cabe resaltar que circula en sangre sola, sin necesidad de una proteína transportadora, y su vida media es de 2 a 4 minutos una vez liberada.

Los receptores de la parathormona se encuentran en los osteoclastos, células precursoras del hueso. Una vez activada la señalización por la unión de la hormona, éstos promueven la reabsorción del ion calcio que les ayuda a diferenciarse a osteocitos, células maduras que solidifican el hueso. Es por ello que la paratohormona se usa en el tratamiento de enfermedades óseas como la osteoporosis, fracturas y enfermedades osteoimunes, ya que ayuda a la mineralización, restauración y remodelación del hueso, además de que controla el balance de los iones fosfato y calcio en sangre (66–70).

A partir del 2002, la Administración para Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) aprobó el uso comercial de la hormona paratiroidea recombinante como tratamiento anabólico para la osteoporosis. Más tarde, en 2003, fue avalado por la Agencia Europea del Medicamento. El fármaco, que hasta hoy sigue siendo el único aprobado, está constituido por el fragmento 1-34 de la paratorhormona humana, producido de manera recombinante en *E. coli* (https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2007/2007082130528/anx_30528_es.pdf)(71–73).

Tabla 2. Secuencia aminoacídica de las variantes de la hormona paratiroidea huma

Variante hormonal	Secuencia ^(a)	Extensión
1-34 PTH	SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF	34 aa
1-84 PTH	SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAPRDAGSQRPKKEDNVLV ESHKSLGEADKADVNVLTAKKSQ	84 aa

^(a)Se indican en rojo y azul los aminoácidos con carga positiva y negativa, respectivamente.

1. 2. Antecedentes específicos

Se plantea evaluar el sistema de secreción tipo I de las microcinas de mayor masa molecular como una nueva alternativa para la secreción de proteínas de interés biotecnológico en *E. coli*. Concretamente, los

transportadores EF y AB presentan dos características interesantes para su empleo. Por un lado, las investigaciones de la Sección de Fisiología y Genética Bacterianas dan cuenta de su versatilidad: (i) el transportador EF es capaz de secretar naturalmente las microcinas H47, I47 y M y, de manera heteróloga, las microcinas E492 y ColV, y (ii) el transportador AB, es capaz de secretar de manera heteróloga MccH47. Ambos transportadores demostraron ser eficientes respecto a la cantidad de sustrato heterólogo que lograron secretar (20,32,33). Más aún, Van Belkum et al 1997 (31), describió que el transportador AB es capaz de secretar una bacteriocina, llamada Divergicina A, fusionada al dominio de secreción de ColV o de Leucocina A desde células de *E. coli* K12. Cabe señalar que Divergicina A es producida por algunas bacterias Gram positivas y no usa naturalmente un exportador ABC para ser secretada. Todo esto sugiere que las secuencias que suceden al DS no estarían involucradas en la secreción, permitiendo así que un mismo transportador pueda secretar varias bacteriocinas que difieren sustancialmente en su secuencia madura. Cabe notar que estos experimentos se han limitado a intercambiar transportadores y péptidos antibióticos, sin incluir otros sustratos foráneos. Por otro lado, se demostró que los exportadores ABC de las microcinas cortan el dominio de secreción de sus respectivos sustratos, secretándolos sin esa secuencia adicional (16,41). Esta característica supone una gran ventaja desde el punto de vista de la producción de proteínas recombinantes, ya que el DS fusionado a una proteína foránea sería procesado por el exportador durante la secreción. Es así que la proteína de interés se recuperaría en el medio extracelular sin secuencias adicionales, por lo que no sería necesario incluir un paso de procesamiento del DS luego de la secreción como sucede al emplear el sistema de secreción tipo I de la α -hemolisina.

Si bien está demostrado que la presencia del DS es indispensable para la secreción, no se conoce cuánto afecta a la eficiencia del proceso la secuencia del péptido posterior al DS. En este sentido, en el laboratorio se intentó secretar de forma heteróloga la citoquina Interleuquina-15, empleada con éxito como inmunoterápico anti-tumoral. Esta proteína tiene 114 aa y se pliega formando hélices alfa. La estrategia consistió en generar un péptido formado por el DS de ColV y la porción madura de la citoquina. Luego, se evaluó su secreción en presencia de los transportadores AB o EF en células de *E. coli* K12. Si bien se constató que el transportador AB reconocía y cortaba el DS del péptido en el medio intracelular, no se logró recuperar la citoquina en el medio extracelular (74). En consecuencia, se eligió trabajar con las dos variantes de la hormona paratiroidea humana (1-34 PTH y 1-84 PTH), ya que su extensión está dentro del rango de las microcinas y poseen una estructura sencilla. Sin embargo, distan en otras características, como ser más hidrofílicas y contener mayor cantidad de aminoácidos cargados que las microcinas.

El éxito en la secreción de alguna de estas variantes podría tener un interés biotecnológico ya que su producción recombinante tiene ciertos inconvenientes. En particular, se ha notado que las variantes tienden a ser inestables y son blanco de proteasas en el medio intracelular (75). El esfuerzo por estabilizar su estructura se ha enfocado principalmente en la variante 1-34 PTH puesto que es la que se administra en los tratamientos clínicos. En este sentido, la estrategia apunta a producir la variante unida a una proteína de fusión que le ayuda a estabilizar su estructura y a ser identificada con mayor facilidad. Se ha ensayado recuperar la proteína híbrida tanto desde el medio intracelular como desde el periplasma, siendo necesario en ambos casos liberar posteriormente el péptido hormonal de la proteína fusión mediante un proceso de proteólisis (75–78).

En base a lo planteado, la estrategia experimental en este trabajo consiste en crear fusiones génicas que codifiquen para el DS de ColV unido al extremo N-terminal de cada una de las variantes de PTH, y evaluar su secreción por parte de los transportadores AB y EF en células de *E. coli*. Se eligió el DS de ColV porque esta microcina es la más extensa de la familia y su transportador es el más estudiado.

2. HIPÓTESIS

Los transportadores AB y EF de las microcinas de mayor masa molecular son capaces de secretar las dos variantes de la hormona paratiroidea humana cuando se les añade el dominio de secreción de ColV.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la secreción heteróloga de dos variantes de la hormona paratiroidea humana (1-34 PTH y 1-84 PTH) por parte de los transportadores AB y EF en *E. coli* B BL21 (DE3).

3.2. Objetivos específicos

- ❖ Clonar los genes codificantes para los transportadores AB y EF.
- ❖ Analizar la funcionalidad de los transportadores AB y EF a lo largo de sucesivas generaciones.
- ❖ Diseñar los plásmidos codificantes para los péptidos híbridos formados por el DS de ColV fusionado a cada una de las dos variantes de la hormona paratiroidea.
- ❖ Construir las cepas que expresen cada uno de los péptidos híbridos y un transportador ABC.
- ❖ Evaluar la secreción de las variantes hormonales en el sistema elegido.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas

Cepas	Características genéticas	Otras características
PAP222	<i>E. coli</i> K12 BZB101. Porta el Plásmido pK270	Codifica para los genes del transportador AB, ColV y su inmunidad (79).
DH5α	<i>E. coli</i> K12, <i>supE</i> 44 Δ <i>lacU69</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Es deficiente para la subunidad HsdR del sistema de restricción tipo I, por lo que no degrada ADN exógeno (80).
MC4100	<i>E. coli</i> K12, F ⁻ <i>araD139 lacU169 rpsL thiA relA</i>	Deficiente para la respuesta estricta, por lo que alcanza altas densidades de población (81).
JW0554	<i>E. coli</i> K12 BW25113 Δ <i>ompT</i>	Mutante para proteasa OmpT. Colección Keio (82).
JW0429	<i>E. coli</i> K12 BW25113 Δ <i>lon</i>	Mutante para la proteasa Lon. Colección Keio (82).
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ <i>dcm hsdS</i> (<i>r^m</i>) <i>lon ompT gal λ</i> (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>]).	Porta en su cromosoma el gen de la ARN polimerasa del fago T7. Se usa para producir altos niveles de expresión de genes bajo el influjo transcripcional del promotor del fago T7 (83).
MC4100 Δ<i>lon</i>Δ<i>ompT::kan</i>	Δ <i>lon</i> Δ <i>ompT::kan</i>	Mutante para las proteasas Lon y OmpT (este trabajo).

4.2. Plásmidos

Plásmido	Resistencia	Replicón	Otras características
pCP20	Amp, Cm	R101	OriC termosensible. Codifica para recombinasa específica de sitio FLP (84).
pBR322	Amp, Tc	pMB1	20/40 copias por cromosoma (85).
pUCYC5	Cm	P15A	10/12 copias por cromosoma. Sistema de detección por complementación en α para la β -galactosidasa (86).
pMVD41	Amp	p15A	Codifica los genes del transportador EF (20).
pValAB	Cm	p15A	Derivado de PUCYC5. Codifica los genes del transportador AB (este trabajo).
pValEF	Cm	P15A	Derivado de pUCYC5. Codifica los genes del transportador AB (este trabajo).
pBRiC	Amp	pMB1	Derivado de pBR322. Porta los genes para ColV y su inmunidad (este trabajo).
pValColV	Cm	P15A	Derivado de pUCYC5. Porta los genes para el transportador AB, ColV y su inmunidad (este trabajo).
pET-PTH34	Km	pMB1	Codifica para el péptido híbrido DS-PTH34-6xHis. Vector para expresar proteínas al periplasma (este trabajo).

Las cepas y los vectores plasmídicos no construidos en este trabajo se encontraban disponibles en el laboratorio. Los plásmidos pET-PTH34 y pET-PTH84 fueron provistos por el servicio de síntesis de GenScript, Hong-Kong.

4.3. Condiciones de cultivo

Se emplearon los siguientes medios de cultivo: LB, Zym 5052 y M63 glucosa (Anexo I). Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a los medios a las siguientes concentraciones finales: 48 µg/ml, Cm; 100 µg/ml, Ap; 30 µg/ml, kanamicina (Km); y 15 µg/ml, Tc. Se adicionó Cm a 60 µg/ml de concentración final para el crecimiento en medio Zym de las cepas BL21 (DE3) que portaban pValAB.

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 para la detección de los clones recombinantes en los experimentos de clonado. Se empleó Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 0.5 mM de concentración final como inductor de la expresión génica en los experimentos de producción de las variantes hormonales.

El crecimiento de los cultivos se monitorizó por medidas de DO₆₀₀ con el espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Nº serie 126414) y por recuento de viables, sembrando diluciones al décimo en placas de LB con los respectivos antibióticos incubadas a 30°C por 18 h.

Las cepas sin plásmidos recombinantes se crecieron a 37°C, mientras que las que contenían construcciones recombinantes se cultivaron a 30°C, de modo que se aletargara el crecimiento para limitar el progreso de inestabilidades genéticas que conllevaran a la aparición de clones mutantes. El tiempo de incubación promedio para los experimentos fue de 18-24 h.

4.4. Construcción de *E. coli* K12 MC4100 Δlon ΔompT::kan

Se construyó una estirpe derivada de MC4100 carente de las proteasas Lon y OmpT por transducción con el bacteriófago P1, siguiendo el protocolo descrito en Miller, 1992 (85). Se utilizaron los mutantes JW0429 y JW0554 de la colección Keio que tienen deletionados los genes correspondientes, en los que cada gen está reemplazado por un “cassette” de resistencia a kanamicina (*kan*) (82). Se generaron los lisados fágicos propagados en ambas cepas y se realizó la construcción mediante dos transducciones P1 sucesivas. En la primera transducción, se introdujo el cassette *kan* de JW0429 en MC4100, y se obtuvo el transductante MC4100 Δlon::kan, seleccionando en LB Km a 37°C. Como era necesario hacer una segunda transducción

para introducir de nuevo un cassette de resistencia a Km, se procedió a remover primero el que tenía la cepa MC4100 $\Delta lon::kan$ según lo descrito por Datsenko y Wanner, 2000 (84). Brevemente, la cepa MC4100 $\Delta lon::kan$ se transformó con el plásmido termosensible pCP20 que codifica para la recombinasa específica de sitio FLP, que reconoce las secuencias repetidas directas que flanquean el cassette de resistencia a kanamicina. Los clones transformantes se seleccionaron en LB Cm a 30°C y, en principio, una proporción habría perdido el cassette. Se estiraron cuatro clones en LB Cm, LB Ap y LB Km a 42°C. Se seleccionó la estría que resultó sensible a los tres antibióticos, es decir, la que perdió el plásmido termosensible pCP20 (Ap^R, Cm^R) y también el cassette *kan* por delección mediada por la recombinasa FLP. Luego, se hizo una segunda transducción infectando la estirpe curada MC4100 Δlon con el lisado P1 propagado en JW0554 para introducir el alelo *ompT::kan*. Los clones transductantes, seleccionados en LB Km, fueron MC4100 $\Delta lon\Delta ompT::kan$.

4.5. Manipulación del ADN

La purificación de los plásmidos se realizó empleando el kit QIAprep Miniprep de QIAGEN (#1018398). Para los ensayos de restricción se utilizaron las enzimas BamHI, EcoRV, HindIII, SacI, SalI y SmaI, y para las ligaciones se usó la enzima T4 ligasa, todas de New England Biolabs. En todos los casos se realizó el procedimiento estándar descrito en Sambrook et al, 1989 (80). Para las amplificaciones por PCR se utilizó como molde ADN plasmídico (10-30 ng) o lisados de células. Estos lisados se obtuvieron suspendiendo masa celular en 250 μ l de agua destilada estéril y calentando a 80°C durante 30 min. Para los experimentos de clonado se usó la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase de New England Biolabs, que tiene actividad de prueba y error. Además, esta enzima produce amplicones con extremos romos, lo que permite clonar los fragmentos directamente en vectores linearizados con una enzima que genere extremos romos. Para otras amplificaciones se usó la enzima Taq Polimerasa de Bioron (#111105). En todos los casos se siguieron las indicaciones del fabricante. Los oligonucleótidos empleados para las reacciones de amplificación se presentan en la Tabla 3. La purificación de los productos de PCR se hizo utilizando el kit MiniElute purification de QIAGEN (#28006), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para visualizar fragmentos de ADN a través de electroforesis, se hicieron geles de agarosa al 0.8% utilizando tampón Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE) y las muestras a resolver se mezclaron con tampón de carga (Anexo I). Se usó el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (#N3231S) de New England Biolabs. Las

corridas electroforéticas se hicieron en tampón TAE 1x, entre 1 a 2 h a 65V aproximadamente. Se tiñeron los gels con bromuro de etidio para visualizar la migración de los fragmentos de ADN.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para las reacciones de amplificación

Oligonucleótido	Secuencia	Extensión	Tm	Referencia
V-L	5´ CCTCCTACCCCTCACTC 3´	17 pb	58°C	(33)
V-R	5´ GAGGAATTACAAGCGTATGAGG 3´	22 pb		
pABFw	5´ TCCTGATAACTCTCCTATGTTGT 3´	23 pb	60°C	(74)
pvEF-F	5´ GTGAGTAAGAGGAGCTATTTTGT 3´	23 pb	61°C	Este trabajo
pvEF-R	5´ CTTCTTAACCTCCCCATCGAC 3´	22 pb		
pvAB-F	5´ CAAACTAATAGTATGCAAGGAGAC 3´	24 pb	60°C	Este trabajo
pvAB-R	5´ CGCTTGTAATTCCTCTATGGTTT 3´	23 pb		

Los análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, y el diseño de los plásmidos recombinantes se realizaron con los programas SerialCloner 2.6.1, SnapGene 5.3.2 y BLASTP (87).

4.6. Transformación de cepas de *E. coli*

Se hicieron cultivos de 50 ml de LB de cada cepa a transformar hasta una DO₆₀₀ entre 0.2 y 0.3. Las células se centrifugaron a 5.000 rpm por 5 min y se resuspendieron en 20 ml de CaCl₂ 100mM estéril, incubándolas en hielo por 20 min. Luego, se hizo una segunda centrifugación en las mismas condiciones y finalmente las bacterias se resuspendieron en 500 µl de CaCl₂ 100mM estéril manteniéndolas en hielo en la heladera. Se pudieron usar para ser transformadas a partir de las 24 h en frío hasta una semana después. Para la transformación, se mezclaron 100 µl de células competentes con el ADN plasmídico de interés, disuelto en un volumen no superior a 25 µl, y se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente, se pasó la mezcla a un baño a 37°C durante 5 min (shock térmico) para lograr que el cambio abrupto de temperatura permitiera el ingreso del ADN al interior de las células. Para la expresión de la resistencia antibiótica portada por el plásmido se agregó a la mezcla de transformación 2 ml de LB y se incubó en baño con agitación a 30°C por 3 h aproximadamente. Para la selección de los clones transformantes se sembraron alícuotas de la mezcla de transformación en placas de LB con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 30°C. En paralelo, se sembraron en igual medio alícuotas solo de bacterias competentes, tratadas como la mezcla de transformación, a modo de control del experimento. En el apartado de resultados solo se consignó el crecimiento de aquellos clones que exhibieron particularidades.

4.7. Ensayo de producción de Colicina V

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 MC1400 como cepa indicadora, sensible a ColV. Ésta se sembró en forma de tapiz sobre una placa de medio mínimo y se inoculó por picada sobre el agar con las cepas experimentales a ensayar. Las placas se incubaron a 37°C por 20 h. En el caso de que las cepas experimentales fueran capaces de secretar correctamente ColV se lograría observar el halo de inhibición del crecimiento. Se usaron las cepas control MC4100 (pValColV) como productora de ColV y MC4100 (pBRiC) como no productora.

4.8. Ensayo de réplica en placa

Para el ensayo fue necesario tener dos tipos de placas: la primera es la placa matriz, que tiene las colonias de los clones a las que se les busca determinar un fenotipo adicional, y la segunda placa, denominada réplica, permitiría distinguir el fenotipo adicional, uno de producción de ColV y el otro de susceptibilidad a Tc. Para evaluar la producción de ColV, se sembró sobre una placa de medio mínimo un tapiz de células indicadoras sensibles al antibiótico, y para determinar la resistencia/sensibilidad a tetraciclina se empleó una placa de LB suplementado con Tc. El patrón espacial de las colonias de la placa matriz se reprodujo pulsándola sobre un trozo de terciopelo estéril, de modo que las bacterias se adhirieron al terciopelo dejando una huella. Luego, el material celular se transfirió a la placa réplica apoyando ésta sobre el terciopelo previamente inoculado. Posteriormente, ambas placas se incubaron a 30°C por 18 h. Comparando el patrón de crecimiento de una placa a otra, se detectaron las colonias que expresaban el fenotipo de interés en la placa réplica y éstas se seleccionaron en la placa matriz.

4.9. Ensayos de producción de las variantes hormonales

4.9.1 Análisis del crecimiento de las cepas

A partir de una estría fresca (menos de 48 h de crecida) se hizo un cultivo de las estirpes BL21(DE3) (pValAB), BL21(DE3) (pET-PTH34), BL21(DE3) (pET-PTH84), BL21(DE3) (pValAB; pET-PTH34) y BL21(DE3) (pValAB; pET-PTH84) inoculando un matraz con 5 ml de medio Zym 5052 modificado (sin lactosa agregada, denominado Zym mod), suplementado con 60 µg/ml de Cm y/o 60 µg/ml de Km, según

correspondiera. El matraz se incubó a 30°C durante 14 h a 120 rpm de agitación y se midió la DO₆₀₀ así como se realizó un recuento de viables de cada cultivo.

Para el caso de las cepas experimentales se continuó el análisis de su crecimiento haciendo una dilución 1/100 del cultivo anterior en 50 ml del mismo medio y se incubó el matraz en las mismas condiciones, midiendo la DO₆₀₀ en lapsos de una hora hasta que llegó a 1. Además, se realizó el recuento de viables del cultivo a tiempo final como se mencionó anteriormente.

4.9.2 Cultivos para la producción de las variantes hormonales

A partir de precultivos de las cepas control y experimentales, que llegaron a la fase estacionaria de crecimiento con una DO₆₀₀ de ca. 9, se hizo una dilución 1/100 para empezar los ensayos de producción en matraces con 10 ml de medio Zym mod con los respectivos antibióticos. Los cultivos se incubaron en agitación a 30°C con 120 rpm. Luego de cuatro horas de incubación se les agregó IPTG a 0.5mM como inductor de la expresión génica. Luego de 20 h posteriores a la inducción se tomó una muestra de 5 ml, de los cuales una alícuota se usó para hacer recuento de viables y el resto se procesó.

4.9.3 Procesamiento de los sobrenadantes y de las fracciones celulares

Se separaron las células del sobrenadante (SN) por centrifugación a 7.000 rpm por 10 min a 4°C usando la macrocentrífuga Sorvall ST16R de Thermo Scientific (código 261.09). El SN se filtró con una membrana de nitrocelulosa de diámetro de poro de 0.45 µm (Sartorius 11306) de modo tal que se eliminaron las células remanentes. Una vez filtrados, los sobrenadantes se fraccionaron en alícuotas de 1 ml y se guardaron a -20°C. Por su parte, las células se resuspendieron en tampón PBS 1x (Anexo I) hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 5, y se lisaron por sonicado inmersas en hielo. Se siguió el protocolo de trabajo para *E. coli*: 2 s de ultrasonido a una potencia del 50% y 3 s de intervalo, repitiendo el proceso hasta alcanzar un tiempo total de 15 min, en el equipo Benchmark Pulse 150 Ultrasonic Homogenizer (N° serie 2020122081). Se guardó una alícuota de la fracción total (FT) del lisado y el resto de la mezcla se centrifugó a 7.000 rpm por 10 min para descartar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 15.000 rpm por 30 min, para separar las fracciones proteicas soluble (FS) e insoluble (FI). Todas las fracciones celulares se fraccionaron en alícuotas de 1 ml y se guardaron a -20°C.

4.9.4 Determinación de la actividad β-galactosidasa

La actividad β -galactosidasa (β -gal) se determinó siguiendo el protocolo descrito por Miller, 1992, que se basa en evaluar la actividad de la enzima mediante la hidrólisis del sustrato cromogénico O-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG). Brevemente, alícuotas de los cultivos y de sus sobrenadantes (v: volumen de la muestra en ml) de las cepas control y experimentales se mezclaron con tampón Z (Anexo I), hasta un volumen final de 1 ml, y se les agregó gotas de cloroformo y SDS al 0.1% para lisar las células. Posteriormente, a cada mezcla se le adicionó 200 μ l de ONPG (4 mg/ml en tampón Z) y se incubó a 28°C hasta que se desarrollara color. La reacción se detuvo agregando 500 μ l de carbonato de sodio 1M y se midió la absorbancia del producto a 420 nm. Las unidades de enzima β -gal se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula: $DO_{420} - (1.75 \times DO_{550}) / t \text{ (min)} \times v \text{ (ml)} \times DO_{600}$. El valor de DO_{600} correspondió al alcanzado por cada cultivo al momento de su procesamiento.

