

PEDECIBA BIOLOGÍA

TESIS DE DOCTORADO

**ESTRATEGIA CATECOL:
UN NUEVO MECANISMO DE SÍNTESIS ANTIBIÓTICA**

María Fernanda Azpiroz Hernández

Orientadora: Dra. Magela Laviña

Sección de Fisiología y Genética Bacterianas
Facultad de Ciencias
Montevideo
Uruguay
2005

Tribunal: Dra. María Hortal (Presidente)

Dra. Lina Bettucci (Vocal)

Dra. Matilde Soubes (Vocal)

Dra. Alicia Arias (Vocal)

Dra. Beatriz Garat (Vocal)

A Gustavo

AGRADECIMIENTOS

A Magela Laviña, mi orientadora de Tesis, a quien le agradezco su rigor científico y perseverancia en la guía de este trabajo. Asimismo, por brindarme su apoyo y dedicación en forma constante.

A mis compañeras de laboratorio Eliana Rodríguez y Eloisa Poey, por compartir provechosos ámbitos de discusión de los resultados presentados en este trabajo. Además, por su compañía diaria, que implicó los días de éxitos y los de fracasos.

A Alicia Parente, por su invaluable y permanente colaboración en la preparación del material y en la realización de los experimentos de la Tesis. En especial, por poner en cada tarea su mayor dedicación y cariño.

A la Dra. Lina Bettucci, por haberme financiado la compra de mitomicina C, sustancia utilizada en una parte de este trabajo.

A la Dra. Elena Fabiano y al Magister Federico Battistoni, por enseñarme y brindarme los reactivos para la preparación del medio CAS utilizado en las etapas tempranas de la Tesis.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), por la financiación de dos proyectos, uno culminado y otro actualmente en curso, en los que se enmarcó esta Tesis.

A la Sociedad Uruguaya de Microbiología (SUM), por generar ámbitos de apoyo y estímulo para los jóvenes investigadores que fueron importantes para mi formación científica.

A Isolina Plata, secretaria de PEDECIBA Biología, quien con disposición y seriedad me facilitó el cumplimiento de los requisitos administrativos necesarios en cada etapa de la Tesis.

A Gustavo Saona, por su paciente y alentadora compañía. Asimismo, por la realización del análisis estadístico de los resultados que dieron lugar al primer artículo científico surgido de esta Tesis.

A mi familia, por su permanente respaldo que hizo posible la concreción de esta Tesis.

RESUMEN

En este trabajo se describe la vinculación entre la síntesis del antibiótico microcina H47 (MccH47) y los sideróforos de tipo catecol. La MccH47 es un antibiótico peptídico de síntesis ribosómica producido por la cepa natural *Escherichia coli* H47. El fenómeno antibiótico está determinado por un sistema genético cromosómico que contiene cuatro genes de síntesis, dos genes de secreción y un gen de inmunidad. La MccH47 ingresa en las bacterias Gram negativas a través de la vía de captación de los catecoles para posteriormente alcanzar su diana de acción, la ATP sintetasa.

Se completó la dilucidación de la secuencia nucleotídica del sistema MccH47. Su análisis indicó que este sistema estaría integrando una isla genómica de la cepa *E. coli* H47 y que ésta probablemente sería de patogenicidad.

Por análisis genéticos se determinó que la vía de síntesis del sideróforo enterobactina era necesaria para la síntesis de MccH47, concretamente en la etapa de maduración antibiótica. Además, se encontró que las cepas productoras de MccH47 hiperproducían enterobactina, habiéndose identificado el gen del sistema MccH47 responsable de esta promoción. El hallazgo de los genes *iroBD* en el sistema MccH47 permitió relacionar el antibiótico con las salmoquelinas, sideróforos derivados de la enterobactina por glucosilación. Se presenta un modelo de síntesis de MccH47 que consiste en la síntesis ribosómica del péptido precursor antibiótico y su posterior maduración por la adición de una salmoquelina. La adquisición de este grupo catecol haría posible que el antibiótico fuese captado por la vía de ingreso de los catecoles. A este modo de síntesis y captación antibióticas lo denominamos estrategia catecol.

Se encontró que el sistema MccH47 codificaba para un segundo antibiótico, microcina I47, que también utiliza la estrategia catecol para su síntesis y captación. Se determinó que la MccI47 se produce en condiciones de deprivación de hierro, sugiriendo entonces que refuerza la acción de la MccH47 en ambientes limitados en este metal.

Por último, se dilucidó que la MccH47 presenta un dominio C-terminal dedicado a hacer posible la captación a través de la vía de los catecoles. En este dominio se adicionaría la molécula de tipo salmoquelina, enrolando así al antibiótico en la estrategia catecol.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Microcinas.....	2
1.1.1. Microcina H47.....	3
1.2. Sideróforos de tipo catecol.....	5
1.2.1. Enterobactina.....	5
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivo I.....	9
2.2. Hipótesis I y objetivos.....	9
2.3. Hipótesis II y objetivos.....	10
2.4. Hipótesis III y objetivos.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos.....	11
3.2. Medios de cultivo.....	11
3.3. Prueba de producción de sideróforos.....	11
3.4. Prueba de producción antibiótica.....	13
3.5. Construcción de estirpes de <i>E. coli</i> K12.....	14
3.6. Construcción de plásmidos recombinantes.....	14
3.7. Manipulación y secuenciación del DNA.....	16
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del sistema genético MccH47.....	17
4.2. Maduración del antibiótico MccH47.....	33
4.2.1. Las estirpes portadoras del sistema genético MccH47 hiperproducen enterobactina.....	34
4.2.2. La producción de MccH47 depende del sistema genético <i>ent</i>	38
4.3. El sistema genético MccH47 codifica para la producción de una segunda microcina, MccI47.....	42
4.4. Existe un dominio de captación en el péptido antibiótico MccH47.....	46
4.4.1. Construcción de fusiones génicas.....	48
4.4.2. Análisis de la producción antibiótica de las estirpes portadoras de las fusiones génicas.....	53
5. DISCUSIÓN.....	63
6. REFERENCIAS.....	73

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias producen diversas sustancias que son exportadas al medio extracelular y que les permiten interactuar con otras bacterias que comparten su nicho ecológico. En este trabajo nos interesan dos tipos de sustancias: unas que generan una relación antagónica y otras involucradas en fenómenos cooperativos. En cuanto a las primeras, nos referiremos a los antibióticos, sustancias que matan o inhiben el crecimiento de otras bacterias. En cuanto a las segundas, nos centraremos en los sideróforos, sustancias capaces de unir hierro del medio extracelular e ingresar luego a las bacterias para proveerles de este metal. Los estudios sobre estos dos fenómenos, antibiótico y sideróforo, evidencian importantes paralelismos en su fisiología, la que se podría representar según un esquema de circuito (Fig. 1.1). Todo fenómeno de antibiosis implica la síntesis del antibiótico, su secreción al medio extracelular y, una vez allí, su acción sobre otras bacterias. Para que el antibiótico interaccione con la célula susceptible debe primero ser captado para luego alcanzar su diana de acción y ejercer el efecto tóxico. Eventualmente, el antibiótico puede reingresar en la propia célula productora, por lo que ésta debe poseer una inmunidad específica que la proteja de su acción. Por su parte, el fenómeno de utilización de hierro mediado por sideróforos implica la síntesis del sideróforo, su secreción y, una vez en el medio extracelular, su unión a hierro y posterior captación por la célula que lo produjo. Dentro de ésta, el hierro es liberado para su utilización. También el complejo hierro-sideróforo puede ser captado por otras células del ambiente que se beneficiarán del aporte del metal.

Considerando el paralelismo exhibido por ambos fenómenos, resulta probable que puedan existir en la naturaleza sistemas híbridos para la producción de sustancias con características mixtas, de antibiótico y de sideróforo. En efecto, se han descrito algunas sustancias naturales producidas por bacterias del género *Streptomyces* que combinan propiedades de antibióticos y de sideróforos. Se trata de compuestos formados por un grupo tóxico unido a un sideróforo de tipo hidroxamato que le otorga la capacidad de ingresar a las células a través de los receptores para estos sideróforos. El ejemplo más estudiado es el de la albomicina (Braun, 1999). Concretamente, en el presente trabajo se describe un nuevo ejemplo de cruzamiento entre un antibiótico, la microcina H47 (MccH47) y un sideróforo de tipo catecol, la enterobactina.

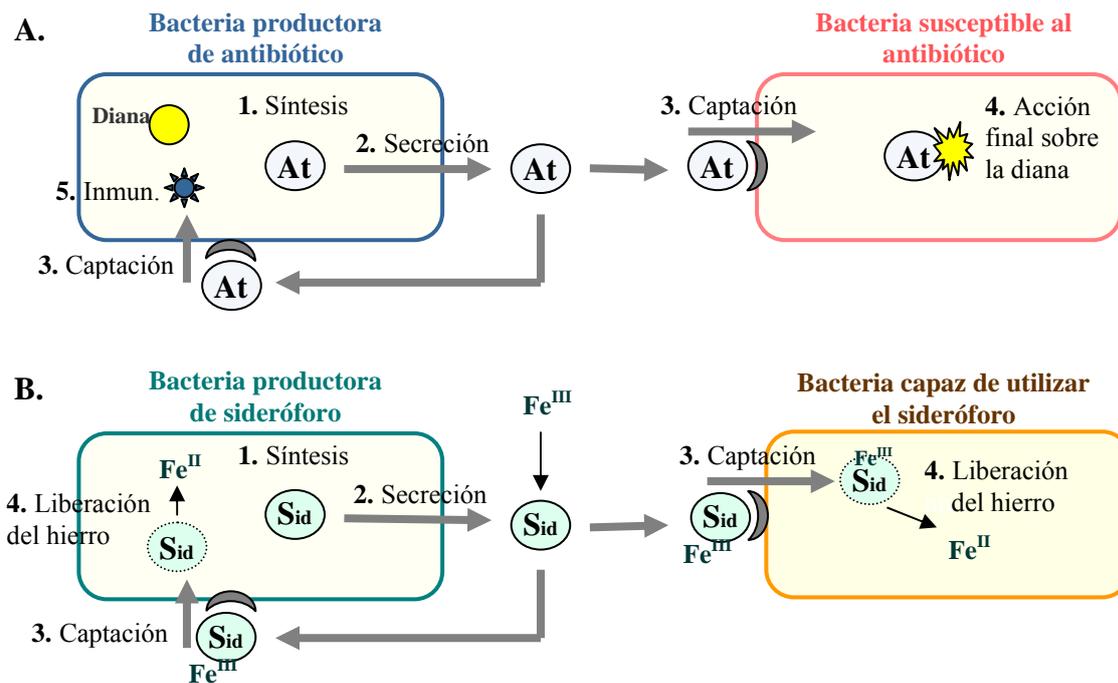


Figura 1.1. Esquema de la fisiología de los fenómenos antibiótico (A) y sideróforo (B).

1.1 Microcinas

La MccH47 pertenece a una familia de antibióticos peptídicos de síntesis ribosómica denominados genéricamente microcinas. Inicialmente descritas en 1976, son antibióticos de bajo peso molecular (≤ 10 kDa.) producidos por cepas de enterobacterias (Asensio et al., 1976). En general, tienen un espectro de acción reducido a especies filogenéticamente relacionadas a la de la productora. El espectro de acción está determinado fundamentalmente por la capacidad del antibiótico de ser captado por las células, dependiendo de la presencia en ellas de determinadas proteínas receptoras en sus envolturas celulares. Aún cuando son pocas las microcinas descritas hasta el momento, llama la atención la amplia diversidad de dianas sobre las que ejercen su efecto deletéreo; e.g. la microcina B17 (MccB17) actúa sobre la DNA girasa inhibiendo la replicación del DNA, la microcina C7 (MccC7) inhibe la síntesis proteica, la colicina V (ColV) y la microcina E492 (MccE492) actúan como ionóforos, y la MccH47 actúa sobre la ATP sintetasa (Konisky, 1982; Vizán et al., 1991; Guijarro et al., 1995; Rodríguez et al., 1999; Lagos et al., 2001).

La capacidad de una cepa bacteriana de producir microcina depende de la presencia en ella de un conjunto de genes que garantizan el cumplimiento de las tres funciones de todo fenómeno de antibiosis: síntesis del antibiótico, secreción del mismo

al medio extracelular e inmunidad para la bacteria productora. Estos determinantes se encuentran agrupados conformando un sistema genético integrado al menos por: un gen de actividad, que codifica para el péptido antibiótico; un gen de inmunidad, cuyo producto protege la célula productora de la acción antibiótica, y uno o dos genes de secreción, que codifican para un sistema dedicado de exportación antibiótica. A este esquema básico se ajustan aquellas microcinas que no presentan modificaciones postraduccionales, de las que ColV es el ejemplo más estudiado (Gilson et al., 1987). Otras microcinas exhiben una mayor complejidad estructural: el gen de actividad codifica para un péptido precursor que luego es modificado postraduccionalmente para convertirse en la molécula madura. Los casos más estudiados son la MccB17, que posee anillos oxazólicos y tiazólicos a lo largo de su cadena polipeptídica, y la MccC7, que presenta la adición de un grupo formilo en su extremo N-terminal y un nucleótido en su extremo C-terminal (Yorgey et al., 1993; Guijarro et al., 1995). Consecuentemente, los sistemas genéticos de estas microcinas poseen genes adicionales, denominados genes de maduración, responsables de imprimir las modificaciones postraduccionales sobre el péptido precursor antibiótico (Genilloud et al., 1989; González-Pastor et al., 1995).

Los sistemas genéticos para las microcinas forman parte del “genoma flexible” bacteriano, por lo que su presencia varía entre cepas de una misma especie. En su mayoría se encuentran localizados en plásmidos y, de hecho, las microcinas fueron inicialmente descritas como actividades codificadas por elementos extracromosómicos (Kolter & Moreno, 1992). En 1990, se describió una nueva microcina que, contrariamente a las anteriores, era codificada por el cromosoma bacteriano (Laviña et al., 1990). Se trata de la MccH47, tema central del presente trabajo.

1.1.1. Microcina H47

La microcina H47 es un antibiótico peptídico de aproximadamente 7 kDa. producido por *Escherichia coli* H47, un aislamiento clínico de heces humanas. Se produce preferentemente en medio mínimo, al final de la fase logarítmica y comienzo de la fase estacionaria de crecimiento (Laviña et al., 1990).

El sistema genético MccH47 se encuentra localizado en el cromosoma de *E. coli* H47, abarcando unas 10 kb de extensión (Fig. 1.2.). Por estudios de genética molecular se ha determinado que contiene cuatro genes de síntesis antibiótica (*mchA*, *mchB*, *mchC* y *mchD*), dos genes de secreción (*mchE* y *mchF*) y un gen de inmunidad (*mchI*). Además, interpuesta entre los genes de función asignada antes mencionados, se

encuentra una región de ca. 3 kb donde las mutaciones no afectan significativamente los fenotipos de producción o inmunidad antibiótica. Esta región se denominó provisionalmente “zona silenciosa” (Gaggero et al., 1993). Por lo tanto, el sistema MccH47 presenta la complejidad propia de aquellos sistemas que codifican para péptidos antibióticos modificados.

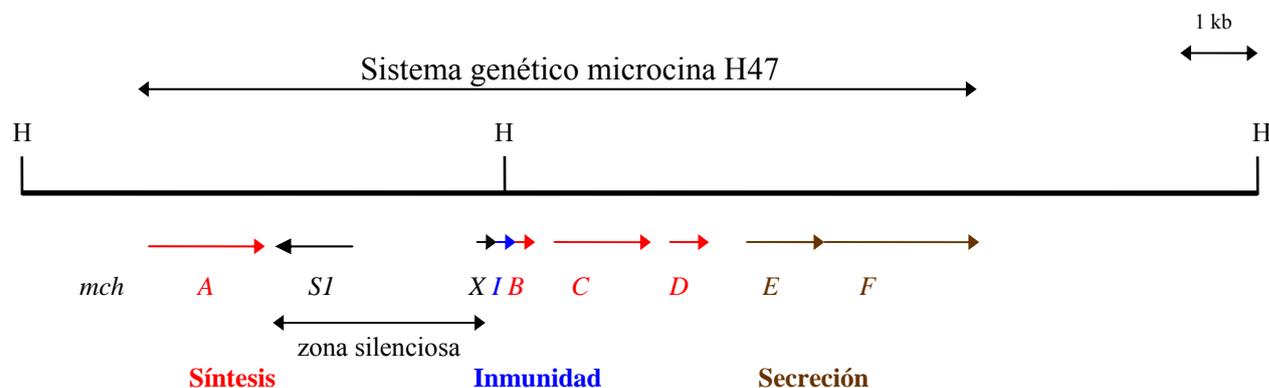


Figura 1. 2. Región de DNA que contiene el sistema genético microcina H47 que ha sido clonada en varios vectores. Se muestra la extensión del sistema antibiótico y de la zona silenciosa. Los genes *mch* identificados, con su dirección de transcripción, se representan abajo. H: HindIII.

En cuanto a la producción antibiótica, proceso que comprende síntesis y secreción, se ha dilucidado que la MccH47 se sintetiza como un péptido precursor que luego sufre modificaciones postraduccionales y finalmente es secretado. El péptido precursor antibiótico, de 75 aa., es codificado por el gen de síntesis *mchB*, que se identificó así como el gen de actividad. Se ha determinado que el péptido MchB posee actividad tóxica de la misma especificidad que la MccH47 madura; sin embargo, es incapaz de ingresar en las células susceptibles y ejercer una acción antibiótica. El efecto tóxico de MchB ha sido detectado por la inviabilidad de las células cuando sólo portan el gen de actividad, de modo que se ejerce sobre la propia célula que lo está produciendo. Este fenotipo se revierte específicamente cuando las células portan también el gen de inmunidad. Para producir actividad antibiótica madura son necesarios los restantes genes de síntesis, *mchA*, *mchC* y *mchD*, cuyos productos seguramente imprimen modificaciones postraduccionales al péptido precursor, confiriéndole la capacidad de ser captado por otras células (Rodríguez et al., 1999). La naturaleza de tales modificaciones postraduccionales no ha sido aún dilucidada. Finalmente, el antibiótico es exportado al medio extracelular por un sistema transportador ABC conformado por los productos de los genes *mchE* y *mchF* del sistema MccH47 y por el

producto del gen *tolC*, no ligado al sistema. Durante la secreción, la MccH47 sufre el procesamiento de sus 15 residuos amino terminales (Rodríguez et al., 1999; Azpiroz et al., 2001).

Una vez en el medio extracelular, el antibiótico puede interactuar con otras células del entorno. Para alcanzar su diana de acción, éste debe primero ingresar en la célula susceptible. Se ha dilucidado que la MccH47 es captada por células de *E. coli* K12 a través de la vía de ingreso de los sideróforos de tipo catecol. Es así que utiliza cualquiera de los tres receptores que reconocen catecoles, Cir, Fiu y FepA, y luego atraviesa la membrana externa gracias a la energía provista por el complejo TonB (Fig. 1.4.) (Hantke, 1990; Trujillo et al., 2001). Este antecedente ya apuntaba a la existencia de una relación entre la MccH47 y los sideróforos de tipo catecol. Finalmente, la MccH47 alcanza su diana, la ATP sintetasa, ejerciendo una acción bactericida (Rodríguez et al., 1999; Trujillo et al., 2001).

1.2. Sideróforos de tipo catecol

Entre las sustancias necesarias para el crecimiento de las bacterias se encuentra el hierro, metal que integra numerosas proteínas involucradas en una variedad de procesos celulares esenciales. Si bien el hierro es necesario en concentraciones micromolares, en condiciones aerobias no se encuentra biodisponible por formar complejos insolubles. Frente a esta dificultad, las bacterias han desarrollado distintos mecanismos de captación de hierro, entre los que se encuentra la producción de sideróforos, moléculas orgánicas que unen hierro con alta afinidad. Cuando las bacterias crecen en un medio deprivado de hierro, se induce en ellas la producción de sideróforos, los que al llegar al medio extracelular unen el metal e ingresan nuevamente a la bacteria como complejos hierro-sideróforo. Una vez en el medio intracelular el hierro es liberado del complejo para su utilización. Nos centraremos en los sideróforos de tipo catecol, moléculas con grupos catecólicos producidas por todas las cepas de enterobacterias (Earhart, 1996). Dentro de este grupo se encuentra la enterobactina, segundo elemento central de este trabajo.

1.2.1. Enterobactina

La enterobactina es el sideróforo de tipo catecol producido por todas las cepas de *E. coli* y *Salmonella enterica* así como por otras enterobacterias. Se trata de una

molécula cíclica formada por tres unidades de dihidroxibenzoilserina (DBS) unidas por enlaces éster (Fig. 1.3). Es el quelante de hierro más potente conocido, con una constante de formación de enterobactina férrica de 10^{52} M^{-1} (Gehring et al., 1997).

El fenómeno enterobactina está determinado por la presencia en el cromosoma bacteriano de un sistema genético de ca. 20 kb de extensión, denominado sistema *ent* (Fig. 1.3). Está integrado por seis genes de síntesis (*entA*, *entB*, *entC*, *entD*, *entE* y *entF*), un gen de secreción (*entS*), seis genes de captación (*fepA*, *fepB*, *fepC*, *fepD*, *fepE* y *fepG*) y un gen de liberación de hierro (*fes*), cuyo producto es una esterasa de enterobactina. Estos genes se encuentran agrupados en varios operones, todos ellos regulados por la disponibilidad de hierro, integrando el regulón llamado “Fur”. Es así que su expresión está sometida a la acción del represor Fur, que se une a los operadores llamados “cajas Fur” cuando hay disponibilidad de hierro. Por el contrario, en condiciones de deprivación de este metal, Fur libera los operadores y los genes incrementan su expresión (Earhart, 1996).

La enterobactina es sintetizada en forma enzimática por una cascada de reacciones que se conoce con el nombre de vía Ent. Dentro de ésta se reconocen dos etapas: la primera consiste en la formación de ácido dihidroxibenzoico (DHB) a partir de ácido corísmico mediante la acción catalítica de los productos de los genes *entC*, *entB* y *entA*, y la segunda da lugar a la enterobactina, resultante de la acción de un complejo enzimático formado por los productos de los genes *entB*, *entD*, *entE* y *entF* (Fig. 1.3). En esta segunda etapa se efectúa la unión covalente entre L-serina y DHB para formar dihidroxibenzoilserina (DBS). Al tiempo que es sintetizado, el DBS es polimerizado, mediante utilización de ATP, hasta formar un trímero circular que es la enterobactina. La polimerización y el ciclado de los tres monómeros de DBS son llevados a cabo por la sintetasa de enterobactina, EntF. Para ello, EntF utiliza un mecanismo muy particular, llamado de “tioplantilla”, que había sido descrito para la síntesis enzimática de los antibióticos policetónicos (Pfeifer & Khosla, 2001; Crosa & Walsh, 2002). Luego de ser sintetizada, la enterobactina es secretada al medio extracelular por un proceso poco conocido, que involucra el producto del gen *entS* (Furrer et al., 2002).