4.9.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas contenidas en los sobrenadantes y en las fracciones celulares se separaron según su peso molecular aparente por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Debido a que los péptidos de interés tienen una masa molecular de entre 5 y 12 kDa, se hicieron geles de tricina al 10% siguiendo el protocolo establecido por Shägger H, 2006 (88). Se mezcló cada muestra con el tampón de carga A según lo formulado (88) y se calentó a 80°C por 30 min, previo a sembrarlas en el gel. En este caso se aplicaron voltajes diferentes a los sugeridos, siendo de 30V el inicial, 50V el intermedio y 90V para el final de la corrida. Como proteínas control se usó 1 μ g de PTH 34 (ab269813) y de PTH 84 (ab51234) puras, tratadas como las muestras, y como marcador de peso molecular Prestained Protein Ladder – Extra broad molecular weight (5 – 245 kDa) (ab116029), todos de la marca ABCAM. Luego de la corrida electroforética, se fijaron las proteínas en el gel con solución de fijación (Anexo I) por 30 min y posteriormente se tiñeron con una solución de Azul de Coomassie R250 por 18 h (Anexo I).

4.9.6. Espectrometría de masas

Las bandas de interés obtenidas en los geles de electroforesis se analizaron por espectrometría de masas LTQ Velos + ETD, Thermo asociado a nano HPLC y por MALDI TOF-TOF en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo.

4.9.7. Inmunoensayos

4.9.7.1. Dot Blot

En una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μm (Biorad) se depositaron alícuotas de 3-10 μl de muestra que se dejaron absorber a 30°C por 15 min. La membrana se embebió en solución de bloqueo (Anexo I) por al menos 40 min y luego se incubó con el anticuerpo (Ac.) primario policlonal anti – hPTH obtenido de conejo (269813, ABCAM) en una nueva solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 5 min cada uno con TBS 1x-Tween-20 0.05% (Anexo I), la membrana se incubó con el Ac. secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (HRP) (205718, ABCAM) por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se hicieron tres lavados con TBS 1x-Tween-20 0.05% de cinco minutos cada uno, para retirar los restos de anticuerpo. Se emplearon distintas diluciones de los anticuerpos primario y secundario para encontrar la combinación que detectara de forma específica las proteínas de interés.

4.9.7.2. Western Blot

Las proteínas migradas en geles de tricina SDS – PAGE se transfirieron a una membrana de 0.2 μm , usando el equipo Mini-trans Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero, el gel y la membrana se embebieron en tampón de transferencia por 15 min (Anexo I) para después transferir las proteínas durante ca. 2:30 h a corriente entre 250-340 mA. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se incubó en solución de bloqueo por 24 h a 4°C. Luego, la membrana se incubó con una dilución 1/5.000 del anticuerpo primario policlonal anti – hPTH (269813, ABCAM) o anti-Histag obtenido de ratón (A00186, GenScript), en solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados de 5 min con TBS 1x-Tween-20 0.05% y luego se incubó la membrana con una dilución 1/20.000 del Ac. secundario anti-conejo (205718, ABCAM) o anti-ratón conjugado a peroxidasa (HRP) (A0545-1ML, Sigma), en tampón TBS 1x-Tween-20 0.05% por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se hicieron tres lavados con TBS 1x-Tween-20 0.05% de cinco minutos cada uno, para retirar los restos de anticuerpo.

Para el revelado de ambos inmunoensayos se utilizó el kit para quimio-luminiscencia aumentada de Biorad (Clarity Max TM Western ECL Substrate, 100 ml #170565), con un tiempo de incubación de entre 3 a 5 min. La membrana se expuso en el equipo de quimioluminiscencia GBOX Chemi System XT4 de

SynGene (N° serie 22393*19504), haciendo dos exposiciones seriadas de 1 minuto cada una.

5. RESULTADOS

La propuesta de trabajo consistió en producir de forma recombinante en *E. coli* dos variantes de la hormona paratiroidea humana haciendo uso de los transportadores AB y EF para secretarlas. Para ello, se esperaba que los transportadores reconocieran y cortaran durante la secreción el DS de CoIV agregado al extremo N-terminal de las variantes 1-34 PTH y 1-84 PTH, de modo de poder recuperarlas desde el medio extracelular sin secuencias adicionales (Fig. 3).

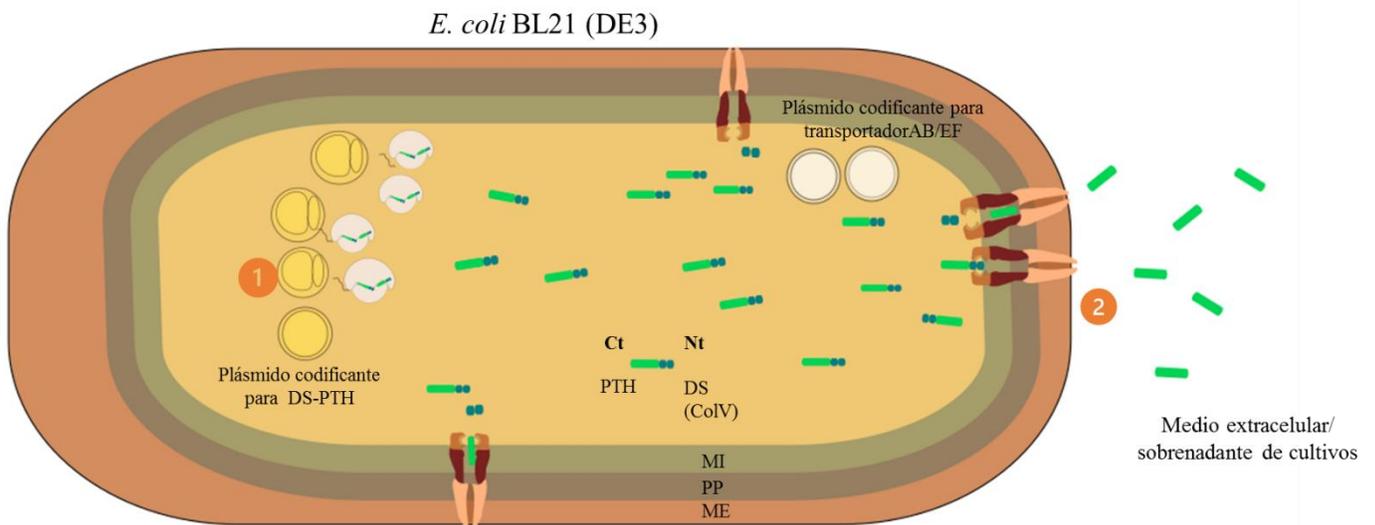


Figura 3. Modelo de producción de las variantes hormonales. 1) Síntesis del péptido DS-PTH. 2) Reconocimiento y corte del DS del péptido por parte del exportador ABC, finalmente la variante hormonal es secretada al medio extracelular. MI: membrana interna; PP: periplasma; ME: membrana externa.

El diseño experimental comprendió cuatro grandes pasos: (i) clonado de los genes codificantes para los transportadores AB y EF, (ii) diseño de las fusiones génicas conformadas por la secuencia codificante para el dominio de secreción de CoIV unida en fase con la secuencia que codifica para cada una de las variantes hormonales seguida de una etiqueta de seis histidinas (6xHis); (iii) expresión de cada una de las fusiones génicas en la cepa de *E. coli* B BL21 (DE3) en presencia de cada uno de los transportadores; y (iv) evaluación de la secreción de 1-34 PTH-6xHis y 1-84 PTH-6xHis.

5.1. Clonado de los genes codificantes para los transportadores AB y EF

En ensayos preliminares se había constatado que los transportadores expresados desde vectores multicopia tendían a alterar el crecimiento y finalmente la viabilidad de las cepas que los sintetizaban (74). Dada la localización de los sistemas de secreción tipo I en las membranas, formando canales que comunican el citoplasma bacteriano con el medio extracelular, se hipotetizó que una cantidad incrementada de los mismos podría generar la desestabilización de la envoltura celular, comprometiendo la viabilidad de la bacteria. Por ende, se procedió a clonar los genes de los transportadores en el vector oligocopia pUCYC5, de tal forma que se disminuyera su dosis génica en la bacteria.

Para clonar los operones de secreción se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos de síntesis que tenían las siguientes características: el cebador “forward” complementaba desde la secuencia Shine-Dalgarno hacia el inicio del primer gen, de modo que los genes carecieran de su propio promotor y quedaran bajo el influjo del *POLac* provisto por el pUCYC5; el cebador “reverse” hibridaba a pocos nucleótidos del codón de terminación del segundo gen. El amplicón correspondiente al operón *cvaAB*, codificante del transportador AB, se obtuvo utilizando la pareja de cebadores pvAB-F y pvAB-R, mientras que la amplificación del operón *mchEF*, codificante para el transportador EF, se realizó con la pareja pvEF-F y pvEF-R. Como molde para la amplificación de los genes que expresan las proteínas del transportador AB, se usó un lisado celular de la cepa productora de ColV, PAP222. Para el caso de la amplificación de los genes *mchEF* se empleó una extracción de pMVD41, plásmido que contiene los genes de secreción. Cabe mencionar que para obtener una buena cantidad de amplicones de cada transportador fue necesario realizar varias reacciones de PCR. Luego de varios intentos se obtuvieron los fragmentos de PCR esperados: uno de 3.414 pb y otro de 3.436 pb correspondientes a los genes *cvaAB* y *mchEF*, respectivamente. A continuación, los amplicones se purificaron y se ligaron con el vector pUCYC5 previamente linearizado con la enzima *SmaI* que genera extremos romos. Las mezclas de ligación se utilizaron para transformar células competentes de DH5 α y los transformantes se sembraron en placas de LB Cm X-gal, de modo que se seleccionaron los clones resistentes a Cm y se detectaron los recombinantes Lac⁻ por el sistema de complementación en α para la β -galactosidasa. Se purificaron cuatro clones transformantes Lac⁻ (blancos) mediante dos estrías sucesivas en medio LB Cm X-gal. Se extrajo el ADN plasmídico de dos clones para realizar el análisis físico. Se corroboró por restricción que los plásmidos tenían el tamaño esperado y la orientación de los genes de los transportadores en relación al *POLac* se determinó por restricción o por PCR. Los plásmidos así obtenidos se denominaron pValEF (6.346 pb) y pValAB (6.324 pb) (Fig. 4) (Anexo II: Fig A1 y A2).

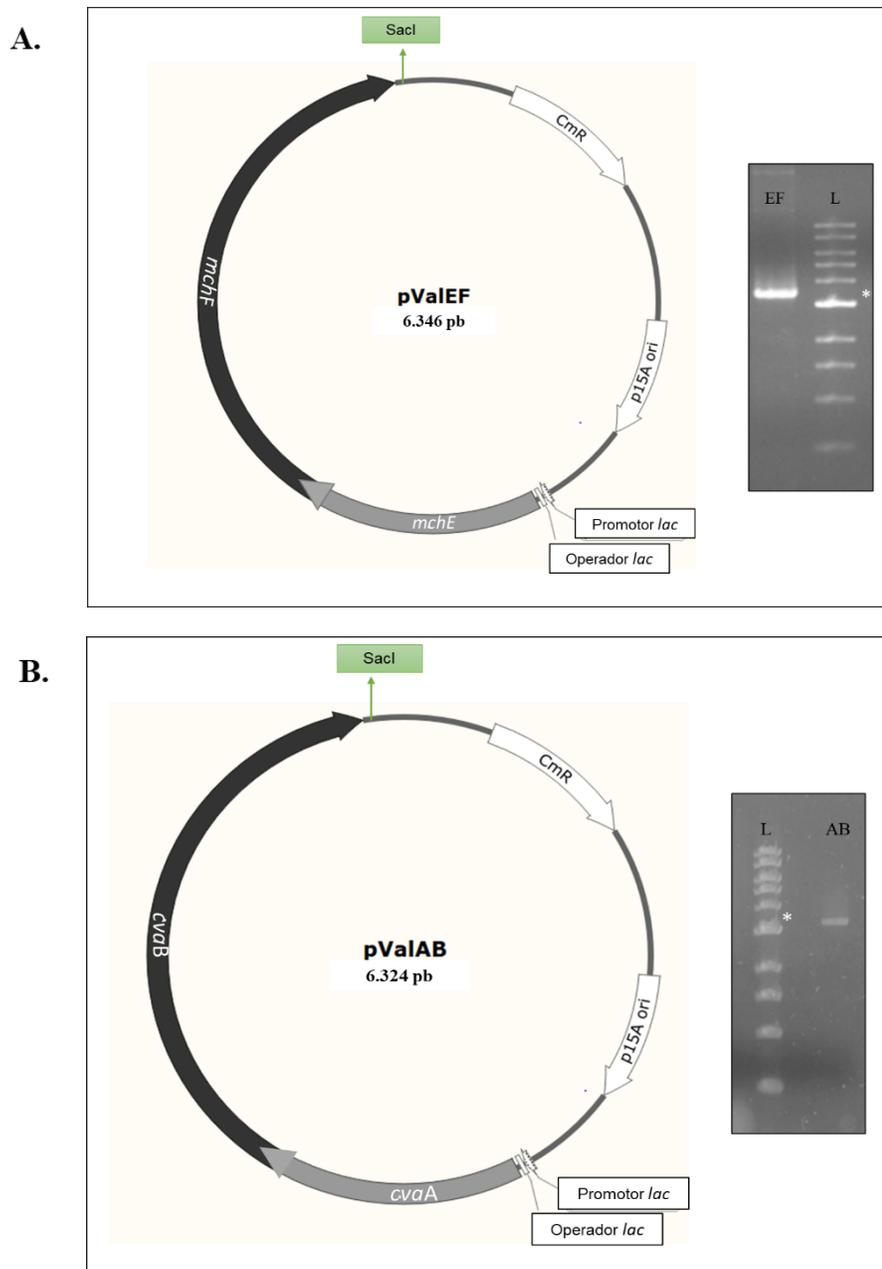


Figura 4. Estructura genética de los plásmidos pValEF y pValAB. A. pValEF, donde se indica el sitio de corte SacI que lo lineariza, y gel con el amplicón purificado de los genes *mchEF*. B. pValAB, donde se indica el sitio de corte SacI que lo lineariza, y gel con el amplicón purificado de los genes *cvaAB*. L: Ladder 1 kb, marcando con * la banda de 3 kb.

Posteriormente, se realizó un ensayo para determinar si los genes clonados en pValAB y pValEF codificaban para transportadores funcionales. Para ello, se eligió evaluar la secreción de ColV, ya que es secretada naturalmente por el transportador AB y de manera heteróloga por EF (33). La prueba consistió

en expresar cada uno de los transportadores en una cepa que sintetizara la inmunidad (gen *cvi*) y el péptido antibiótico ColV (gen *cvaC*) y evaluar la secreción mediante la aparición de halos de antibiosis sobre un tapiz de células sensibles. El diámetro de los halos se comparó con el generado por una cepa control que portaba el sistema genético ColV completo. Por ende, fue necesario clonar tanto el sistema genético ColV completo como el operón *cvi-cvaC* en vectores oligocopia de modo de garantizar una síntesis moderada del tóxico, salvaguardando la viabilidad celular.

Para clonar el sistema genético ColV, se eligió el vector pUCYC5 ya que, además de ser oligocopia por tener el replicón p15A, permitía detectar los clones recombinantes por el sistema de complementación en α para la β -galactosidasa. El amplicón que codifica para el sistema genético ColV se obtuvo por PCR combinando los oligonucleótidos V-L y pABFw, usando como molde un lisado celular de PAP222. El cebador V-L hibrida corriente arriba del inicio del gen *cvi*, que amplificaría desde la región promotora del operón *cvicvaC*, y el cebador pABFw hibrida corriente arriba del inicio del gen *cvaA*, también apostando a que se incluiría el promotor del operón *cvaAB* (Fig. 5) (Anexo II). El amplicón de 4.278 pb se purificó, se ligó con el plásmido pUCYC5 digerido con SmaI y la mezcla de ligación se empleó para transformar células competentes de DH5 α . Se seleccionaron y detectaron los clones recombinantes sembrados en medio LB Ap X-gal y se purificaron cuatro clones blancos (Lac⁻). Posteriormente, se evaluó la actividad de ColV de los clones recombinantes mediante el ensayo de producción de ColV. Los cuatro clones generaron halos de antibiosis, confirmando que portaban plásmidos con el sistema genético ColV. Luego, se purificó el plásmido contenido en uno de estos clones para linearizarlo con la enzima Sall. Efectivamente, tenía el tamaño esperado de unos 7.188 pb y se denominó pValColV. En el caso del operón *cvicvaC* se eligió clonar en el vector pBR322, porque tiene el replicón pMB1 compatible con el replicón p15A de los plásmidos pValAB y pValEF. Esto era necesario para mantener establemente ambos plásmidos en la célula y poder realizar el ensayo de funcionalidad de los transportadores mediante complementación para la secreción de ColV. El operón *cvicvaC* se amplificó con la pareja de cebadores V-L y V-R a partir de un lisado celular de PAP222. Se generó un amplicón de 781 pb, que incluyó ambos genes, desde una región corriente arriba de su inicio, donde se encontraría el promotor, hasta el terminador de la transcripción (Fig. 5) (Anexo II: Fig. 3A). Por su parte, el vector pBR322 se linearizó con la enzima EcoRV, cuyo sitio de restricción se localiza en el gen de resistencia a Tc que quedaba interrumpido al clonar el amplicón, generando un fenotipo de sensibilidad al antibiótico en los clones recombinantes. Además, esta digestión dejaba extremos romos lo que permitió ligar el vector con el amplicón. Se transformó la cepa DH5 α con la mezcla de ligación y los clones resultantes se seleccionaron en placas de

LB Ap. Posteriormente, los transformantes se analizaron para su susceptibilidad a Tc mediante la técnica de réplica en placa. Se identificaron las colonias sensibles a Tc y se purificaron cuatro de ellas mediante dos estrías sucesivas en LB Ap. Con los plásmidos extraídos a partir de dos de los clones puros, se digirió con la enzima EcoRV y se corroboró que el plásmido tenía el tamaño esperado de unos 5.142 pb. De esta manera se obtuvo el plásmido denominado pBRiC (Anexo II: Fig. A3).

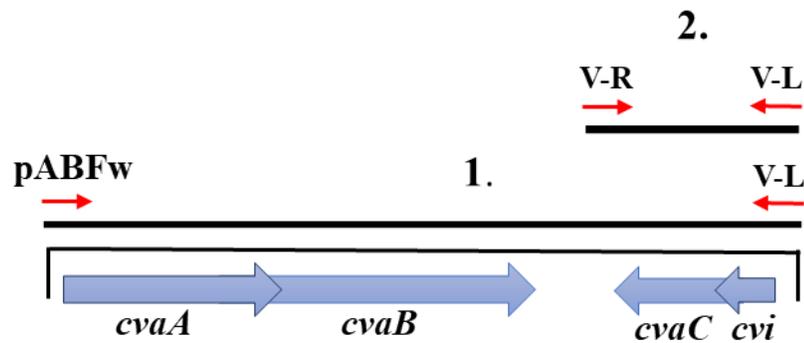


Figura 5. Sistema genético ColV y amplicones clonados. Se indican los cebadores y el amplicón generado que contiene el sistema genético ColV (1) y el operón *cvicvaC* (2).

Una vez obtenidas las construcciones genéticas necesarias, se procedió a realizar el ensayo de funcionalidad de los transportadores. Para ello, se empleó la cepa MC4100 porque tiene un crecimiento más robusto y estable que DH5 α . Es así que primero se construyeron por transformación las cepas MC4100 (pValAB) y MC4100 (pValEF). Luego de purificarlas, ambas estirpes se transformaron con el plásmido pBRiC, seleccionando en placas de LB Cm Ap, y se analizó la secreción de ColV de los clones resultantes a través de una réplica sobre un tapiz de células sensibles a la microcina. Todos los clones de MC4100 (pValAB; pBRiC) y MC4100 (pValEF; pBRiC) produjeron halos de antibiosis, con lo cual se corroboró que los plásmidos pValAB y pValEF codificaban para transportadores funcionales (Fig. 6A y B). Una vez que se comprobó la funcionalidad, se comparó su producción con la de la cepa que portaba todo el sistema ColV, MC4100 (pValColV). Para llevar a cabo este análisis fue necesario construir la cepa MC4100 (pValColV) y obtener sus clones puros al igual que se obtuvieron los de MC4100 (pValAB; pBRiC) y MC4100 (pValEF; pBRiC). Posteriormente, se realizó el ensayo de producción de ColV evaluando cuatro clones de cada cepa (Fig. 6C).

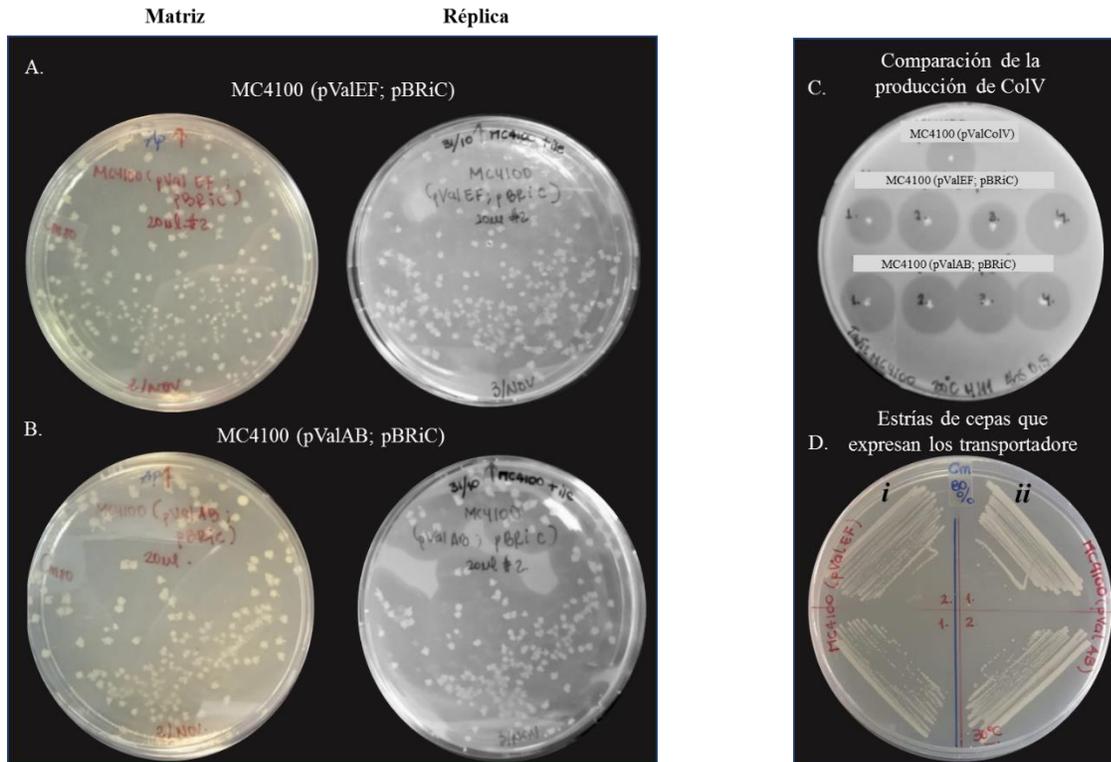


Figura 6. Ensayo de funcionalidad de los transportadores EF y AB. Análisis de la secreción de ColV por la aparición de halos de inhibición del crecimiento sobre un tapiz sensible. Ensayos de réplica en placa: **A)** MC4100 (pValEF, pBRiC) y **B)** MC4100 (pValAB, pBRiC). **C)** Comparación de la producción de ColV MC4100 (pValEF, pBRiC) y MC4100 (pValAB, pBRiC) con la cepa control MC4100 (pValColV). **D)** Estrías de las cepas recién transformadas: (i) MC4100 (pValEF) y (ii) MC4100 (pValAB).

Los clones que expresaban el transportador AB presentaron halos de diámetros muy similares entre sí y con el generado por la cepa control MC4100 (pValColV). Sin embargo, aquéllos que expresaban el transportador EF exhibieron halos de distintos tamaños, dos de ellos notoriamente más pequeños que el de la cepa control.

El ensayo anterior planteó la pregunta de si las variaciones en los halos de antibiosis eran debidas a alteraciones genéticas en el plásmido pBRiC o en los plásmidos pValAB y pValEF. Cabe resaltar que la cepa MC4100 (pValEF) exhibió vacíos en la zona de crecimiento confluyente y heterogeneidad de las colonias en sus estrías mientras que MC4100 (pValAB) no exhibió mayores alteraciones en su crecimiento (Fig. 6D). Por lo tanto, se decidió llevar a cabo un ensayo de estabilidad genética de los plásmidos pValAB y pValEF.

5.1.1. Ensayo de estabilidad genética de los plásmidos pValAB y pValEF

Antes de empezar los ensayos de producción de las variantes de la hormona paratiroidea, era importante garantizar que la estructura genética de los plásmidos codificantes para los transportadores permanecía estable a lo largo de las generaciones de bacterias. El ensayo consistió en hacer sucesivos repiques de las cepas portadoras de pValAB y pValEF y analizar en algunos de ellos la capacidad de los transportadores de secretar ColV. Para ello, se utilizaron las estirpes MC4100 y MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kan$. Este último contexto doble mutante para proteasas se incluyó porque las pruebas de producción de las hormonas se realizaron en BL21 (DE3), que también es deficiente para estas proteasas, y es muy utilizada para la producción de proteínas recombinantes (83).

Primero, se transformó cada una de las cepas con los plásmidos pValAB y pValEF recién construidos, seleccionando en LB Cm. Se purificaron algunos clones, consignados como R0, a partir de los que se hicieron cuatro repiques (R1 a R4), siempre en LB Cm, a lo largo de 28 días, de modo tal que la diferencia entre cada repique fuera de siete días. Una muestra de las cepas correspondientes a R0, R2 y R4 se transformó con el plásmido pBRiC y se evaluó la secreción de ColV de los clones resultantes por réplica en placa para evidenciar la funcionalidad de los transportadores (Fig. 7). Por último, algunos de estos clones se purificaron para hacer ensayos de producción de ColV.

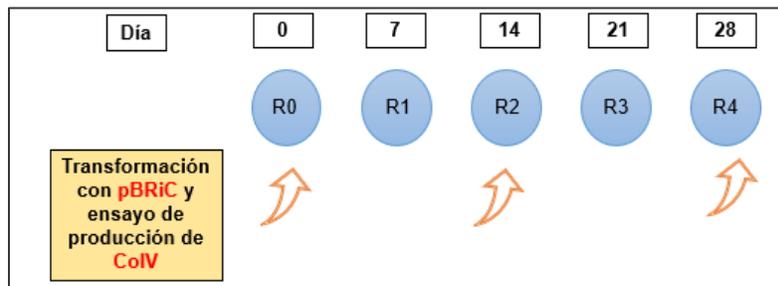


Figura 7. Diseño experimental del ensayo de estabilidad de los plásmidos pValAB y pValEF.

Cabe aclarar que se muestran los resultados del experimento hecho en el contexto doble mutante, debido a que en éste fue más notorio lo ocurrido con el plásmido pValEF (Fig. 8). En el caso del transportador AB, en ambos contextos genéticos, las estrías tuvieron buen crecimiento y con colonias de tamaño homogéneo en todos los repiques. En cuanto a la secreción, todos los clones transformados con pBRiC fueron productores de ColV (Fig. 8A). Asimismo, los clones puros surgidos a partir de la transformación

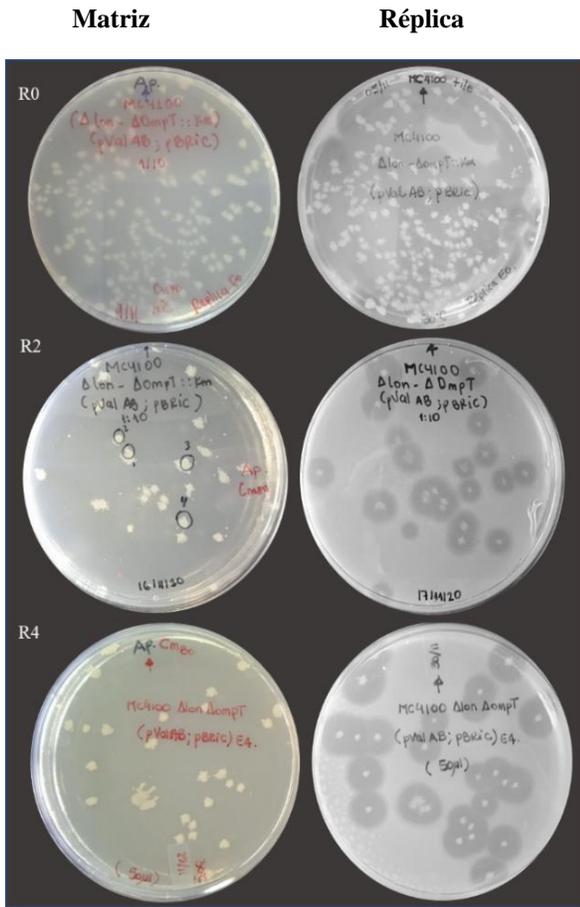
de los tres repiques (R0, R2 y R4), en ambos contextos, generaron halos de antibiosis de similar tamaño al producido por la cepa control, MC4100 (pValColV) (Fig. 8B).

Por su parte, las cepas que portaban pValEF presentaron un menor crecimiento y colonias de distinto tamaño. Se notó que en los sucesivos repiques las estrías mejoraban su crecimiento. A diferencia de lo ocurrido con pValAB, la funcionalidad del transportador EF se fue perdiendo a lo largo de los repiques. Concretamente, MC4100 (pValEF) mantuvo la secreción de todos los clones transformados con pBRiC hasta el repique R2 pero para el repique R4 algunos clones habían perdido la capacidad de generar halos de antibiosis. En el caso de los clones correspondientes al contexto carente de proteasas, la ausencia de halos se comenzó a observar en algunos clones desde el repique R2 y ya para el repique R4 ninguno de los clones transformantes generó halos de antibiosis (Fig. 8A). En cuanto a los clones transformantes puros, hubo variación en el tamaño de los halos entre clones procedentes de un mismo repique en el contexto MC4100. El contexto mutante, en cambio, mostró clones con dos fenotipos opuestos: productores y no productores de ColV (Fig. 8B). Es importante señalar que todas las transformaciones realizadas con pBRiC se efectuaron con la misma preparación y cantidad de ADN plasmídico. Por lo tanto, se descartó que la pérdida de la producción de ColV fuera debida a una alteración de pBRiC, así que se apuntó a analizar el plásmido pValEF.

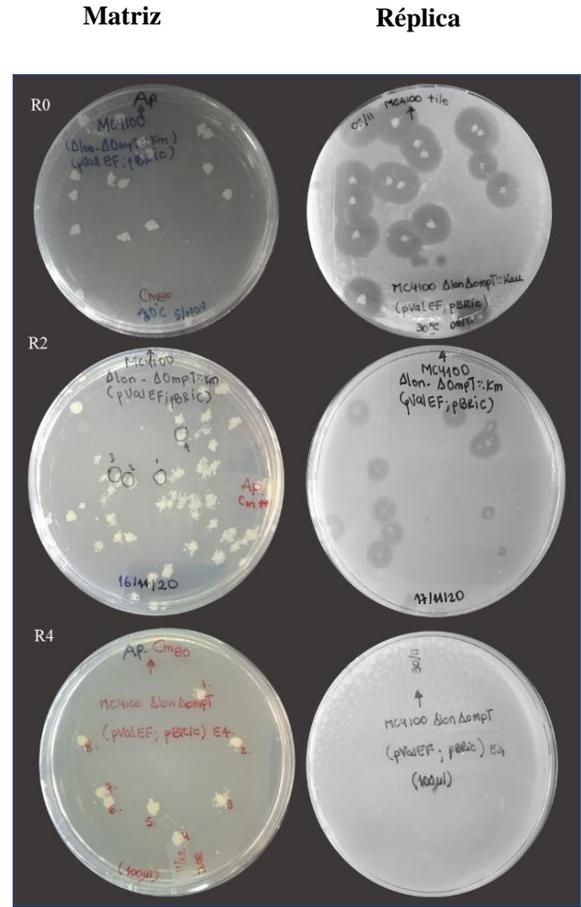
Se extrajo el DNA plasmídico a partir de clones puros de MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kan$ (pValEF) desde R0 hasta R4, ya que el fenómeno fue más notorio en este contexto. Al resolverlos en una electroforesis, se detectó un único tipo de plásmido pValEF del tamaño esperado (6.346 pb) en R0, pero en los repiques apareció un segundo tipo de plásmido de mayor tamaño que fue siendo mayoritario en los sucesivos repiques hasta ser el único en R4 (Fig. 9A). Después se amplificaron los genes *mchEF* con la pareja de cebadores pVEF-F y pVEF-R a partir de cada una de las extracciones plasmídicas. Se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (3.436 pb) a partir de los plásmidos contenidos en R0, R1 y R2, mientras que en el caso de R3 y R4 el amplicón resultante fue de mayor tamaño, ca. 4.100 pb (Fig. 9B). Por lo tanto, se comprobó que el plásmido de mayor tamaño era un derivado de pValEF que presentaba una inserción en el operón *mchEF*, lo que resultó en la pérdida de funcionalidad del transportador

A.

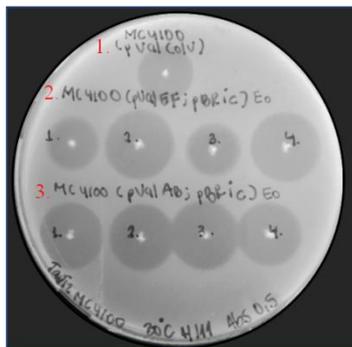
MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kan$ (pValAB; pBRiC)



MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kan$ (pValEF; pBRiC)

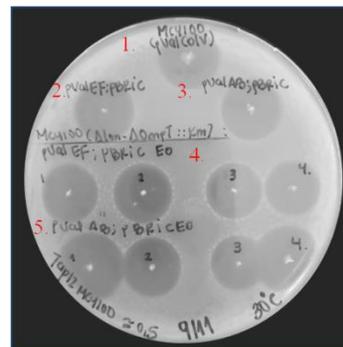


B.



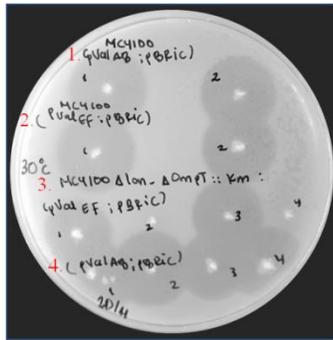
R0

1. MC4100 (pValColV)
2. MC4100 (pValEF; pBRiC)
3. MC4100 (pValAB; pBRiC)



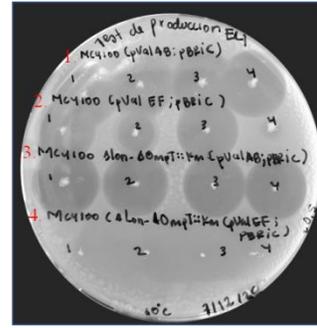
R0

1. MC4100 (pValColV)
2. MC4100 (pValEF; pBRiC)
3. MC4100 (pValAB; pBRiC)
4. MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kan$ (pValEF; pBRiC)
5. MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kan$ (pValEF; pBRiC)



R2

1. MC4100 (pValAB; pBRiC)
2. MC4100 (pValEF; pBRiC)
3. MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kn$ (pValEF; pBRiC)
4. MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kn$ (pValAB; pBRiC)



R4

1. MC4100 (pValAB; pBRiC)
2. MC4100 (pValEF; pBRiC)
3. MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kn$ (pValAB; pBRiC)
4. MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kn$ (pValEF; pBRiC)

Figura 8. Ensayo de estabilidad genética de los plásmidos codificantes de los transportadores AB y EF. A. Evaluación de la estabilidad de los plásmidos pVal AB y pValEF a través de la secreción de ColV mediante réplica en placa. **B.** Prueba de producción de ColV de clones puros de las estrías transformadas con ColV y su inmunidad.

Mediante este ensayo se pudo determinar que pValAB mantenía su estructura genética en las sucesivas generaciones, codificando siempre para un transportador funcional. Sin embargo, pValEF derivó y no mantuvo su estructura genética original. Por lo anterior, se decidió continuar trabajando únicamente con el transportador AB codificado desde pValAB. Para ello se realizó nuevamente una prueba de funcionalidad esta vez usando el exportador AB en la cepa BL21 (DE3), ya que fue el sistema de producción elegido para las variantes hormonales. Ésta consistió en hacer cinco repiques sucesivos de la cepa BL21 (DE3) (pValAB) desde R0 hasta R4, y transformar tres de ellos (R0, R2 y R4) con el plásmido pBRiC. En este caso para la construcción de la estirpe, su purificación y los repiques se usó medio Zym mod. adicionando una mayor concentración de Cm (60 $\mu\text{g/ml}$) para ejercer más presión de selección, ya que BL21 (DE3) alcanza mayor crecimiento en Zym por ser éste un medio más rico que el LB. Para empezar, se construyó por transformación la cepa BL21(DE3) (pValAB) y se purificaron cuatro clones. Las estrías mostraron buen crecimiento, notándose homogeneidad en las colonias, lo que permaneció así a lo largo de los repiques (Fig. 10A). La producción de ColV se mantuvo en todos los clones transformantes BL21 (DE3) (pValAB; pBRiC) hasta el último repique en R4.

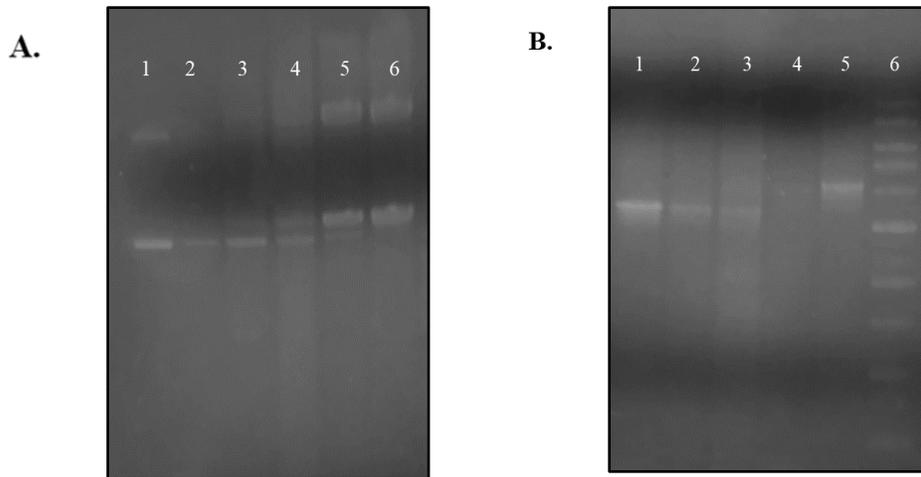
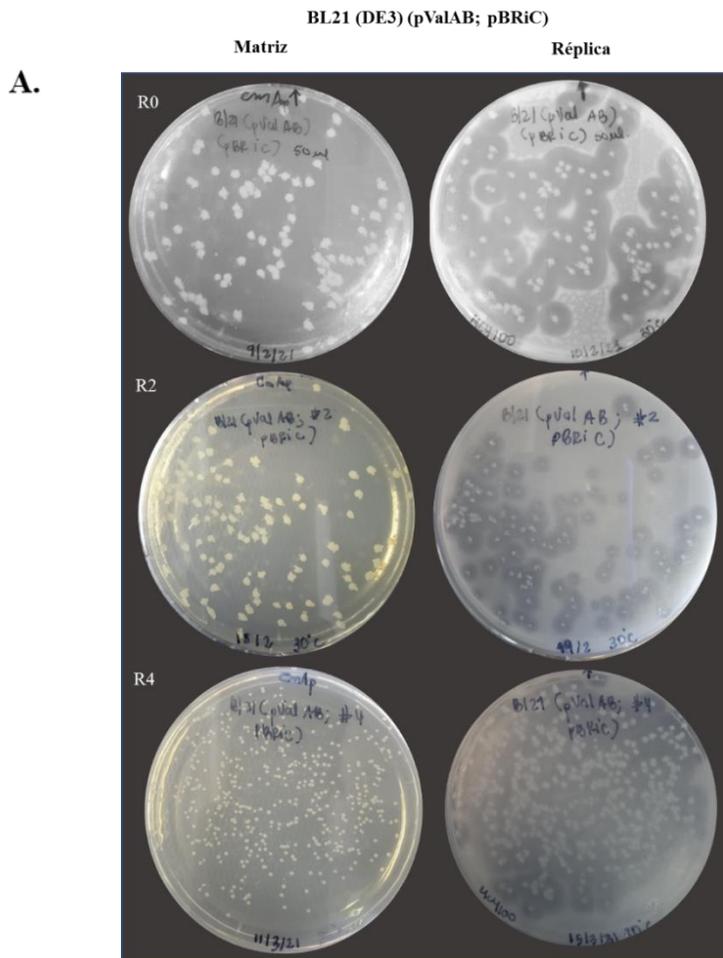


Figura 9. Análisis genético de la pérdida de funcionalidad del transportador EF. **A.** Extracciones de ADN plasmídico a partir de los sucesivos repiques de MC4100 $\Delta lon \Delta ompT::kan$ (pValEF). 1: pValEF (recién construido). Repiques: 2:R0, 3: R1, 4: R2, 5: R3, 6: R4. **B.** Amplificación del operón *mchEF* a partir de las extracciones plasmídicas de A. 1: R0, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4, 6: Ladder 1 kb (Biolabs).



B.



BL21 (DE3) (pValAB)

Figura 10. Ensayo de estabilidad genética del plásmido pValAB en BL21 (DE3). A. Crecimiento de la estria R0 de BL21 (DE3) (pValAB). B. Ensayo de réplica en placa para la evaluar la estabilidad y funcionalidad del plásmido pValAB a lo largo de sucesivas generaciones.

5.2. Diseño de los plásmidos codificantes para los péptidos DS-PTH34 y DS-PTH84

Habiendo demostrado que el plásmido codificante para el transportador AB es estable en la cepa BL21 (DE3), el siguiente paso consistió en generar fusiones génicas que codificaran para péptidos formados por el dominio de secreción de ColV seguido de cada una de las variantes hormonales, 1-34 PTH o 1-84 PTH. Para su expresión, se eligió un sistema que permitiera una transcripción fuerte y con inducción modulable. Es así que se eligió para el clonado un vector pET y la estirpe BL21 (DE3) como contexto genético. Estos vectores contienen el promotor del gen para la ARN polimerasa del fago T7 junto con el operador *lac*, el gen *lacI* que codifica para el represor del operón lactosa y el terminador del fago T7. Por su parte, BL21 (DE3) tiene integrado en su cromosoma el gen *lacI* y el gen para la ARN polimerasa del fago T7 sujeto al influjo transcripcional del *PlacUV5*. De esta manera, al inducir el sistema con lactosa o IPTG se sintetiza la ARN pol. de T7 que uniéndose a su promotor en el pET permite la expresión de las fusiones génicas. Esta polimerasa es muy eficiente y selectiva reconociendo únicamente su propio promotor, de modo que en condiciones de inducción se alcanzan altos niveles de transcriptos del gen de interés. Adicionalmente, el promotor *lacUV5* tiene una mutación puntual que impide que la proteína CAP se le una, por ende, es insensible a la represión catabólica y solo queda regulado por lactosa o IPTG.

El vector elegido fue el pET26b(+) que tiene un tamaño de 5.400 pb, es multicopia (20-40 copias/cromosoma) por poseer el origen de replicación pMB1, y porta un gen de resistencia a Km. Asimismo, provee de una secuencia Shine-Dalgarno (RBS) de alta eficiencia y del codón stop TAA

predominante en *E. coli*. Por último, contiene la secuencia codificante para una etiqueta de seis histidinas (6xHis) que quedaría añadida al extremo carboxilo terminal de la proteína sintetizada y permitiría su purificación mediante una cromatografía de afinidad a metales, en caso de ser requerido.

Las fusiones génicas se diseñaron de modo tal que quedaran en fase las secuencias codificantes del DS de ColV con la de cada una de las variantes hormonales. Posteriormente, se optimizó al uso de codones de *E. coli* la porción de la fusión que correspondía a la secuencia codificante para la hormona, usando el programa ofrecido por el servicio de síntesis nucleotídica GenScript en su página web. Se solicitó a este servicio el clonado de las fusiones entre los sitios NdeI y BlnI del pET26b(+) de modo que cada plásmido recombinante portara una única fusión génica que diera lugar al péptido híbrido con una etiqueta de histidinas en su extremo C-terminal. Una vez recibidos los plásmidos, se introdujeron por transformación en DH5 α . Los clones transformantes se seleccionaron en LB Km y se purificaron algunos de ellos para posteriormente extraer su ADN plasmídico y corroborar el tamaño del plásmido. En ambos casos se digirió con la enzima SmaI, que lineariza los plásmidos, y se constató que tenían el tamaño esperado. A estos plásmidos se les denominó pET-PTH34 y pET-PTH84 (Fig. 11 y 12) (Anexo II: Fig. A4 y A5). Finalmente, como parte del diseño se estimaron los pesos moleculares de los péptidos híbridos y sus variantes carentes del DS en caso de que fueran procesadas por el transportador AB (Tabla 4). Este dato era importante para definir la estrategia de búsqueda de los péptidos en los sobrenadantes de los cultivos.