Una vez en el medio extracelular, los oxhidrilos de los tres grupos catecol de la enterobactina pueden coordinar una molécula de Fe^{III} y formar así un complejo Fe^{III} -enterobactina (Fig. 1.3). Luego, el sideróforo cargado con el metal vuelve a la célula

que lo produjo ingresando a la misma a través de una vía de captación específica. Primero, la enterobactina férrica es reconocida por el receptor FepA, luego atraviesa la

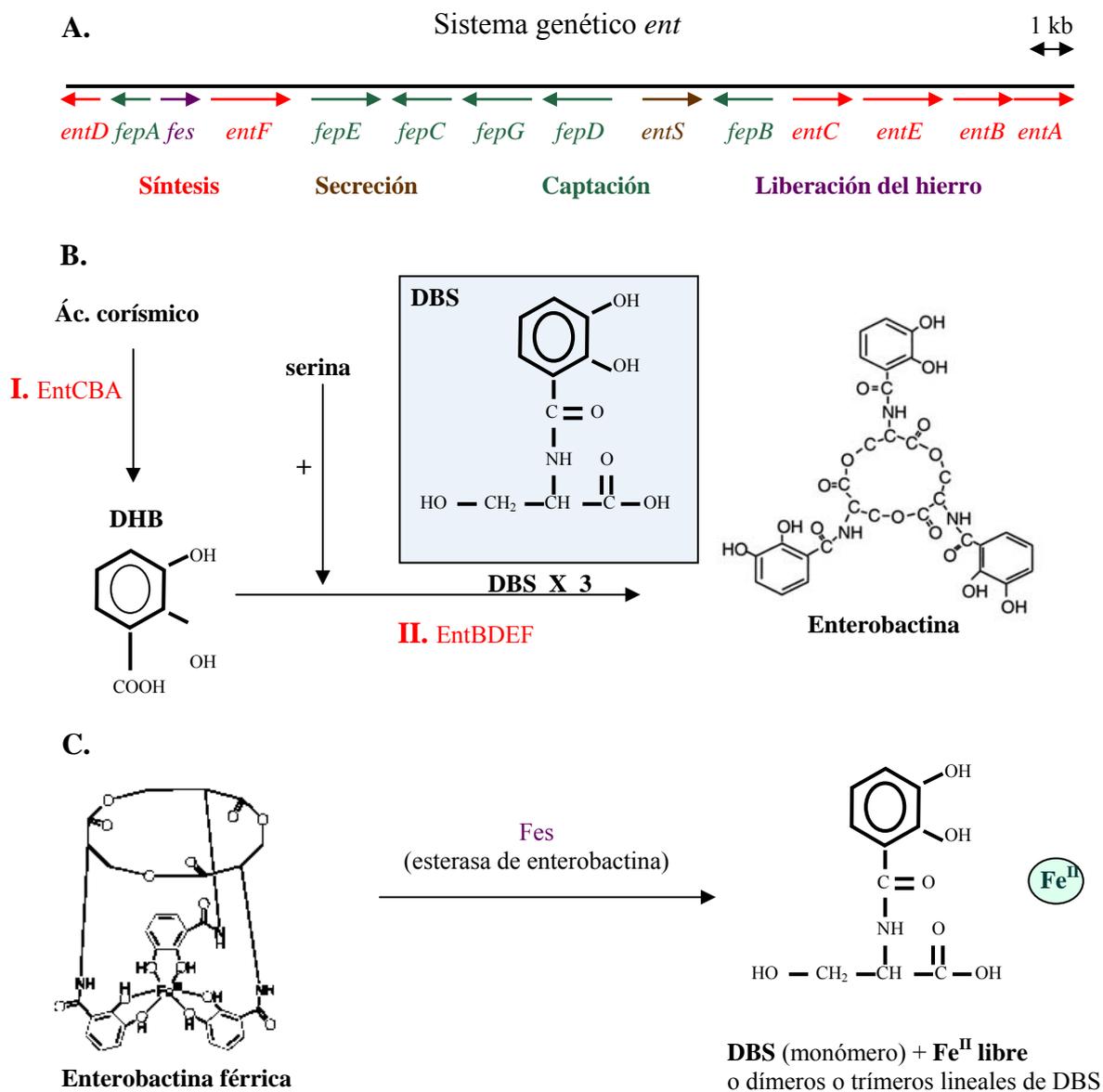


Figura 1.3. Sistema de captación y utilización de hierro mediado por enterobactina. A) Sistema *ent*. Debajo se representan los genes con su extensión y dirección de transcripción. B) Representación esquemática de la vía de síntesis del sideróforo enterobactina (vía Ent), indicándose sus dos etapas (I y II). C) Liberación del hierro en el medio intracelular mediante hidrólisis del complejo Fe^{III}-enterobactina.

membrana externa gracias a la energía provista por el complejo TonB, y finalmente atraviesa la membrana interna llegando al citoplasma por un complejo de tipo ABC, producto de los genes *fep* (Fig. 1.4). Para que las bacterias puedan utilizar el hierro internalizado, éste debe ser liberado del sideróforo. La enterobactina es entonces hidrolizada por la acción de la esterasa de enterobactina, codificada por el gen *fes*,

dando lugar a monómeros, dímeros o trímeros lineales de DBS y a hierro libre. Se ha propuesto que durante este proceso el metal sufre una reducción, pasando de su estado oxidado (Fe^{III}) a su estado reducido (Fe^{II}), para poder ser utilizado por la bacteria (Fig. 1.3) (Earhart, 1996).

Cabe señalar que en la síntesis de enterobactina y en su hidrólisis se generan otros compuestos catecólicos: el precursor DHB y el producto de degradación DBS. Éstos se han encontrado en reducidas cantidades en el medio extracelular y se ha determinado que son capaces de quelar hierro con baja afinidad. En efecto, se ha descrito que promueven el crecimiento de células de *E. coli* K12 incapaces de sintetizar enterobactina, siendo captados por éstas a través de los receptores de membrana externa Cir, Fiu o FepA, indistintamente (Fig. 1.4) (Hantke, 1990).

Debido a la importancia que tendrá en este trabajo, nos interesa mencionar que a partir del año 1996 se describió la existencia de un nuevo locus regulado por hierro en el cromosoma de *Salmonella enterica*. Este locus se denominó *iroA* y está compuesto por cinco genes, *iroBCDEN*. Si bien su función era desconocida, dos de estos genes apuntaban a una vinculación con los sideróforos de tipo catecol: *iroN* codifica para un receptor de catecoles e *iroD* presenta similitud con *fes*, el gen para la esterasa de enterobactina de *E. coli* (Baümlier et al., 1996; Baümlier et al., 1998).

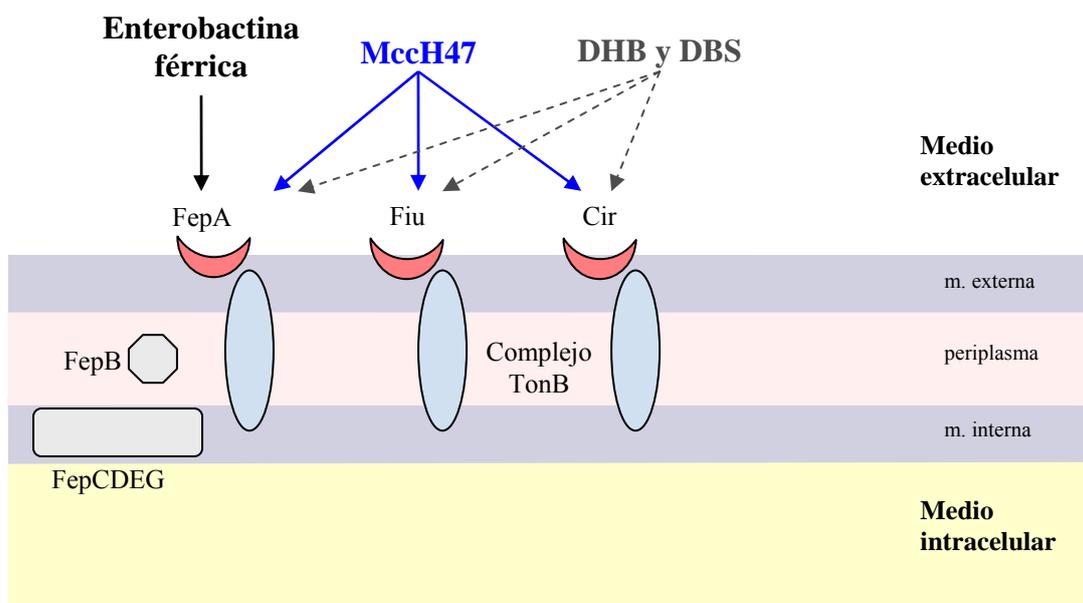


Figura 1.4. Vía de captación de MccH47 y de los sideróforos de tipo catecol enterobactina, DHB y DBS. Se señalan los receptores de membrana externa, la vía TonB y, para el caso de la enterobactina, el complejo de tipo ABC integrado por las proteínas Fep.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El trabajo comenzó cumpliendo con el objetivo de completar la dilucidación de la secuencia nucleotídica del sistema genético MccH47. De esta manera se pretendía obtener una información descriptiva que sirviera de base para análisis ulteriores. A partir de allí, el desarrollo del trabajo se realizó en base a una sucesión de hipótesis y objetivos que iban surgiendo a medida que se alcanzaban resultados.

2.1. Objetivo I

Consistió en completar la secuencia nucleotídica del sistema genético MccH47 y de las porciones adyacentes al mismo. A través del cumplimiento de este objetivo no sólo se planteó dilucidar la secuencia nucleotídica sino también identificar marcos abiertos de lectura, deducir las secuencias aminoacídicas de los productos génicos, localizar mutaciones, comparar las secuencias contra los bancos de datos, etc.

En esta etapa surgió un nuevo dato que vinculaba la MccH47 con los sideróforos de tipo catecol. Concretamente, dos genes del sistema MccH47 resultaron pertenecer a la familia de genes *iroB* e *iroD* de *S. enterica*. Este hallazgo, conjuntamente con el antecedente de que la MccH47 utiliza la misma vía de captación que los sideróforos de tipo catecol, nos condujo a elaborar la primera hipótesis del trabajo.

2.2. Hipótesis I y objetivos

La hipótesis consistió en considerar la existencia de una vinculación entre el antibiótico MccH47 y los sideróforos de tipo catecol.

Para probarla, se planteó analizar dicha relación en dos direcciones: 1) estudiar la producción de enterobactina por parte de las cepas productoras de MccH47 y 2) estudiar la producción de MccH47 de cepas eficientes y deficientes para la síntesis de enterobactina.

En esta etapa se determinó que la MccH47 requería de la enterobactina para su síntesis, elaborándose un modelo de síntesis y captación antibiótica que denominamos “estrategia catecol”.

2.3. Hipótesis II y objetivos

En esta etapa se consideró que el sistema MccH47 podría codificar para una segunda microcina que también utilizaría la estrategia catecol. Esta hipótesis se basó en la identificación por secuencia nucleotídica de dos genes del sistema MccH47 con ciertas características semejantes a las de los genes de actividad-inmunidad para MccH47.

Los objetivos correspondientes comprendieron la búsqueda de una segunda producción antibiótica así como la determinación de las condiciones fisiológicas y los contextos genéticos en los que ésta tenía lugar.

El hallazgo de una segunda actividad, microcina I47 (MccI47), que también cumplía la estrategia catecol, nos condujo a la tercera hipótesis.

2.4. Hipótesis III y objetivos

Se consideró que podía existir un dominio de captación en las microcinas que utilizan la estrategia catecol. Esta hipótesis se basó en una primera instancia en la comparación de los péptidos microcina H47 e I47, que a su vez condujo a incluir otras microcinas en el análisis. Del hallazgo de una característica estructural común en todos los péptidos comparados surgió la hipótesis planteada.

Para probarla, se diseñó un abordaje de síntesis combinatoria para la construcción de péptidos quiméricos con porciones de dos antibióticos, uno que seguía la estrategia catecol y otro que no. El diseño permitiría analizar si una determinada porción del péptido MccH47 sería capaz de enlazar a otro antibiótico en la estrategia catecol.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos

Los genotipos, fenotipos y procedencia de las estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos utilizados se describen en la Tabla 3.1.

3.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron: medio rico LB, medio mínimo M63 adicionado de glucosa y de vitamina B1, y medio R para la propagación de fagos (Miller, 1992). Para detectar la producción de sideróforos se utilizó el medio cromo azurol S (CAS) (Schwyn & Neilands, 1987). Cuando fue necesario, se agregaron L-aminoácidos a una concentración final de 40 µg/ml.

Los antibióticos se añadieron a las concentraciones finales siguientes:

ampicilina	(Ap)	50 µg/ml
cloranfenicol	(Cm)	30 µg/ml
kanamicina	(Km)	30 µg/ml
tetraciclina	(Tc)	15 µg/ml

Las concentraciones crecientes de hierro se obtuvieron adicionando a las placas 1.0, 2.5 y 10.0 µg/ml de FeSO₄·7H₂O. Por el contrario, las condiciones de privación de hierro se obtuvieron añadiendo a las placas 10 µg/ml de 2,2 dipiridilo (DPP). Cuando fue requerido, se suplementó el medio con ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB) a una concentración final de 10 µg/ml. La mitomicina C se adicionó a una concentración final de 1µg/ml.

3.3. Prueba de producción de sideróforos

Para analizar la producción de sideróforos se realizaron picadas de las estirpes a ensayar sobre placas de medio CAS. Este medio tiene un color verde azulado conferido por la formación de un complejo Fe^{III}-cromo azurol S en presencia de un detergente. Ante una actividad quelante fuerte, cualquiera sea su naturaleza química, el hierro se une al quelante en vez de al CAS determinando que el color vire al amarillo. Por lo tanto, la producción de sideróforos se detectó por la aparición de halos amarillos (también llamados halos CAS) alrededor de las picadas luego de 24 horas de incubación a 37° C. La prueba de actividad quelante de hierro de MccH47 se ensayó sembrando en

placa CAS una alícuota de un extracto intracelular con actividad MccH47 e incubando 24 horas a 37° C.

Tabla 3.1. Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos

Bacterias, Plásmidos, Bacteriófagos	Genotipo/Fenotipo	Origen/referencia
<i>E. coli</i> H47	Productora de MccH47	Laviña et al., 1990
<i>E. coli</i> K12		
MC4100	<i>araD lacU169 relA rpsL thiA</i> (Sm ^R)	Colección del laboratorio
RYC1000	MC4100 <i>rbs7 gyrA recA</i> (Sm ^R , Nal ^R)	Colección del laboratorio
FGB099	MC4100 <i>atpB::Tn5 99</i> (Km ^R)	Rodríguez & Laviña, 2003
FGB11	MC4100 <i>tonB::Tn5</i> (Km ^R)	Trujillo et al., 2001
FGB1876	MC4100 <i>rpsL⁺ cir fepA::Tn10 fiu::Mud1X</i> (Tc ^R , Ap ^R)	M. Laviña
FGB1728	MC4100 <i>rpsL⁺ cir fiu::Mud1X</i> (Ap ^R)	M. Laviña
FGB1594	MC4100 <i>rpsL⁺ fiu::Mud1X</i> (Ap ^R)	M. Laviña
FGB102	MC4100 <i>fepA::Tn10</i> (Sm ^R , Tc ^R)	Azpiroz & Laviña, 2004
FGB103	MC4100 Δ (<i>ompT-fepC</i>)267 <i>crcA::Tn10</i> (Sm ^R , Tc ^R)	Azpiroz & Laviña, 2004
UT400	<i>araC entA403 lacY leuB mtl</i> Δ (<i>ompT-fepC</i>)267 <i>proC rfbD rpsL secA thi trpE tsx xylA</i> (Sm ^R)	Genetic Stock Center
Plásmidos		
pBR322	replicón pMB1(Tc ^R , Ap ^R)	Miller, 1992
pACYC184	replicón p15A (Tc ^R , Cm ^R)	Miller, 1992
pUC13	<i>bla lacZ'</i> replicón pMB1(Ap ^R)	Miller, 1992
pUCYC5	<i>bla lacZ'</i> replicón p15A (Cm ^R)	M. Laviña
pEX4	pUC13 con el sistema MccH47 (Ap ^R)	Laviña et al., 1990
pEX4::Tn5 38	pEX4 <i>mchS2::Tn5</i> (Ap ^R , Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX4::Tn5 35	pEX4 <i>mchS4::Tn5</i> (Ap ^R , Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX4::Tn5 B41	pEX4 <i>mchF::Tn5</i> (Ap ^R , Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX4::Tn5 B54	pEX4 <i>mchF::Tn5</i> (Ap ^R , Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX100	pACYC184 con el sistema MccH47 (Cm ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX100::Tnlac 7.2	pEX100 <i>mchA₁₂-lacZ</i> (Cm ^R , Km ^R)	Este trabajo
pEX100::Tnlac 5.4	pEX100 <i>mchS1₃₇₁-lacZ</i> (Cm ^R , Km ^R)	Este trabajo
pEX100::Tn5 76	pEX100 <i>mchB::Tn5</i> (Cm ^R , Km ^R)	Rodríguez et al., 1999
pEX100::Tnlac 7.7	pEX100 <i>mchC₆₉-lacZ</i> (Cm ^R , Km ^R)	Este trabajo
pEX100::Tnlac 7.3	pEX100 <i>mchC₄₃₉-lacZ</i> (Cm ^R , Km ^R)	Este trabajo
pEX100::Tnlac 3.5	pEX100 <i>mchD₂₈-lacZ</i> (Cm ^R , Km ^R)	Este trabajo
pEX100::Tnlac 7.1	pEX100 <i>mchE::Tnlac</i> (Cm ^R , Km ^R)	Azpiroz et al., 2001
pENT1	Mud5005 con el sistema <i>ent</i> (Km ^R)	Azpiroz & Laviña, 2004
pMVD10	pACYC184 con <i>mchB</i> (Cm ^R)	Rodríguez et al., 1999
pMVD41	pACYC184 con <i>mchEF</i> (Cm ^R)	Este trabajo
pMVDS4	pACYC184 con <i>mchS4</i> (Cm ^R)	Azpiroz & Laviña, 2004
pMVDS3	pACYC184 con <i>mchS3</i> (Cm ^R)	Este trabajo
pUY270	pUC13 con el sistema ColV (Ap ^R)	Azpiroz et al., 2001
Δ pUY270	derivado de pUY270 con <i>cvi</i> y <i>cvaC</i>	Este trabajo
pUYcvi	pUC13 con <i>cvi</i> (Ap ^R)	M. E. Poey Larrea
pUYS1	pUC13 con <i>mchS1</i> (Ap ^R)	Azpiroz & Laviña, 2004
pUY69	pUC13 con <i>mchI</i> (Ap ^R)	Rodríguez & Laviña, 1998
pUY44	pUC13 con <i>fes</i> (Ap ^R)	Azpiroz & Laviña, 2004
pUY46	pUC13 con <i>entD</i> , <i>fepA</i> y <i>fes</i> (Ap ^R)	Azpiroz & Laviña, 2004
pUY47	pUC13 con <i>entD</i> , <i>fepA</i> , <i>fes</i> y <i>entF</i> (Ap ^R)	Azpiroz & Laviña, 2004
pFC103-11	pBR322 con <i>cvi</i> y <i>cvaC₁₀₃-mchB₁₁</i> (Ap ^R)	Este trabajo
pFC103-19	pBR322 con <i>cvi</i> y <i>cvaC₁₀₃-mchB₁₉</i> (Ap ^R)	Este trabajo
pFC90-11	pBR322 con <i>cvi</i> y <i>cvaC₉₀-mchB₁₁</i> (Ap ^R)	Este trabajo
pFC90-19	pBR322 con <i>cvi</i> y <i>cvaC₉₀-mchB₁₉</i> (Ap ^R)	Este trabajo
Bacteriófagos		
Muets Ap ^R	Muets con el gen <i>bla</i> del Tn3 (Ap ^R)	Laviña et al., 1990
Mud5005	plásmido mini-Mu con el replicón pMB1(Km ^R)	Laviña et al., 1990
P1	<i>vir</i>	Miller, 1992

3.4. Prueba de producción antibiótica

La prueba de producción antibiótica consistió en realizar picadas de las estirpes a ensayar sobre una placa de medio M63 glucosa sembrada con un tapiz de bacterias sensibles al antibiótico. Luego de 24 horas de incubación a 37° C, aquellas estirpes productoras de antibiótico generan halos de inhibición del crecimiento del tapiz alrededor de la picada (halos de antibiosis) (Gaggero et al., 1993). Para la MccI47 las placas se incubaron 72 horas. Como estirpe indicadora de uso general, sensible a todos los antibióticos analizados, se empleó RYC1000(pUC13). Para corroborar la especificidad de las actividades antibióticas, se utilizaron cepas indicadoras portadoras de plásmidos recombinantes con los genes de inmunidad a cada antibiótico: pUY69, inmunidad a MccH47; pMVDS3, inmunidad a MccI47, y pUY*cvi*, inmunidad a ColV. Cuando se analizaron cepas productoras de dos antibióticos, uno de ellos MccH47, se utilizó la estirpe resistente a MccH47 FGB099 para observar sólo la otra producción antibiótica.

Para analizar los requerimientos de maduración y secreción de las actividades antibióticas, se utilizaron estirpes portadoras de mutaciones en los genes del sistema MccH47: *mchA*, RYC1000(pEX100::Tn*lac*_{7.2}); *mchS1*, RYC1000(pEX100::Tn*lac*_{5.4}); *mchB*, RYC1000(pEX100::Tn5₇₆); *mchC*, RYC1000(pEX100::Tn*lac*_{7.7}); *mchD*, RYC1000(pEX100::Tn*lac*_{3.5}), y *mchE*, RYC1000(pEX100::Tn*lac*_{7.1}). Para analizar la vía de captación antibiótica, se utilizó una colección de cepas mutantes para la vía de ingreso de los catecoles, todas derivadas de MC4100: FGB1728 (*cir*, *fiu*), FGB1594 (*fiu*), FGB102 (*fepA*), FGB1876 (*cir*, *fiu*, *fepA*) y FGB11 (*tonB*).

Para la detección de actividad antibiótica intracelular, se lisaron las estirpes siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Gaggero et al., 1993). Esencialmente, esta prueba se utilizó para determinar si un defecto de producción antibiótica correspondía a un defecto de secreción. Como control, se empleó el mutante de secreción RYC1000(pEX100::Tn5_{B54}), que porta una inserción del transposón Tn5 en *mchF*. La actividad antibiótica de los extractos se evaluó por el sistema de gota sobre tapiz de células sensibles en placas de medio mínimo. Luego de 24 horas de incubación a 37° C, aquellos extractos con actividad antibiótica generan inhibición del crecimiento. En el caso de la prueba para determinar si la MccH47 poseía actividad quelante de hierro, se utilizó agua en vez de buffer en la extracción, evitando así la interferencia de actividades quelantes inespecíficas.

3.5. Construcción de estirpes de *E. coli* K12

Se construyeron dos estirpes por transducción con el fago P1 siguiendo el protocolo descrito en Miller, 1992.