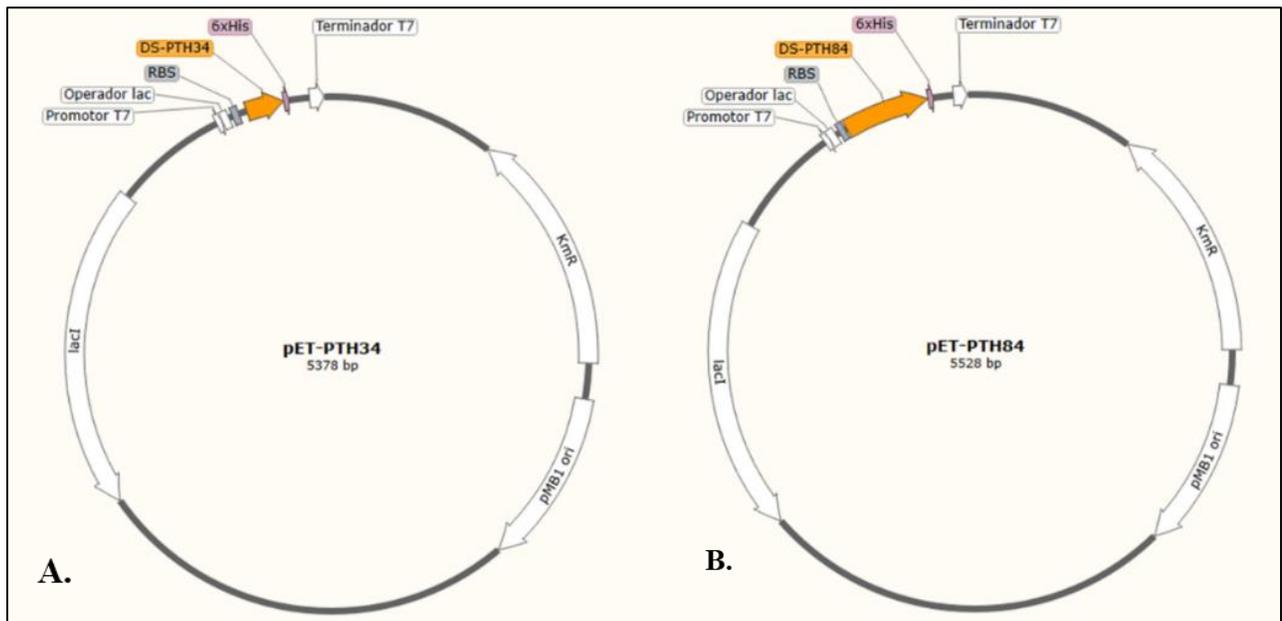


Figura 11. Estructura genética de los plásmidos pET-PTH34 (A) y pET-PTH84 (B).

Tabla 4. Características de los péptidos hormonales

Péptido	Secuencia aminoacídica	Ext.	P.M. ^(a)
DS-PTH34-6xHis	↓ MRTLTLNELDSVSGGSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFHHHHHHH	55aa.	6,5 kDa
PTH34-6xHis	SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFHHHHHHH	40aa.	4,9 kDa
DS-PTH84-6xHis	↓ MRTLTLNELDSVSGGSVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAPRDAG SQRPRKKEDNVLVESHEKSLGEADKADVNVLTKAKSQHHHHHHH	105aa.	11,8 kDa
PTH84-6xHis	SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAPRDAG SQRPRKKEDNVLVESHEKSLGEADKADVNVLTKAKSQHHHHHHH	90aa.	10,2 kDa

Se indica en azul el DS de ColV, en rojo la secuencia hormonal, en negro la etiqueta de histidinas y con una flecha el sitio de corte del transportador AB. ^(a) Peso molecular estimado.

5.3. Construcción de las cepas para la producción de las variantes de la hormona paratiroidea humana

Los ensayos de producción se hicieron en la cepa BL21 (DE3) porque permite la expresión de los genes clonados en pET-PTH34 y pET-PTH84, favoreciendo además la alta producción de proteínas foráneas al ser deficiente para las proteasas Lon y OmpT (89). Cabe recordar que se decidió trabajar únicamente con el transportador AB para evaluar la secreción de las variantes hormonales. Los plásmidos codificantes para las fusiones se usaron para transformar BL21 (DE3) y BL21 (DE3) (pValAB) seleccionando los clones resultantes en LB Km y LB Cm Km, respectivamente. Las estirpes BL21 (DE3) (pET-PTH34) y BL21 (DE3) (pET-PTH84) se construyeron con la finalidad de verificar que la producción intracelular de los péptidos no generaba una cantidad importante de lisis celular y que las células no secretaran los péptidos por vías desconocidas. Éstas, junto con BL21 (DE3) (pValAB) se consignaron como cepas control. Esta última estirpe evidenciaría el patrón de proteínas extracelulares secretadas en ausencia de los péptidos híbridos. Las estirpes BL21 (DE3) (pValAB; pET-PTH34) y BL21 (DE3) (pValAB; pET-PTH84), fueron consignadas como cepas experimentales ya que eran, justamente, las que se esperaba que secretaran las variantes hormonales producto de la actividad del transportador AB (Tabla 5). Luego de obtener los transformantes, se purificaron cuatro clones de cada tipo en el mismo medio de selección. Las estrías de las cepas control que portaban pET-PTH34 y pET-PTH84 exhibieron buen crecimiento con colonias de mediano tamaño, mientras que las cepas experimentales mostraron un crecimiento más

delicado con vaciado en la zona confluyente y colonias de tamaños diferentes (Fig. 13). Esta inestabilidad fue más notoria para la cepa BL21 (DE3) (pValAB; pET-PTH34).

Tabla 5. Cepas empleadas para los ensayos de producción

	Cepas	Características	Resistencias antibióticas
Experimentales	BL21 (pValAB; pET-PTH34)	Síntesis de DS-PTH34 y del transportador AB. ¿Secreción de PTH34?	Cm y Km
	BL21 (pValAB; pET-PTH84)	Síntesis de DS-PTH84 y del transportador AB. ¿Secreción de PTH84?	Cm y Km
Controles	BL21(pET-PTH34)	Síntesis de DS-PTH34	Km
	BL21 (pET-PTH84)	Síntesis de DS-PTH84	Km
	BL21 (pValAB)	Síntesis del transportador AB	Cm

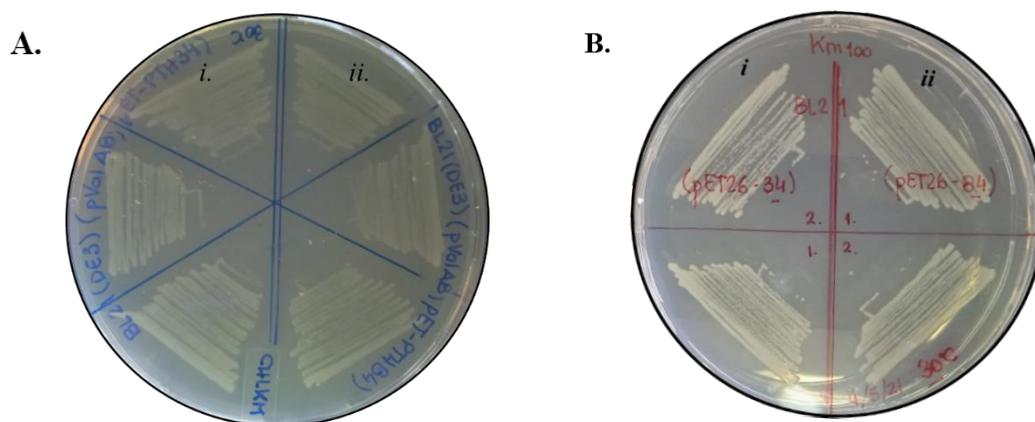


Figura 13. Crecimiento de las cepas portadoras de los plásmidos pET-PTH34 y pET-PTH84. A. Estrías de (i) BL21 (DE3) (pValAB; pET-PTH34) y (ii) BL21 (DE3) (pValAB; pET-PTH84). **B.** Estrías de (i) BL21 (DE3) (pET-PTH34) y (ii) BL21 (DE3) pET-PTH84.

5.4. Evaluación de la producción recombinante de las variantes hormonales

5.4.1. Análisis del crecimiento de las cepas control y experimentales

Para los ensayos de producción se trabajó con un medio más rico que el LB, eligiendo una versión

modificada del medio Zym 5052, donde la solución 5052 carecía de lactosa, ya que se usó IPTG como inductor de la expresión de las fusiones génicas. En base a lo establecido por Studier, 2005, el IPTG se adiciona cuando el cultivo alcanza una DO_{600} de 1 (89). Inicialmente, se evaluó el crecimiento en medio Zym mod. líquido y se determinó que en fase estacionaria las cepas que portaban pET-PTH34 o pET-PTH84 alcanzaban una DO_{600} de ca. 9 y un recuento de viables en el orden de 10^9 ufc/ml. En el caso de la cepa que sólo portaba pValAB se registró una DO_{600} de 11 y un recuento de viables en el orden de 10^{10} ufc/ml. Teniendo en cuenta que las cepas control portadoras de pET-PTH34 o pET-PTH84 tenían un crecimiento similar a las experimentales, se hizo un análisis del crecimiento solo con estas últimas de tal manera que se pudiera establecer el tiempo que les tomaba alcanzar una DO_{600} de 1 en el medio escogido. Al realizar el ensayo, se determinó que ambas cepas experimentales alcanzaban una DO_{600} de ca. 1 después de cuatro horas de incubación y un recuento de viables de aprox. $3,5 \times 10^8$ ufc/ml. Con lo anterior se evidenció que BL21 (DE3) (pValAB; pET-PTH34) y BL21 (DE3) (pValAB; pET-PTH84) tienen tasas de crecimiento similares, que concuerdan con lo descrito por Studier, 1986 (83) para la cepa BL21 (DE3).

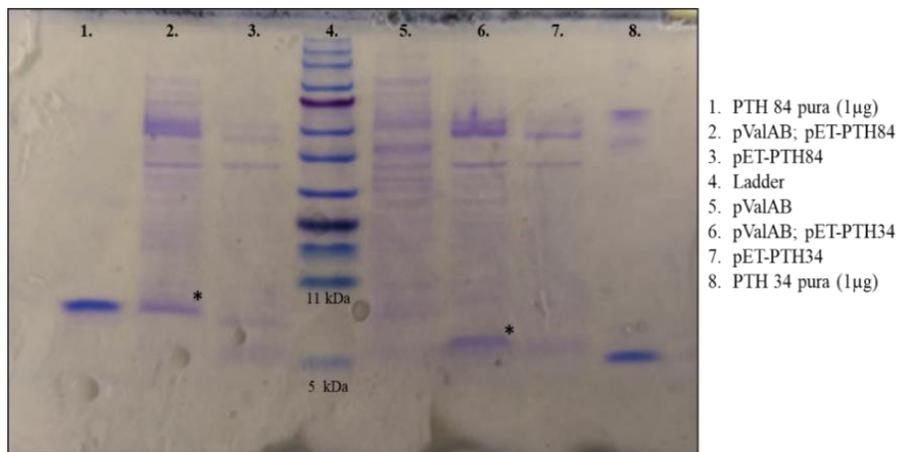
5.4.2. Análisis de los sobrenadantes

Se procedió a hacer los ensayos de producción de las variantes hormonales enfocados en el análisis de los sobrenadantes de los cultivos. En un primer experimento se obtuvieron las muestras correspondientes a los sobrenadantes de los cultivos de todas las cepas a las 4 y a las 20 h después de la inducción con IPTG. Los recuentos para las cepas que portaban pET-PTH34 y pET-PTH84, tanto como único plásmido como co-residiendo con pValAB, estaban en el orden de $4-7 \times 10^8$ ufc/ml y $1-2 \times 10^9$ ufc/ml luego de 4 h y 20 h de la inducción, respectivamente. En cambio, BL21 (DE3) (pValAB) tuvo recuentos más altos, del orden de 10^{10} ufc/ml en ambas condiciones.

Posteriormente, se procesaron los sobrenadantes y se analizó el contenido proteico de cada uno mediante electroforesis en geles de tricina SDS-PAGE al 10%, resolviendo alícuotas de cada SN. Se adicionaron en la corrida alícuotas de las variantes hormonales puras comerciales, PTH34 y PTH84. En el caso de los SN procesados a las 4 h posinducción, el perfil de bandas fue muy similar entre los experimentales y los controles, no evidenciándose bandas que correspondieran a péptidos hormonales. Por el contrario, se obtuvieron bandas de aproximadamente 5,2 kDa y 10 kDa que podrían corresponder a los péptidos híbridos PTH34-6xHis y PTH84-6xHis, respectivamente, en los SN experimentales luego de 20 h de inducción (Fig. 14A). Por lo tanto, se extrajeron las bandas de interés para su análisis por espectrometría de masas asociado a nano HPLC, usando una base de datos construida con los contaminantes más abundantes en

este tipo de experimentos, el proteoma de *E. coli* BL21-DE3 (bajado de Uniprot) más las secuencias PTH34-6xHis y PTH84-6xHis. Posteriormente, se realizó el análisis añadiendo las secuencias de los péptidos híbridos DS-PTH34-6xHis y DS-PTH84-6xHis. Se determinó que las bandas correspondían a los péptidos PTH34-6xHis y PTH84-6xHis. Más aún, en ambos casos se detectó el péptido tríptico N-terminal cuya secuencia comenzaba en el aminoácido inmediatamente posterior al dominio de secreción, con lo cual se constató que los péptidos híbridos habían sido procesados por el transportador AB (Fig. 14B) (Anexo III: PTH34 y PTH84). Por el contrario, el análisis no reveló la presencia de los péptidos sin procesar.

A.



B.

Espectrometría de masas asociado a nano HPLC

Péptidos de PTH34

SVSEIQLMHN LGKHLNSMER VEWLRRKKLQD VHNF HHHHHH -- 20/40 = 0.5 de cobertura

Péptidos de PTH84

SVSEIQLMHN LGKHLNSMER VEWLRRKKLQD VHNFVALGAP LAPRDAGSQR PRKKEDNVLV ESHEKSLGEA
DKADVNVLTAK AKSQ HHHHHH -- 62/90 = 0.7 de cobertura

Figura 14. Secreción de las variantes de PTH. A. Gel de tricina SDS-PAGE. Se resuelven 10 µl de SN de cultivos de BL21 (DE3) con los plásmidos consignados. **B.** Espectrometría de masas asociado a nano HPLC de las bandas señaladas con asterisco en A. En rojo se resaltan los péptidos que se identificaron en el análisis.

A partir de estos resultados se continuó trabajando siempre procesando los cultivos a 20 h después de la inducción.

En ensayos posteriores, se realizaron pruebas para confirmar que los péptidos identificados en los sobrenadantes de las cepas experimentales eran producto de la secreción y no de lisis celular. Es así que se hizo un ensayo para determinar la actividad β -galactosidasa en los sobrenadantes ya que al ser una enzima de localización citoplasmática (90), la detección de su actividad hidrolítica era sugestiva del grado de lisis celular. La prueba incluyó, además de los SN de las cepas experimentales, los correspondientes a los de las cepas control. Se tomaron como referencia las medidas de actividad de los cultivos, siendo en promedio de ca. 1600U tanto para las cepas experimentales como para las control. En el caso de los SN, se obtuvieron valores de actividad dispares entre las cepas, pero todos ellos fueron mucho menores a los de los cultivos, siendo alrededor de 14U para las experimentales, 65U para las cepas portadoras de pET-PTH34 o pET-PTH84 y menor a 10U para la que portaba solo pValAB. Dada la diferencia entre las actividades enzimáticas de los cultivos y de los sobrenadantes, se descartó que hubiera una importante lisis celular.

Asimismo, las muestras de SN se evaluaron a través de un Western Blot, de manera que se pudiera detectar los péptidos hormonales en caso de que estuvieran en bajas concentraciones o que éstos estuvieran formando agregados. Para ello fue necesario hacer ensayos de Dot Blot para determinar la concentración de anticuerpo primario y secundario que revelara específicamente las variantes hormonales. Cabe señalar que el Ac. primario anti-PTH era policlonal e iba dirigido contra la fracción 1-34 de la hormona paratiroidea humana, por lo cual se esperaba que reconociera dicha porción en los dos péptidos secretados, PTH34-6xHis y PTH84-6xHis. En estos ensayos se incluyeron los SN de las cepas control y experimentales. Luego de probar varias concentraciones se evidenció que todos ellos emitían fluorescencia, especialmente el correspondiente al cultivo de BL21 (DE3) (pValAB). Finalmente, se hizo un Western Blot, que evidenció una única banda en los SN de todas las cepas que migraba como el patrón de 65kDa del peso molecular. Dichas bandas se extrajeron del gel idéntico para su análisis por espectrometría de masas, el cual concluyó que no se trataban de las variantes hormonales sino de otra proteína inespecífica. Incluso el anticuerpo primario no reconoció las proteínas puras de PTH, de manera que se descartó su uso. Frente a este inconveniente, se decidió hacer un nuevo Western Blot empleando un anti-Histag como anticuerpo primario, dirigido contra la cola de seis histidinas ubicada en el extremo C-terminal de los péptidos híbridos. Cabe mencionar que el Ac. secundario correspondiente fue provisto amablemente por Juan J. Marizcurrena de la Sección de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias. El nuevo inmunoensayo ahora sí generó resultados concluyentes: los sobrenadantes de ambas cepas experimentales revelaron bandas de los pesos moleculares esperados para PTH34-6xHis y PTH84-

6xHis. Más aún, en los SN de las tres cepas control no aparecieron bandas, confirmando así la especificidad del Ac. primario y la identidad de los péptidos secretados. Además, se pudo determinar que no había altos niveles de lisis celular en las cepas control BL21 (DE3) (pET-PTH34) y BL21 (DE3) (pET-PTH84) (Fig. 15).

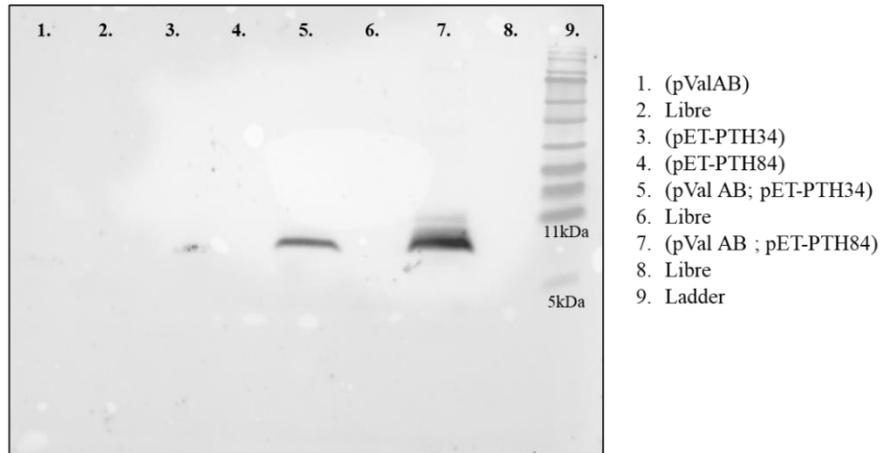


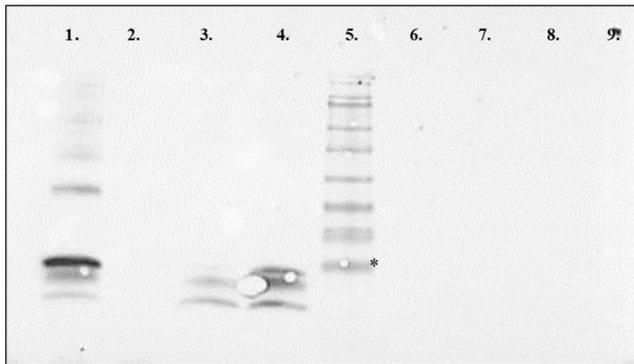
Figura 15. Identificación por Western Blot de los péptidos hormonales secretados. Se resuelven 10 μ l de SN de los cultivos de BL21 (DE3) con los plásmidos consignados. Ac primario anti-Histag y Ac secundario anti- IgG de ratón conjugado a peroxidasa.

5.4.3 Análisis de las fracciones celulares

Para determinar si las variantes hormonales se estaban sintetizando y acumulando correctamente dentro de la célula se evaluaron las fracciones celulares correspondientes a las células de los cultivos a las 20 h posinducción, analizando la fracción total, soluble e insoluble de las cepas experimentales y control, resolviéndolas por electroforesis de tricina SDS-PAGE. En general, no se evidenciaron bandas intensas del peso molecular esperado para los péptidos hormonales. Además, se hicieron análisis por Western Blot para evaluar las fracciones total y soluble. También se analizaron las fracciones insolubles para todas las muestras, sin embargo no se encontró. En este caso se empleó el Ac. primario anti-Histag, el cual logró identificar específicamente los péptidos híbridos. Aun así, los resultados fueron poco concluyentes, especialmente porque nunca se evidenciaron bandas en las fracciones de las cepas que portaban el plásmido pET-PTH34. Sin embargo, en aquellas derivadas de las cepas que portaban pET-PTH84 se lograron ver bandas en las fracciones de la cepa experimental, pudiendo identificar el péptido monomérico DS-PTH84-6xHis, así como bandas tenues de menor y mayor peso molecular relacionadas con los

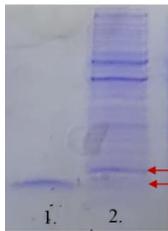
péptidos híbridos. En cuanto a su cepa control, se observaron mayormente bandas con el mismo patrón de migración que las de menor peso exhibidas por la experimental (Fig. 16A). En su conjunto, estos resultados indicaron que las células contenían el péptido no procesado DS-PTH84-6xHis, más formas multiméricas y productos de degradación. En el mismo experimento se extrajeron bandas correspondientes a la fracción total de la cepa experimental que contenía pET-PTH84 del gel homólogo teñido con Coomassie, según se muestra en la Fig. 16B. Las bandas se analizaron por espectrometría de masas MALDI TOF-TOF empleando la base de datos de Uniprot y la secuencia DS-PTH84-6xHis (Fig. 16C) (Anexo III: FTBA y FTBB). Se constató que la banda A correspondía al péptido no procesado DS-PTH84-6xHis. Por su parte, la banda B era ancha, probablemente doble, de modo que los resultados de la espectrometría corresponderían a ese conjunto. En esta última banda, no se identificó ni el DS ni la porción N-terminal de PTH84, de modo que podría tratarse de péptidos derivados degradados o, tal vez, del procesado por el transportador.

A.



1. FT pValAB; pET-PTH84
2. Libre
3. FS pET-PTH84
4. FS pValAB; pET-PTH84
5. Ladder (* banda de 11 kDa)
6. FS pValAB pET-PTH34
7. FS pET-PTH34
8. FT pValAB; pET-PTH34
9. FS pValAB

B.



A Se extraen para análisis por
B espectrometría de masas

C.

Resultados del análisis por espectrometría de masas

- A.** MRTLTTLNELD SVSGGSVSEI QLMHNLGKHL NSMERVEWLR KKLQDVHNFV ALGAPLAPRD AGSQRPRKK
EDNVLVESHE KSLGEADKAD VNVLTAKSQ HHHHHH - 28/40= 70% de cobertura
- B.** MRTLTTLNELD SVSGGSVSEI QLMHNLGKHL NSMERVEWLR KKLQDVHNFV ALGAPLAPRD AGSQRPRKK
EDNVLVESHE KSLGEADKAD VNVLTAKSQ HHHHHH - 43/90= 52.2% de cobertura

Figura 16. Análisis de las fracciones celulares. **A.** Western Blot. Se resuelven 10 µl de fracciones total (FT) y soluble (FS) de BL21 (DE3) con los plásmidos consignados. Ac primario anti-Histag y Ac secundario anti- IgG de ratón conjugado a peroxidasa. **B.** Gel de tricina del que se extrajeron las bandas A y B para análisis MALDI TOF – TOF (2.) y PTH84 pura (1.). **C.** Resultados del análisis por espectrometría de masas. En rojo, péptidos identificados.

6. Discusión

La secreción de proteínas recombinantes en *E. coli* continúa siendo un tema de investigación de gran interés para la industria biotecnológica. Es por ello que en este trabajo se apostó a evaluar dos sistemas de secreción tipo I de las microcinas de mayor masa molecular, los cuales exponen características útiles para su uso como herramienta de secreción de péptidos foráneos. Para estos ensayos se eligieron las variantes 1-34 y 1-84 de la hormona paratiroidea humana, porque son péptidos que no superan la extensión de las microcinas, no tienen modificaciones postraduccionales y, además, son usadas como tratamiento de enfermedades óseas. El contexto celular elegido fue la cepa *E. coli* B BL21 (DE3), de la cual se tiene evidencia respecto a su robustez para sintetizar grandes cantidades de proteínas recombinantes sin sufrir mayor lisis celular (89).

Se logró determinar que uno de los dos SS1 evaluados, el transportador AB, es capaz de secretar las dos variantes hormonales unidas a una etiqueta de seis histidinas. En efecto, dicho transportador secreta los péptidos foráneos a través del reconocimiento y procesamiento del DS de su sustrato natural ColV, tal y como se planteó en la hipótesis. Varias son las evidencias experimentales que así lo confirman. Primero, las bandas reveladas a partir de los SN de las cepas experimentales en el gel de tricina SDS-PAGE (Fig. 14) fueron sugestivas de la presencia de los péptidos hormonales en el medio extracelular, lo que posteriormente se confirmó al analizarlas por espectrometría de masas. Más aún, dicho análisis evidenció que se trataba de los péptidos hormonales carentes del dominio de secreción. En consonancia, el Western Blot (Fig. 15) reafirmó la identidad e integridad de los péptidos PTH34-6xHis y PTH84-6xHis en el sobrenadante de las cepas experimentales. Uno de los puntos clave en este trabajo fue determinar el origen de la presencia de los péptidos hormonales en el sobrenadante de los cultivos. Para ello, el procesamiento de los sobrenadantes incluyó siempre su filtración por lo que se descartó que la presencia de los péptidos proviniera de las células remanentes luego de la centrifugación. Otro aspecto relevante para consolidar el resultado de la secreción fue descartar que los cultivos tuvieran un alto porcentaje de lisis celular. A priori, las imágenes de los geles de SDS-PAGE revelaron que las cantidades de proteínas en los SN fueron bajas, de acuerdo a lo esperado según antecedentes de la literatura (49). Además, a través de la medida de actividad β -galactosidasa, se constató que los cultivos tenían valores alrededor de tres órdenes de magnitud mayores a los de sus correspondientes SN tanto de las cepas experimentales como de las control. Esto reveló claramente que la β -galactosidasa permanecía en el interior de las células, no siendo liberada por lisis al exterior celular. Por lo tanto, la expresión separada o conjunta de los péptidos y el transportador no

estaría generando grandes alteraciones en la integridad de las células. En este sentido, la caída relativamente discreta en el número de células de los cultivos que expresan los péptidos hormonales a las 20 h posinducción no sería consecuencia de lisis celular, sino de un enlentecimiento del crecimiento. Este hallazgo puede deberse a varias razones. Por un lado, la hiperexpresión de las fusiones génicas y por otro, no se puede descartar un cierto efecto tóxico de los péptidos hormonales producidos. Otra razón podría ser que el exportador B utiliza ATP y Ca^{2+} para procesar y secretar los péptidos híbridos, consumiendo energía celular en detrimento del crecimiento. Esto último sería improbable ya que ocurriría solo en las cepas experimentales (en presencia del sustrato), sin embargo, el efecto se extiende a las cepas control. En contraparte, la cepa que únicamente porta pValAB creció de forma muy similar sin y con inducción. Todo lo anterior sugiere que la presencia del transportador en la envoltura celular no estaría afectando de forma significativa la viabilidad.

Es preciso notar que existen muy pocos trabajos de secreción de proteínas recombinantes que incluyan la filtración del SN previo a su análisis (55,91,92). En cuanto a la lisis celular del cultivo, tampoco es general su determinación, habiendo algunas descripciones que evalúan la actividad β -galactosidasa, como en este trabajo, o la presencia de proteínas citoplasmáticas mediante Western Blot, mayormente cuando la estrategia de secreción comprende la alteración de la membrana externa (91,93–97). En particular, la mayoría de los trabajos que emplean el transportador ABC de la α -hemolisina u otro, no abordan este aspecto. En su mayoría, realizan un seguimiento de la curva de crecimiento de las células por mediciones de densidad óptica, deduciendo que su nula o baja alteración sugiere que la lisis celular es despreciable (28,59,93,98).

En cuanto al sistema de producción, se eligió una inducción moderada de la expresión génica de los péptidos híbridos (0.5mM de IPTG), tal como se sugiere en el caso de proteínas que se secretan, en virtud de mantener la integridad de la envoltura celular (99). En efecto, los reportes de secreción usando el transportador HlyBD que inducen la síntesis del sustrato con IPTG, en su mayoría agregan 0.5mM cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} : 0.5-1) (51,55,100–102). Por su parte, en la mayoría de las descripciones, la expresión de los genes del transportador no es inducida (como en este trabajo) o sujeta a una inducción muy moderada por arabinosa (55,92,98,101–103). Con esta estrategia se visualizaron las variantes hormonales a partir del SN correspondiente a 10 μl de cultivo luego de 20 h de la inducción. Teniendo en cuenta que se evaluó una alícuota pequeña de sobrenadante sin concentrar, parece que el transportador AB secreta con eficiencia los péptidos hormonales. Sin embargo, para poder confirmar esta hipótesis, sería necesario hacer experimentos donde se cuantifique la proteína

desde el sobrenadante.

Un inconveniente importante en estos ensayos fue el bajo nivel de reproducibilidad de los resultados, y en consecuencia tanto los sobrenadantes como las fracciones celulares analizados no provienen de un mismo experimento. En efecto, no se logró volver a evidenciar la secreción con una banda tan contundente como en el primer experimento. De hecho, se halló en el Western Blot la variante hormonal 1-84 PTH degradada en las fracciones celulares. En la cepa experimental si bien se llegaron a reconocer los péptidos DS-PTH84-6xHis y PTH84-6xHis, también se evidenciaron bandas más pequeñas. Más aún, en el caso de la cepa control, no se observó una banda correspondiente al péptido DS-PTH84-6xHis, como era esperado, y sólo se encontraron bandas menores (Fig. 16). En base a lo anterior, se deduce que muy probablemente la variante 1-34 PTH también se habría degradado, ya que hubo ausencia total de bandas (tanto en ensayos de Western Blot como en geles de tricina) en las fracciones celulares de la cepa experimental como control (Fig. 16). En suma, la degradación de los péptidos hormonales podría ser la causa en el descenso de la concentración de éstos en el sobrenadante. Cabe recordar que la hormona paratiroidea es naturalmente inestable, por lo que solucionar el problema de degradación es un desafío en cuanto a su producción recombinante (104). De hecho, se han producido las variantes hormonales en el medio intracelular fusionadas a proteínas como Tiorredoxina (77), Factor X (105), Glutation transferasa (75) y β -galactosidasa (78,106) para estabilizar su estructura y facilitar su purificación. Asimismo, se logró recuperar la variante 1-34 PTH sintetizada como un tetrámero desde el medio intracelular (107). Si bien este abordaje de producir PTH fusionada a otras proteínas logra subsanar mayormente el problema, implica etapas posteriores de separación de la proteína fusión y purificación de la hormona. Asimismo, los dos trabajos de secreción que existen hasta el momento se basaron en sintetizar las hormonas fusionadas a otras proteínas y transportarlas al periplasma para que finalmente alcancen el medio extracelular gracias a la permeabilización de la envoltura de *E. coli*. Cabe resaltar que ninguno de ellos empleó un método de detección de lisis celular y se limitó al seguimiento de la curva de crecimiento (76,77). En este trabajo se logró secretar las variantes hormonales con un sistema de secreción que transloca los péptidos en un solo paso. Cabe anotar, que la estrategia permitió secretar las variantes hormonales sin que estuvieran fusionadas a otras proteínas, más allá del dominio de secreción. En efecto, se logró obtener ambas variantes íntegras en el sobrenadante de los cultivos, sugiriendo que la ausencia de proteasas y la baja concentración de proteínas del medio extracelular favorece su estabilidad. No obstante, se detectó degradación en el medio intracelular, lo cual podría deberse a la diferencia de dosis génica entre sustrato y transportador que determinaría un desfase entre la síntesis y la secreción, por lo

cual la hormona permanecería en el citoplasma expuesta a la degradación. Una mejora para este inconveniente podría ser equiparar la expresión del transportador y de los péptidos hormonales de modo de lograr un equilibrio entre la cantidad de péptidos sintetizados y la tasa de secreción.

Para considerar los transportadores AB y EF como herramienta de secreción de péptidos recombinantes, antes de realizar los ensayos de producción se evaluó la estabilidad genética de los plásmidos que los codificaban. Cabe señalar que el resultado fue inesperado, considerando la alta homología de secuencia entre ambos transportadores así como su capacidad de secretar de forma heteróloga las microcinas H47 y ColV (32,33). Si bien las construcciones genéticas eran idénticas, pValEF derivó rápidamente en un plásmido mutado en los genes de secreción a diferencia de pValAB, cuya estructura genética se mantuvo indemne. La pérdida de funcionalidad del transportador EF fue independiente de la presencia del sustrato ColV y ocurrió tanto en el contexto salvaje como en el deficiente para las proteasas Lon y OmpT, siendo incluso más acentuado en este último. Esto sugiere que el transportador EF estaría afectando más la viabilidad de la célula, haciendo que sólo aquellas que inhabilitaron su función sobrevivan. Actualmente, no se tiene una explicación para este fenómeno, por lo que se requieren más ensayos y estudios con el transportador EF.

Cabe señalar que, tratándose de transportadores dedicados a la secreción de antibióticos, fue posible ensayar su funcionalidad a través de la complementación para la producción de ColV. Por el contrario, en el caso del transportador de la α -hemolisina, al secretar una toxina que afecta la célula eucariota, no es posible un ensayo fenotípico sencillo como el desarrollado en este trabajo. No obstante, ninguna descripción en la que se empleó el transportador HlyBD u otro ABC en la producción de proteínas recombinantes refiere un análisis de la estabilidad genética ni de la funcionalidad del transportador (55,60,98,101). Se enfatiza aquí entonces la importancia de los ensayos de estabilidad, gracias a los cuales se evidenciaron las diferencias entre los transportadores EF y AB, lo que determinó que se ensayara la producción de las hormonas únicamente con el transportador AB.

Si bien en este trabajo se buscó evaluar el transportador AB como una herramienta para la secreción de proteínas recombinantes en *E. coli*, este tipo de análisis aporta también información sobre la fisiología por la cual el exportador opera la secreción del sustrato. En este sentido, se postula que los exportadores con dominio cisteín-proteasa funcional, una vez unen el sustrato, desencadenan las etapas de reconocimiento del DS, procesamiento del DS y secreción del péptido de forma sucesiva e inexorable. Esta hipótesis fue postulada en base a estudios bioquímicos y estructurales que daban cuenta del procesamiento de péptidos por la porción cisteín-proteasa del exportador (3,37,41,108–110). Es así que cobra importancia el análisis

de la fracción celular procedente de la estirpe que sintetiza los péptidos híbridos en presencia del transportador AB. En este sentido, los datos obtenidos con la variante PTH84 permitieron identificar la presencia del péptido DS-PTH84-6xHis y de un péptido menor que podría ser PTH84-6xHis (Fig. 16). Esto podría indicar que hay una pequeña cantidad de péptido procesado en el medio intracelular, hallazgo que concuerda con lo obtenido previamente en la evaluación de la secreción de Interleuquina 15 por el transportador AB. En este caso, no se observó el péptido sin procesar sino sólo una versión de menor tamaño, compatible con el péptido procesado, en los extractos celulares (74). Por lo tanto, estos resultados podrían contradecir el modelo de secreción de etapas inexorablemente sucesivas para estos transportadores, planteado en la literatura. Se considera que este tipo de ensayos realizados en nuestro laboratorio podrían aportar al entendimiento de la fisiología de estos exportadores ABC.

En suma, en esta tesis se aporta información sobre la secreción heteróloga de un péptido recombinante por un sistema de secreción de tipo I de microcinas en el contexto *E. coli*. Si bien los resultados son preliminares, se logró probar la secreción específica de la paratohormona por el transportador AB de Colicina V.

7. Conclusiones

- ❖ El transportador AB de Colicina V es capaz de secretar ambas variantes de la hormona paratiroidea humana.
- ❖ El exportador B reconoce y procesa específicamente el dominio de secreción de ColV unido a cada variante, de manera que son secretadas al medio extracelular sin secuencias adicionales.
- ❖ La expresión del transportador AB no parece afectar de manera significativa la viabilidad de *E. coli*, y su funcionalidad se mantiene estable a lo largo de las generaciones.
- ❖ El transportador EF no se mantuvo funcional en las células, por lo que se descartó su uso para los análisis de secreción de las hormonas.
- ❖ Las variantes de la hormona paratiroidea humana exhibieron degradación en el medio intracelular lo cual dificultó la reproducibilidad de los experimentos de secreción.
- ❖ El transportador AB tendría el potencial de concebirse como una herramienta para la secreción de proteínas recombinantes en *E. coli*.

8. Bibliografía

1. Costa T.R., Felisberto-Rodrigues C., Meir A., Prevost M.S., Redzej A., Trokter M., et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2015;13(6):343–59. DOI: 10.1038/nrmicro3456
2. Green E.R., Meccas J. Bacterial secretion systems: An overview. *Virulence Mech Bact Pathog*. 2016;4(1):213–39. DOI: 10.1128/microbiolSpec.VMBF-0012-2015
3. Lin D.Y., Huang S., Chen J. Crystal structures of a polypeptide processing and secretion transporter. *Nature*. 2015;523(7561):425–30. DOI: 10.1038/nature/4623
4. Fitzpatrick A.W., Llabrés S., Neuberger A., Blaza J.N., Bai X.C., Okada U., et al. Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat Microbiol*. 2017;2(May). DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.70
5. Morgan J.L., Acheson J.F., Zimmer J. Structure of a Type-1 Secretion System ABC Transporter. *Structure*. 2017;25(3):522–9. DOI: 10.1016/j.str.2017.01.010
6. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* (80-). 1997;277(5331):1453–62. DOI: 10.1126/science277.5331.1453
7. Aravind L., Walker D.R., Koonin E.V. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(5):1223–42. DOI: 10.1093/nar/27.5.1223
8. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology* 8: 67–113. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:67–113. DOI:10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.an.
9. Busch W, Saier MH. The Transporter Classification (TC) system, 2002. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2002;37(5):287–337. DOI: 10.1080/10409230290771528
10. Lecher J., Schwarz C.K., Stoldt M., Smits S.H., Willbold D., Schmitt L. An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain. *Structure* [Internet]. 2012;20(10):1778–87. DOI: 10.1016/j.str.2012.08.005
11. Rees D.C., Johnson E., Lewinson O. ABC transporters: The power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(3):218–27. DOI: 10.1038/nrm2646
12. Jones P.M., George A.M. The ABC transporter structure and mechanism: Perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(6):682–99. DOI: 10.1007/S00018-003-3336-9
13. Koronakis V. TolC - The bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Lett*. 2003;555(1):66–71. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01126-6
14. Weston N., Sharma P., Ricci V., Piddock L.J.. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol* . 2018;169(7–8):425–31. DOI: 10.1016/j.resmic.2017.10.005
15. Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*. 2000;405:914–9. DOI: 10.1038/35016007
16. Ford R.C., Beis K. Learning the ABCs one at a time: Structure and mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans*. 2019;47(1):23–36. DOI: 10.1042/BST20180147
17. Du D., Wang-Kan X., Neuberger A., Van Veen H.W., Pos K.M., Piddock L.J., et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(9):523–39. DOI: 10.1038/s41579-018-0048-6
18. Yamanaka H., Kobayashi H, Takahashi E., Okamoto K. MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol*. 2008;190(23):7693–8. DOI:

10.11258/JB00853-08

19. Binet R., Wandersman C. Protein secretion by hybrid bacterial ABC-transporters: Specific functions of the membrane ATPase and the membrane fusion protein. *EMBO J.* 1995;14(10):2298–306.
20. Poey M.E., Azpiroz M.F., Laviña M. Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1411–8. DOI: 10.1128/AAC.50.4.1411-1418.2006
21. Koronakis V., Koronakis E., Hughes C. Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membrane. *EMBO J.* 1989;8(2):595–605. DOI:
22. Fath M.J., Kolter R. ABC transporters: Bacterial exporters. *Microbiol Rev.* 1993;57(4):995–1017. DOI: 10.1128/mr.57.4.995-1017.1993
23. Thomas S., Holland I., Schmitt L. The tipe I secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochim Biophys.* 2014;1843(8):1629–41. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.09.017
24. Blight M.A., Holland I.B. Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. *Trends Biotechnol.* 1994;12(11):450–5. DOI: 10.1016/0167-7799(94)900220.5
25. Duong F., Lazdunski A., Murgier M. Protein secretion by heterologous bacterial ABC-transporters: The C- terminus secretion signal of the secreted protein confers high recognition specificity. *Mol Microbiol.* 1996;21(3):459–70. DOI:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02555.x
26. Beis K., Rebuffat S. Multifaceted ABC transporters associated to microcin and bacteriocin export. *Res Microbiol.* 2019;170(8):399–406. DOI: 10.1016/j.resmic.2019.07.002
27. Havarstein L.S., Diep D.B., Nes I.F. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol.* 1995;16(2):229–40. DOI: 10.1111/j1365-2958.1995.tb02295.x
28. Nishie M., Shioya K., Nagao J ichi, Jikuya H, Sonomoto K. ATP-dependent leader peptide cleavage by NukT, a bifunctional ABC transporter, during lantibiotic biosynthesis. *J Biosci Bioeng.* 2009;108(6):460–4. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.06.002
29. Klaenhammer T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;12(1–3):39–85. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
30. Rodríguez JM, Martínez M.I., Horn N., Dodd H.M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2003;80(2):101–16. DOI: 10.1016/s0168-1605(02)00153-8
31. Van Belkum M.J., Worobo R.W., Stiles M.E. Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: Colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol.* 1997;23(6):1293–301. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.3111677.x
32. Azpiroz M.F., Rodríguez E., Laviña M. The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(3):969–72. DOI: 10.1128/AAC.45.3.969-972.2001
33. Azpiroz M.F., Laviña M. Modular structure of microcin H47 and colicin V. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(7):2412–9. DOI: 10.1128/AAC01606-06
34. Hetz C., Bono M.R., Barros L.F., Lagos R. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(5):2696–701. DOI: 10.1073/pnas.052709699
35. Lagos R., Baeza M., Corsini G., Hetz C., Strahsburger E., Castillo J.A., et al. Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol Microbiol.* 2001;42(1):229–43. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02630.x

36. Gilson L., Mahanty H.K. Genetic analysis of an MDR-like export system : the secretion of colicin V. 1990;9(12):3875–84. DOI:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07606.x
37. Wu K.H., Tai P.C. Cys32 and His105 Ate the Critical Residues for the Calcium-dependent Cysteine Proteolytic Activity of CvaB, an ATP-binding Cassette Transporter. *J Biol Chem.* 2004;279(2):901–9. DOI: 10.1074/jbc.M308296200
38. Wu K.H., Hsieh Y.H., Tai P.C. Mutational analysis of Cvab, an ABC transporter involved in the secretion of active colicin V. *PLoS One.* 2012;7(4). DOI: 10.1371/Journal.pone.0035382
39. Fath M.J., Zhang L.H., Kolter R., Rush J. Purification and Characterization of Colicin V from *Escherichia coli* Culture Supernatants. *Biochemistry.* 1994;33(22):6911–7. DOI: 10.1021/bi00188a021
40. Li H. Z., Fath M.J., Mahanty H.K., Tai P.C., Kolter R. Genetic analysis of the Colicin V secretion pathway. *Genetics.* 1995;141(1):25–32. DOI: 10.1093/genetics/14.1.25
41. Havarstein L.S., Holo H., 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.* 1994;140(9):2383–9. DOI: 10.1099/1350088-140-9-2383
42. Lagos R., Villanueva J.E., Monasterio O. Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J Bacteriol.* 1999;181(1):212–7. DOI: 10.1128/JB.181.1.212-217.1999
43. Vassiliadis G., Destoumieux-Garzón D., Lombard C., Rebuffat S., Peduzzi J. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):288–97. DOI: 10.1128/AAC.00744-09
44. Thomas X., Destoumieux-Garzón D., Peduzzi J., Afonso C., Blond A., Birlirakis N., et al. Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J Biol Chem.* 2004;279(27):28233–42. DOI: 10.1074/jbc.M400228200
45. Azpiroz M.F., Laviña M. Involvement of Enterobactin Synthesis Pathway in Production of Microcin H47. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1235–41. DOI: 10.1128/AAC.48.4.1235-1241.2004
46. Gaglione R., Pane K., Dell’Olmo E., Cafaro V., Pizzo E., Olivieri G., et al. Cost-effective production of recombinant peptides in *Escherichia coli*. *N Biotechnol.* 2019;51(December 2017):39–48. DOI: 10.1016/j.nbt.2019.02.004
47. Francis D.M., Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci.* 2010;(SUPPL. 61):1–29. DOI: 10.102/0471140864.ps0524s61
48. Han M.J., Kim J.Y., Kim J.A. Comparison of the large-scale periplasmic proteomes of the *Escherichia coli* K-12 and B strains. *J Biosci Bioeng [Internet].* 2014;117(4):437–42. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.09.008
49. Xia X.X., Han M.J., Sang Y.L., Yoo J.S. Comparison of the extracellular proteomes of *Escherichia coli* B and K-12 strains during high cell density cultivation. *Proteomics.* 2008;8(10):2089–103. DOI: 10.1002/pmic.200700826
50. Kleiner-Grote G.R., Risse J.M., Friehs K. Secretion of recombinant proteins from *E. coli*. *Eng Life Sci.* 2018;18(8):532–50. DOI: 10.1002/elsc.201700200
51. Mergulhão F.J., Summers D.K., Monteiro G.A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv.* 2005;23(3):177–202. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2004.11.003
52. Ni Y., Chen R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 2009;31(11):1661–70. DOI: 10.1007/s10529-009-0077-3
53. Gentschev I., Mollenkopf H., Sokolovic Z., Hess J., Kaufmann S.H., Goebel W. Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. *Gene.*