FGB102: transductante *fepA::Tn10* de MC4100 por infección con un lisado P1 propagado en H1876 (Hantke, 1990). Los clones transductantes se seleccionaron en medio LB Tc ya que el transposón *Tn10* contiene el gen de resistencia al antibiótico tetraciclina. Se corroboró el fenotipo *FepA* en un ensayo CAS, donde la estirpe obtenida originó grandes halos amarillos, característicos de un mutante *fepA*.

FGB103: transductante Tc^R *ent* de MC4100, construido en dos transducciones P1 sucesivas por las que se introdujo la delección $\Delta(ompT-fepC)267$ de UT400 en MC4100. En la primera transducción, se introdujo en UT400 un *Tn10* vecino al sistema *ent* (minuto 14.7) procedente de CAG12077 (“Genetic Stock Center”). De esta forma, se dispuso de un marcador directamente seleccionable para introducir la delección $\Delta(ompT-fepC)267$ en MC4100 por co-transducción. Es así que en la segunda transducción se propagó P1 en UT400-*Tn10* y se infectó MC4100 con el lisado, seleccionando los transductantes Tc^R . Se detectaron aquellos que eran *ent* en placa CAS -no produjeron halos amarillos- y la estructura genética buscada se identificó por complementación para la producción de enterobactina al introducir el plásmido pUY47.

3.6. Construcción de plásmidos recombinantes

A continuación se describen los plásmidos construidos en este trabajo.

pMVDS4. Porta el gen *mchS4*. Se obtuvo subclonando a partir de pEX100 el fragmento ClaI-ClaI de 659 pb del sistema *MccH47* en pACYC184.

pUYS1. Porta el gen *mchS1*. Se construyó subclonando a partir de pEX100 el fragmento PstI-BglII de 1.905 pb del sistema *MccH47* en pUC13.

pMVDS3. Porta el gen *mchS3*. Se obtuvo subclonando a partir de pEX4::*Tn5*₃₅ el fragmento SphI-SphI de 4.592 pb, compuesto por secuencias del sistema *MccH47* (852 pb) y del transposón *Tn5*, en pACYC184.

pMVD41. Porta los genes *mchE* y *mchF*. Se obtuvo subclonando a partir de pEX4::*Tn5*_{B41} el fragmento HindIII-HindIII de 9.000 pb, compuesto por secuencias del sistema *MccH47* (7.800 pb) y del transposón *Tn5*, en pACYC184.

ΔpUY270. Porta los genes *cvi* y *cvaC*. Se obtuvo a partir de pUY270 mediante la delección del segmento EcoRV de ca. 4.050 pb del sistema genético ColV que contiene los genes *cvaA* y *cvaB*.

pENT1. Porta el sistema genético *ent* entero clonado *in vivo* a partir del cromosoma de la cepa Ent⁺ MC4100. Primero, se realizó una propagación lítica del fago Mud5005 en MC4100 Mucts_{ApR} como se describió previamente (Groisman & Casadaban, 1986, Laviña et al., 1990). El lisado transductor obtenido se utilizó para infectar la estirpe *ent*⁻ UT400, previamente lisogenizada con el fago Mucts_{ApR} para impedir la inducción cigótica del fago infectante. Los clones transductantes se seleccionaron en placas de LB Km DPP incubadas a 30° C durante 48 horas. Este medio definía condiciones de privación de hierro, determinando que sólo crecieran aquellos clones que se hubieran vuelto Ent⁺, i.e. que portaran el sistema genético *ent* clonado. Se obtuvo entonces un clon transductante que albergaba un plásmido con un inserto de ca. 27 kb donde estaba contenido todo el sistema *ent*, el que se denominó pENT1.

pUY47. Porta los genes *entD*, *fepA*, *fes* y *entF*. Se construyó subclonando a partir de pENT1 el fragmento HindIII-HindIII de 10.817 pb del sistema *ent* en pBR322.

pUY46. Porta los genes *entD*, *fepA* y *fes*. Se construyó subclonando a partir de pENT1 el segmento BamHI-BamHI de 6.265 pb del sistema *ent* en pBR322.

pUY44. Porta el gen *fes*. Se obtuvo subclonando a partir de pENT1 el fragmento EcoRI-EcoRI de 2.991 pb del sistema *ent* en pUC13.

Plásmidos portadores de las fusiones génicas *cvaC-mchB*. Primero se clonaron los fragmentos de amplificación codificantes para las porciones básicas ColV y terminales MccH47 en los vectores pUCYC5 y pUC13, respectivamente. Posteriormente, estas construcciones plasmídicas se digirieron con las enzimas MfeI y PstI y los fragmentos de digestión se ligaron en las combinaciones adecuadas para obtener las cuatro fusiones génicas. En este punto se corroboró la secuencia nucleotídica de las mismas. El cambio de vector de cada fusión se realizó digiriendo el plásmido que las contenía y el vector pBR322 con las enzimas de restricción HindIII y AvaI. De esta forma, se obtuvieron los plásmidos recombinantes portadores de las fusiones génicas consignadas entre paréntesis: pFC103-11 (*cvaC*₁₀₃-*mchB*₁₁), pFC103-19 (*cvaC*₁₀₃-*mchB*₁₉), pFC90-11 (*cvaC*₉₀-*mchB*₁₁) y pFC90-19 (*cvaC*₉₀-*mchB*₁₉).

3.7. Manipulación y secuenciación del DNA

Los vectores plasmídicos, las técnicas de purificación del DNA, la transformación de células competentes de *E. coli* K12, las digestiones con enzimas de restricción, las amplificaciones de DNA por la técnica de PCR y otras manipulaciones de rutina del DNA se describen en Sambrook et al., 1989. Se utilizó el vector plasmídico pUCYC5, construido previamente en el laboratorio, que tiene una extensión de 2.906 pb. Está compuesto por una porción del vector pACYC184 (replicón p15A y gen de resistencia a cloranfenicol) y por una porción del vector pUC13 (“cassette” con el sitio de policlonado y la porción del operón *lac* que permite la detección de los clones recombinantes por complementación en α para la β -galactosidasa). La secuenciación nucleotídica del sistema MccH47 fue realizada en el Centro de Secuenciación de la Universidad de Florida, USA. La localización de algunas mutaciones y la corroboración de las fusiones génicas se llevó a cabo en el Centro Técnico de Análisis Genéticos (Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay). Los oligonucleótidos de síntesis utilizados en las reacciones de amplificación por PCR se describen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Oligonucleótidos de síntesis utilizados en las reacciones de amplificación

Nombre	Secuencia	Extensión
PV _{iz}	5' CCTCCTACCCTTCACTC 3'	17 mer
PV ₁₀₃	5' CAATTGCTAAACAAACATCACTAA 3'	24 mer
PV ₉₀	5' CAATTGCCAATCTTCCCGCAGCAT 3'	24 mer
PH _{der}	5' TAAATCATATCTTCATCAGT 3'	20 mer
PH ₁₁	5' CAATTGGTAGTGCCAGTTCTT 3'	21 mer
PH ₁₉	5' CAATTGGCTCGACCGTG 3'	17 mer

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas se utilizaron los siguientes programas computacionales: BLASTN (Altschul et al., 1997), Lalign (Huang & Miller, 1991), BLASTP 2.2.5 (Altschul et al., 1997) y Multalin (Combet et al., 2000).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del sistema genético MccH47

Previamente se habían secuenciado dos fragmentos del sistema antibiótico, uno que contenía los genes *mchX*, *mchI* y *mchB*, y otro los genes *mchE* y *mchF* (Rodríguez & Laviña, 1998; Rodríguez et al., 1999; Azpiroz et al., 2001). Se completó ahora la secuencia nucleotídica del sistema y se secuenciaron también sus regiones flanqueantes. En su totalidad, el segmento secuenciado tiene una extensión de 16.823 pb con un contenido G+C de 39,9% (Fig. 4.1). Se procedió a analizar esta información.

En primer lugar, se encontró una estructura llamativa consistente en un extenso repetido directo, de 148 pb, en las regiones flanqueantes al sistema MccH47 (Fig. 4.1). Se trata de un repetido imperfecto con una conservación de secuencia de 75,2% de acuerdo al programa Lalign. Se ha descrito que la mayoría de las islas genómicas presentan en sus extremos secuencias repetidas directas, producto de su integración en el cromosoma bacteriano (Hacker & Kaper, 2000). Por lo tanto, el repetido directo encontrado podría estar indicando los límites del sistema genético MccH47, que tendría entonces una extensión de 12.926 pb (Fig. 4.1).

La secuencia nucleotídica obtenida se analizó buscando homologías en los bancos de datos, para lo que se utilizó el programa BLASTN. Se encontraron altos niveles de similitud con secuencias genómicas de cepas de enterobacterias. En el caso del segmento que abarca el sistema genético MccH47, los mayores porcentajes de identidad se exhibieron con cepas portadoras de determinantes para las microcinas H47, M y E492: *E. coli* CA46 (AC: ECO515251), CA58 (AC: ECO515252), Nissle 1917 (AC: AJ586887) y CFT073 (AC: AE016758), y *K. pneumoniae* RYC492 (AC: AF063590) (Fig. 4.2). En cuanto a las regiones flanqueantes al sistema MccH47, se obtuvieron altos niveles de identidad con islas de patogenicidad de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 (AC: AE005174), de *E. coli* uropatógenas 536 (AC: X16664, AJ494981), CFT073 y CL3 (AC: AY275838), y de *E. coli* septicémica 4787 (AC: AY560914) (Fig. 4.2). Nótese que las secuencias del sistema MccH47 y las externas al mismo presentaron distintos perfiles de similitud, correspondientes a genomas de cepas diferentes o a segmentos diferentes de una misma cepa, i.e. no hubo continuidad significativa de similitud con las secuencias internas y externas al sistema antibiótico.

HindIII

aagcttaaggcctgagcctccgctcctggaacactccgctcggtaaaaacttaccgcattgattaatgatgtgaa
 ttcgaaattccggactcggagcgagacaccttgtgaggcagccatttttgatggcgtaactaattactacactt 1-75 pb

ctgaagtcaacggagatcattcatcctgaacctgaatccgggttctgtcccttatcttcccggttctgcttcagt
 gacttcagttgctctagtaagtaggacttggacttaggccacaagacaggggaatagaagggcaagacgaagtca 76-150 pb

tcttcaacttattccatcaatctcatccgcaagccataaacagtcagctcattcacgggcaggacgcattgtgggc
 agaagtgaataaggtagttagtaggagcgttcggtattgtgcagtcgagtaagtgcccgtcctgcgtaaacaccg 151-225 pb

tgcgcataacggaacatacttataatgtctattccttatttcgactatagcctggcacccttctggccatctta
 acgcttatgcttctgtagaatacttacgataaggaataaagctgatatcggaccgtgggaagaccggtagaat 226-300 pb

tcagaacaaagtcatcggcgtccttgagcgtgagctgagcagtcagcctcagggatcagggcggatcctgct
 agtcttgcttccagtagccgaggaactcgcacgcgacgactcgtcaggccgagtgccctatgccccttaggacga 301-375 pb

tgcctcgcctgggaacatgacaacgccttcaacagcagacagacctgggttggtaggattttatcgaaaccgt
 agcagacggcacccttgtactgttgcggaagtgtcgtctgtctggaccaaacctatacctaaaatagctttggca 376-450 pb

cagtgcgctgatgaatgcgaaaccggagcgcaccttctgctggctcctgaccgctcatccggaagaccggaata
 gtcacgcgactacttacgctttggcctcgcgtggaacgacccgagactgggcagtaggcttttcggccttat 451-525 pb

ccacgtggtgctgtgcgtcagacagagatatttcgacggccccgaactggaccggctgattctggatgcctggag
 ggtgcaccacgacagcagctgtcctcataaagctgcccgggcttgacctggccgactaagacctacggacctc 526-600 pb

caacgtactgggcttcgcgtcaccgggggaagcggcaccgtaccgaaacagataaccgggagtggtgctgga
 gttgcatgaccggaagcgcagtgggcccccttcgctggtgcatggtcttctgtctattgggcccctacaccacgact 601-675 pb

cagtcgttaccggactgcgaagacatcctcaaagattgatctggcgctcagtgatttcgcccgcgactcgtcg
 gtcagcaagtggcctgacgcttctgtaggagtcttaaacctagaccgcaagctcactaaagcgggctagcagc 676-750 pb

tgggtgctgcgactccggaagcccgttgcctcgcggtaatcccgctatcccggatctgacggaccgttctgaga
 accacacagcctaggccttcgggcaacggagcggcattaggccgtagggcctagacgtcctggaagactct 751-825 pb

atacggctcagcacttcccccgcattcgcacaacctcataaactcacagaggatattctgacctggtgacc
 tatgcccagtcggtgaaagggcgtaagcgtggtggaagtatttagagtgctcctataagactggtacaactgg 826-900 pb

tcaatgacaggccacgactcgtggttctgctgctgcgacgatcccctgatcgacatgaactacatcaccagtttc
 agtactgtccgggtgctgacgcacaacgacgcacggctgctaggggactagctgtacttgatgtagtggtcaaag 901-975 pb

accggtatgacagataaatggttttacaagctgatcagtgaggccatttcccgaaacccatcaagctgggcccgc
 tggcatactgtctatattacaaaatgctcagactagtcacttccggtaaaagggttgggtagttcgaccggcg 976-1050 pb

agcagccgctggtacaaaagtgaagtggagcagtgatgacgagcgaattgagggaatcacgaggagcagcagca
 tcgctcggcgaacctgttttcaactcactcgtcacctacgctcgtcgttaactccttagtgctcctcgtcgtcgt 1051-1125 pb

tgaacgctggtgtagtgcggctacgctggcaatgtgcaaaatgccggcgctggtattgcggaatcagccctgtc
 acttgcacaacactacggccatgacgaccttacacgtttacggccgacccataacgcctttagtcgggacag 1126-1200 pb

cctggtgctggcgacattaccgctcattttcctgctgacctctccggctcagccagcaggttgtagctcttctcct
 ggaccacgaccgctgtaattggcaagtaaaaggacgactgggagagccagtcggctcgtccaacatcgagaaagga 1201-1275 pb

gactgattcgtcattccattcacttggttataactggcattacacgggtggtgtagcgcaccttcccggtgtc
 ctgactaagcagtaaggttaagtgtaacaaatattgaccgtaattgtggccacaactacgctggaagggcacacag 1276-1350 pb

tgcacggccttaacaaaattcaacagagctcgaaggagctgattctgtgcaaaataaccgaagcgttacttttag
 acgtggccgaattgttttaagttgtctcagacttctcagcataaagacacgctttattggcttcgcaatgaaatc 1351-1425 pb

tgaagggttatccaaactttctagtcagtggttagtatttatgcaagcagtgtaagtagtaaccgcttagac
 actgcccgaatagggttatgaaaagatcagtcacaaatcataaatacgttcgctacattcatcattggcgaaatcg 1426-1500 pb

tattgacattcatgatgcctgtaattcaaatccaggtatgatctgtcatttattgggtgatactgattccgg
 ataactgtaagtactacggacaattaagtttaaagtcatactagacagtaataaccacactatgactaaggcc 1501-1575 pb

taggtggcataactgtcctgtaactcattgttcaaaaaaagaagctcctacaaactgtatcctgtatctctacc
 atccaaccgtattgacaggacattgagtaacaagtttttcttccgaggtggttgacataggacatagagatgg 1576-1650 pb

agaagataagatacttgggtatttttggcataagctcacataaaaaataattaattatgttttcttagcgata
 tcttctattctatgaaccaataaaaacagctattcagtggtatttttattataaatacaaaaagaatcgctat 1651-1725 pb

gaaaaataaacaggttaagcagaagcggacttttttaatgcaaaaacgatttcttttattggcccaccgctgta
 ctttttattgtccattcgtcttctgacctgaaaaaattacgcttttgcataagaaaaataaccgggtggcgacat 1726-1800 pb

←————— *mchA* M R K R I L F I G P P L Y
 G L L Y P L I S L A Q A F R V I G H D V V I S S A
 cggtttggtaataaccattgatttctctggctcagccttctcgtgtaaatcgacatgatgtagtaattagtagtgc
 gccaaacaatatgggtaactaaagagaccgagtcgggaaagcacattagcctgtactacatcattaatcatcacg 1801-1875 pb

NruI

G K F A N K A A E A G L V V F D A V P G L D S E A
 tggcaaatcggcgaataaagcagcagaagctggactgggtggttttgatgcagttccaggttttagattcagaggc
 accgtttaagcgcttatttcgctgctcttcgacctgaccaaaaaactacgtcaaggtccaaatctaagtctccg 1876-1950 pb

G Y R H Q E E L R K K S N I I G H F S F F S D E M
 tggatattcggcatcaggaagagttgaggaaaaaagtaataatttgggtcattttctcttttttagcggatgaaat
 acctatagcggtagtctctctcaactcctttttttcattataataaccagtaaagagaaaaaatcgctacttta 1951-2025 pb

ClaI

A D N L I D F A G K W R P D L I V Y P P L G P A G
 ggcagataaacctcattcgaatttgcaggaaaatggaggccagatttaaatagctatcccccgcttggtccggcagg
 ccgtctattggagtagctaaaacgtccttttacctccggctctaaattatcagatagggggcgaaccaggccgctcc 2026-2100 pb

EcoRI

P L V A A K Y R I P S V M L A V G F A H T S A H I
 cccattgggtgctgctaaatagaaattccttcagtgatgctggctggtgattcgcgcatacatctgccatatt
 gggtaaccaacgacgatttatcttaaggaaagtcactacgaccgacaacctaagcgcgtatgtagacgggtata 2101-2175 pb

Q M L N R S L S N A Y R R H G V S G P L C D L A W
 tcagatggttaaaccgttctttaagcaatgcttacaggcggcatggagtcagcgggtccactatgtgatttagcatg
 agtctacaatttggcaagaattcgttacgaatgtccgccgtacctcagtcgccaggtgatacactaaatcgtaac 2176-2250 pb

I D V A P P S M S I L K N A E E P V I S M R Y I P
 gattgatggtgctcccccaagtatgagcatcttataaaatgctgaagaaccgggttatctcaatgagatataattcc
 ctaactacaacgagggggtcatactcgttaagaatttttacgactcttggccaatagagttactctatataagg 2251-2325 pb

Y N G G A V K E T W W D R D S D R K R L L I S L G
 ttataacggagggtgctgtaaaaggaacatgggtggacagggattctgatcgaaaacggtttactcatcagccttgg
 aatattgctccacgacatttcttggtaaccctgtccctaagactagcttttgcaaatgagtagtccggaacc 2326-2400 pb

T V K P M V D G L E L I S W V M D S A N E V D A D
 cactgtaaaaccaatgggtgatggtctggagctgatttcatgggttatggattctgcaaatgaagtgtgatgctga
 gtgacatttgggttaccactaccagacctcgactaaagtaaccataacctaagcgtttacttcaactacgact 2401-2475 pb

I I L Q L A I N A R T G L R K L P S N V R L V D W
 tatcatttggcaacttgcaataaatgctcgtactggattacgaaaactaccatcaaatgtacgtctgggtgactg
 atagtaaaacggtgaacgttatcttagcagcatgacctaagcttttgatggtagtttacatgcagaccaactgac 2476-2550 pb

I P M G V F L N G A D G F I H H G G A G N T L T A
 gatacctatgggtgtattccttaaggagctgatggatttattcatcatggtggcgcaggttaatacctgacagc
 ctatggatacccacataaggaattacctcgactacctaataagtagtaccaaccgctccattatgggactgctg 2551-2625 pb

L Y S G I P Q I V F G E G A D R S V N A E I V A M
 gttgtatagtgggataccacagatgtgtttggcgaagggtgcagatcgctctgttaatgcagaaatggttgcgat
 caacatataccctatgggtgctaacacaaaaccgcttccacgtctagcagagacaattacgtctttaacaaacgta 2626-2700 pb

R G C G I I P D K H G L T S D L V N R L L Y D D S
 gcgtgggtgtgggattattccggacaagcatggactgaccagtgatttggtaaatgcgctgctttatgatgattc
 cgcacccacaccctaataaaggcctgttctgactgactgggtcactaaaccatttagcggacgaaataactactaag 2701-2775 pb

PstI

L R F C S D Q V A A E M A E Q P S P A E I A E V L
 actacgcttctgttcagatcaggtagccgctgaaatggctgaacaaccagtcctgcagagatcgcagaggtttt
 tgatgcgaagacaagtctagtccatcggcgactttaccgacttgttgggtcaggacgtctctagcgtctccaaaa 2776-2850 pb

M R K L K N N G K *
 gatgagaaaaataaaaaacaacgggaataattgtatagtagtctgatattatcgacgaaaaatgtcatgagta
 ctactcttttaatttttggttgcccctttttaacatatcataacgactataatagctgctttttacagtaactcat 2851-2925 pb

→ ←
 atagaatgtccttcaacttatatgatgaaggacataactaaataaatgagtagtctccggttataatggttcaga
 tatcttacaggaagtgaataatactacttctctgattgatttatttactcatacagagggaatattacaacgtct 2926-3000 pb

aagcgttatcggtagcagtagataatcgcttacacaaagttattatctgatattcttctgcaattataatttgc
 ttcgcaatagccatgctactctattagcgaatgtgtttcaataatagactatagaaggacgttaatattaaacga 3001-3075 pb

* V F N N D S I K R C N Y N A

aatgcatcaataattgctccgcccaccaggcataatcatgaccacggcatagacagtgagggttactttccaaa
 ttacgtagttatataacgagggcgggtgggtccgtatttagtactgggtggccgtatctgtcactccaatgaaagggtt 3076-3150 pb

L A D I I A G R W A Y D H G G A Y V T L N S E L
 style="text-align: center;">Tnlac 5.4 ;

cctgctgcgattaacgactgatgcaaccgctgaacatgtgagacggttgtaaccttctaagaaccgactccaagt
 ggacgacgctaaattgctgactacgttggcgactgttacactctgccaacatgggaagatttcttggctgaggttca 3151-3225 pb

G A A I L S Q H L R Q V H S V T T G E L S G V G L
 tggatatttatactcttccggaggcgtgaaagtagtctgctcacttaaccaggagatattctctcagtaaaaa
 acctataaatgtagaagcctccgacactttcatagacgagtgaaatgggtcctctatagtaagagtcatttggtt 3226-3300 pb