- 1996;179(1):133–40. DOI: 10.1016/s0378-1119(96)00424-6
54. Tzschaschel B., Guzmán C., Timmis K., de Lorenzo V. An Escherichia coli hemolysin transport system based vector for the export of polipeptides: export of Shiga-like toxin IeB subunit y Salmonella typhimorium aroA. *Nature Biotechnology*. 1996. 14:765-769. DOI: 10.1038/nbt0696-765
 55. Su L., Chen S., Yi L., Woodard R.W., Chen J., Wu J. Extracellular overexpression of recombinant Thermobifida fusca cutinase by alpha-hemolysin secretion system in E. coli BL21(DE3). *Microb Cell Fact*. 2012;11:1–7. DOI: 10.1186/1475-2859-11-8
 56. Kenny B., Haigh R., 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. *Mol Microbiol*. 1991;5(10):2557–68. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb02102.x
 57. Hahn H.P., Von Specht B.U. Secretory delivery of recombinant proteins in attenuated Salmonella strains: Potential and limitations of Type I protein transporters. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;37(2–3):87–98. DOI: 10.1016/S0928-8244(03)00092-0
 58. Schwarz C.K., Landsberg C.D., Lenders M.H., Smits S.H., Schmitt L. Using an E. coli Type 1 secretion system to secrete the mammalian, intracellular protein IFABP in its active form. *J. Biotechnol*. 2012;159(3):155–61. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.02.005
 59. Li Y., Chen C.X., Von Specht B.U., Hahn H.P. Cloning and hemolysin-mediated secretory expression of a codon-optimized synthetic human interleukin-6 gene in Escherichia coli. *Protein Expr Purif*. 2002;25(3):437–47. DOI: 10/1016/s1046-5928(02)00028-1
 60. Angkawidjaja C., Kuwahara K., Omori K., Koga Y., Takano K., Kanaya S. Extracellular secretion of Escherichia coli alkaline phosphatase with a C-terminal tag by type I secretion system: Purification and biochemical characterization. *Protein Eng Des Sel*. 2006;19(7):337–43. DOI:10.1093/protein/gzl017
 61. Chung C.W., You J., Kim K., Moon Y., Kim H., Ahn J.H. Export of recombinant proteins in Escherichia coli using ABC transporter with an attached lipase ABC transporter recognition domain (LARD). *Microb Cell Fact*. 2009;8:1–12. DOI: 10.1186/1475-2859-8-11
 62. Felsenfeld A.J., Rodríguez M., Aguilera-Tejero E. Dynamics of parathyroid hormone secretion in health and secondary hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(6):1283–305. DOI: 10.2215/CJN.01520407
 63. Keutmann H.T., Sauer M.M., Hendy G.N., Jeffrey L., O’Riordan H., Potts J.T. Complete Amino Acid Sequence of Human Parathyroid Hormone. *Biochemistry*. 1978;17(26):5723–9. DOI: 10.1021/bi00619a019
 64. Rosenblatt M. Parathyroid Hormone: chemistry and structural-activity. *Pathobiol Annu*. 1981;11:53–86. PMID: 6276847
 65. Marx U.C., Adermann K., Bayer P., Forssmann W.G., Rösch P. Solution structures of human parathyroid hormone fragments hPTH(1-34) and hPTH(1-39) and bovine parathyroid hormone fragment bPTH(1-37). *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267(1):213–20. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1958
 66. Campbell E.J., Campbell G.M., Hanley D.A. The effect of parathyroid hormone and teriparatide on fracture healing. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(1):119–29. DOI: 10.1517/14712598.2015.977249
 67. McClung M. Parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis. *Obstet Gynecol Surv*. 2004;59(12):826–32. DOI:10.1097/01.ogx.0000146584.12831.c9
 68. Auchus R., Goldfine A.B., Koeing R.J., Rosen C.J. *Tratado de Endocrinología*. Williams. 14^a Edició. Elsevier, editor. 2021. 1257–1297. ISBN: 9788491138518

69. Cupp M.E., Nayak S.K., Adem A.S., Thomsen W.J. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide domains contributing to activation of different PTH receptor-mediated signaling pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;345(3):404–18. DOI: 10.1124/jpet.112.199752
70. Greenspan S.L., Bone H.G., Ettinger M.P., Hanley D.A., Lindsay R., Zanchetta J.R., et al. Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. A randomized trial. *Ann Intern Med.* 2007;146(5):326–39. DOI: 10.7326/0003-4819-146-5-20073060-00005
71. Kraenzlin ME, Meier C. Parathyroid hormone analogues in the treatment of osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(11):647–56. DOI: 10.1038/nrendo.2011.108
72. Ritter J., M., Flower R., Henderson G., Loke, Y.K., MacEwan D., Rang H. P. Rand and Dale. *Farmacología. Elsevier. Metabolismo óseo.* Novena edi. 2020. p. 470–9. ISBN: 9788491136446
73. McClung M.R., Martin J.S., Miller P.D., Civitelli R., Bandeira F., Omizo M., et al. Opposite bone remodeling effects of teriparatide and alendronate in increasing bone mass. *Arch Intern Med.* 2005;165(15):1762–8. DOI: 10.1001/archinte.165.15.1762
74. Grimaldi A. Diseño de una nueva estrategia para la secreción de Interleuquina 15 en *Escherichia coli* K12. Tesis de Maestría PEDECIBA. Facultad de Ciencias, Universidad de la República; 2018.
75. Chilakapati R., Mannully C.T., Ghosh M., Pulicherla K. K. Characterization and Expression Profiling of Recombinant Parathyroid Hormone (rhPTH) Analog 1–34 in *Escherichia coli*, Precise with Enhanced Biological Activity. *Int J Pept Res Ther.* 2020;26(1):93–105. DOI: 10.1007/s10989-019-09819-1
76. Chen Z.Y., Cao J., Xie L., Li X.F., Yu Z.H, Tong W. Y. Construction of leaky strains and extracellular production of exogenous proteins in recombinant *Escherichia coli*. *Microb Biotechnol.* 2014;7(4):360–70. DOI: 10.1111/1751-7915.12127
77. Fu X.Y., Tong W.Y., Wei D. Z. Extracellular production of human parathyroid hormone as a thioredoxin fusion form in *Escherichia coli* by chemical permeabilization combined with heat treatment. *Biotechnol Prog.* 2005;21(5):1429–35. DOI: 10.1021/bp050137z
78. Audu C., Cochran J., Pellegrin M., Mierke D. Recombinant production of TEV cleaved human parathyroid hormone. *J pept Sci.* 2013;19(8):504–10. DOI: 10.1002/psc.2528
79. Pugsley A.P. *Escherichia coli* K12 strains for use in the identification and characterization of colicins. *J Gen Microbiol.* 1985;131(2):369–76. DOI: 10.1099/0221287-131-2-369
80. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning.* Segunda ed. Nolan C, editor. Cols Spring Harbor laboratory Press; 1989. A.8-A.13. ISBN: 0-87969-309-6
81. Casadaban M. J. Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol.* 1976;104(3):541–55.
82. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2006;2.
83. Studier F.W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986;189(1):113–30. DOI: 10.1016/0022-2836(86)90385-2
84. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(12):6640–5. DOI: 10.1073/pnas.120163297
85. Miller J. *A short course in bacteria genetics.* Press CSHL, editor. N.Y; 1992. ISBN: 0-87696-349-5
86. Azpiroz M.F., Poey M.E., Laviña M. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* 2009;47(5):274–80. DOI: 10.1016/j.micpath.2009.09.003

87. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403–10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
88. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 2006;1(1):16–22. DOI: 10.1038/nprot.2006.4
89. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif.* 2005;41(1):207–34. DOI: 10.1016/j.pep.2005
90. Smale S. B-galactosidase assay . *Cold Spring Harbour Protocols.* 2010. p. 3. Disponible en: <http://cshprotocols.cshlp.org/>
91. Albinia A. M., Matos C. F., Branston S. D., Freedman R.B., Keshavarz-Moore E., Robinson C. High-level secretion of a recombinant protein to the culture medium with a *Bacillus subtilis* twin-arginine translocation system in *Escherichia coli*. *FEBS J.* 2013;280(16):3810–21. DOI: 10.1111/febs.12376
92. Długołęcka A., Cieśliński H., Turkiewicz M., Białkowska A. M., Kur J. Extracellular secretion of *Pseudoalteromonas* sp. cold-adapted esterase in *Escherichia coli* in the presence of *Pseudoalteromonas* sp. components of ABC transport system. *Protein Expr Purif.* 2008;62(2):179–84. DOI: 10.1016/j.pep.2008.07.006
93. Kern I., Ceglowski P. Secretion of streptokinase fusion proteins from *Escherichia coli* cells through the hemolysin transporter. *Gene.* 1995;163(1):53–7. DOI: 10.1016//03781119(95)00395-m
94. Zhang G., Brokx S., Weiner J. H. Extracellular accumulation of recombinant proteins fused to the carrier protein YebF in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 2006;24(1):100–4. DOI: 10.1038/nbt1174
95. Majander K., Anton L., Antikainen J., Lång H., Brummer M., Korhonen T. K., et al. Extracellular secretion of polypeptides using a modified *Escherichia coli* flagellar secretion apparatus. *Nat Biotechnol.* 2005;23(4):475–81. DOI: 10.1073/nbt1077
96. Sommer B., Friehs K., Flaschel E. Efficient production of extracellular proteins with *Escherichia coli* by means of optimized coexpression of bacteriocin release proteins. *J Biotechnol.* 2010;145(4):350–8. DOI: 10.1016/j.biotech.2009.11.019
97. Su L., Jiang Q., Yu L., Wu J. Enhanced extracellular production of recombinant proteins in *Escherichia coli* by co-expression with *Bacillus cereus* phospholipase C. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):1–11. DOI: 10.1186/s12934-017-0639-3
98. Low K. O., Muhammad Mahadi N., Abdul Rahim R., Rabu A., Abu Bakar F. D., Murad A. M., et al. An effective extracellular protein secretion by an ABC transporter system in *Escherichia coli*: Statistical modeling and optimization of cyclodextrin glucanotransferase secretory production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011;38(9):1587–97. DOI: 10.1007/s10295-011-0949-0
99. Donovan R.S., Robinson C.W., Click B. R. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol.* 1996;16(3):145–54. DOI: 10.1007/BF01569997
100. Chervaux C., Sauvonnnet N., Le A., Brendan C., Lesley K. A., Holland J. K. Secretion of active β -lactamase to the medium mediated by the *Escherichia coli* haemolysin transport pathway. 2001;(1995):237–45. DOI: 10.1078/1542-45.2001.45
101. Narayanan N., Khan M., Chou C. P. Enhancing functional expression of heterologous lipase B in *Escherichia coli* by extracellular secretion. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2010;37(4):349–61. DOI: 10.1007/s10295-009-0680-2
102. Linton E., Walsh M. K., Sims R. C., Miller C. D. Translocation of green fluorescent protein by comparative analysis with multiple signal peptides. *Biotechnol J.* 2012;7(5):667–76. DOI: 10.1002/biot.2011100158
103. Bakkes P. J., Jenewein S., Smits S. H., Holland I. B., Schmitt L. The rate of folding dictates substrate secretion by the *Escherichia coli* hemolysin type 1 secretion system. *J Biol Chem.*

- 2010;285(52):40573–80. DOI: 10.1074/jbc.M110.173658
104. Rabbani S.A., Yasuda T., Bennett H. P., Sung W. L., Zahab D. M., Tam C. S., et al. Recombinant human parathyroid hormone synthesized in *Escherichia coli*. Purification and characterization. *J Biol Chem*. 1988;263(3):1307–13. DOI: 10.1021/bi00619a019
 105. Liu Q., Lin J., Liu M., Tao X., Wei D., Ma X., et al. Large scale preparation of recombinant human parathyroid hormone 1-84 from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2007;54(2):212–9. DOI: 10.1016/j.pep.2007.03.009
 106. Bakhtiari N., Bayat Z. A., Sagharidouz S., Vaez M. Overexpression of recombinant human teriparatide, rhPTH (1-34) in *Escherichia coli*: An innovative gene fusion approach. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2017;9(1):19–22. PMID: 28090276
 107. Oldenburg K. R., D’Orfani A. L., Selick H. E. A method for the high-level expression of a parathyroid hormone analog in *Escherichia coli*. Vol. 5, *Protein Expression and Purification*. 1994. p. 278–84. DOI: 10.1006/prep.1994.1042
 108. Ishii S., Yano T., Hayashi H. Expression and characterization of the peptidase domain of *Streptococcus pneumoniae* ComA, a bifunctional ATP-binding cassette transporter involved in quorum sensing pathway. *J Biol Chem*. 2006;281(8):4726–31. DOI: 10.1074/jbc.M512516200
 109. Bountra K., Hagelueken G., Choudhury H. G., Corradi V., El Omari K., Wagner A, et al. Structural basis for antibacterial peptide self-immunity by the bacterial ABC transporter McjD. *EMBO J*. 2017;36(20):3062–79. DOI: 10.15252/embj.201797278
 110. Bobeica S. C., Dong S. H., Huo L., Mazo N., McLaughlin M. I, Jiménez-Osés G., et al. Insights into AMS/PCAT transporters from biochemical and structural characterization of a double glycine motif protease. *Elife*. 2019;8:1–27. DOI: 10.7554/eLife.42305

ANEXO I: medios de cultivo y soluciones

Medio Luria Bertani (LB)

Bactotriptona.....10 gr
Extracto de levadura5.0 gr
NaCl.....10 gr
Agua destilada.....c.s.p. 1L

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

Medio mínimo M63 (MM)

K_2HPO_49,8 g
 KH_2PO_44,5g
 $(NH_4)_2SO_4$2g
Agua destilada.....c.s.p 1L

El MM sólido se prepara añadiendo 15 gr de agar por litro de medio de cultivo. Se esteriliza por autoclave (30 min. a 121°C) y posteriormente se agrega 1 ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 ml de glucosa al 20% y 1 ml de vitamina B1 (1 mg/ml).

Medio Zym 5052

Solución Zym 250

Triptona..... 2gr
Extracto de levadura.....1g
 $MgSO_4$ (20mM).....400 μ l
Oligoelementos.....40 μ l

Solución M “25X”

Na_2HPO_48,8 g
 KH_2PO_48,5 g
 NH_4Cl6,7 g
 Na_2SO_41,7 g
Volumen final.....100 ml

Solución “5052”

Glicerol.....12,5 g
Glucosa.....12,5 g
Lactosa.....5 g
Volumen final..... 100 ml

La solución Zym 250 se enraza hasta 184 ml. Luego de autoclavar todas las soluciones, se adiciona a la solución Zym 250 8 ml de las soluciones M y 5052, hasta completar un volumen final de 200 ml de medio. En el caso de **Zym mod.** se hace el mismo procedimiento sin agregar lactosa a la solución 5052.

SOLUCIONES

TAE 1X

Tis-base pH7.6

Ácido acético glacial

EDTA (0.5M) (pH 8.0)

Se utiliza como solvente agua destilada.

Tampón de carga para muestras de electroforesis

Sacarosa4 g
Azul de bromofenol25 g
Xilencianol25 g
Agua destiladac. s. p. 1L

PBS 1X

KCl..... 0,2 g
NaCl.....8 g
NaH₂PO₄ anhidrido.....0,2 g
NaH₂PO₄.12H₂O.....2,89 g
Agua destilada..... c.s.p 1L

Tampón Z

Na₂HPO₄.7H₂O..... 60 mM
NaH₂PO₄.H₂O..... 40 mM
KCl.....10 mM
MgSO₄.7H₂O..... 1 mM
2-mercaptoetanol..... 0.05 M
Ajustar el pH a 7

Solución de fijación de proteínas

Ácido acético 10%
Etanol20%
Agua destiladac. s. p. 1L

Solución de tinción para geles de SDS-PAGE

Azul brillante de coomasie R – 250..... 0.25%
Ácido acético.....10%
Metanol.....50%
Agua.....39.7%

Solución decolorante

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

Inmunoensayos

TBS 1X

NaCl..... 150 mM
Tris-HCl 20 mM
Se ajusta pH a 7.5

Solución de bloqueo

Tween 20..... 0.05%
Leche descremada..... 6%
PBS 1X..... 93.9%

Solución de transferencia: tampón de tris-tricina pH 8.3

Tris-base..... 100mM
SDS..... 0,1%
Tricina.....100 mM
Metanol.....20%
Agua destiladac.s.p 1 L

Anexo 2: inserto de los plásmidos pBRiC, pValColV, pValAB y pValEF

Inserto de pValAB

pvAB-F **cvaA**
caaactaatagtatgcaaggagacattat **ttg**ttttcgcaggatgctttagaaaaacagaaaaatgaagtggcagg base pairs
gtttgattatcatagcttccctctgtaataaacaaggcgtcctacgaaatcctttgtctttttacttcaccgtcc 1 to 75
M F R Q D A L E N R K M K W Q
gacgggcaatattacttcccgaataaccactgtggtaaatcatgctggaagcattgtgtttattacggcatttc base pairs
ctgcccgttataatgaagggccttatggtgacaccaattagtagcacccttcgtaacacaaataatgcccgtaaag 76 to 150
G R A I L L P G I P L W L I M L G S I V F I T A F
tgatgttcattattgttggtacatagccgctgttaatgtcagtggtgaggtcacaacctggccaagagctg base pairs
actacaagtaataacaaccatggatcggcggcacaattacagtcaccactccagtggttgaccggttctcgcac 151 to 225
L M F I I V G T Y S R R V N V S G E V T T W P R A
tcaatataatattcaggtgtacagggatttgggtcaggcagtttgggtcatgaagggcagttgataaaaaagggg base pairs
agttatataataagtcacatgtccctaacaacagtcctcgaacaagtaacttcccgtcaactatTTTTTTTccc 226 to 300
V N I Y S G V Q G F V V R Q F V H E G Q L I K K G
atcctgtttatctgattgacatcagtaaaagtacacgcaatggtattgtcactgataatcatcgccgggatag base pairs
taggcaaatagactaaactgtagtcattttcctgctgcttaccataaacagtgactattagtagcggcctatc 301 to 375
D P V Y L I D I S K S T R N G I V T D N H R R D I
aaaaccagctggttcggtgagacaacattatccccgtctggaagaaagtaaaaaataacgctagataccctgg base pairs
ttttggtcgaccaagcacacctggtgtaataaagggcagacctttctcattttttattgcatctatggggacc 376 to 450
E N Q L V R V D N I I S R L E E S K K I T L D T L
aaaaacaacgctgcaatacacagatgcttccgtcgtctcatcagacattatacagcgtgcagaggaaggataa base pairs
ttttgttgacagcgttatgtgtctacgcaaggcagcagtagtctgtaatatgtcgcacgtctcctcctcatt 451 to 525
E K Q R L Q Y T D A F R R S S D I I Q R A E E G I
aaataatgaaaaataatggagaattacagataactcagtcacaaaggactgattaataaagatcaattaacta base pairs
tttattactttttattatacctcttaagtctatgatagtcagttttcctgactaattattttctagttaattgat 526 to 600
K I M K N N M E N Y R Y Y Q S K G L I N K D Q L T
accaagttgcattatattatcaacaacaaaacaccttctcagtcctgagcggacaaaaatgaacaaaatgccttc base pairs
tggttcaacgtaataatagttgtgtttgttggaaagtcagactcgcctgttttactgttttacggggagc 601 to 675
N Q V A L V R Y Y Q Q N N L L S L S G Q N E Q N A L
agataaccactctggagagtcagattcagactcaggcagcagattttgataatcgatctatcagatggaactgc base pairs
tctattggtgagacctctcagtcctagtctgagtcctcgtctaaaactattagcatagatagctcacttgagc 676 to 750
Q I T T L E S Q I Q T Q A A D F D N R I Y Q M E L
aacgactcgaattgcaagaagagttgtaaacactgagtggaagggcaaatcattatccgggctgtgtctgagc base pairs
ttgctgagcttaacgtctttcttgaccaattgtgactacaccttccgcttttagtaaataggcccgaacagactgc 751 to 825
Q R L E L Q K E L V N T D V E G E I I I R A L S D
ggaagtgactcctctgagctgactgtagggcaaatggtcaataaccggagacagccttctgcaggttattcctg base pairs
cctttcaactgagggactcacagtgacatccccgtttaccagttatggcctctgctcgggaagcgtccaataaggac 826 to 900
G K V D S L S V T V G Q M V N T G D S L L Q V I P
agaacattgaaaactattatcttattctctggttcccgaatgatgctgttcccttatatttcggctggtgacaaag base pairs
tcttgtaacttttgataatagaataagagccagggcttactacgacaaggaatataaagccgaccactgtttc 901 to 975
E N I E N Y V L I L V P N D A V P Y I S A G D K
tgaatattcgttatgaagccttcccctcagaaaaatttgggcagttctctgctacggttaaaactatatccagga base pairs
acttataagcaataacttcggaaggggagctcttttaaacccgtcaagagacgatgccaattttgatataggtcct 976 to 1050
V N I R Y E A F P S E K F G Q F S A T V K T I S R
ctcctgctcaacacaggaatggtgacctataaagggcacctcaaaaatacggcgggtgctctgttccctggt base pairs
gaggacgcagttgtctctttacaactggatattccctcgtggagttttatgctggcccacggagacaagggacca 1051 to 1125
T P A S T Q E M L T Y K G A P Q N T P G A S V P W
ataaagtcattgocagcctgaaaagcagataatcaggtatgacgaaaaatacctcctctggaatggaatga base pairs
tatttcagtaaacgctgoggacttttcgtctattagtcataactgctttttatggaggagaccttttaccttact 1126 to 1200
Y K V I A T P E K Q I I R Y D E K Y L P L E N G M
aagccgaaagtacactatttctggaaaaaaggcgtattaccagtgatgctttctcctttctatgacatgaaac base pairs
ttcggctttcatgtgataaagacctttttccgcataaatggtcacctacgaaaggaaagatactgtactttg 1201 to 1275
K A E S T L F L E K R R I Y Q W M L S P F Y D M K
cvaB
acagtgcaacaggaccgatcaatgactaaacaggaatcttcagacaaattataaatctgcttgattttgctgctgcaa base pairs
tgtcacggtgtcctggttagttactgattgtccttaaaagtctgttttaatttttagacgaactaaacgcgaccgtt 1276 to 1350
H S A T G P I N D -
M T N R N F R Q I I N L L D L R W Q
cgtcgtgttccggttattcatcagacggagaccgctgaaatgtggactggcctgcttagcaatgatatgctggtcat base pairs
gcagcacaaggccaataagtagtctgctcctggtgacttacacctgaccggacggatcgttactatacgccagta 1351 to 1425
R R V P V I H Q T E T A E C G L A C L A M I C G H

tttggaagaatattgacctgatatatcttcgcccgaagttaaattctctctgcccgtggagcaacccttgacgga base pairs
aaaccattcttataactggactatagaagcggccttcaaattagagagacgggacacctcgttgggaacgtcct 1426 to 1500
F G K N I D L I Y L R R K F N L S A R G A T L A G
atcaattggaatagcggagcaactggggatggccaccgggctcttctactggagttggatgaacttcgagtcctc base pairs
tagttaccttatcgctcgttggaccctaccggtggcccgagaaagtgcacctcaacctacttgaagctcaggag 1501 to 1575
I N G I A E Q L G M A T R A L S L E L D E L R V L