Q I N V D K P P A S L I Q E S V W S I D N E T F L

atcgggctgcocctgggtcagggttccaccacattgaaggtgagtggttaattgattgtaccaaatggtgtcgacgca
 tagcccgacgggaccagtcoccaaggtgggtgaactccactcaccgattactaacaatgggtttacaa**gagctcgg** 3301-3375 pb
 I P S G Q D P N W W M S P S H S I I T G F T T S A

tatatagctgccatcagtgctgtcactccaccgaggtctgaccggccagtatagtattagaacgaccagcccat
 atatatcgacggtagtcacgacagtgaggtggctccgagactggcgggtcattatcataatcttggctggctcgggta 3376-3450 pb
 Y I A A M L A T V G G L S Q G A L I T N S R G A W

acgatattcgggtagctctctgtataactggggatcagattttccgctatatcaaagataagttctttattgctt
 tgctataagcccatcagagacatatgaccccatagctctaaaaggcagatagtttctattcaagaaataacgga 3451-3525 pb
 V I N P Y D R Y L Q P I L N E A I D F I L E K N G

cccagtatattcatacagatcagattcattaatattgtctatcccataaattgccattggcgcaatatgaccagtg
 gggctatataagtagtctagctctaagtaattataacagataggggtattaacggtaaccgcttatactggctcac 3526-3600 pb
 G L I N M R D S E N I N D I G M I A M P A I H G T

gtaatggccatatctaatg**cccggt**taatatccatccggtaaacacatatttcagcatcaggtaacacaagtaat
 cattaaccggtatagattac**ggccc**attataggtagggcatttgggtataaagctcgtagctcattgtgttcatta 3601-3675 pb
 T I A M D L A R T I D M R D F W I E A D P L V L L

ccaagaggtactgatgttgattctgggaaaataaaacgaatccggcgttgatatcctgcaacaaggaatgt
 ggttctccatgactacaac**taagcccttttata**tttggcttaggcgcaactataggacgttgtttccttaca 3676-3750 pb
 G L P V S T P N Q P F Y L R I R R Q Y G A V F S H

aatgttgaagaatacctgtacatttatgggaagatcatcccattccttttggctcaggagccatatcaagagaa
 ttacaactttccttaggacatgtaaatacccttcataggtagggtaaagaaacaagctcctcgggtatagttcctt 3751-3825 pb
 L T S L I G T C K H S T D D W E K Q E P A M D L S

aggactgattctccgaatcctcgtatatttatcttctgctgttttggtaaatggatcagattaccgggtaattgga
 tcctgactaagaggcttaggagcatataaaataaagacagcaaaaacaatttaactagctctaaatggccattact 3826-3900 pb
 L V S E G F G R I N I E A T K N F P D S K G P L P

gagaagcgacttctagttgaaatagtctttttgtgcatatctgtgggaatttctataaatgagtatgagccc
 ctctcgcgtaaggatcaactttatcacagaaaaacacagtatagacacccttaagatatttactcatactcggg 3901-3975 pb
 S F R S G L Q F I D K Q T M D T P I E I F S Y S G

cgatatgaagctggttaacaccagtgctcagcatccagatattctgtcgaaggatagtgctcattagctcctttttg
 gctatactcgaccattgtggctcacagctgtaggtctatagacgctccctataactcagtaatacaggaaaaaac 3976-4050 pb
 R Y S A P L V L T L M W I D T S P I H T M L G K K

acatcctttttatctgtaacacgattcaggcgaagatatacgccttgcactgctttctctgagcgcacagaaat
 tgtagaaaaatagacattgtgctaagtcgccttctatgcggaagctgacgaaagagactcgcgggtgtcttta 4051-4125 pb
 V D K K D T V R N L R L Y V G Q V A K E S R W L F

gtaacctcccgattttctgtagtggtgctttttgtgatcaccggaaagattgctgactcaagatagtgccagaaa
 catgggagggctaaaagacatcaccacgaaaaaacactagtgcccttctcaacgactgagttctatcacgggtcttt 4126-4200 pb
 T V E R N E T T T S K T I V P L T A S E L Y H W F

ttagcaatatctgtgttcttattgtgacaggatgtgctcatttttttaactgtacacaaatatcttcgggagtc
 aatcgttatagacaacaagaataaacactgtcctacacagtaaaaaaattgacatgtgtttatagaagccctcag 4201-4275 pb
 N A I D T T R I T V P H T M K K L Q V C I D E P T

tggaaaagatagttttcataggtatcatcttaaatatccaagtgaagaataatacatcaaatgacgttcoat
 accttttctatcaaaaagta**tccatagtagaa**tttaattaggttcacattcttattatgtagtttactgcaagta 4276-4350 pb
 Q F L Y N K M *mchS1*

tcaaggggtgatgagtgactttccggaattaaatctgttgattgatgataaaatataaacagggttaataaaat
 agttccccactactcactgaaaggccttaatttagacaacataactactatttatattttgtccaaattatttta 4351-4425 pb

ttttgtttatactgtagatttcacgtatgtaagtaatatatgaaaaggctctcgttaagatgtctgggtacaaa
 aaaacgaaatgatgacatctaaagtgacatactcattataacttttccgagagcaattctacagaccatgtttt 4426-4500 pb

tgtcagatcatatgcctttgtaaagagacgacagaagtagagtttacaggccacatcataaataccctccggcat
 acagctctagtatacggaaacattttctctgtgcttccatctcagaatgtccggtgtagtatttatgggaggccgta 4501-4575 pb

agccggatgggtatttttaactgcccgtgtttgactggatgtggaactactcactataagaaggtccactt
 tcggcctaccataaata**aattgacggcgcaaaacgtgacctacaccttgatgagtagatattcttcagggtgaa** 4576-4650 pb
 * S G S N A S S T S S S M S Y S P G S

cccccggatatacagatgatggatggagtaccggagccagc**atgct**ccattagcatcaatatatgttcccata
 gggggcctatgtaactactacctc**ataggcctcgggtcgtacgaggt**aatcgtagttatatacaaggggat 4651-4725 pb
 G G P Y M I I S P T D P A W C A G N A D I Y T G M

BglIII
 tcttttccacgtagatctattacattagtagaagcaggtaatccattaagattcatccctcctttccaggaatca
 agaaaagggtgcattctagataaatgtaaatcatctctcgtccatctaggttaattctaaagtaggaggaaaagtgccttagt 4726-4800 pb
 D K G R L D I V N T S A P L G N L N M G G K V S D

agcatggtatctgatatttctctcatttttaaaacctcctgctcatttatgttcagatattaatttgggtgttga
 tcgtacaatagactataaagagagtaaaattttggaggacgagttaatacaagctataaattaaaccacaacgt 4801-4875 pb
 L M N D S I E R M *mchS2* * K H E S I L K T N C
 EcoRI

accatttattatcacagaattcagaatatcattcagttttattttggtaaaatatccctcttaagacagacac
 tggtaaaataatagtgcttaagcttatagtaagtcaaaaataaaacaattttataggggagaattctgtctgtg 4876-4950 pb
 G N I I V S N L I D N L K I K T L I D G R L V S V

atattctgtttatcattttcattaacaatgactctatattttctacgtttaaataatagcccacaagcagc
 tataagaacaatagtaaaagtaatttggtaactgagatataaaagatgcaaatatttataatcgggtgttctg 4951-5025 pb
 Y E Q K D N E N F L S E I N E V N L Y Y L G C A A

ataaattttagactccttagttgactttctattttttattatatttttaaatatctcttcgggattatctaagt
 tatttaaaatctgaggaatcaactgaaagataaaaaataataaaaaatttatagagaagcctaataagattaca 5026-5100 pb
 Y I K S E K T S K R N K I I N K F I E E P N D L T

aagaatggtgtgtatataattttccctcctgctctgatagcctataaaaccattcacaacctatagaaaaataggt
 ttcttacacacacatataaaaagggaagcgagactatcgatatttgggtaagatggatctcttttatcca 5101-5175 pb
 L I H T Y L K E G E S Q Y G I F G N M G I S F Y T
 Tn5 1

tgttttttctaacgattggtgaagggagggtggatctgatgaaaatgagcagatggtaatataaacatcact
 acaaaaaagattgcttaacaacttccctccactagactactttttagctgctaccattatattttagtagtata 5176-5250 pb
 T K E L S Q Q L P P P D S S F A A S P L I F M M S
 ClaI

tattataatctttttcgttaagatacactttccctttggttttccatcgataaatattcagataaacaatata
 ataattattagaaaaagcattctatgtagaaaggggaaccaaaggtagctattataagtctatttgttatat 5251-5325 pb
 I I I K K T L Y M *mchS3*
 ClaI

tgttttttctgttaatggtcatatcgatggattgataactggaatattcagcataaatacaacaggctgtgac
 acaaaaaagaacaattacaagtagtaacctactattgacctataagtcgtattattagttgtccgaacatg 5326-5400 pb

ctgatcaggtatcagtttgcaaatatggtttataggtcatgaccgcaaccaggacacataaatttcaccacaac
 gactagtcctatagtcacaacgtttatacaaaacaatatccagtaactggcgttggctcctgtgtattaaagtgggtgtg 5401-5475 pb
 * L D H G C G P C M I E G C G

cacaaatataatcggcatcatagtcattgttactataccggaagccgacttattatttgtgatacagtggtct
 gtgtttatattagcgttagtatcagtaacacaatgatatggccttcggctggaataaataaacactatgtcacacaga 5476-5550 pb
 C I Y D A D Y D H T V I G S A S K N N T I C H T E
 Tn5 35

ccagctctacggaggattctacctctatagaaaattatcgtgttttctgcttgaattgtcttggctgtgtgctt
 ggtcgagatgctcctaagatggagatattccttttaataagcacaagaagcagaacttaacagaacgaacaacggaa 5551-5625 pb
 L E V S S E V E I P F N D H K R R S N D Q K N G K
 EcoRI

tatcaaggtacaatgaattcttctattctgtgattattatcacaattcattcttatgctcctcactatttccc
 atagtttccattgttacttaagaagtaaaagacactaataatagtgtaagtagaatacggaggagtgtaaaggg 5626-5700 pb
 D F T V I F E E N R H N N D C N M *mchS4*

gatgtatgaccgtcagtgctatttagtgtagcttcaagtctcaggttatcatgagcgaacatgagatcctgga
 ctacatactggcagtcacgataatcacatgcaagttcagagtcacaatattgactcgtgttggtactctaggact 5701-5775 pb

ctaacaattgcatcagttacataacgtaaaatctcttacttttatatggacaatagacactttttttgaaaa
 gatgttaacgtagtcaatgtattgcattttatggagaactgaaatatacctggtatactgtgaaaaaaactttt 5776-5850 pb

gtaaataacaatcattctcttttctgtctgtggtgaggtctggtaagatggaatttgctacaaacaggggtta
 catttattgtagtaagagaaaacagaaacagaccactccagaccattctacctaaacgatggttgcctcaat 5851-5925 pb
 T V N D S R S A L S S T L L L S L I M S A T L L E
 Tnlac 3.2;
 ctgtaaatgacagtcggcagcactgtcatcaactttgctgttctttgatcatgagcgcactctactggaat
 gacatttactgtcagccagtcgtgacagtagttgaaacgacaacagaaactagtagtactcgcggtgagatgacctta 5926-6000 pb
 Y S L S M T *
 attctttatcgatgacctgaactccctgactgaagcgtcaagatttggtaacttttcataatgaaaaataagcaa
 taagaaaatagctactggactgaggggactgacttcgagattctaaaccattgaaaagtattacttttatttctgt 6001-6075 pb
 MfeI

caggtaggtattaatgagttataaaaaactgtaccattgacggctatatttagtttacctcttactatcttatt
 gtccatccataaataactcaatatttttgacatggttaactgcccataataatcaaatggagaatgatagaataa 6076-6150 pb
 V S L S S L R I V G E G N S Y V D V F L S F I I F
 EcoRI HindIII

ggtttccactttcatccctcggattgttggcgaagggaaattcttatgttgacgtttttctaaagctttataatatt
 ccaagtgaaagtagggaagcctaacaaccgcttcccttaagaatacaactgcaaaaagattcgaaatattataa 6151-6225 pb

Y I G K Y M F D P D F T L A A R L K V E E I F Q K
 atatcggaaaatatatggttgaccctgacttcactcttgcagccggttgagggtgaggagatatattcagaaaa
 tatagccttttatatacaaaactgggactgaagtgagaacgtcgggcaaaactccaactcctctataaagtctttt 7726-7800 pb

T F H E A C Y Y C Y L E L L G I P G E F I T Q K E
 cttttcatgaagcatggttattactgttatctagaactgttgggtattcctgggagaatttataacacaaaaagaga
 gaaaagtactctgtacaataatgacaatagatccttgacaaccataaggacctcttaaatattggtgtttttctct 7801-7875 pb

I P D I L K Q L V N S F V A L L N K Y C E K S H A
 tacctgatataattgaaacaactgggttaacagttttgttgcattactcaataaaactgcgagaaaatcacatgccc
 atggactatataactttgttgaccaattgtcaaaaacagtaatgagttatttatgacgctcttttagtgtacggg 7876-7950 pb

Q D I V N Q D G S P L Q K L V V T L I H H R H N Q
 aagatattgtcaatcaggatgggtcaccattgcaaaagttgggttgacgctaataccatcataggcataatcaaa
 ttctataacagtttagtctaccaagtggtaacggtttcaaccaactgcgattaggtagtagtaccgtattagttt 7951-8025 pb

K Q A L N S S I K N D V Y F T V A Q Q C F S Q T I
 agcaggcaactgaatagtagcatcaagaatgatgtttatttaccggttgcaaacagtggtttttccagacatacc
 tcgtccgtgacttatcatcgtagttcttactacaataaagtggcaacggtgtgtgcacaaaagggtctgatagg 8026-8100 pb

H W L T Q G S T R R Q I N A S L L L K E I E H H T
 actggctgacgcaaggcagttaccagacgtcagataaatgttcttactcctgaaagaaattgaacatcatacca
 tgaccgactgcggtccgtcatggctgcagtcctatttacgaagtaatgaggacttttcttaacttgtagtagtgg 8101-8175 pb

M K R L Q P R E E L R K E N M C E K I A I L L D N
 tgaagggtgcaaccagggaagagctgaggaaagagaatattgctgcaaaaaattgccatcctgctggataatc
 acttttccgacgttgggtcccttctcgactcctttctctatacacgcttttttaacggtaggacgacctattag 8176-8250 pb

H G D D P L F L Q E A I S D M K N F M L K F S R D
 atggcgtgatcccccttttttacaagaagcaatttctgatatgaaaaattttatgcttaagttttccagagatg
 taccgctactaggggaaaaaatgttcttctgtaaaagactatacttttaaaatacgaattcaaaaggctctctac 8251-8325 pb

A F G Y L E P I R N T V * → *mchD* M S Y I
 ctttggatattcctgaaccgataaagaacacagtgtaataaaatatataagggaaatagtaatc atgtcttatata
 gtaaacctatagaacttggctatttcttctgtgtcacattatttatatattccctttatcattagtagacagatatat 8326-8400 pb

R E T I R G K D E W T V Y E Q I G F A V S C M L Y
 agggaaaccatcagaggaaaagatgaatggactgtttatgaacagataggttttgcgggtcagttgtatgctctac
 tcctttggtagtctccttttctacttacctgacaataacttgtctatccaaaacgccagtcacatacagagatg 8401-8475 pb

N R N Y S L Y P V L T I Q Y W T E Y A I Q H N Q I
 aatcgtaattacagctctgtatccggtgttaaccattcaataactggactgaatatgagatacagcataatcagatt
 ttagcattaatgtcagacataggccacaattggtaagttatgacctgacttatacgctatgtcgtattagtagttaa 8476-8550 pb

K F L F D S R G F P L A Y I T W A Y L E A D T E A
 aaattcctgtttgattcacagggttttccactggcgtatataacctgggcatatcttgaggctgatcgggaagcg
 ttaaggacaacactaagtgtccaaaaggtgaccgcatatattggaccgctatagaactccgactatgctcttcgc 8551-8625 pb

R L L R D P E F R L H P S E W N E D G R I W I L D
 cgctgctcagggatccagaattcagggttgcctcgtctgaatggaatgaagatggaaggatctggatcctggat
 gggacgagctccttaggtccttaagtcacaacgtaggcagacttaccttacttctaccttctagaccttaggaccta 8626-8700 pb

F C C K P G F G R K V I D Y L I Q L Q P W G E G E
 ttctgttgtaaacaggcttttggcgaaaaagttattgactatctcatacagcttcagccatggggggaaggagaa
 aagacaacatttggctccgaaccagcttttcaataactgatagagtagtgcgaagtcggtaccccccttctctt 8701-8775 pb

V R W L S R R K K I V T Y I P E R L H K T *
 gtacgatggttaagcaggcgaagaaaattgtgacatacatccctgagcggctgcataaaaacgtagtacctctga
 catgctaccaattcgtccgctttcttttaacactgtatgtagggactcggcagctattttgcatcatggagact 8776-8850 pb

agatacagagataattgtaaattacggggtaaatgcatcgtctgatactattttgacaggactctgtattttctgg
 tctatgtctctattaacatttaatgccccatttacgtagcagactatgataaaactgtcctgagacataaaagacc 8851-8925 pb

mchE M F
 ctttgattatagcgtttcgggttaatcagtgagggtattacaggaaaagtgtagtaagaggagctattttgttttc
 gaaactaatatcgcaagccaattagtcacttccataatgtccttttcacactcatttctcctcgataaaaacaag 8926-9000 pb

R Q D A L E N R K M K W Q G R A I L L P G I P L W
 gtcaggatgcttttagaaaacagaaaaatgaagtggcagggagcgggcaatattacttcccggaaataccactatggt
 cagtcctacgaaatcctttgtcttttacttcaccgctccctgcccgttataatgaagggccttatggtgatacca 9001-9075 pb

L I M L G S I V F I T A F L M F I I V G T Y S R R
 taatcatgctgggaagcattgtgtttattacggcatttctgatgttcattattgttgggtacctatagccgctgg
 attagtagcaccctcgtaacacaaaataatgcccgtaaagactacaagtaataacaacatggatcggcggccac 9076-9150 pb

V N V S G E V T T W P R A V N I Y S G V Q G F V V
 ttaatgtcagtggtgaggtcacaacctggccaagagctgtcaatatatattcaggtgtacagggatttggttgtca
 aattacagtcaccactccagtggtggaccggttctcgacagttatatataagtcacatgtccctaaacaacagt 9151-9225 pb
 BamHI

R Q F V H E G Q L I K K G D P V Y L I D I S K S T
 ggcaatttgttcatgaagggcagttgataaaaaaggggatcctgtttatctgattgacatcagtaaaagtagac
 ccgtaaacaagtaacttcccgtcaactatTTTTTCCCTAGGacaaatagactaactgtagtcattttcatgtg 9226-9300 pb

R S G I V T D N H R R D I E N Q L V R V D N I I S
 gtagtgggtattgtcactgataatcatcggcgggatataaaaaatcagctgggtcgtgtggacaacattatTTCC
 catcaccataaacagtgactattagtagccgcccataatcttttagtcgaccaagcacacactggttgaataaaagg 9301-9375 pb

R L E E S K K I T L D T L E K Q R L Q Y T D A F R
 gtctggaagaaagtaaaaaataacggttagataacctggaaaaacaacgtctgcaatacacagatgCGTTTcgtc
 cagaccttctttcatTTTTTattgcaatctatgggacctTTTTgtgagacggttatgtgtctacgcaaagcag 9376-9450 pb

R S S D I I Q R A E E G I K I M K N N M E N Y R N
 gctcatcagatattatacagcgtgcagaggaagggataaaaaataatgaaaaacaatatggagaattacagaaact
 cgagtagtctataatagtcgcacgtctccttccctatTTTTtattactTTTTgttataacctcttaatgtcTTTga 9451-9525 pb

Y Q A K G L I N K D Q L T N Q V A L Y Y Q Q Q N N
 atcaggcaaaagggctgattaataaagatcagttaactaaccaggtggcattatattatcagcaaaaaacaatc
 tagtcogtttcccgaactaattatttctagtcgaatgattggccaccgtaataataatagtcggttggTTTTgttag 9526-9600 pb
 PstI

L L S L S G Q N E Q N A L Q I T T L E S Q I Q T Q
 ttctcagcctgagcggacagaacgacaagaatgCCCTgcagataaccactctggagagtcagattcagactcagg
 aagagtcggaactcgctgtctgtgtcttacgggacgtctattggtgagacctctcagtcctaagtcctgagtc 9601-9675 pb
 PstI

A A D F D N R I Y Q M E L Q R Y E L Q K E L V N T
 ctgcagattttgataacctatctaccagatggaaactgcaacggtagcagttacagaaagaactggttaacactg
 gacgtctaaaactattggcatagatggtctaccttgacgttgccatgctcaatgtctttcttgaccaattgtgac 9676-9750 pb

D V E G E I I I R A L T D G K V D S L S V T V G Q
 atgtggagggcgaattattatccgggCGTTgactgacgggaaagttagctccctgagtgctcactgtcgggcaaa
 tacacctccgctttaataataggccgcaactgactgcctttcaactgagggactcacagtgacagcccgttt 9751-9825 pb
 PstI

M V N T G D S L L Q V I P E N I E N Y Y L I L W V
 tggccaataccgggagacagccttctgcaggttatctctgagaacattgaaaactattatcttattctctgggtcc
 accagttatggcctctgtcggaagcgtccaataaggactcttgtaacttttgataatagaataagagaccagg
 Tnlac 7.1

P N D A V P Y I S A G D K V N I R Y E A F P A E K
 caaatgatgctgttcttataatttCGGCTGGTgacaaagtgaatatctggttatgaagccttccggcagaaaaat
 gttactacgacaaggaataaaagccgaccactgtttcacttataagcaataacttcggaagggcctcttttta 9901-9975 pb

F G Q F S A T V K T I S R T P A S T Q E M L T Y K
 ttgggcagttctctgctacgggttaaaactatattccaggactcctgctgcaacacagggaaattgtgacctataagg
 aaccgctcaagagacgatgccaattttgatataggtcctgaggacgcagttgtgtcctttacaactggatattcc 9976-10050 pb

G A P Q N T P G A S V P W Y K V I A M P E K Q I I
 gtgcaaccacagaatacggccggcgctctgttccctggatataaagtcatgctgctgctgaaaagcagattatca
 cacgtggtgtcttatgggcccgcgagacaagggaccatatttcagtaacgctacggacttttctgctcaatagt 10051-10125 pb

R Y D E K Y L P L E N G M K A E S T L F L E K R R
 gatatgacgaaaaatacctccctctggaaaatggaatgaaagccgaaagtacactatttctggaaaaaggCGTA
 ctatactgctttttatggagggagaccttttaccttactttcggctttcatgtgataaagaccttttttccgcat 10126-10200 pb

mchF M T N G S

I Y Q W M L S P F Y D M K H S A T G P L N D *
 tttaccagtggtgcttttctcctttctatgacatgaaacacagtgcaacaggaccgctcaatgactaacgggagt
 aaatggtcacctacgaaagaggaagatactgtactttgtgtcacggtgtcctggcgagttactgattgcccctca 10201-10275 pb

F R Q I I N Q L D M R W R R R V P V I H Q T E T A
 ttcagacaaattataaatcagcttgatgctgctggcagcgtcgtgttccggttattcatcagacggagaccgct
 aagtctgtttaatatattagtcgaactatacgcgacgctgcagcacaaggccaataagtagtctgctctgcccga 10276-10350 pb

E C G L A C L A M I C G H F G K N I D L I S L R R
 gaatgtggactggcctgctggcaatgatagcggatcattttggtaagaatattgacctgatctcttctgcccgg
 cttacacctgaccggacggaccgttactatacgcagtaaaaccattcttataactggactatagagaagcggcc 10351-10425 pb