aaaacgcggtgattctccactgggatttccagtcacttcgctgcttctggtcagcgtaaagcgtaaccggttatgta base pairs
ttttgcccacataagaggtgacctaaagtcagtgaaagcagcaagaccagtcgatttcgattgcaatacat 1576 to 1650
K T P C I L H W D F S H F V V L V S V K R N R Y V
ctgcatgatccggccaggggcataagatatagcggggaggaaatgagccgatattttacaggcgttgactt base pairs
gacgactaggcggctcccgtattctatagtcggccctcttctactcggctataaaaatgtccgcaacgtgaa 1651 to 1725
L H D P A R G I R Y I S R E E M S R Y F T G V A L
gaggtctgcccgggaagtgaattccagtcggaaccctgcagaccgcataagtcttcggttccactgattaacagt base pairs
ctccagaccgggcttccacttaaggtcagccttgggagctctggcgctattcagaagcaagtgactaattgtca 1726 to 1800
E V W P G S E F Q S E T L Q T R I S L R S L I N S
attcaggtattaaagagcgtggcgaataatttctgtctgctgtaattgaaagcaatcaatctgctaaagt base pairs
taaagccataatcttcttgcgaccgtttttaaagacagacagtcacattaacttcggttagttagactgattac 1801 to 1875
I Y G I K R T L A K I F C L S V V I E A I N L L M
ccggtggggacacagctggttatggatcatgctattctcgcgggggacagagggtactgacgctaatttctgct base pairs
ggcccccctgtgctgcacataacctagtagcagataagagcggccctctcctccgatgactgcgattaagacga 1876 to 1950
P V G T Q L V M D H A I P A G D R G L L T L I S A
gctcttatgtttttatattactcaaagctgcaacgagtagcgtgcccgcgatggtcttccactggttatgagcag base pairs
cgagaatacaaaaaatataatgagtttcgacgctgctcatgacgcgctaccagaagtaccaataactcgtgc 1951 to 2025
A L M F I L L K A A T T S T L R A W S S L V M S T
ctcatcaatgtacagtggtcagtcggggctgttcgatcatcttctcagactaccgctggcggttttttgaaacgcga base pairs
gagtagttacatgtcaccgctcagccccgacaagctagtagaagagctgatggcgaccgcaaaaaacttgccggt 2026 to 2100
L I N V Q W Q S G L F D H L L R L P L A F F E R R
aaattagtgatattccagtcagcttttggactcccttgacacattgagggccacatttaccaccagtgctgctg base pairs
tttaatccactataggtcagtcgcaaaaactgagggaaactgtgtaactcccgggtgtaaatgggtggtcacactagccc 2101 to 2175
K L G D I Q S R F D S L D T L R A T F T T S V I G
ttcataatggacagcattatggttgtcgggtgtttgtgtgatgatgctgttatacggaggatattctcactgggata base pairs
agtattaccctgctgtaataccaacagccacaacacactactgacagaatagctcctctatagagtggtacctat 2176 to 2250
F I M D S I A M V V G V C V M M L L Y G G Y L T W I
gttctctgctttaccacaatttaccatttttattcagactggtgacatacggcaattaccgacagatatacagaagaa base pairs
caagagacgaaatgggtgttaaatgtaaaaaataagctgaccactgtagccggttaattggctgtctatagctcttctt 2251 to 2325
V L C F T T I Y I F I R L V T Y G N Y R Q I S E E
tgtcttgcagggagcccgctgcgctcctatttttggaaaacattatggtattgcccacggtaaaaatccag base pairs
acagaacagtcctcctcgggacagggggaggataaaaataccttgttaataataccataacgggtgccatttttaggtc 2326 to 2400
C L V R E A R A A S Y F M E T L Y G I A T V K I Q
gggatggtcggaattcggggggcacactggcttaatatgaaaatagatgcgataaattcgggtattaagctaac base pairs
cctaccagccttaagccccggtgtgaccgaattatacttttactcagcctatttaagcccataattcggattgg 2401 to 2475
G M V G I R G A H W L N M K I D A I N S G I K L T
aggatgatttgccttccggaggaaataaaccttggttaccgctgtgatcagattgtaattttatggctggga base pairs
tcctacctaaacgagaagcctccttatttggaaacaatggcggacactagtctaacattaaaataccgacctc 2476 to 2550
R M D L S Y R Y D S Q S A P I F S A L S L S V A P
gcagccttgtgatcagataatcagatgacaataggaatggtttagcgttttagttcttttctggtggcagttttcg base pairs
cgtccggaacactagctattagctactggttattccttcaaaacatcgcaaatcaagaaaagcaccctcctcaaaagc 2551 to 2625
A G L V I D N Q M T I G M F V A F S S F R G Q F S
gaaagattgctctctgaccagttttctctcagctaaagaataatgagtcctgcacaatgagcgcattgacagat base pairs
ctttctcaacggagagactggtcaaaaagaagaagtcgattcttattactcagacggttactcgcgtaacgtcta 2626 to 2700
E R V A S L T S F L L Q L R I M S L H N E R I A D
attgcattacatgaaaaggaggaaaagaacctgaaattgaaatcattgctgatattggggccaatatccctggaa base pairs
taacgtaagtacttttctccttttcttggactttaacttttagtaacgactataaccgggttataggacctt 2701 to 2775
I A L H E K E E K K P E I E I I A D M G P I S L E
accaatggtttaaagctatcgttatgacagtcagtcagcaccgatattcagtgctctgagtttctgtagctccg base pairs
tggttaccaaaattcgatagcaactactgtcagtcagtcggtgctataagtacagagactcaaatagacatcgaggc 2776 to 2850
T N G L S Y R Y D S Q S A P I F S A L S L S V A P
ggggaaagtgtggctataactggtgcttccggtgcccgggaaaaaacacattaatgaaagtactatgtggactattt base pairs
ccctttcacaccgatattgaccacgaaggccacgccccttttgggtgtaattactttcatgatcacctgataaaa 2851 to 2925
G E S V A I T G A S G A G K T T L M K V L C G L F
gaactgatagcgggaggtactgataaattgataatagatatacggcctaattgaaataaataatcaccgggat base pairs
cttggactatcgccctccatgactatttaccatattctatctcgggtttaaacttatttataatagtgccctac 2926 to 3000
E P D S G R V L I N G I D I R Q I G I N N Y H R M
atagcctgtgttatgacggatgaccggctatcttccaggtcaattcgtgaaaaatctgtggttttgcagaggaa base pairs
tatcggacacaactcctactggccgataaagctcogagtttaagcacttttatagacaccaaactcctcctt 3001 to 3075
I A C V M Q D D R L A A S G S I R E N I C G F A E E
atggatgaagagtgatggttagaatgtgccagagcaagtcattcattgatgttataatgaatagccaatggga base pairs
tacctacttctcactaccatcttacacgggtctcgttcagtagtaagtagtactacaatattacttatacggttacct 3076 to 3150
M D E E W M V E C A R A S H I H D V I M N M P M G

tatgaaacattaataggtgaacttgggaaggtctttctggcgggtcaaaaacagcgtatatttattgcacgagcc base pairs
 atactttgtaattatccacttgaacccctccagaaagaccgccagtttttgcgcatataaaataacgtgctcgg 3151 to 3225
Y E T L I G E L G E G L S G G Q K Q R I F I A R A
 ttataccggaaaccaggaatattatgttgatgaggaaccagtgctcttgattcagagagtgaacatttctg base pairs
 aatatggcctttgtccttataataaaatcctactccgttggtcagcagaactaagtctctcacttgtaaagcac 3226 to 3300
L Y R K P G I L F M D E A T S A L D S E S E H F V

aatggtgccataaaaaacatgaatatcaccagggaattattgcacacagagaaaacaacggttgagaactggtgat base pairs
 ttacaacggtattttttgtacttatagtggtccattaataacgtggtctctttgttgaactcttgacaacta 3301 to 3375
N V A I K N M N I T R V I I A H R E T T L R T V D

agagttattttctattt**taa**acatagaggaattacaagcg base pairs
 ttcaataaagataaa**tttgg**tatctccttaatggttcgc 3376 to 3414
R V I S I - pvAB-R

Figura A1. Amplicón de 3.414 pb que contiene el operón *cvaAB*. Se indican los genes y su secuencia aminoacídica deducida. Se señalan con gris los cebadores y se subrayan las posibles secuencias Shine-Dalgarno.

Inserto de pValEF

pvEF-F **mchE** →

gtgagtaagaggagctattttgttttcgctcaggatgcttttagaaaacagaaaaatgaagtggcagggacgggcaat base pairs
 cactcattctcctcgtataaaaacaaagcagtcctacgaaatcctttgtcttttacttcaccgctccctgcccgtta 1 to 75
M F R Q D A L E N R K M K W Q G R A I

attacttcccggaaataccactatggtaaatcatgctgggaagcattgtggtttattacggcattttctgatggtcat base pairs
 taatgaagggccttatggtgataccaattagtagcagcctctcgtaacacaaataatgccgtaaaagactacaagta 76 to 150
L L P G I P L W L I M L G S I V F I T A F L M F I

tattggttgatcctatagccgctggttaatgtagtggtgaggtcacaacctggccaagagctgtcaatatata base pairs
 ataacaacatggatcctggcggcacaattacagtcaccactccagtggtggaccggttctcgacagttatata 151 to 225
I V G T Y S R R V N V S G E V T T W P R A V N I Y

ttcaggtgtacagggatttgggtcaggaatgttcatgaagggcagttgataaaaaaggggatcctgttta base pairs
 aagtccacatgtccctaaacaacagtcctgtaacaagtagtactcccgcaactattttttccctaggacaat 226 to 300
S G V Q G F V V R Q F V H E G Q L I K K G D P V Y

tctgattgacatcagtaaaagtagcagtagtggtattgtcactgataatcatcggcgggatagaaaatcagct base pairs
 agactaactgtatgctattttctgtgcatcaccataacagtgactattagtagccgacctatattcttttagtgcga 301 to 375
L I D I S K S T R S G I V T D N H R R D I E N Q L

ggttcggtgagacaacattattttcccgctcgtgaagaaagtaaaaaataacggttagataccctggaaaaacaacg base pairs
 caagcacacctggttgaataaagggcagaccttctttcatttttttattgcaatctatgggacctttttgttgc 376 to 450
V R V D N I I S R L E E S K K I T L D T L E K Q R

tctgcaatacacagatgcttttcgctcctcatcagatattatacagcgtgagaggaagggataaaaaataatgaa base pairs
 agacgttatgtgctacgcaaaagcagcagtagtctataaatgctgcagctctcctccctatttttattactt 451 to 525
L Q Y T D A F R R S S D I I Q R A E E G I K I M K

aaacaatatggagaattacagaaactatcaggcaaaagggctgattaataaagatcagttaactaaccaggtggc base pairs
 tttgttatacctcttaagtctttgatagtccggttttcccgactaattatttctagtcgaattgattggtccaccg 526 to 600
N N M E N Y R N Y Q A K G L I N K D Q L T N Q V A

attatattatcagcaaaaaacaatctctcagcctgagcggacagaaacagaatgccctgcagataaccac base pairs
 taatataatagtcggttgggtttgtagaagagtcggactccgctgtcttctgttcttaccgggacgtctattggtg 601 to 675
L Y Y Q I Q N N L L S L S G I V T D N H R R D I E N Q L

tctggagagtcagattcagactcaggtcagatatttggataaccgtagtaccagatggaactgcaacggtacga base pairs
 agacctctcagtcctagtcagtcagtcagtcctaaaactattggcatagatggtctaccttgacgttgccatgct 676 to 750
L E S Q I Q T Q A A D F D N R I Y Q M E L Q R Y E

gttacagaaagaaactggttaacactgtagtgagggcgaaatattatccggcgttgactgacgggaaagttga base pairs
 caatgtctttcttgaccaattgtgactacacctcccgctttaataataggcccgcaactgactgacctttcaact 751 to 825
L Q K E L V N T D V E G E I I I R A L T D G K V D

ctccctgagtgctcactgtcgggcaaatggcaataccggagacagccttctcaggttattcttgagaacattga base pairs
 gaggactcacagtcagcggctttaccagttatggcctctgctcgggaagcgtccaataaggactcttgaact 826 to 900
S L S V T V G Q M V N T G D S L L Q V I P E N I E

aaactattatcttattctctgggtcccaaatgatgctgttctctatatttccgctggtgacaagtgaaattctg base pairs
 tttgataatagaataagagaccaggtttactacgacaaggaatataaagccgaccactgtttcaacttataagc 901 to 975

N Y Y L I L W V P N D A V P Y I S A G D K V N I R
 ttatgaagcctttccggcagaaaaatggggcagttctctgctacgggttaaaactatatccaggactcctgctc base pairs
 aactctcggaagccgctcttttaaccggcgaagagacgatgccaatgttgataggtctgaggacgca 976 to 1050
Y E A F P A E K F G Q F S A T V K T I S R T P A S
 aacacaggaatgttgacctataaggggtgcaccacagaatacgcggggcgcctctgttccctggtataaagtc base pairs
 ttgtgtcctttacaactggatattcccacgtggtgtcttatcgggcccgaggagacaaggaccatatttcagta 1051 to 1125
T Q E M L T Y K G A P Q N T P G A S V P W Y K V I
 tgcgatgctgaaaagcagattatcagatatgacgaaaaatccctcctctggaaaatggaatgaaagccgaaag base pairs
 acgctacggacttttctgctaatagtctatactgctttttatggaggagaccttttaccttcttctggcttc 1126 to 1200
A M P E K Q I I R Y D E K Y L P L E N G M K A E S
 tacactatttctggaaaaagggcgtatttaccagtggtgcttttctcttctatgacatgaaacacagtgcaac base pairs
 atgtgataaagacctttttccgcataaatggtcacctacgaaagagaaagatactgtactttgtgtcacgttg 1201 to 1275
T L F L E K R R I Y Q W M L S P F Y D M K H S A T
 aggacgcctcaatgactaaaggaggatgttcagacaaattataaatcagcttgatagcgcgtggcgcagctcgtgttc base pairs
 tctgtggcaggttactgtccctcaaagtctgtttaatatttagtgaactatacgcgaccgctgcagcacaag 1276 to 1350
G P L N D -
M T N G S F R Q I I N Q L D M R W R R R V
 cggttattcatcagacggagaccgctgaaatgtggactggcctgctggcaatgatagcggtcattttggtaaga base pairs
 gccaaataagctagctgctctggcacttacactgacggagcggagcgttactatacggcagtaaaaccattct 1351 to 1425
P V I H Q T E T A E C G L A C L A M I C G H F G K
 atattgacctgatctcttccgccaagtttaattctctcggcccgtggagcaaaccttgcaggaatcaatggaa base pairs
 tataactggactatagagaagrrckctcaaattagagagccgggacacctcgtttggaacgtccttagttacctt 1426 to 1500
N I D L I S L R R K K F N L S A R G A N L A G I N G
 tagcggagcagctggggatggtcaccgggctctttcactggagctggatgaacttggtgcctcaaaatgccgt base pairs
 atcgcctcgtcgaccctaccagtgggcccagaaagtgcacctgacctacttgaaccacgggagtttacggca 1501 to 1575
I A E Q L G M V T R A L S L E L D E L G A L K M P
 gtattctccactgggatttcagtcactttgtcgtgctggcagcgtaaagcgttaaccggttatgtactgcatgatc base pairs
 cataagaggtgacctaaagtgcagtaaacagcagcaccagctgcatttgcattggcaatacatgacgtactag 1576 to 1650
C I L H W D F S H F V V L V S V K R N R Y V L H D
 cggccagagggcagaagatatctcggtcgggagaaatgagccggtattttacgggcattgcaacttgaggtctggc base pairs
 gccggtctccgtcttctatagagccagccctcctttactcgccataaaaatgcccgtaacgtgaactccagaccg 1651 to 1725
P A R G R R Y L G R E E M S R Y F T G I A L E V W
 ctggaagtgaattcctggcgaaaccagcagatccgcataaagtctcctgctcactgattaacagttattacggta base pairs
 gaccttcaacttaaggaccgctttgggtcgtctaggcgtattcagagcaagtgcactaattgtcataaatgccat 1726 to 1800
P Q S E F L A E T T Q I R I S L R S L I N S I Y G
 ttaaaagaacactggcgaaaatcttctgctgtcagttgtaattgaagcaatcaatctggtaatgccggtgggga base pairs
 aatcttctgtgaccgcttttaaaagacagacagtcacattactcgttagtttagaccattacggccaccct 1801 to 1875
I K R T L A K I F C L S V V I E A I N L V M P V G
 ctcagctggttatggtatcagcattccggcgggggacagggctgctgacgcttatttctgctggcctgatgt base pairs
 gagtcgaccaataactagtagcetaagcgcgccctgtctcccgacgactgcgaataaagacgaccggactaca 1876 to 1950
T Q L V M D H A I P A G D R G L L T L I S A G L M
 tctttatattgctcagggccgcggtgagatgctgctgcatggtcctcactggttatgagcagcgtcatcaata base pairs
 agaaataaacgagtcocggcgccactcatacagcagcagcagcagagtgaccaataactcgtgagtagttat 1951 to 2025
F F I L L R A A V S M L R A W S S L V M S T L I N
 tacagtgccagtcgggtctgtttaaccatcttctcagactgcccgtggcggtttttgaaacccgtaaaattaggtg base pairs
 atgtcacctcagcccagacaaaattgtagaagagctgacggccagcggcaaaaaacttggcgcatthaatccac 2026 to 2100
I Q W Q S G L F N H L L R L P L A F F E R R K L G
 ataccagtcgcttttggctcccttgacactttgaggccacctttaccctgtgtggttgggcaatcatgg base pairs
 tataggtcagcgcaaaaccgaggggaactgtgaaactccgggtggaatggtggacacaccaacccttagtacc 2101 to 2175
D I Q S R F G S L D T L R A T F T T C V V G A I M
 acagttatggtgtggtgggttttgtgatgatgctgttatatggaggatattcttacctggatagtgctcggtt base pairs
 tgtcataatacaaaccccccaaacactactacgcaataatcctcctatagaatggacctatcacgagccaa 2176 to 2250
D S I M V V G V F V M M L L Y G G Y L T W I V L G
 ttaccatggtttacgttcttattcgtctggtgacatacggctattaccggcaaatatcggaagaaactcctgtca base pairs
 aatggtaccaaatgcaagaataagcagaccactgtatgccgataatggcgtttatagccttctttgagaacagt 2251 to 2325
F T M V Y L I R L V T Y G Y R Q I S E E T L V
 ggggggcccgggcccagctcctattttatgaaaagcctgtatggtattgccacggtaaaaatccaaggtatggctg base pairs
 cccccgggcccgggtcgaggataaaaatcctttcggacataaccataacgggtgccatttttaggttccataccgac 2326 to 2400
R G A R A S S Y F M E S L Y G I A T V K I Q G M A
 ggaatccggggaacacactggccttaacctgaaaaatagatgcatcaattcaggtattaagtttaaccaagatggatt base pairs
 cctaggcccttgtgtgaccgaattggacttttctacgctagtttaagtccataattcaattggttctacctaa 2401 to 2475
G I R G T H W L N L K I D A I N S G I K L T K M D
 tgctcttcgggggataaataacttttggcgcctgtgatcaggtggcgattttatggctgggtgcaagccttg base pairs
 acgagaagccccctattttatgaaaacaacggcgggacactagtcacacggctaaaaataaccgacccacgttcggaac 2476 to 2550
L L F G G I N T F V A A C D Q V A I L W L G A S L
 tgatcgataatcagatgacaatagggatggttggcatttggctcctttctggtggcagtttctcgatcgggttg base pairs
 actagctattagctctgattccctcaaacaccgtaaaaccaagaaagcaccctgcaaaagcctagcccaac 2551 to 2625
V I D N Q M T I G M F A A C F A A G S F R G Q F S D R V
 cttcgtgaccagttttcttctcaactgagaataatgagctgtgcataatgagcgcattgacagatattgcactac base pairs
 gaagcagctggtcaaaagaagaagttgactcttattactcagacgtattactcgcgtaacgtctataacgtgatg 2626 to 2700

A S L T S F L L Q L R I M S L H N E R I A D I A L
atgaaaaggaagaaaagaaccggaaattgaaatcggtgtgcatgagccgggttctactggaaaccactgatt base pairs
tacttttcttcttttctttggccttaacttttagcaacgactgtactcgggccaagtgcacttttggtgactaa 2701 to 2775
H E K E E K K P E I E I V A D M S P V S L E T T D
taagctaccggatgacagccagtcagcacaggtattcagtggtctggaatttctgtggctccgggagaaagt base pairs
attcgatggccatactgtcggtcagtcgtgtccataagtcaccagacttaaacagacaccggccctctttcac 2776 to 2850 **L L S**
Y R Y D S Q S A Q V F S G L N L S V A P G E S
tggctataactggctcctccgggtgcccggaaaaaacacattaatgaaagtattatgtggactgtttgaaccagata base pairs
accgatattgaccacggaggccacggcctttttgggtgaattactttcataatacacctgacaaacttggctctat 2851 to 2925
V A I T G A S G A G K T T L M K V L C G L F E P D
gtggaaaagtactggtaatggcagggatatacgtcaacttggaaataaataattatcacctgatgatagcctgtg base pairs
caccttttcatgaccaattaccgtgcctatgtcagttgaaccttatttattaatagtgccatactatcggacac 2926 to 3000
S G K V L V N G T D I R Q L G I N N Y H R M I A C
ttatgcaggacgaccggctattttcaggatcaattcgtgaaaaatctgtgggtttgcagaagaaacagacgacg base pairs
aatagtcctgtcggcgataaaaagtcctagtttagcacttttatagacaccaacacgtcttctttgtctgtctg 3001 to 3075
V M Q D D R L F S G S I R E N I C G F A E E T D D
aatggatgacagaatgtgccagagcaagtcatattcatgatgtgataatgaaaatgccaatggggatgaaacgt base pairs
ttacctactgtcttacacgggtcctcgttcagttactacactattacttttacggttacccatactttgca 3076 to 3150
E W M T E C A R A S H I H D V I M K M P M G I E T
taatagtgaaactgggggaaggtctttccggcggtcaaaaacagcgtatattcattgcccagctttataaccgga base pairs
attatccacttgacccttccagaaaggccgacggtttttgtcgcataataagtaacgggctcgaaatatggcct 3151 to 3225
L I G E L G E G L S G G Q K Q R I F I A R A L Y R
aacctggaatattatttatggatgaggctacaagttctcttgatacagaaagtgaacgtttcgtgaatgctgcca base pairs
ttggaccttataataaacctactccgatgttcaagagaactatgtctttcacttgcaaagcacttacgacggt 3226 to 3300
K P G I L F M D E A T S S L D T E S E R F V N A A

taaaaaaatgaatatcaccgggtgattattgacacagagaaactacgttgagaactggtgacaggattattt base pairs
attttttacttatagtgggcccactaataacgtgtgtctcttttgatgcaactcttgacaactgtcctaataaa 3301 to 3375
I K K M N I T R V I I A H R E T T L R T V D R I I
ctattt**aaa**atccactggtgtaactttgtaaggagttttgtcgtatggggagggttaagaag base pairs
gataaattttaggtgaccacattgaaacattctcaaaa**cagctacc**ccctccaattcttc 3376 to 3436
S I -

pvEF-R

Figura A2. Amplicón de 3.436 pb que contiene el operón *mchEF*. Se indican los genes y su secuencia aminoacídica deducida. Se señalan con gris los cebadores y se subrayan las posibles secuencias Shine-Dalgarno.