K F N L S A R G A N L A G I N G I A E Q L G M V T
 aagtttaatctctcggcccggtggagcaaaccttgcaaggaatcaatggaatagcggagcagctggggatgggtca
 ttcaaattagagagccgggcaacctcgttttggaaactccttagttaccttatacgcctcgtcgaaccctaccagtg 10426-10500 pb
 XmaI

R A L S L E L D E L G A L K M P C I L H W D F S H
 gggcctctttcactggagctggatgaacttgggtgcccctcaaaatgccgtgtattctccactgggatttcagtcac
 gcccgagaaagtgacctcgacctacttgaaccacgggagttttacggcacataaagaggtgacctaaagtcagtg 10501-10575 pb
 SmaI

F V V L V S V K R N R Y V L H D P A R G R R Y L G
tttgtcgtgctgggtcagcgtaaagcgtaaccggttatgtaactgcatgatccggccagagggcagaagatatctcgggt
 aaacagcagcaccagtcgcatcttcgattggcaatacatgacgtactaggccggctccgtctcttctatagagcca 10576-10650 pb
EcoRI

R E E M S R Y F T G I A L E V W P G S E F L A E T
cgggaggaaatgagccgggtatcttaccggcattgcaacttgaggtctggcctggaaagtgaattcctggcgaaacc
 gccctccttactcggccataaaaatgcccgtaacgtgaactccagaccggaccttcaacttaaggaccgcctttgg 10651-10725 pb

Q Q I R I S L R S L I N S I Y G I K R T L A K I F
cagcagatccgcataagctcctcgttcaactgattaacagtatcttaccggtattaaaagaacactggcgaaaaatcttc
 gtcgtctaggcgtattcagaggcaagtgaactaattgtcataaatgccataatcttcttctgtgaccgcttttaaaag 10726-10800 pb

C L S V V I E A I N L V M P V G T Q L V M D H A I
tgtctgtcagttgtaattgaagcaatcaatctggtaatgccgggtggggactcagctgggttatggatcatgcgatt
 acagacagtcacaatcaactctgtagtttagaccattacggccaccctgagtcgaccaatacctagtagcgttaa 10801-10875 pb

P A G D R G L L T L I S A G L M F F I L L R A A V
ccggcgggggacagagggtcgtgacgcttatcttctgctggcctgatggtctcttataattgctcagggccgcgggtg
 ggccgcccctgtctcccagcactgccaataaagacgaccggactacaagaatataacagagtcggcgccacc 10876-10950 pb

S M L R A W S S L V M S T L I N I Q W Q S G L F N
agtatgctcgtgcatggtcctcactggttatgagcacgctcatcaatatacagtgccagtcgggtctggtttaac
 tcatacagcagcagtcaccagagtgaccaatactcgtgagtagttatgtcaccgtcagcccagacaaaattg 10951-11025 pb

H L L R L P L A F F E R R K L G D I Q S R F G S L
catcttctcagactgccgctggcgttttttgaacgccgtaaaatagggtgatatccagtcgcggttttggctccctt
 gtagaagagtcgacggcgaccgcaaaaaacttgccgcatctaactataggtcagcgcaaaaaccgaggaa 11026-11100 pb

D T L R A T F T T C V V G A I M D S I M V V G V F
gacactttgagggccacctttaccacctgtgtggttggggcaatcatggacagtatattatggttgtgggggttttt
 ctgtgaaactcccgtggaatggtggacacaccaaccctgtagtacctgtcataataccaacacccccaaaaa 11101-11175 pb

V M M L L Y G G Y L T W I V L G F T M V Y V L I R
gtgatgatgctgttatatggaggatattctacctggatagtgctcgggtttaccatgggttacggtcttattctgt
 cactactacgacaatatactcctatagaatggacctatcacgagccaaaatggtaacaaatgcaagaataagca 11176-11250 pb
XmaI

L V T Y G Y Y R Q I S E E T L V R G A R A S S Y F
ctggtgacatacggctattaccggcaaatatcggaagaaactcttgtcaggggggcccgggcccagctcctatctt
 gaccactgtatgccgataatggcgtttatagcctcttctgagaacagtcccccggggccggtcgaggataaaa 11251-11325 pb
SmaI

BamHI
 M E S L Y G I A T V K I Q G M A G I R G T H W L N
atggaaagcctgtatggtatgcccacggtaaaaaatccaaggtatggctgggatccggggaacacactggcttaac
 tactttcggaataaccataaccatgcccatttttaggttccataccgaccctaggcccttgtgtgaccgaattg 11326-11400 pb

L K I D A I N S G I K L T K M D L L F G G I N T F
ctgaaaatagatgcgatcaattcaggtattaagttaaccaagatggatttgctctcggggggataaatactttt
 gacttttctcagctagtttaagtcataattcaattgggtctacctaaccgagaagccccctattttatgaaaa 11401-11475 pb
ClaI

V A A C D Q V A I L W L G A S L V I D N Q M T I G
ggttggcctgtgatcaggtggcgattttatggctgggtgcaagccttgtgatcgataatcagatgacaataggg
 caacggcgacactagtcaccgctaaaaataccgaccacggttcggaacactagctattagtctactggtatccc 11476-11550 pb

M F V A F G S F R G Q F S D R V A S L T S F L L Q
atgtttgtggcatttgggtctttctcgtgggcagttttcggatcgggttgcttcgctgaccagttttcttcttcaa
 tacaaaacacgtaaaccaagaaaagcaccgctcaaaagcctagcccaacgaagcagctggtcaaaaagaagaagt 11551-11625 pb

L R I M S L H N E R I A D I A L H E K E E K K P E
ctgagaataatgagctcgcataatgagcgcattgcagatattgcactacatgaaaaggaagaaaagaaaccggaa
 gactcttattactcagacgtattactcgcgtaacgtctataacgtgatgtacttttcttcttttcttggcctt 11626-11700 pb

I E I V A D M S P V S L E T T D L S Y R Y D S Q S
attgaaatcggtgctgacatgagccgggtttcactggaaaccactgatttaagctaccgggtatgacagccagtc
 taactttagcaacgactgtactcgggcaaaagtgacctttgggtgactaaattcgatggccatactgtcggtcagt 11701-11775 pb

A Q V F S G L N L S V A P G E S V A I T G A S G A
gcacaggtattcagtggtctgaatttctctgtggctccgggagaaagtgtggctataaactgggtgctccgggtgc
 cgtgtccataagtcaccagacttaaacagacaccgaggccctcttccacaccgatattgaccacggaggccaccg 11776-11850 pb

G K T T L M K V L C G L F E P D S G K V L V N G T
ggaaaaaccacatfaatgaaggtattatgtggactggttgaaccagatagtggaaggtactggttaattggcagc
 cctttttgggtgtaattactttcataataacacctgacaaactgggtctatcacctttctcatgaccaattaccgtgc 11851-11925 pb

D I R Q L G I N N Y H R M I A C V M Q D D R L F S
gatatacgtcaacttggaaataaataattatcaccggtatgatagcctgtgttatgcaggacgaccggctatcttca
 ctatagcagttgaaaccttatttataatagtgacatactatcggacacaatacgtcctgctggccgataaaaagt 11926-12000 pb

G S I R E N I C G F A E E T D D E W M T E C A R A
 ggatcaattcgtgaaaatatctgtgggttgcagaagaaacagacgacgaatggatgacagaatgtgccagagca
 cctagttaagcacttttatagacacccaaacgctctcttctgtctgctgtctacactactgtcttacacgggtctcgt 12001-12075 pb

S H I H D V I M K M P M G Y E T L I G E L G E G L
 agtcatattcatgatgtgataatgaaaatgccaatggggatgaaaacggttaataggtgaaactgggggaaggctctt
 tcagtataagtactacactattacttttacggttaccocatactttgcaattatccacttgacccocctccagaa 12076-12150 pb

S G G Q K Q R I F I A R A L Y R K P G I L F M D E
 tccggcgggtcaaaaaacagcgtatattcattgcccagcgtttataccggaaaacctggaatattattttatggatgag
 aggcgcagcgtttttgtcgatataagtaacgggctcgaaaataggcctttggaccttataataaacactactc 12151-12225 pb

A T S S L D T E S E R F V N A A I K K M N I T R V
 gctacaagttctcttgatacagaaaagtgaacggttctgtgaatgctgccataaaaaaaaaatgaatatcaacggcgtg
 cgatgttcaagagaactatgtctttcacttgcaaacgacttacgacggatatttttttacttatagtgggcccac 12226-12300 pb
XmaI
SmaI

I I A H R E T T L R T V D R I I S I *
 attatgacacagaaaactacggttgagaactggtgacaggattatttctatttaa
 aatccactgggtgtaactt
 taataacgtgtgtctctttgatgcaactcttgacaactgtcctaataaagataaatttttagtgaccacattgaa 12301-12375 pb

mcmI' M G E V K K D I K I T V I A F V I N Y
 tgtaaggagtttttgtcgtatgggggagggttaagaaggatataaaaaaacagtgattgcttttggtatcaattatc
 acattcctcaaacagcgtaccccctccaattcttctctatatttttattgtcactaacgaaacaatagttaatag 12376-12450 pb

L F F Y I P V S L Y L S Y Y Y R Y N F F N L Y M F
 tgttcttttatattccgggtgtcattatattcttagttattactatagatataaattttttaaactatataatgttt
 acaagaaaatataaggccacagtaatatagaatcaataatgatattctatataaaaaaattagatatatacaaaa 12451-12525 pb

F Y H L *
 tttatcacttgtagttacatttttatcgttgggttaaactggaatttttacttcttcacaaattttatagcgaa
 aaatagtgaaacatcaatgtaaaaatagcaacccaatttgcacttaaaaaatgaagaagtgtttaaataatcgtt 12526-12600 pb

mcmA' M R K L S E N E I K Q I S G G D G N D G Q A
 ggtgtgaaatgagaaaaactatctgaaaatgaaataaaaaaaaatctggagggtgacggggaatgacggggcaggca
 ccacaactttactcttttgatagacttttactttattttgtttatagacctccactgcccctactgcccgtccgt 12601-12675 pb
XmaI

E L I A I G S L A G T F I S P G F G S I A G A Y I
 gaattaattgctattgggtcacttgaggtacggtttattagccgggatttgggtctattgacggggcttatata
 ctttaataacgataaccaagtgaacgtccatgcaataatcgggcccctaaaccaagataacgtcccgaatatat 12676-12750 pb
SmaI

G D K V H S W A T T A T V S P S M S P S G I G L S
 ggtgataaagtacattcatgggcaacgactgacgagcgggttagtccctccatgtctccctcagggtataggattatca
 ccatttcatgtaagtaccggtgtgtgacgctgccaatcagggaggtacagagggagtccatattcctaattagtt
 S * BamHI
 tcctagtttggatccggcagatgtacatcaagtgtctctctgtctgcccgggagtggaaattaaaccttatattgt
 aggatcaaacctaggccgtctacatgtagttcacgaagaagcagacgcccctcacctttaaatttggaaatataaca 12751-12825 pb

taatgatgcctatgtaattggtttaagtttaggtcctccgaacggtttatcattttatgcataccgcatagtaacaa
 attactacggatacattaccaaatcaatccgaggaggcttgcaaatagtaaaatacgtatggcgtatcattggt 12826-12900 pb

tgctagtcggtttaattttatcatatgagattgtaacagaaaatgctctgttaatgggaataactgatataagc
 acgatcaggcaaatataaaatagttactctaaccattgtcttttacgagacaattacccttattgactatattcg 12901-12975 pb

tagatattgtattcctgctatgactgcattcatcgccatgtaagtaatatgggcattaacagaccattcgaact
 atctataacataaggacgatactgacgtaagtacgggtacacttcattataaccgtaattgtctggttaagctgaa 13051-13125 pb

tatttgtgcgctaataagaactaacgatactaaaaagagcataaaaaatgtacgaaagtcaagtatattgtagatg
 ataaacacgcgattattcttgattgctatgatttttctcgtatttttacatgctttcagtcataataacatctac 13126-13200 pb

caatgcagagaatatgactgatgttacaatagcagagatgtaaatattgtcattaaccagaattataaagaatt
 gttacgtctcttatactgactacaatgttatcgtctctacatttataacagtaatttgggtcttaataatttcttaa 13201-13275 pb

aaaaaacaccctcgaaatacaatctcttcatatacaggaacatagaagtacagaagaacataaaatggcctcag
 tttttgtgggagctttatggttagagaagtatgtccttgatcttctcatgtctctctttgtattttaccggagtc 13276-13350 pb
*

aaaaagatatttgcgagatcatccattcttccggtttcctcactgcccagcagataagggcaaaaactgaataa
 tttttctataaacgctctagtaggtaagaaggcaaaaggagtgacgggtcgtctattccctggtttattgacttatt 13351-13425 pb

F F I N A L D D M R G N E E S S G A S L P C I V S Y
 tcattatataagagaaaagagtaaaaaacatccgggtcgaaaagaacctcttccataatccttctcttttccggaag
 agtaataatttctcttttctcattttttgtaggccagcttttcttggagaaggattaggaagagaaaaagccttc 13426-13500 pb

D N N F L F S Y F V D P R F S G R G L G E R K R F
 aaaataaaatacagtggaacaagaattagaattcagcaagaataatgctggaacaagaagtccocctggatata
 ttttattttatgtcaccttgttcttaattttaaagtcgttctttattacgaccttgttcttcaggggacctatatt 13501-13575 pb

F I F Y L P V L I L F E A L F L A P V L L G R S I

agttcctgcctgtttgaaggaatgcaggaataaaggtaatagaaaatgataaagtaaacattaaaaagcagccg
 tcaaggacgggacaacaacattccttacgctccttatttccattatcttttactatttccatttgaatttttcgctcgccg 13576-13650 pb
 L E Q R N T L F A P I F T I S F S L T F M 'mcmM'

ctgatgactgttttatggttcattttttgttatttccatttatattcccttacttgttattttaaattttttata
 gactactgacaaaaatacaacgtaaaaaacaataaaggtaaatataaggggaatgaacaataaatttttaaaatata 13651-13725 pb

taacaggaagaggttaacatagaatgaacgtttcttctccggtatcagaacagccataattttttattttatagtt
 attgtccttctccattggtatcttacttgcagaagaagaggccatagtcctgtcggattaaaaataaaatatacoa 13726-13800 pb

gttatcagtgaatgaatataaaactaatagaacaataaaaaagaatggagaaaaaacgacgggcaggacgcccattagt
 caatagtcacttacttatatttgattatcttgttatttttcttacctctttttgtctgcccgtcctcgggtatca 13801-13875 pb

tcataattctctcgatcagcctcacgtatcaacctttctgaaacggtttcaatttcttctccgctccagaata
 agtataagagagcatagtcggagtgcatagttggaagactttgccaagttaaaggaaagaggcagggtcttat 13876-13950 pb

tatttgtaatgtttctcatgacatataaccgaaaactggaaccagattaataggtggatcacacaacacataaa
 aataaacattacaaaggagtactgtatattggttttgacctggtctaattataacctacctatggttgtgtattt 13951-14025 pb

cttctgatgatatcgctaggaacgtatcttgagcgggtaaaagaaagtcatatactctgaataaaacattcatt
 gaagactactatagcgtacccctgcatagaactcgcctattttcttccagtatatgagacttatttggtagtaa 14026-14100 pb

tcagggttgatgagcggcttactgtgtctgcactggcttaacaaaattcaacagggttgaaaaggaacatttcc
 agtccacaactacgcgcaaatgacacagacgtgaccgaattgttttaagttgtccaaaacttttcttgttaaag 14101-14175 pb

gtgcaataaccgaagccttaatttcagagccgggagacatccggcgtttgttcagcagggcggtagccactgg
 cagtttatttggcctcggaaataaagtctcggccctctgtaggccgcaaaaacaagtcgtccgcccactggtgacc 14176-14250 pb

ccgctctgctggcagtcacttccagctccattcggctgaaggaacatcaacgggcaacagattcaggcattc
 ggcgcagacgacctcaggtgaagtgcgaggttaagccgacttctttgtagttgcccgtgtctaagtccgtaag 14251-14325 pb

tgtacttcttttatcgacaactgcatgaacgtattactgagcgtaatcacactgccagtcctcctcctccggtg
 acatgaaggaaaatagctgttgacttctgcataatgactcgcattagtgtagcggtaggtaggagggccac 14326-14400 pb

gtattacgctggttgcgggaacaacatgaaggagcaacaattcgatgctgttgctgctcagccagacgagtatt
 cataatgcgaccaacgccttgttacttctcgttgttaagctacggacaacgacgagtcggctgctcataa 14401-14475 pb

tgtcaccgcgagccagtgctcacagttgatgaacaatggtcgcaagtggggatttactgcaacatagctggcag
 acagtgggcgtcggtcacagtgcaactacttgttacaagcgttccaccctaagtacgcttctgtagccgctc 14476-14550 pb
 XmaI

gtgataagtgtggcggacaatgccgggtgaaaggtgttttcgggttgcccggtgtagatacatccggctcagtat
 cactattcagcagccctgttacggcccaactttccacaaaagcccaacgggcccactatgtaggccagtcata 14551-14625 pb
 SmaI

gttgcttaaaaacagtcgattgtctctggggtaccggtgtgaccgcaattaccatcgtccggtacagcgc
 caacgcaatttttgcagcgtaacagagaccccaatggccaacactggcggtaatgggtagcaggccatgtcgg 14626-14700 pb

tgtacattgattacagctcagtgaaatcagcgttttctggctttctcgtcggctatttctgtcaacgccacgatgtt
 acatgtaactaatgtcgagtcacttagtcgcaaaagaccgaaaagcagccagtaagacagttgcggtgctacaaa 14701-14775 pb

gaccgttatggggatgcccagcattccctgcacagcgttgtttcacgggtgggtgagcgcacaacaccgctgttaa
 ctggcaataaccctacgctgctaagggagcgtgtcgcaaaaagtgccaccactactgcttgtggcgacaatt 14776-14850 pb

aacagctcgttcagtccttctgtgtaccggtgtgacaacaatcagttggtaatggacgtgtgaaccatctcggc
 tttgtcagcaagtcaggaacacacaatggccaacactggtgttagtcaaccattacctgcacacttggtagacgcg 14851-14925 pb

ttccggtgatttttatggactgataaagttttgcccagctgaatctttatacggaaatgctcttccagatgctgaca
 aaggcaactaaaaatacctgactatttcaaaacggtcgacttagaaatagccttacgagaagtcatacgcagatg 14926-15000 pb

cgaattgactatctgcccggataaaatcacgttttactgagctgaatgagtcctcccgtcttccgagcagtgggag
 gcttaactgatagaccgcctatttatgtcaaaatgactcgaacttactcagaagggcagaagcggctcgtcacccgtc 15001-15075 pb

gatgttctggaggagtgccggcagacagagggccggccagaagaacggctcgtattgcaactgctgaatgtggat
 ctacaagacctcctcagggcgtctgtctccggccggctcttctgcccagcagataacgtgacgacttacaccta 15076-15150 pb

tacgtcaccagttttgaactgccttttctgctgcttaccggacaccacaactgattgcccgcgtcgtgaa
 atgacagtggtcaaaacttgacggaaaagcgaacgacgaatgggctgtggtgttgactaacggcgcgacgactt 15151-15225 pb

gaatggggcatcagccgaaaaatgtggtgtttaaagataaacggtttggttgctgtacagcctgaaggccagc
 cttaccccgtagtcggctctttttacaccacaaatgtctatttgcacaaacacgcacatgtcggacttccggctc 15226-15300 pb

ctttctggtgtcccggatacattccgggtatcatctgtctcaccgtattcgtcgcgtgggtgggaatgaaaacaca
 gaaagaccacacggcctatgtaaggccatagtagacagagtggcataagcagcgcaccaacccttacttttgtgt 15301-15375 pb
 SmaI

tcattgccatatacagcaggttgcccggaagtgaagcgcgccctgaaacggctgaagtatgcaactggaggcgggt
 agtaacgggtatagtcgtccaacgggccccttcaacttccggggcacttgcggacttcatacgtgacctccgccc 15376-15450 pb
 XmaI

ttactggtgactgactggacggcctggtctggtttggcagtcagcgtattgcgctgatgttctgaggctgaga
 aatgaccactgacgtgacctgcccggacaagaccaaaccgtcagtcgcataaacgcccactacaagactccgactct 15451-15525 pb

aaggccggaatgccggtggtgaccacgacctggagggtgacgataaacctgacaggaacaacccgcaaagtaccg
 ttccggccttacggccaccactggtgctggcacctccacgtgctattggactgtccttgttgggctttcatggc 15526-15600 pb

gcataccatctctgatacaaccatcagggggaatatgctctggcagcagcagtagacattctttatactttat
 cgtatggttagagactatggtgtagtcccccttataacgagacacctgctgctcatgctgtaagaaatagaata 15601-15675 pb

ccccgctgctgaaaatattgcttaaggaaacgggaatggcaaggctccgattatgatattataatctgtctctga
 ggggcacggacttttatacacgattcctttgccccttaccgttccaggctaataactataataattagacagagact 15676-15750 pb

aacatgaactgaatgagtggtgacagagagaggttatgcccggactggcggataaccggaaccgctggcagagg
 ttgtacttgacttactcaccgactgtctctctccaatacggcctgaccgcctattggccttggcggaccgtctcc 15751-15825 pb

tggttaccggaaatgacagacagcttttatataaacggttctctgggatgagcgtgaacacggcatacagtgaa
 accaatgggctttaaactgctgctgcaaaatataattgcaaggacctacgagacttggcctgtagtctacttg 15826-15900 pb

accctgagtggttttcagggtctgtctccggagatgagaattaataagtggtattatgctgcatcaggcagtggt
 tgggactcaccaaaagtcccgaacagaggctctactcttaattattcacctaatacagcggtagtccgtcacac 15901-15975 pb

attgcccggcagggtttctgttttattctgtttcttcccgggggggcgggttgaattttccagaaagtgtacat
 taacggcctgcttaagcaaaataagacaagaa*ggggcccccggccaaacttaaaagggtctttcaacatgta 15976-16050 pb

SphI XmaI
 cggtcgcatgaggggatgaggatagccgtcccgcataaacacca*ccgggttttctcaacactggtcacggtgac
 gccagcgtactcctacgctatcggcagggcgtatttgggtgggccc*aaaggagtgtgaccagtgccactg 16051-16125 pb

SmaI
 aagcgcaccatgatcgtctttgtatcgctgattgactttcggtaatggaacatcttctgacataaaat*tttagtac
 ttcgctggtactagcagaacatagcgaactaactgaaagccattaccttgtagaagactgtat*ttaaaatcatg 16126-16200 pb

ggtaacagttaactaaat*tttcatgtggtgactgaatcaggagactgctttcctgatgtgctggtt*taattt
 ccattgtcaattgat*ttaaaagtaaccatcgtgacttagtctctgacgcaaaggactacacgcgacaat*taaa 16201-16275 pb

tctgtttt*taacgaaacat*tttccccttcttctctgtat*ttttattgogctcctcctttcatgtccttcccatac
 agcaaaaaatgctt*tgtaaaaggggaagaaggacata*aaaaaacgcgagggaggaaagtaacaggaagggatag 16276-16350 pb

ctgaaactcact*taaatgctgttgaatcgtcatgcatgcaat*tttcaatgactgaaatcaaaaattgctat*ttt
 gactttgagtgaa*tttacgacaacttagcagtagcgttaacg*ttaaaagttactgacttttagt*ttttaa*cgataaaa 16351-16425 pb

tttagctaaccaactgagcattcagtggaataat*tttctgact*tttccat*taattatggttataaaat*tttgcaa
 aatcgattggttgactcgt*taagtcaccttat*taaaagcgtgaaaggt*taataaccaaatt*taaaacggt 16426-16500 pb

ClaI
 tgtgctgtttt*tcgatataatgacagaataaagaactgttcat*ttgtgttatatcgatcgat*aaatctgtcatat
 acacgacaaaaacgctata*actgtcttatttctgacaagtaaacacaat*atagctagctat*tttagacagtata 16501-16575 pb

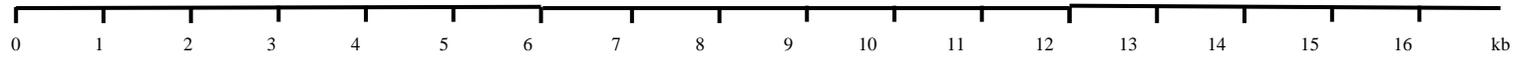
tgctgtagttcagattat*tttctataatgatcaaaaataagtcagctaaa*attggcagatt*tttctgctcagca
 acgacatcaagtc*taataataagatattactagtt*tttctcagtcgatt*ttttaaaccgtctaaataacgagtcgt 16576-16650 pb

ttctggatccgggtgatgcccgttaaataaccggaagggcggtagcgtgccatcgcaaaacatgggtgggaggtatcg
 aagaccatggccaactacgcccatttatggccttcccgccatcgacggtagcgtttt*gtaccaccctccatagc 16651-16725 pb

tcaggaggctggtgattggtggtatgacatgaataaaaggt*tttctggtt*actggaaaattatg*ttgcaggaac
 agtctccgaccactaaacaaccatactgacttatt*tttccaaaaagcaaaactgacct*tttaatacaacgctcctg 16726-16800 pb

HindIII
 gagagggctgaggaacaagctt
 ctctcccactccttgt*ttcga 16801-16823 pb

Figura 4.1. Secuencia nucleotídica del segmento de DNA de 16.823 pb que contiene el sistema genético McH47. Los números a la derecha se refieren a las posiciones nucleotídicas. Se indican con distintos colores los sitios de reconocimiento para algunas enzimas de restricción. También se consigna la secuencia aminoacídica deducida de los productos de los genes del sistema antibiótico, indicándose con asterisco los codones de terminación. Las posibles secuencias Shine-Dalgarno se subrayan en los nucleótidos que coinciden con el consenso. Se señala con una línea punteada el sitio de unión en las fusiones génicas con *lacZ* generadas por inserciones *Tnlac*. En las inserciones simples, de *Tn5* o *Tnlac*, se subraya el repetido directo generado por la inserción. En gris se pintan los nucleótidos idénticos de dos grandes repetidos directos que flanquean el sistema antibiótico. Dentro del sistema, repetidos más pequeños, directos o invertidos, se subrayan y se indican con flechas en gris.



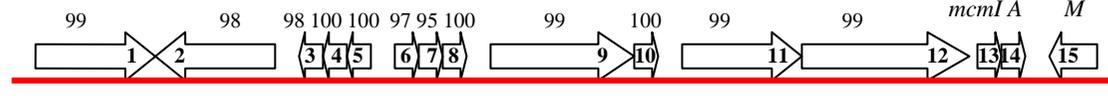
Genes *mch*

A SI S2 S3 S4 X I B C D E F

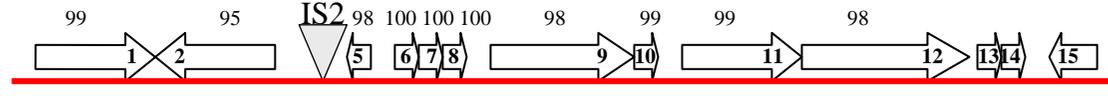
*E. coli*_{H47}
(MccH47)



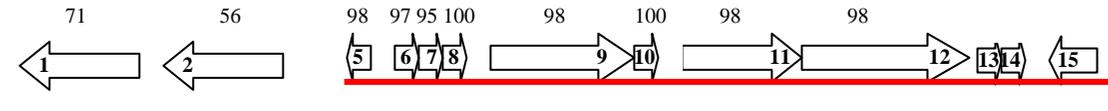
*E. coli*_{CA46} >90%
(MccH47 y MccM)



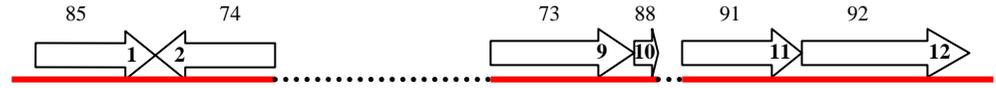
*E. coli*_{CA58} >90%
(MccH47 y MccM)



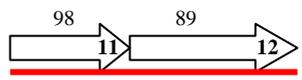
*E. coli*_{Nissle 1917 GI I y}
*E. coli*_{CFT073 PAI} >90%
(MccH47 y MccM)



*K. pneumoniae*_{RYC492} >80%
(MccE492)



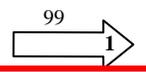
E. coli >90%
(ColV)



*E. coli*_{CL3 PAI I} >90%



*E. coli*_{536 PAI III} >90%



*E. coli*_{O157:H7 GI 43} >90%

*E. coli*_{4787 PAI II} >90%



*E. coli*_{CFT073 (15)} >90%

*E. coli*_{536 PAI II} >90%

Posteriormente se procedió a buscar marcos abiertos de lectura (ORFs) en el segmento secuenciado y a comparar las secuencias aminoacídicas deducidas contra los bancos de datos utilizando el programa BLASTP 2.2.5. Por fuera del repetido directo se encontraron ORFs cuyos supuestos productos mostraron similitud con proteínas hipotéticas a las que no se ha asignado aún ninguna función. Por dentro del repetido directo se encontraron varios marcos abiertos de lectura, aquellos que correspondieron a genes previamente descritos por análisis genéticos y bioquímicos clásicos (Gaggero et al., 1993) y otros nuevos encontrados en este análisis. Todos ellos, excepto uno, presentaron secuencias de tipo Shine-Dalgarno a una distancia adecuada del codón de inicio. Se identificaron quince marcos abiertos de lectura que se presentan a continuación según su localización de izquierda a derecha. También se secuenciaron los sitios de inserciones *Tnlac* previamente aisladas en el sistema MccH47, que conferían a las células actividad β -galactosidasa (Gaggero et al, 1993) (Fig. 4.1). Se confirmó ahora que generaban fusiones génicas *mch-lacZ*, codificando entonces para proteínas híbridas. Esta confirmación tiene la importancia de probar que los genes *mch* involucrados son verdaderas unidades de expresión que codifican para proteínas. Las fusiones se consignaron indicando el número de codón *mch* involucrado en la unión.

Figura 4.2. Análisis de la secuencia nucleotídica que contiene el sistema MccH47. Con línea azul se representa el segmento de DNA en estudio, delimitándose el sistema genético MccH47 con dos líneas verticales correspondientes al repetido directo de 148 pb. Con líneas rojas se indican las secuencias de DNA con las que el segmento en estudio exhibió niveles de similitud superiores al 80% de acuerdo al programa BLASTN (Altschul et al., 1997). Las líneas punteadas unen segmentos de alta similitud pertenecientes al mismo organismo. Se consigna la cepa de enterobacteria a la que pertenece cada secuencia nucleotídica, el porcentaje de identidad y, cuando corresponde, el tipo de microcina que produce. GI: isla genómica; PAI: isla de patogenicidad; IS2: secuencia de inserción 2. Con flechas se representa la extensión y dirección de transcripción de los genes. Se indica el nombre de los genes *mch* de *E. coli* H47 y se les asigna un número dentro de las flechas, el que se repite en los genes homólogos encontrados en otros organismos. Se señala con flechas en negro tres genes truncados derivados de los genes *mcmI*, *mcmA* y *mcmM*. Estos últimos genes, codificantes para MccM, están presentes y se consignan en otros sistemas antibióticos. Los números por encima de las flechas indican el porcentaje de identidad de los productos génicos, de acuerdo al programa BLASTP 2.2.5 (Altschul et al., 1997). Cuando hubo homología a nivel de la secuencia aminoacídica y la identidad fue baja para la secuencia nucleotídica, sólo se representaron los genes.

mchA. Se expresa en la dirección de izquierda a derecha (Figs. 4.1 y 4.2). Codifica para una proteína de 372 residuos que presentó homología significativa con glicosiltransferasas de organismos procariontes, particularmente con el subgrupo de proteínas IroB. MchA exhibió altos porcentajes de identidad (71-99%) con las proteínas IroB codificadas por los sistemas genéticos microcina M, H47 y E492 contenidos en otras cepas entéricas y por el locus *iroA* de *S. enterica*. Además, presentó homología, con un máximo de identidad de 34%, con glicosiltransferasas de sistemas productores de antibióticos policetónicos pertenecientes a los actinomicetes. Se corroboró a nivel de secuencia nucleotídica la generación de una fusión génica *mchA*₁₂-*lacZ* por la inserción *Tnlac*_{7,2} en el plásmido pEX100.

mchS1. Se expresa en la dirección de derecha a izquierda, localizándose dentro de la llamada zona silenciosa (Figs. 4.1 y 4.2). Codifica para una proteína de 421 residuos que presentó niveles significativos de homología con esterases de enterobactina férrica, en particular con el subgrupo de proteínas IroD. MchS1 compartió niveles elevados de identidad (55-98%) con las proteínas IroD codificadas por los sistemas antibióticos M, H47 y E492 de otros organismos y por el locus *iroA* de *S. enterica*. Además, presentó homología, con un máximo de identidad de 27%, con miembros del subgrupo Fes de esterases de enterobactina. Se confirmó a nivel de secuencia nucleotídica la generación de una fusión génica *mchS1*₃₇₁-*lacZ* por la inserción *Tnlac*_{5,4} en pEX100.

mchS2*, *mchS3* y *mchS4. Se expresan en dirección de derecha a izquierda, encontrándose dentro de la zona silenciosa (Figs. 4.1 y 4.2). Estos genes codifican para proteínas de 77, 144 y 81 residuos, respectivamente. Comparadas contra los bancos de datos, MchS2, MchS3 y MchS4 no presentaron homologías significativas. Sin embargo, analizando la secuencia nucleotídica del sistema para las microcinas H y M de *E. coli* CA46, se encontraron los genes *mchS2* y *mchS3*. De igual manera, se encontró el gen *mchS4* en los sistemas antibióticos H y M de las cepas de *E. coli* CA46, CA58, Nissle 1917 y CFT073. Los genes *mchS2* y *mchS3* están separados por una distancia de 16 nucleótidos, por lo que posiblemente conformen un operón. Se ha determinado en este trabajo que *mchS2* es el gen estructural para una nueva microcina, denominada microcina I47 (MccI47), producida por el sistema genético MccH47. El gen *mchS3* codifica para la inmunidad a esta microcina. Por otra parte, *mchS4* codifica para una proteína que promueve la producción de enterobactina. El estudio de estos determinantes genéticos será ampliado en las siguientes secciones.

***mchX*, *mchI* y *mchB*.** Estos tres genes ya habían sido descritos a nivel genético y molecular (Rodríguez & Laviña, 1998; Rodríguez et al., 1999). Se expresan de izquierda a derecha y probablemente conforman una unidad transcripcional (Figs. 4.1 y 4.2). El gen *mchX* codifica para un péptido de 39 residuos de función aún no dilucidada aunque se sabe que regula positivamente su propia expresión. El gen *mchI* codifica para un péptido de 69 residuos que confiere inmunidad contra MccH47. El gen *mchB* es el gen estructural para la MccH47, codificando para el péptido precursor antibiótico de 75 residuos. El análisis contra los bancos de datos reveló que MchX, MchI y MchB están presentes en el sistema MccH47 de las cepas de *E. coli* CA58, CA46, Nissle 1917 y CFT073.

***mchC*.** Se expresa en dirección de izquierda a derecha (Figs. 4.1 y 4.2). Codifica para una proteína de 516 residuos cuyo análisis contra los bancos de datos concentró la mayor identidad (73-99%) con proteínas homólogas pertenecientes a los sistemas genéticos microcina H47, M y E492 de otros organismos. Al igual que en casos anteriores, se corroboraron dos fusiones génicas: *mchC₆₉-lacZ* y *mchC₄₃₉-lacZ*, generadas por las inserciones *Tnlac_{7.7}* y *Tnlac_{7.3}* en pEX100, respectivamente.

***mchD*.** Se expresa de izquierda a derecha (Figs. 4.1 y 4.2). Codifica para una proteína de 150 residuos que presentó homología con aciltransferasas activadoras de toxinas RTX de bacterias Gram negativas. MchD exhibió los mayores porcentajes de identidad (88-100%) con proteínas homólogas pertenecientes a los sistemas antibióticos M, H47 y E492 de otras cepas entéricas. *mchD* comienza a 25 nucleótidos del final de *mchC*, por lo que muy probablemente ambos genes conformen un operón. Se corroboró que la inserción *Tnlac_{3.5}* en pEX100 generaba una fusión génica *mchD₂₈-lacZ*.

***mchE* y *mchF*.** Estos dos genes ya habían sido descritos a nivel molecular (Azpiroz et al., 2001). Se expresan en la dirección de izquierda a derecha y sus secuencias codificantes se solapan 7 nucleótidos, indicando claramente que conforman un operón (Figs. 1 y 2). Los productos de estos dos genes conforman el sistema exportador de MccH47: MchF es el transportador ABC y MchE es el segundo componente. MchE y MchF comparten altos niveles de similitud con homólogos pertenecientes a los sistemas productores de microcinas H47, M, E492 y ColV contenidos en otras cepas de enterobacterias.

ORF48, ORF73 y ORF96. Los dos primeros se expresarían en dirección de izquierda a derecha mientras que el tercero lo haría de derecha a izquierda (Figs. 4.1 y 4.2). El análisis de sus productos contra los bancos de datos reveló que presentan

homología casi total con tres proteínas del sistema genético MccM. Estas comparaciones indicaron que los tres ORFs serían derivados truncados de los genes *mcm*. El ORF48 compartió un 93% de identidad con los primeros 48 residuos de la proteína de inmunidad a MccM (AC: Q83TS3). El ORF73 mostró un 100% de identidad con los primeros 73 residuos del precursor de la MccM (AC: Q83TS1). Finalmente, el ORF96 exhibió un 95% de identidad con la proteína MccM (AC: Q6KDB0), entre sus residuos 22 y 86. Este último es el único caso en que presentamos un marco abierto de lectura para el que no se identificó una secuencia de tipo Shine-Dalgarno y que por lo tanto sería un pseudogen.

A la luz del análisis genético de la secuencia nucleotídica, se detectaron secuencias repetidas directas o invertidas que podrían tener una significación funcional por localizarse delante o detrás de genes *mch* (Fig. 4.1). Concretamente, estas estructuras se encontraron, de izquierda a derecha, en las siguientes localizaciones. 1) Por delante de *mchA* se identificó un repetido invertido, presente en un total de tres copias, que podría dar lugar a horquillas alternativas involucradas en la regulación de la expresión de este gen. 2) Después de *mchA* se encontró un repetido invertido con estructura de tipo terminador de la transcripción que podría operar tanto para este gen como para *mchS1*. 3) Justo después del codón de terminación de *mchS2* se identificó un repetido invertido, probable terminador de la transcripción del supuesto operón *mchS3S2*. 4) Por detrás de *mchB*, se había hallado previamente un repetido invertido con estructura de tipo terminador de la transcripción del operón *mchXIB* (Rodríguez et al., 1999). 5) Por delante de *mchC* se identificó un repetido directo de 12 pb, señal característica de un sitio de regulación de la expresión génica. 6) A un lado y a otro del codón de iniciación de *mchD* se encontró un repetido directo de 13 pb, que abarca la secuencia de unión a ribosoma y podría entonces estar involucrado en la regulación a nivel de la traducción.

4.1. Maduración del antibiótico MccH47

Se analizó la relación entre la síntesis del sideróforo enterobactina y la producción de MccH47 atendiendo a los siguientes antecedentes.

- 1) A partir de los datos de secuencia nucleotídica se identificaron en el sistema genético MccH47 los genes *mchA* y *mchS1*, homólogos a *iroB* e *iroD*,

respectivamente. En aquel entonces, se sabía que estos genes integraban el locus *iroA*, sometido a regulación por hierro y presente en *S. enterica*. A juzgar por homologías de secuencia, se proponía que IroB sería una glicosiltransferasa e IroD una esterasa de enterobactina (Baümle et al., 1996; Baümle et al., 1998).

- 2) Se sabía que la MccH47 es captada por las células de *E. coli* K12 a través de la vía de ingreso de los sideróforos de tipo catecol, entre ellos la enterobactina, i.e. que utiliza los receptores de membrana externa Cir, Fiu y FepA así como la vía TonB (Trujillo et al., 2001).

Estos antecedentes sugirieron que podría existir una relación entre la síntesis de enterobactina y la de MccH47, por lo que se iniciaron estudios en dos direcciones. Por un lado, se analizó la producción de enterobactina por parte de las cepas productoras de MccH47. Por otro lado, se realizó el análisis inverso para determinar la producción de MccH47 de cepas eficientes y deficientes para la síntesis de enterobactina. Estos estudios permitieron comprender la etapa de maduración en la síntesis de MccH47.

4.2.1. Las estirpes portadoras del sistema genético MccH47 hiperproducen enterobactina

Se ensayó la producción de sideróforos por parte de cepas portadoras del sistema MccH47 en placas CAS, según se describe en Materiales y Métodos. *E. coli* H47, así como la cepa hiperproductora de MccH47 RYC1000(pEX100), dieron lugar a halos amarillos de aproximadamente 7 mm de diámetro. Por su parte, RYC1000(pACYC184), isogénica a RYC1000(pEX100) pero sin el sistema antibiótico, así como otras cepas de *E. coli* K12 disponibles en el laboratorio, produjeron halos de 4 a 5 mm de diámetro que denominamos halos CAS basales (Fig. 4.3). Estos resultados indicaron que las cepas portadoras del sistema MccH47 presentaban una producción incrementada de actividad quelante de hierro. Se analizó entonces si el propio antibiótico MccH47 actuaba como sideróforo. Para ello, se sembraron alícuotas de un extracto con actividad MccH47 sobre una placa CAS, según se describe en Materiales y Métodos. Al cabo de 24 horas de incubación, no se observó halo amarillo, por lo que se descartó que la MccH47 fuera el ligando de hierro hiperproducido (dato no mostrado).

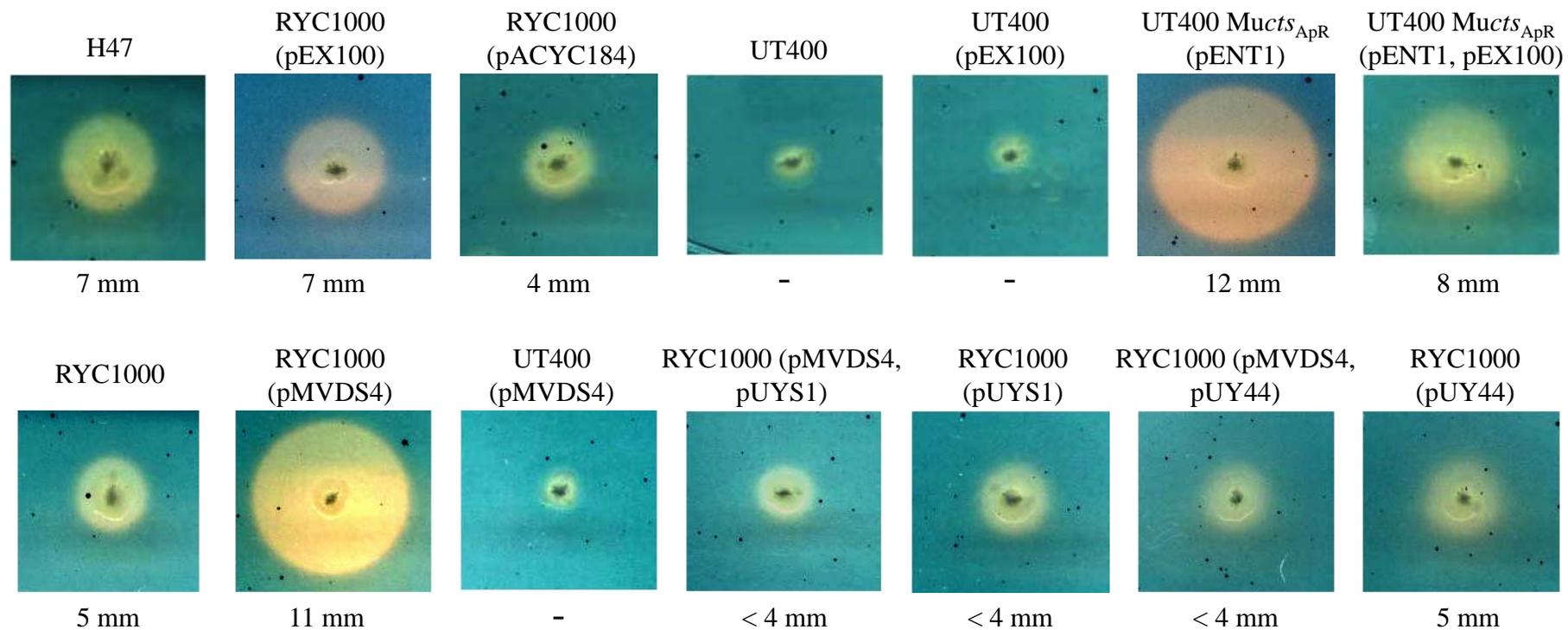


Figura 4.3. Producción de actividad quelante de hierro. Los halos amarillos corresponden a la actividad quelante de hierro secretada por las estirpes consignadas cuando se picaron sobre una placa CAS. Debajo de cada sector se indica el diámetro aproximado del halo producido por cada estirpe. La ausencia de halo amarillo se indica con un signo de menos.