Inserto de pBRiC

pV-R
 gaggaattacaagcgtatgaggaatatttcttctgttataattcctcgttatgctcagatatctgttggaggtg base pairs
 ctctttaatgttcgcatactccttataaagaaggacaatattaaggagcaatcagagtctatagacaacctccac 1 to 75

gaatggaagatagacaatccaccaagaagaatattcattctgtgtggattgtccaataactgttctttcttatat base pairs
 cttaccttctatctgtttaggtgttcttctttatagtaagacacacctaacaggttattgacaagaaagaatata 76 to 150

taaataactattttataaacaacatcactaagatttttggactccaattacacaatcttcccgcagcatagt base pairs
 atttattatgataa**aat**attttgtttgtagtgattcctaataaacctgaggttaattgtgttagaagggcgtcgtatca 151 to 225
 - L C V D S L N N P S W N C L R G A A Y N

tccatgcttctgaaggtatcccttcgggtttttgcttaattgttccccctaaaccggatggagacattgcaggat base pairs
 aggtacgaagacttccataggggaagcccaaaaacgaattaacaaggggatttggcctacctctgtaacgtccta 226 to 300
 W A E S P I G E P K Q K I T G G L G S P S M A P N

taggtttgtgagtgatgcatagtcatatattgcacctccagccacacccccagcagctgctccaattcctcctg base pairs
 atccaaacactcacctacgtatcagtatataacgtggaggtcgggtgtgggggtcgtcgcagcaggttaaggaggac 301 to 375
 P K H T S A Y D Y I A G G A V G G A A A G I G G A
 caacaaattgcccgatagtgcttctatagccatcgcaatatcacgcctgaagcaccaccagaaacagaatcta base pairs
 gttgtttaacggcctatcacaaggatatcggtagcgttatagtgcgggacttctgtgtgttctttgtcttagat 376 to 450
 V F Q G S L T G I A M A I D R G S A G G S V S D L

← **cvaC**

atcatttagagtcagagttctcatatgatctcctttttatcttatcggatattgaataataattatcaccaaca base pairs
 ta**agt**aaatctcagttcctcaagagtaactagagga^{aa}aatagaatagcctataacttattattaatagtgttgt 451 to 525
 - K S D S N E Y S R R K I K D S I S Y Y N D G V
 E N L T L T R M

aagtaacatattgcagacattaatgcagagaagcaaaatgtatgcatggataaaaagtcctttcctctaaaaaca base pairs
 ttcattgtataacgtctgtaattacgtctcttctgttttacatcgtacctaatttttcaggaaaggagattttgt 526 to 600
 F Y C I A S M L A S F C F T H M S L F D K G R F V

caatcatatagctaagcaatatatattgcggtgcatattattataaatgcaaataaacaactctaattttgtt base pairs
 gttagtatatatcgattacgttatatataacgccaccgtaaataatatttcgttttattgttgagattaaaaca 601 to 675
 C D Y I A L A I Y I A T A N I I F A F L L E L K T

← **cvi**

ctttttctatccattactttttatcccattactttctatcccattaccacacaaacactaagataatgattatc base pairs
 gaaaaagatag**gta**atgaaaaat**agg**gtaatgaaagatagggtaatggtgtgtttgtgattgctattactaatag 676 to 750
 R K R D M

gtaacatagtcagagtggaaggtaggagg base pairs
 caattgtatcagttctcacttcccacctcc 751 to 781

pV-L

Figura A3. Amplicón de 781 pb que contiene el operón *cvi-cvaC*. Se indican los genes y su secuencia aminoacídica deducida. Se señalan con gris los cebadores y se subrayan las posibles secuencias Shine-Dalgarno.

Inserto de pValColV

pAB-Fw
tctgataactctcctatgttgatgtttatatgattttccttgaaacatataatgcaaattttcgatttatttt base pairs
aggactattgagaggatacaacatacaaatataactaaaaggaactttgtatattacgttttaaagctaaataaaa 1 to 75

cvaA
ccatcattaatccagataaacaacaaactaatagatgcaaggagacattatttggttccgaggatgctttaga base pairs
ggtagtaattaggctctatttggttgattatcatacgttccctctgtaataaacaagcggctctacgaaatct 76 to 150

M F R Q D A L E
aaacagaaaaatgaagtggcagggacgggcaatattacttcccggaataccactgtggttaatcatgctgggaag base pairs
ttgtccttttacttaccgctccctgcccgttataatgagggccttatgtgacaccaattagtagcacccttc 151 to 225

N R K M K W Q G R A I L L P G I P L W L I M L G S
cattgtgtttattacggcatttctgatgttcattattgttggtagcctatagccgctgttaatgtcagtggtga base pairs
gtaacacaaataatgcccgtaaagactacaagtaataacaacctggatattcggcggcacaattacagtcaccact 226 to 300

I V F I T A F L M F I I V G T Y S R R V N V S G E
ggtcacacctggccaagagctgtcaatatataattcaggtgtacaggatttggttgtcaggcagtttggttcatga base pairs
ccagtggtggaccggttctcgacagttatataaagtcacatgtccctaaacaacagtcctgcaacaagtagt 301 to 375

V T T W P R A V N I Y S G V Q G F V V R Q F V H E
agggcagttgataaaaaaaggggatcctgtttatctgattgacatcagtaaaagtacagcgaatggtattgtcac base pairs
tccgctcaactatttttcccctaggacaataagactagtcattttcatgtgctggtaccataacagtg 376 to 450

G Q L I K K G D P V Y L I D I S K S T R N G I V T
tgataatcatcgccgggatagaaaaccagctggttcgtgtggacaacattatttcccgtctggaagaaagtaa base pairs
actattagtagcggcctatatcttttggtcgacaaagcactgttgttaataaagggcagaccttctttcatt 451 to 525

D N H R R D I E N Q L V R V D N I I S R L E E S K
aaaaataacgctagataccctggaaaaaacgctctgcaatacacagatgcttccgctcgtcatcagacattat base pairs
tttttattgcatctatgggaccttttgggtgcagcgttatgtgtctacgcaaggcagcagtagtctgtaata 526 to 600

K I T L D T L E K Q R L Q Y T D A F R R S S D I I
acaggtgcagaggaaggataaaaaataatgaaaaataatggagaattacagatactatcagtcaaaaggact base pairs
tgtcgcagctctccttccctatttttattactttttattatacctcttaagtctatgatagtcagcttttccctga 601 to 675

Q R A E E G I K I M K N N M E N Y R Y Y Q S K G L
gattaataaagatcaattaactaaccaagttgcatatattatcaacaacaaaacaaccttctcagctgagcgg base pairs
ctaattattctagttaattggttcaacgtaataataatggttggtttggttggaagagtcagactcgcc 676 to 750

I N K D Q L T N Q V A L Y Y Q Q Q N N L L S L S G
acaaaatgaacaaaatgccttcgagataaccactctggagagtcagattcagactcaggcagcagattttgataa base pairs
tgttttactgttttacgggagctctattggtgagacctctcagctcaagctgagtcgctgctcaaaactatt 751 to 825

Q N E Q N A L Q I T T L E S Q I Q T Q A A D F D N
tcgtatctatcagatggaactgcacagactcgaattgcagaaagaactggtaaacactgatgtggaaggcgaat base pairs
agcatagatagctcacttgacgttgctgagcttaacgtcttcttgaccaattgtgactacaccttccgcttta 826 to 900

R I Y Q M E L Q R L E L Q K E L V N T D V E G E I
cattatccgggctgtgctgacgggaaagttgactccctgagtgctactgtagggcaaatggtcaataaccggaga base pairs
gtaataggccgcaacagactcccttcaactgagggactcagactgacatcccgcttaccagttatggcctct 901 to 975

I I R A L S D G K V D S L S V T V G Q M V N T G D
cagcctctcaggttatctcctgagaacattgaaaactattatcttattctctgggtcccgaatgatgctgttcc base pairs
gtcggaaagcgtccaataaggactcttggtaacttttgataatagaataagagaccagggttactacgacaagg 976 to 1050

S L L Q V I P E N I E N Y Y L I L W V P N D A V P
ttatatttccggctggtgacaaaagtgatattcgttatgaagccttcccctcagaaaaatttgggcagttctctgc base pairs
aatataaagccgaccactgtttcacttataagcaatacttccggaagggagcttttttaaacccgtaacagagacg 1051 to 1125

Y I S A G D K V N I R Y E A F P S E K F G Q F S A
tacggttaaaaactatataccaggactcctgcgtcaacacaggaatggtgacctataagggagcacctcaaaatac base pairs
atgccaattttgataggtcctgaggacgcagttgtgtcctttacaactggatattccctcgtggagttttatg 1126 to 1200

T V K T I S R T P A S T Q E M L T Y K G A P Q N T
gccgggtgctctgttccctggtataaagtcattgacgacctgaaaagcagataatcaggtatgacgaaaaata base pairs
cggcccacggagacaaggaccatatttcagtaacgctgcccgttttctgtctattagtcatactgctttttat 1201 to 1275

P G A S V P W Y K V I A T P E K Q I I R Y D E K Y
cctccctctgaaaaatggaatgaaagccgaaagtacactatttctgaaaaaaggcgtatttaccagtggtgct base pairs
ggaggagaccttttaccttcttccgctttcatgtgataaagacctttttccgcataaatggtcacctacga 1276 to 1350

L P L E N G M K A E S T L F L E K R R I Y Q W M L

cvaB
ttctcctttctatgacatgaaacacagtgcaaacaggaccgatcaatgactaaacaggaatttcagacaaattataa base pairs
aagaggaaagatactgtactttgtgtcagttgtcctggctagttactgattgtccttaaagctgttttaatt 1351 to 1425

S P F Y D M K H S A T G P I N D -

M T N R N F R Q I I
atctgcttatttgcgctggcaacgctggttccggttattcatcagacggagaccgctgaatgtggactggcct base pairs
tagacgaactaaacgacgacctgtgacgacaaagccaaataagtagtctgcctctggcgacttacacctgaccgga 1426 to 1500

N L L D L R W Q R R R V P V I H Q T E T A E C G L A
gcoctagcaatgatagcggcttttggtaagaatattgacctgatatacttccgccaagatttaattctctctgc base pairs
cggatcgttactatcggcagtaaaaccattcttataactggaactatataagaagcggccttcaaatagagagac 1501 to 1575

C L A M I C G H F G K N I D L I Y L R R K F N L S

ccogtggagcaacccttgcaggaatcaatggaatagcggagcaactggggatggccaccgggctctttcactgg base pairs
gggcacctcgttgggaacgtccttagttaccttatcgctcgttgaccctaccggtgggcccggagaaagtgacc 1576 to 1650
A R G A T L A G I N G I A E Q L G M A T R A L S L
agttggatgaacttcgagtcctcaaaacgcccgtgtattctccactgggatttccagtcacttcgctcgttctggta base pairs
tcaacctacttgaagctcaggagtttgcggcacataagaggtgacccataaagtcagtgaagcagcaagaccagt 1651 to 1725
E L D E L R V L K T P C I L H W D F S H F V V L V
gcgtaaagcgtaacctgtatgtactgcatgatccggccaggggcataagatatatcagccgggagaaatgagcc base pairs
cgcatcttcgattggcaatacatgacgtactagggcgggtccccgtattctatatatagtcggccctcctttactcgg 1726 to 1800
S V K R N R Y V L H D P A R G I R Y I S R E E M S
gatattttacagcgttgcacttgaggtctggcccgaagtgaattccagtcggaaaccctgcagaccgcataa base pairs
ctataaaatgtccgcaacgtgaactccagaccggccttcaacttaaggtcagcctttgggacgtctgggctgatt 1801 to 1875
R Y F T G V A L E V W P G S E F Q S E T L Q T R I
gtcttcgctcactgattaacagttatcaggtattaaagaacgctggcgaaaatcttctgctgctcagttgtaa base pairs
cagaagcaagtgactaattgtcataaatgccataatcttcttggcaccgcttttaaaagacagacagtcacatt 1876 to 1950
S L R S L I N S I Y G I K R T L A K I F C L S V V
ttgaagcaatcaatctgctaattcgggtggggacacagctggttatggatcatgctatttctcgggggacagag base pairs
aacttcgttagttagacgattacggccaccctgtgctgaccaatacctagtagcagataaggacgccccctgtctc 1951 to 2025
I E A I N L L M P V G T Q L V M D H A I P A G D R
ggctactgacgctaatttctgctgctcttatgtttttatattactcaaagctgcaacgagtagcgtcgcgcat base pairs
ccgtagctcgatataaagcagcagatacaaaaaataatgagtttgcagcttgcctcatgcaacgcccga 2026 to 2100
G L L T L I S A A L M F F I L L K A A T S T L R A
ggcttctcactggttatgagcagctcatcaatgtacagtgaggcagtcggggcttctcagatcatcttctcagactac base pairs
ccagaagtgaccaactactcgtgctgagtagttacatgtcaccctcagccccgacaagctagtagaagagctctgatg 2101 to 2175
W S S L V M S T L I N V Q W Q S G L F D H L L R L
cgctggcgtttttgaaacgcccgaatagggtgatccagtcacgcttttctgactcccttgacacattgagggcca base pairs
gcgaccgcaaaaaacttggcgttttaaccactataggtcagtgcaaaactgagggaaactgtgtaactcccgt 2176 to 2250
P L A F F E R R K L G D I Q S R F D S L D T L R A
catttaccaccagtgatgctgggttcataatggacagcattatggttgctggtggtttgtgtagatgctggtat base pairs
gtaaatggtggtcacactagcccagatattacctgctgtaataccaacagcccaaacacactactacgacaata 2251 to 2325
T F T T S V I G F I M D S I M V V G V C V M M L L
accgagatattcaccctgatagttctctgctttaccacaatttacatttttattcagactggtgacatacggca base pairs
tgctcctatagagtggaacctatcaagagacgaaatggtgtaaatgtaaaaaataagctgaccactgtatgccgt 2326 to 2400
Y G G Y L T W I V L C F T T I Y I F I R L V T Y G
attaccgacagatatacgaagaatgtcttctgcaaggaggcccgtgcccctcctattttatgaaacattatag base pairs
taatggctgtctatagctcttctcagacaacagtcctccgggacacggcggagataaaatacctttgtaataatc 2401 to 2475
N Y R Q I S E C L V R E A R A S Y F M E T L Y
gtattgccagctgtaaaaaactcaggggatggtcggaaatcgggagcactggccttaatatgaaatagatgcca base pairs
cataacggtgccatttttaggtcccctaccagccttaagccccctgtgaccgaattatacttttctacgct 2476 to 2550
G I A T V K I Q G M V G I R G A H W L N M K I D A
taaattcgggtattaagtaaccaggtgatttgcctctcggaggaataaacctttggtaccgctgtgac base pairs
atthaagcccataattcgattggtcctacctaaccgagaagcctcctattttatgaaacaatggcggacactag 2551 to 2625
I N S G I K L T R M D L L F G A I N T F V T A C D
agattgtaattttatggctgggagcaggccttctgtagcagataatcagatgacaataggaatggtttgtagcgttta base pairs
tctaaccattaaaaataccgacctcgtccggaacactagctattagtctactgttatccttacaacatcgcaaat 2626 to 2700
Q I V I L W L G A G L V I D N Q M T I G M F V A F
gttctttctggtggcagttttcggaaagagttgctctctgaccagttttcttctcagctagaataaatgagtc base pairs
caagaaaagcaccgctcaaaagcctttctcaacggagagactggtcaaaagaagaagtcgattccttattactcag 2701 to 2775
S S F R G Q F S E R V A S L T S F L L Q L R I M S
tgcacaatgagcgcatttcagatattgcattacatgaaaaggaggaaaagaaacctgaaattgaaatcattgctg base pairs
acgtgttactcgcgtaacgtctataacgtaatgtacttttctccttttcttggactttaacttttagtaacgac 2776 to 2850
L H N E R I A D I A L H E K E E K K P E I E I I A
atatggggcaaatatccctgaaaccaatggttaagctatcgttatgacagtcagtcagcaccgatattcagtg base pairs
tataccgggttataggacctttggttaccaaatcgatagcaataactgtcagtcagtcggtgctataagtcac 2851 to 2925
D M G P I S L E T N G L S Y R Y D S Q S A P I F S
ctctgagtttatctgtagctccgggggaaagtgtggctataactgggtcttccgggtcgggaaaaaccacattaa base pairs
gagactcaaatagacatcgaggccccctttcacaccgatattgaccacgaagccacgccccttttgggtgtaatt 2926 to 3000
A L S L S V A P P G E S V A I T G A S G A G K T T L
tgaagtagtactgtgactattgaaacctgatacgggaggtgactgataaatggtatagatatacgcacaaatg base pairs
actttcatgatacacctgataaaacttgactatcgccctcccactgactatttaccatctatagcgggttaaac 3001 to 3075
M K V L C G L F E P D S G R V L I N G I D I R Q I
gaataaataaattatcccgatgatagcctgtgttatcgaggatgaccggctattttcaggctcaattcgtgaaa base pairs
cttatttataatagtgccctactatcggcacaaatagctcctactggccgataaaagtccgagtttaagcacttt 3076 to 3150
G I N N Y H R M I A C V M Q D D R L F S G S I R E

atatctgtggttttgcagaggaaatggatgaagagtggatggtagaatgtgccagagcaagtcattcatgatg base pairs
 tatagacacaaaacgtctcctttaccctactctcaccctaccatcttacacggtctcgttccagtataagtaactac 3151 to 3225
N I C G F A E E M D E E W M V E C A R A S H I H D
 ttataatgaatatgccaatgggatgaaacattaatagggtgaacttggggaaggtctttctggcgggtcaaaaac base pairs
 aatatacttatacgggttaccctatactttgtaattatccacttgaacccctccagaagaccgcaagtttttg 3226 to 3300
V I M N M P M G Y E T L I G E L G E G L S G G Q K
 agcgtatatttattgacagagccttataccggaaaccaggaatattttatggatgaggcaaccagtgctcttg base pairs
 tcgcataaaataacgtgctcgggaatattggcctttggcttataataataacactactccggtgggtcacgagaac 3301 to 3375
Q R I F I A R A L Y R K P G I L F M D E A T S A L
 attcagagagtgaacatttctgtaagtgtgccataaaaaacatgaatatcaccagggttaattattgcacacagag base pairs
 taagtctctcacttgaagcacttacaacgggtattttttgtactttagtggtcccattaataacgtgtgtctc 3376 to 3450
D S E S E H F V N V A I K N M N I T R V I I A H R
 aaacaacgttgagaactgttgatagagtattttctatt**taa**ccatagaggaattacaagcgtatgaggaatatt base pairs
 ttgtttgcaactcttgacaactatctcaataaagataaatttggatctccttaagtgttcgcatactccttataa 3451 to 3525
E T T L R T V D R V I S I -
 tcttcctgttataaattctcgttattctcagatattctgttggagggtgaatggaagatagacaatccaccaagaa base pairs
 agaaggacaatattaaggagcaatacagagtctatagacaacctccaccttactcttctatctgttaggtggttctt 3526 to 3600

 gaaatattcattctgtgtgattgtccaataactgttctttcttataataataactatttataaacaacatc base pairs
 ctttataagtaagacacacctaacaggttattgacaagaagaatataaatttattatgata**aa**tatttgtttgttag 3601 to 3675
- L C V D
 actaagattatttggactccaattacacaactcttcccgcagcatagttccatgcttctgaaggtatcccttcggg base pairs
 tgattctaataaacctgaggttaattgtgttagaagggcgtcgtatcaaggtacgaagacttccataggggaagccc 3676 to 3750
S L N N P S W N C L R G A A Y N W A E S P I G E P
 tttttgcttaattgttccccctaaaccggatggagacattgcaggattaggtttgtgagtgatgcatagtcata base pairs
 aaaaacgaaattaacaaggggatattgctacctctgtaacgtcctaataccaacactcacctacgtatcagtat 3751 to 3825
K Q K I T G G L G S P S M A P N P K H T S A Y D Y
 tattgcactccagccacccccagcagctgctccaattcctcctgcaacaaattgcccggatagtgttcctat base pairs
 ataacgtggaggtcggtgtgggggtcgtcgacgaggttaaggaggacgttggtttaacgggcctatcacaaggata 3826 to 3900
I A G G A V G G A A A G I G G A V F Q G S L T G I
← cvaC
 agccatcgcaatatcacgccctgaagcaccaccagaaacagaaatctaattcatttagagtcagagtttctcatatg base pairs
 tcggtagcgttatagtgccggacttctggtggtctttgtcttagatta**agt**aaatctcagctcacaag**gta**tac 3901 to 3975
- K S D S N E Y S
A M A I D R G S A G G S V S D L E N L T L T R M
 atctcctttttatcttatcggatattgaataataattatcaccaacaagtaacatattgacagacattaatgcag base pairs
 tag**aggg**aaaaatagaatagcctataacttattattaatagtggtgttttcattgtataacgtctgtaattacgtc 3976 to 4050
R R K I K D S I S Y Y N D G V F Y C I A S M L A S
 agaagcaaaatgtatgcatggataaaaaagtcctttcctctataaaacacaatcatatatagctaagtgaatatata base pairs
 tcttcgtttttacatacgtacctatttttcaggaaggagatttttgggttagtatataatcgattacgttatataat 4051 to 4125
F C F T H M S L F D K G R F V C D Y I A L A I Y I
← cvi
 ttgcgggtggcatttattataaatgcaaataacaactctaattttgttctttttctatccattactttttatccca base pairs
 aacgccaccgtaaaataatatttacgttttattgttgagattaaaacaagaaaaagata**ag**gtaatgaaaaat**agg**gt 4126 to 4200
A T A N I I F A F L L E L K T R K R D M
 ttactttctatccattaccacaaaacactaacgataatgattatcgttaacatagtcgaagtggaagggttagg base pairs
 aatgaaagatagggtaatgggtgtttgtgattgctattactaatagcaattgtatcagttctcacttcccatcc 4201 to 4275
pV-L
 agg base pairs
 tcc 4276 to 4278

Figura A4. Amplicón de 4.278 pb que contiene el sistema genético ColV. Se indican los genes y su secuencia aminoacídica deducida. Se señalan con gris los cebadores y se subrayan las posibles secuencias Shine-Dalgarno.