Considerando que la enterobactina es el sideróforo producido por todas las cepas de *E. coli*, nos preguntamos si los grandes halos CAS generados por las estirpes productoras de MccH47 podían corresponder a la hiperproducción de enterobactina. Se contaba en el laboratorio con la estirpe UT400, portadora de mutaciones en el sistema *ent*, siendo entonces deficiente para la síntesis de enterobactina (Ent⁻). Se transformó UT400 con el plásmido pEX100 y los clones resultantes se analizaron para su capacidad de producir actividad quelante de hierro. No se observó halo amarillo sobre placa CAS, comportándose igual que la estirpe de base UT400 (Fig. 4.3). Considerando que la delección de UT400 abarca cierta extensión de DNA a los lados del sistema *ent*, era importante corroborar que el fenotipo observado se debía específicamente a la ausencia de los genes *ent* y no a la de otros genes adyacentes. Se procedió entonces a clonar el sistema genético *ent* de forma ajustada para introducirlo en UT400 y en UT400(pEX100). Es así que se construyó el plásmido pENT1, portador de todo el sistema *ent* en un vector derivado del fago Mu, según se explica en Materiales y Métodos. Para poder introducir pENT1 en una cepa bacteriana, es necesario que ésta sea lisógena para Mu, de modo que exprese el represor del ciclo lítico del fago e impida la inducción cigótica cuando ingresa el plásmido. Las estirpes UT400 y UT400(pEX100) se hicieron entonces lisógenas para el fago *Mu*_{cts_{APR} y luego fueron transformadas con pENT1. Analizadas en placas CAS, se observó que estas construcciones recuperaron la capacidad de producir actividad quelante de hierro: UT400 *Mu*_{cts_{APR}(pENT1) generó un halo amarillo de 12 mm de diámetro y UT400 *Mu*_{cts_{APR}(pENT1, pEX100) un halo de 8 mm de diámetro (Fig. 4.3). Estos resultados indicaron que la actividad quelante de hierro hiperproducida por las cepas portadoras del sistema MccH47 dependía estrictamente de la presencia del sistema *ent* y que seguramente era enterobactina.}}}

Posteriormente, se procedió a buscar el determinante genético del sistema MccH47 responsable de la hiperproducción de actividad quelante de hierro. Para ello, se transformó una estirpe Ent⁺ con plásmidos portadores de distintos segmentos *mch* y los clones resultantes se ensayaron sobre placas CAS. Sólo aquellos clones que contenían el gen *mchS4* hiperprodujeron actividad quelante de hierro. Se construyó entonces el plásmido pMVDS4, que sólo contenía el gen *mchS4*, según se describe en Materiales y Métodos. Este plásmido se utilizó para transformar las estirpes RYC1000 (Ent⁺) y UT400 (Ent⁻) y los clones resultantes se ensayaron sobre placas CAS. RYC1000(pMVDS4) generó halos CAS de aproximadamente 11 mm de diámetro mientras que UT400(pMVDS4) no generó ningún halo (Fig. 4.3). Por lo tanto, la

hiperproducción de actividad quelante de hierro promovida por *mchS4* fue sintetizada a través de la vía Ent, pudiendo ser la propia enterobactina o catecoles monoméricos (DHB o DBS). Se descartó que estos últimos fueran responsables de los grandes halos amarillos observados ya que gotas de una solución concentrada de DHB (2mg/ml) no variaron el color de una placa CAS (dato no mostrado). En conclusión, la hiperproducción de actividad quelante de hierro promovida por el sistema MccH47 correspondió al sideróforo enterobactina.

Teniendo en cuenta que las cepas productoras de MccH47 nunca alcanzaron tan altos niveles de producción de sideróforo como los determinados por la sola presencia de pMVDS4, se buscó el determinante genético del sistema MccH47 que compensara dicho efecto. Con este objetivo, la cepa RYC1000(pMVDS4) se transformó con una serie de plásmidos portadores de distintos segmentos *mch* y los clones resultantes se analizaron sobre placas CAS. Sólo aquéllos que contenían el gen *mchS1* exhibieron halos amarillos marcadamente reducidos. Es así que se construyó el plásmido pUYS1, que contenía sólo *mchS1*, según se describe en Materiales y Métodos. Las estirpes RYC1000(pMVDS4, pUYS1) y RYC1000(pUYS1) dieron lugar a halos CAS muy reducidos, incluso menores que los basales (Fig. 4.3). Considerando que MchS1 pertenece a la familia de las esterases de enterobactina, se llevó a cabo un experimento similar al anterior utilizando el plásmido pUY44. Este plásmido contenía el gen *fes* para la esterasa de enterobactina del sistema *ent*. Se observó un comportamiento similar al determinado por *mchS1* (Fig. 4.3), sugiriendo que Fes y MchS1 tendrían el mismo efecto sobre la hiperproducción de enterobactina promovida por MchS4: la enterobactina hiperproducida sería hidrolizada por la acción de Fes y/o MchS1 determinando así la reducción del halo CAS.

Considerando que la expresión de los genes *ent* se encuentra regulada por la disponibilidad de hierro, la producción de sideróforos fue analizada en condiciones de diferente disponibilidad de este metal, según se explica en Materiales y Métodos. Efectivamente, en presencia de altas concentraciones de hierro (10 µg/ml de FeSO₄·7H₂O) las estirpes ensayadas mostraron una drástica reducción de esta actividad quelante: las cepas productoras de antibiótico, H47 y RYC1000(pEX100), no generaron halos CAS mientras que RYC1000(pMVDS4) aún produjo halos amarillos, aunque reducidos aproximadamente a la mitad de su diámetro original. Por el contrario, las mismas estirpes ensayadas en condiciones de menor concentración de hierro (1/4 y 1/10

de la previamente usada) dieron lugar a halos CAS, los que se incrementaron en tamaño a medida que la concentración de hierro decrecía (datos no mostrados).

4.2.2. La producción de MccH47 depende del sistema genético *ent*

Se analizó la estirpe *Ent*⁻ portadora del sistema genético MccH47, UT400(pEX100), para su capacidad de producir antibiótico, según se describe en Materiales y Métodos. Sorprendentemente, UT400(pEX100) no generó ningún halo de inhibición del crecimiento mientras que la estirpe de referencia RYC1000(pEX100) originó un halo de unos 18 mm de diámetro (Fig. 4.4). Esta observación indicó que la deficiencia en la síntesis de enterobactina podía afectar la producción antibiótica. Para evaluar esta posibilidad, se analizó si la introducción del plásmido pENT1 revertía el fenotipo: la pareja de estirpes isogénicas UT400 *Mucts*_{ApR}(pEX100) (*Ent*⁻) y UT400 *Mucts*_{ApR}(pENT1, pEX100) (*Ent*⁺) se ensayó para su capacidad de producir antibiótico (Fig. 4.4). La primera no produjo inhibición del crecimiento mientras que la segunda generó un halo de aproximadamente 14 mm de diámetro. Se corroboró así que la integridad del sistema *ent* era necesaria para producir MccH47.

Posteriormente, nos abocamos a determinar la etapa de la producción de MccH47 afectada en la estirpe UT400(pEX100): podía tratarse de un defecto en la síntesis antibiótica o de un defecto en su secreción. Se sabe que las estirpes portadoras del sistema MccH47 con mutaciones en los genes de secreción antibiótica no generan halos de antibiosis aunque contienen actividad en su interior: los extractos intracelulares de estas estirpes inhiben el crecimiento de un tapiz de células susceptibles (Gaggero et al., 1993). Para analizar si UT400(pEX100) era defectuosa para la secreción de MccH47, se obtuvieron extractos intracelulares de esta estirpe y se ensayaron sobre un tapiz indicador. Como control, se le realizó el mismo procedimiento a un mutante de secreción afectado en el gen *mchF*. Luego de incubación durante 24 horas, el extracto de UT400(pEX100) no inhibió el crecimiento del tapiz mientras que el extracto control sí lo hizo. Por lo tanto, se descartó un defecto en la secreción antibiótica, indicando que la producción de MccH47 estaba afectada en algún paso previo, i.e. en la síntesis antibiótica. En este sentido, cabe recordar que la síntesis de MccH47 implica dos pasos: la síntesis ribosómica del péptido precursor MchB y luego su maduración, mediada por los productos de los genes *mchA*, *mchC* y *mchD*. MchB posee efecto tóxico de la misma especificidad que la MccH47 sobre la propia célula que lo está produciendo: las células transformadas sólo con *mchB* no son viables (Rodríguez et al., 1999). Es así entonces

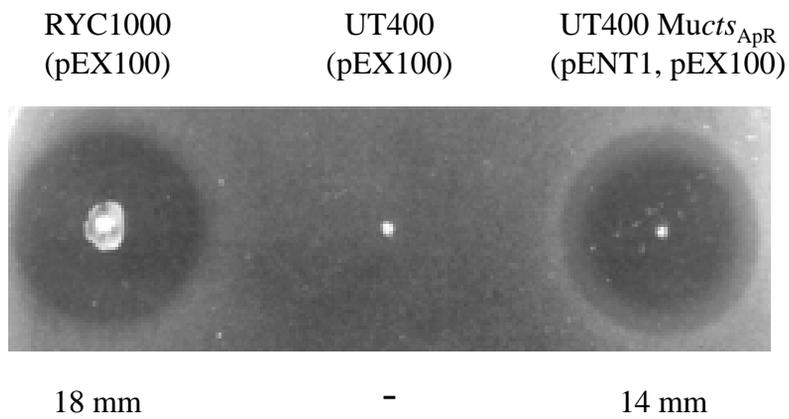


Figura 4.4. Producción de MccH47. Picadas de las estirpes consignadas sobre una placa de medio mínimo con los aminoácidos requeridos por UT400 y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10 \mu\text{g/ml}$) sembrada con un tapiz de RYC1000. Los halos de inhibición del crecimiento corresponden a la producción de MccH47. Debajo de cada picada se muestra el diámetro aproximado del halo producido por cada estirpe. La ausencia de halo de antibiosis se indica con un signo de menos.

que para analizar si el contexto Ent⁻ impedía la síntesis del precursor antibiótico, UT400 se transformó con el plásmido pMVD10, portador del gen *mchB*, y los transformantes se seleccionaron en placas de LB Cm. No crecieron clones, lo que indicó que las células habían sufrido el efecto tóxico de MchB. Como control, la estirpe inmune a MccH47 UT400(pUY69) se transformó también con pMVD10 y en este caso crecieron abundantes clones. Por lo tanto, la deficiencia en la vía Ent no impidió la expresión de *mchB* ni tampoco que su producto proteico ejerciera efecto tóxico. Estos resultados indicaron que era el otro paso de la síntesis antibiótica, la maduración del péptido precursor, el que dependía de la integridad del sistema *ent*.

Una vez establecido el requerimiento del sistema *ent* para la síntesis de MccH47, se procedió a analizar cuáles de sus genes eran necesarios para ello. Cabe recordar que este sistema genético determina la producción de enterobactina (producto principal) así como también la de los catecoles monoméricos DHB y DBS. La primera etapa de la vía Ent genera el precursor de la enterobactina DHB y la segunda etapa produce enterobactina a partir de dicho precursor (Earhart, 1996). En primer lugar, la estirpe UT400(pEX100) se ensayó para su capacidad de producir MccH47 en presencia de DHB, según se describe en Materiales y Métodos. No se observaron halos de antibiosis, por lo que se descartó que la primera etapa de la vía Ent fuera suficiente para restaurar el fenotipo de producción antibiótica. Por lo tanto, se procedió a estudiar el posible requerimiento de enterobactina para la síntesis de MccH47. Para ello, se construyó una estirpe eficiente para la producción de DHB y deficiente para la síntesis de enterobactina, introduciendo la delección $\Delta(ompT-fepC)_{267}$ de UT400 en MC4100, según se describe en Materiales y Métodos. La estirpe resultante Ent⁻ se denominó FGB103. Como era esperado, FGB103 no produjo MccH47 al ser transformada con pEX100 (Fig. 4.5A). La delección $\Delta(ompT-fepC)_{267}$ remueve genes del sistema *ent* involucrados en diferentes funciones relacionadas a la enterobactina: su síntesis (*entD* y *entF*), su captación (*fepA*, *fepE* y *fepC*) y su hidrólisis (*fes*). Se descartó que el receptor de membrana externa FepA fuese necesario para la producción antibiótica, ya que la cepa FGB102(pEX100), portadora de la mutación *fepA:Tn10*, generó halos de antibiosis de tamaño similar a los producidos por la estirpe de referencia RYC1000(pEX100). Posteriormente, para analizar el posible requerimiento de los otros dos genes de captación, se construyó el plásmido pUY47, portador de los genes *entD*, *fepA*, *fes* y *entF*. Este plásmido se introdujo por transformación en la estirpe FGB103(pEX100) y los clones resultantes se volvieron Ent⁺ y productores de microcina (Fig. 4.5B)

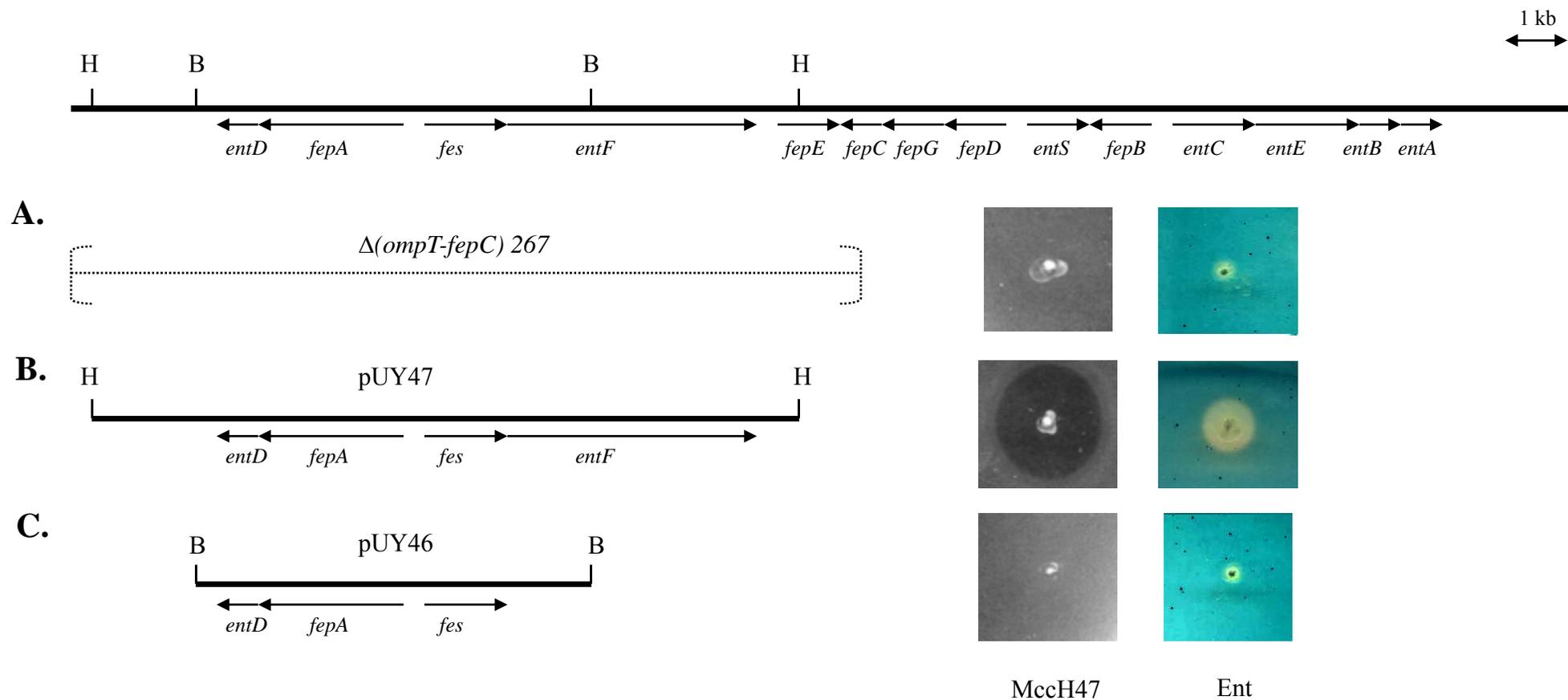


Figura 4.5. Producción de MccH47 en diferentes contextos genéticos *ent*. Arriba se representa el sistema genético *ent*: se indica la extensión y dirección de transcripción de cada uno de los genes que lo componen y se señalan los puntos de corte para las enzimas de restricción de interés. A la izquierda, se indican los contextos genéticos *ent* de las estirpes: **A.** FGB103 –MC4100 $\Delta(ompT-fepC)267^-$, **B.** FGB103(pUY47), **C.** FGB103(pUY46). A la derecha, se muestran los fenotipos de producción antibiótica (MccH47) y de sideróforo (Ent) de las estirpes mencionadas cuando además portan el plásmido pEX100. B: BamHI; H: HindIII.

Por lo tanto, los genes *fepE* y *fepC* no eran necesarios para la producción antibiótica. Finalmente, se analizó el requerimiento del gen *entF*, cuyo producto es la sintetasa de enterobactina, proteína indispensable para la síntesis de este sideróforo. Para ello, FGB103(pEX100) se transformó con el plásmido pUY46, portador de los genes *entD*, *fepA* y *fes*, y en este caso las células resultantes no produjeron enterobactina ni tampoco MccH47 (Fig. 4.5C). Este resultado indicó entonces que la sintetasa de enterobactina EntF era necesaria para la producción antibiótica. Más aún, sabiendo que dicha enzima es indispensable para la estructuración del trímero cíclico enterobactina, este hallazgo sugirió fuertemente que la propia molécula de enterobactina sería necesaria para la maduración del péptido precursor MchB.

Teniendo en cuenta los siguientes dos hallazgos: 1) que la producción de MccH47 depende de la síntesis de enterobactina, esta última regulada por la disponibilidad de hierro, y 2) que la cantidad de sideróforo producido y secretado por las cepas productoras de MccH47 varía de acuerdo a la concentración disponible de este metal, nos preguntamos si también la producción de MccH47 dependía de la disponibilidad de hierro. Para ello, las estirpes H47 y RYC1000(pEX100) se ensayaron para su capacidad de producir antibiótico en placas de medio mínimo con concentraciones crecientes de hierro, según se describe en Materiales y Métodos. Cabe señalar que en condiciones de disponibilidad de hierro los genes que codifican para los receptores de MccH47, Cir, Fiu y FepA, están reprimidos, por lo que la cepa indicadora en estos experimentos es menos sensible al antibiótico (Trujillo et al., 2001). Inesperadamente, los halos de antibiosis alcanzaron un tamaño similar en todas las concentraciones de hierro ensayadas, indicando que la disponibilidad de este metal no afectaba significativamente la producción de MccH47 (datos no mostrados).

4.3. El sistema genético MccH47 codifica para la producción de una segunda microcina, MccI47

La búsqueda de una segunda actividad antibiótica codificada por el sistema MccH47 fue alentada por las siguientes observaciones: 1) en la secuencia del sistema MccH47 se encontraron dos genes, *mchS2* y *mchS3*, cuya extensión y disposición sugerían que podrían estar codificando para una posible pareja de actividad-inmunidad antibiótica (Fig. 4.1), y 2) la comparación de la secuencia de MchS2 con la de MchB reveló similitudes en ambos extremos de los péptidos: la región N-terminal presentó una secuencia que se ajustó al consenso de los péptidos señal de tipo ABC y la región C-

terminal exhibió una llamativa riqueza en serinas (Fig. 4.6). Cabe señalar que estas observaciones no encontraban soporte fenotípico: no se había detectado que las cepas portadoras del sistema genético MccH47 produjeran otra actividad antibiótica además de MccH47. De todas formas, se emprendió la búsqueda de esta segunda actividad, que denominamos microcina I47 (MccI47).



Figura 4.6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los péptidos precursores de MccH47 y MccI47. Se realizó con el programa Multalin (Combet et al., 2000). Los residuos idénticos se pintan en amarillo y los conservados en gris. Se señala con una flecha el sitio de corte consenso del péptido señal de tipo ABC.

Considerando que en las condiciones ensayadas en el laboratorio para la producción de MccH47 no se producía una segunda actividad, al menos en forma detectable, se pensó que esta última podía producirse en otras condiciones. Se procedió entonces a buscarlas cultivando a diferentes temperaturas, en presencia de distintos aminoácidos, compuestos catecólicos, agentes que dañan el DNA y en condiciones de disponibilidad o deprivación de hierro. Teniendo en cuenta que las cepas eventualmente productoras de MccI47 producían siempre MccH47, la búsqueda se realizó por prueba de producción antibiótica sobre un tapiz de células resistentes a MccH47. Concretamente, se utilizó como indicadora la cepa FGB099, portadora de una mutación en el operón *atp* que la hacía totalmente resistente a la acción de la MccH47 por carecer de su diana de acción, la ATP sintetasa (Trujillo et al., 2001; Rodríguez & Laviña, 2003). En estos ensayos se detectó la actividad MccI47 en dos condiciones.

En presencia de mitomicina C se observó sistemáticamente la aparición de halos turbios de antibiosis de hasta unos 8 mm de diámetro (datos no mostrados). La mitomicina C genera lesiones en el DNA, induciendo la respuesta SOS. Estos resultados nos llevaron a pensar que la producción de MccI47 podía estar bajo la regulación SOS. Se procedió entonces a ensayarla en dos contextos: uno eficiente (RecA^+) y otro deficiente (RecA^-) para la respuesta SOS. Sorprendentemente, en ambos contextos se obtuvieron halos de antibiosis MccI47. Por lo tanto, la producción de MccI47 en presencia de mitomicina C no se enmarcó en la respuesta SOS. No disponiéndose de una explicación para este fenómeno, los experimentos fueron discontinuados.

Se detectó la producción de MccI47 en condiciones de privación de hierro, adicionando el quelante 2,2 dipiridilo (DPP) a las placas del ensayo de producción (Fig. 4.7). En estas condiciones las estirpes ensayadas generaron halos de antibiosis: RYC1000(pEX100), RYC1000(pEX4) y RYC1000(pEX100::Tn5 76) produjeron halos de ca. 10 mm de diámetro. La última estirpe se incluyó ya que era deficiente para la producción de MccH47 y por lo tanto producía únicamente MccI47. Cabe señalar que a las 24 horas de incubación el tapiz de la cepa indicadora estaba crecido y se observaban halos de antibiosis muy turbios. A medida que transcurrieron más horas de incubación (hasta 72 horas), los halos aumentaron algo su diámetro y adquirieron mayor claridad, aunque nunca llegaron a presentar la nitidez de los halos MccH47.

Una vez detectada la MccI47, se procedió a analizar si era codificada por el gen *mchS2* como se había sospechado inicialmente. Se ensayó entonces la producción de MccI47 de la estirpe RYC1000(pEX4::Tn5 38), que porta el sistema MccH47 con una mutación en *mchS2* por inserción del transposón Tn5. Por secuenciación nucleotídica se localizó dicha inserción a continuación del codón 49 de *mchS2* (Fig. 4.1). Esta estirpe no originó ningún halo sobre la estirpe indicadora FGB099, fenotipo esperado para un mutante en el gen de actividad antibiótica. En un principio también se había sospechado que *mchS3* podía ser el gen de inmunidad para MccI47. Se procedió entonces a clonar este gen, construyéndose el plásmido recombinante pMVDS3, según se describe en Materiales y Métodos. Introducido en FGB099, la cepa resultante fue resistente a MccI47. Por lo tanto, se identificó *mchS3* como el gen de inmunidad a esta microcina. Se corroboró además que las cepas portadoras del gen *mchS3* fueron totalmente sensibles a MccH47 y que las cepas portadoras del gen *mchI* (inmunidad a MccH47) fueron totalmente sensibles a MccI47. Por lo tanto, cada péptido de inmunidad fue específico para su correspondiente antibiótico. En suma, *mchS2* y *mchS3* serían la pareja de genes de actividad-inmunidad de la MccI47.

Considerando que la pareja de genes de actividad-inmunidad de la MccI47 se encuentra inmersa en el sistema MccH47, cabía la posibilidad de que la producción de MccI47 dependiera de las vías de maduración y secreción utilizadas por la MccH47. Se analizó entonces el requerimiento de los genes de maduración y secreción de MccH47 para la producción de MccI47. Para ello, estirpes portadoras del sistema genético MccH47 con mutaciones en cada uno de los genes de maduración, *mchA*, *mchS1*, *mchC* y *mchD*, así como en el gen de secreción *mchE*, se ensayaron para su capacidad de producir MccI47. Todas ellas fueron deficientes para la producción de MccI47 a

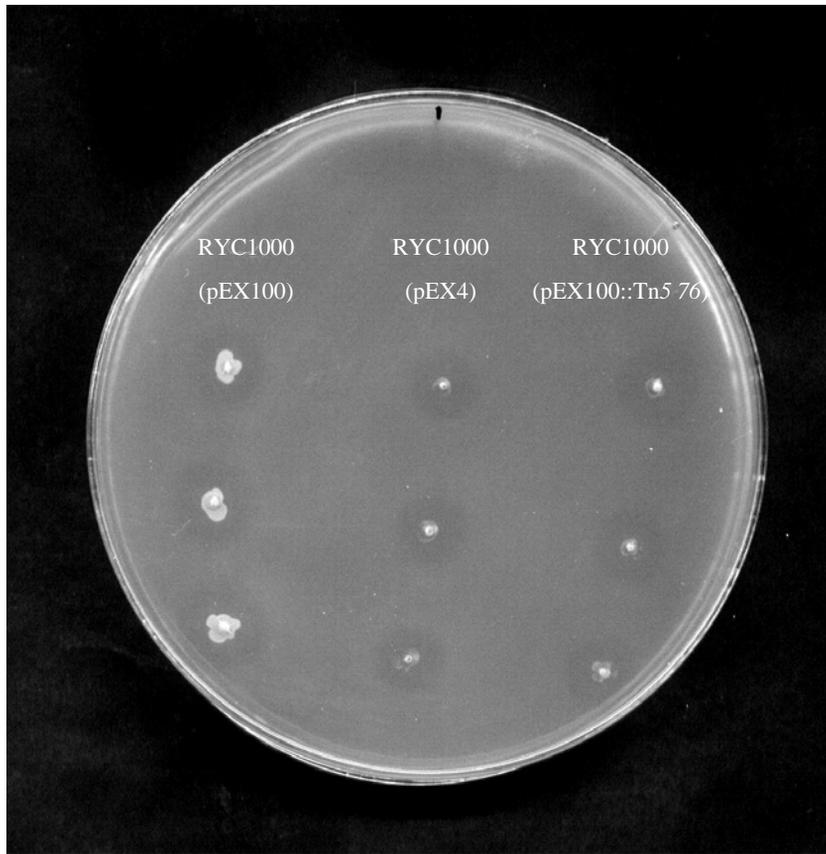


Figura 4.7. Producción de MccI47. Picadas de estirpes de *E. coli* K12 portadoras del sistema genético MccH47 sobre una placa de medio mínimo con DPP y sembrada con un tapiz de células de FGB099. Cada columna muestra tres picadas de una misma estirpe. Los halos de inhibición del crecimiento corresponden a la producción de MccI47 luego de 72 horas de incubación a 37° C.

excepción del mutante *mchSI*, que originó un halo claramente menor al producido por la estirpe portadora de todo el sistema genético indemne (datos no mostrados). Estos resultados indicaron que los genes *mchA*, *mchC*, *mchD* y *mchE* eran necesarios para producir MccI47, i.e. que esta segunda microcina presentaba los mismos requerimientos de maduración y secreción que la MccH47. Además y al igual que para la MccH47, el producto del gen *mchSI* no fue indispensable pero sí necesario para garantizar una eficiente producción de MccI47. Recordando que para la maduración de MccH47 son necesarios no sólo los genes de modificación sino también la vía de síntesis del sideróforo enterobactina, analizamos este último requerimiento ensayando la estirpe Ent⁻ FGB103(pEX100) para su capacidad de producir MccI47. Como era previsible, no se observaron halos de antibiosis. Del conjunto de estos resultados, se deduce que la MccI47 utiliza la misma estrategia de síntesis y es exportada por el mismo sistema transportador ABC que la MccH47.

Considerando que la etapa de maduración confiere a la MccH47 la capacidad de ser captada por las células susceptibles (Rodríguez et al., 1999), se analizó si la MccI47 utilizaba la misma vía de captación que la MccH47. Para ello, se ensayó el espectro de acción de la MccI47 sobre una colección de cepas de *E. coli* K12 mutantes simples, dobles o triple de los receptores de catecoles Cir, Fiu y FepA, así como sobre un mutante TonB. Cabe señalar que las estirpes indicadoras eran sensibles a ambas microcinas, por lo que en este caso se ensayó la cepa RYC1000(pEX100::Tn5 76), incapaz de producir MccH47. Ésta generó halos de antibiosis sobre todas las estirpes indicadoras, excepto sobre el triple mutante Cir, Fiu y FepA y sobre la estirpe deficiente para la vía TonB (datos no mostrados). De esta forma, se comprobó que la MccI47 ingresaba en las células susceptibles por la vía de captación de los catecoles.

Por lo tanto, las microcinas H47 e I47 compartieron una misma vía de maduración que determinó que ambas utilizaran la misma vía de captación para ingresar en las células. Apareciendo los catecoles como moléculas clave en estos dos aspectos, proponemos denominar “estrategia catecol” al recurso empleado por estos antibióticos para su síntesis y captación.

4.4. Existe un dominio de captación en el péptido antibiótico MccH47

Considerando que en la estrategia catecol la etapa de maduración implicaría modificaciones postraduccionales del péptido precursor, cabía suponer que existiese una

región en los péptidos precursores que fuera reconocida por la maquinaria de modificación. Se trataría entonces de un dominio dedicado a hacer posible la captación antibiótica. En esta etapa nos abocamos a identificar dicho dominio.

Si este dominio existiera, tendría que estar presente en todas las microcinas que utilizan la estrategia catecol. Si bien esta última se definió en base a las microcinas H47 e I47, se conocían otras dos microcinas, E492 y M, que también eran captadas por la vía de los catecoles y que por datos genéticos parecían estar muy emparentadas con las anteriores (Lagos et al., 2001; Patzer et al., 2003). Se realizó entonces un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los péptidos precursores de MccH47, MccE492, MccM y MccI47 (Fig. 4.8). Este análisis mostró dos regiones de homología, situadas en los extremos amino y carboxilo de los péptidos. En la porción N-terminal se encontró el péptido señal ABC donde reside el dominio de secreción (Havarstein et al., 1994; Rodríguez et al., 1999). La porción C-terminal presentó una gran riqueza en glicinas y serinas y supusimos que podía corresponder a un dominio de captación. Si así fuera, en esta región se efectuarían las modificaciones postraduccionales sobre los péptidos precursores que les conferirían la capacidad de ser captados por la vía de los catecoles.

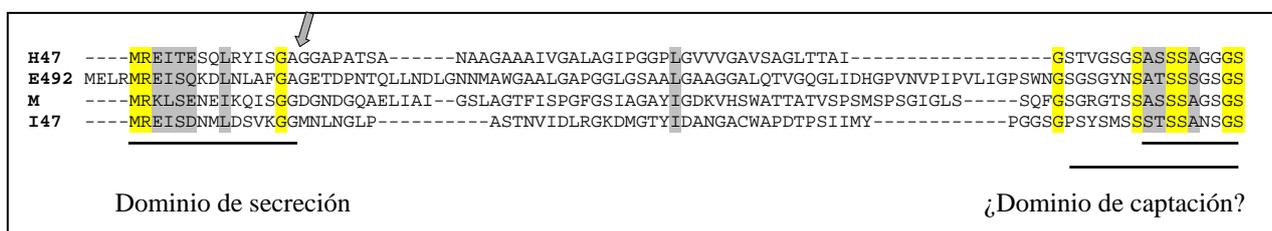


Figura 4.8. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los péptidos precursores de MccH47, MccE492, MccM y MccI47. Se realizó con el programa Multalin (Combet et al., 2000). Los residuos idénticos se pintan en amarillo y los conservados en gris. Se señalan con líneas los dominios N-terminal de secreción y el posible dominio C-terminal de captación, este último con dos extensiones tentativas. Se señala con una flecha el sitio de corte consenso del péptido señal de tipo ABC.

Para probar la hipótesis planteada, se pensó en hacer construcciones híbridas entre dos antibióticos peptídicos, uno de ellos MccH47. El otro antibiótico debía presentar distinta secuencia C-terminal, distinta estrategia de síntesis y distinta vía de ingreso a las células susceptibles. El diseño consistiría en añadir a este último antibiótico la porción C-terminal del péptido MccH47 y luego analizar si esta adición determinaba la adquisición de la estrategia catecol para su síntesis y captación. Se eligió entonces otra microcina, la colicina V (ColV), que cumplía con los requisitos planteados. Se produce como un péptido precursor de 103 aa., denominado CvaC, que

no es modificado más allá de la formación de un puente disulfuro en su porción C-terminal. Luego es secretado por un sistema ABC al tiempo que se procesa en sus 15 aa. N-terminales. ColV es captado por las células susceptibles a través de un único receptor de catecoles, Cir. Al no requerirse modificaciones postraduccionales, el sistema genético ColV es muy sencillo, constando de: el gen de actividad *cvaC*, el gen de inmunidad *cvi*, y los genes de secreción *cvaA* y *cvaB*, homólogos a *mchE* y *mchF* del sistema MccH47. En cuanto a su diana de acción, ColV se diferencia de MccH47 en que actúa como ionóforo (Gilson et al., 1987; Gilson et al., 1990; Havarstein et al., 1994). Consideramos entonces que las microcinas ColV y H47 serían paradigmas de dos estrategias de síntesis y captación: 1) la “estrategia ColV” y 2) la “estrategia catecol”, respectivamente.

Para el diseño experimental se tuvo en cuenta una hipótesis adicional: la existencia de un dominio C-terminal dedicado a la captación antibiótica podía no estar limitada a las microcinas que utilizan la estrategia catecol. En efecto, por ese entonces se describió la secuencia aminoacídica de la microcina L (MccL) que resultó compartir con ColV los 32 últimos residuos en forma altamente conservada, incluyendo las cisteínas para la formación del puente disulfuro (Fig. 4.9) (Pons et al., 2004). Consideramos que dicha región podía ser un dominio de captación en estos antibióticos y que entonces no sería necesaria para la toxicidad. Esta fue la base para parte de nuestro diseño experimental.

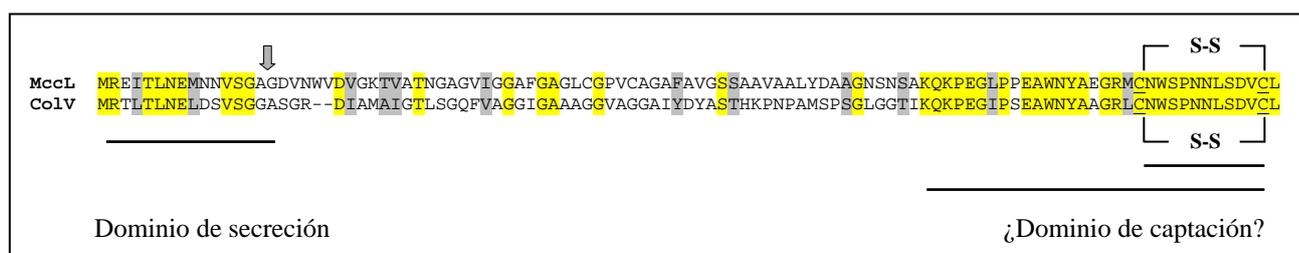


Figura 4.9. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los péptidos precursores de MccL y ColV. Se realizó con el programa Multalin (Combet et al., 2000). Los residuos idénticos se pintan en amarillo y los conservados en gris. Se subrayan las cisteínas que forman el puente disulfuro consignado. Con barras se señalan los dominios N-terminal de secreción y el posible dominio C-terminal de captación, este último con dos extensiones posibles. Se indica con una flecha el sitio de procesamiento ABC durante la secreción.

4.4.1. Construcción de fusiones génicas

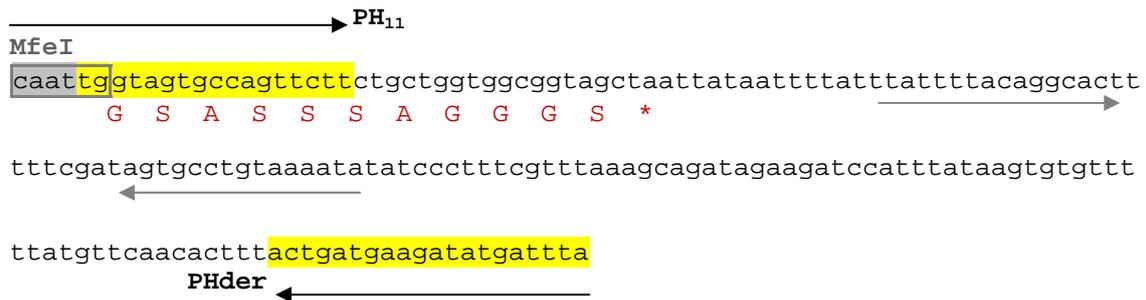
La estrategia experimental consistió en construir fusiones génicas que dieran lugar a péptidos quiméricos ColV-MccH47. Estos péptidos constaron de una “porción

Para la construcción de las fusiones, las porciones esenciales fueron los segmentos de *cvaC* y *mchB* incluidos en las amplificaciones. Se siguió la nomenclatura de indicar el número de codones o de aminoácidos según se hiciera referencia a estos determinantes o a sus productos, respectivamente. Siguiendo el esquema planteado, se amplificaron dos segmentos de DNA codificantes para la porción básica de ColV: uno que abarcó el gen completo *cvaC* sin el codón de terminación, *cvaC*₁₀₃ (Fig. 4.11A), y otro que abarcó la mayor parte de *cvaC*, careciendo de los 13 últimos codones, *cvaC*₉₀ (Fig. 4.11B). ColV₉₀ carecería entonces de la porción C-terminal de ColV, que contiene las dos cisteínas involucradas en el puente disulfuro. Por otro lado, se amplificaron dos fragmentos de diferente extensión que codificaban para la porción terminal de MccH47, uno corto, que correspondió a los 11 últimos codones de *mchB*, *mchB*₁₁ (Fig. 4.11C), y otro más largo, que correspondió a los 18 últimos codones, *mchB*₁₉ (18 del fragmento amplificado más uno que se adicionará al formar la fusión) (Fig. 4.11D). El número de codones consignado no incluyó el codón de terminación.

Todas las amplificaciones se realizaron con oligonucleótidos de síntesis que cumplieron con los siguientes requerimientos: 1) poseer secuencia complementaria a los extremos de la región a amplificar, 2) incluir un sitio de restricción (MfeI) que permitiera posteriormente la unión de fragmentos para la formación de las fusiones génicas, y 3) prever el mantenimiento de la fase de lectura entre las dos porciones que formarían luego cada una de las fusiones, añadiendo un nucleótido cuando fue necesario. Para el cumplimiento de los dos últimos requerimientos se tuvo también en cuenta que los codones adicionales que se crearan en el sitio de unión codificaran para aminoácidos hidrofóbicos (Fig. 4.12).

Una vez obtenidos los fragmentos de amplificación, se clonó cada uno de ellos en un vector de elevado número de copias (pUC13) y los plásmidos recombinantes se introdujeron en células de *E. coli* K12, según se describe en Materiales y Métodos. En el caso de los clones portadores de los segmentos codificantes para las porciones básicas ColV se observó un crecimiento muy lento, con importante inestabilidad genética (sobrecrecimientos). Es por ello que se clonaron nuevamente estos fragmentos en un vector plasmídico de menor número de copias, según se describe en Materiales y Métodos. En este caso, se obtuvieron estirpes con buen crecimiento, estables, con las que se continuó trabajando. Los clones portadores de los segmentos codificantes para las porciones terminales MccH47 clonados en pUC13 presentaron buen crecimiento.

C.



D.

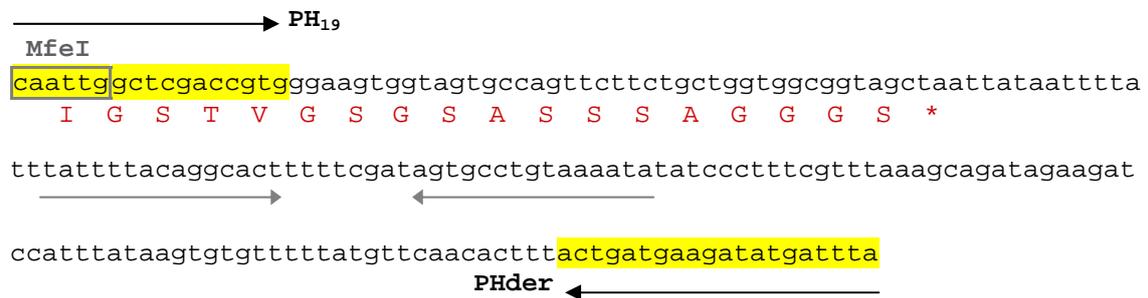


Figura 4.11. Fragmentos de amplificación para la construcción de fusiones génicas. Se muestra la secuencia nucleotídica de los segmentos de DNA amplificados por PCR de los sistemas ColV (**A** y **B**) y MccH47 (**C** y **D**). Se indica con flechas la extensión y dirección de los oligonucleótidos cebadores usados. Se pintan en colores las secuencias de DNA de los segmentos amplificados correspondientes a los oligonucleótidos: en amarillo secuencia del sistema antibiótico, en gris el sitio de restricción MfeI y en celeste el nucleótido adicionado para mantener el marco abierto de lectura de las futuras fusiones génicas. En los fragmentos del sistema ColV, se subraya con verde la región promotor-operador y dentro de ésta se recuadra la caja Fur. En los fragmentos del sistema MccH47, se señala con un asterisco rojo el codón de terminación de *mchB* y con flechas grises el repetido invertido que corresponde al terminador transcripcional. Debajo de la secuencia nucleotídica se indican las secuencias aminoacídicas: en negro la de la proteína de inmunidad a ColV, Cvi; en azul la de ColV₁₀₃ (**A**), ColV₉₀ (**B**); y en rojo la de H47₁₁ (**C**) y H47₁₉ (**D**).

2) Construcción de las fusiones génicas. Se construyeron las fusiones génicas que codificaban para las quimeras ColV₁₀₃-H47₁₁, ColV₁₀₃-H47₁₉, ColV₉₀-H47₁₁ y ColV₉₀-H47₁₉ (Fig. 4.12). Los plásmidos recombinantes portadores de *cvaC*₁₀₃ y *cvaC*₉₀ se digirieron con MfeI y PstI y se ligaron a fragmentos MfeI-PstI que contenían los determinantes *mchB*₁₁ y *mchB*₁₉. De esta forma, se obtuvieron los plásmidos portadores de las fusiones: *cvaC*₁₀₃-*mchB*₁₁, *cvaC*₁₀₃-*mchB*₁₉, *cvaC*₉₀-*mchB*₁₁ y *cvaC*₉₀-*mchB*₁₉. En las construcciones con *mchB*₁₁ se añadieron dos codones en el sitio de unión (Fig. 4.12). Los plásmidos portadores de las fusiones se introdujeron en células de *E. coli* K12 y los clones resultantes presentaron buen crecimiento. Se corroboró la estructura de los plásmidos por análisis físico y se confirmaron las cuatro fusiones génicas por secuenciación nucleotídica. Se corroboró también que todos los clones fueron inmunes a ColV.

Una vez construidas las fusiones, éstas debían ser analizadas funcionalmente para determinar si codificaban para una actividad antibiótica y en qué condiciones ésta tenía lugar. Para ello, era necesario introducir los plásmidos portadores de las fusiones en distintos contextos genéticos que involucraban otros plásmidos recombinantes. Por lo tanto, fue necesario tener en cuenta las compatibilidades plasmídicas. Atendiendo a estos requerimientos, los insertos que contenían *cvi* y las fusiones génicas se clonaron en el vector plasmídico pBR322, según se describe en Materiales y Métodos. De esta forma, no hubo incompatibilidad entre los plásmidos portadores de las construcciones híbridas (replicón pMB1) y los plásmidos que generaron los distintos contextos genéticos ensayados (replicón p15A). Los nuevos plásmidos portadores de las fusiones recibieron los siguientes nombres: pFC103-11, pFC103-19, pFC90-11 y pFC90-19, siguiendo la nomenclatura numérica de las correspondientes fusiones.

4.4.2. Análisis de la producción antibiótica de las estirpes portadoras de las fusiones génicas

Nos abocamos a dilucidar si los péptidos quiméricos podían tener actividad antibiótica en algún contexto genético. Todos los ensayos de producción antibiótica se realizaron en condiciones de deprivación de hierro, adicionando DPP a las placas. De esta forma, se indujo la expresión de las fusiones génicas ya que éstas mantenían la región promotor-operador del operón *cvicvaC*, donde se encuentra la caja Fur (Fig. 4.12).

2. *cvaC*₁₀₃-*mchB*₁₉

cja Fur

cctcctacccttcactc ttgactatg ttaacgataatcattatc gtttagtgtttggtggtgaatgggat
 agaaagtaatgggataaaaagtaatggatagaaaaagaacaaaattagagttggttatttgcatttataat
 M D R K R T K L E L L F A F I I
 aaatgccaccgcaatatattgcatagctatatatgattgtgttttttagaggaaaggactttttatcc
 N A T A I Y I A L A I Y D C V F R G K D F L S
 atgcatacattttgcttctctgcattaatgtctgcaatatgttactttgttggtgataattattattcaa
 M H T F C F S A L M S A I C Y F V G D N Y Y S
 tatccgataagataaaaaggagatcatatgagaactctgactctaaatgaattagattctgtttctggtg
 I S D K I K R R S Y E N S D S K -
 M R T L T L N E L D S V S G
 gtgcttcagggcgtgatattgcgatggctataggaacactatccgggcaatttggtgcaggaggaattgg
 G A S G R D I A M A I G T L S G Q F V A G G I G
 agcagctgctgggggtgtggctggaggtgcaatatatgactatgcatccactcaciaacctaatacctgca
 A A A G G V A G G A I Y D Y A S T H K P N P A
 atgtctccatccggtttagggggaacaattaagcaaaaacccgaagggataccttcagaagcatggaact
 M S P S G L G G T I K Q K P E G I P S E A W N
 MfeI
 atgctgcgggaagattgtgtaattggagtccaaataatc ttagtgatg tttgtttag caattg gctcgac
 Y A A G R L C N W S P N N L S D V C L A I G S T
 cgtg ggaagt ggtagtgccagttcttctgctggtggcggtagctaattataattttatttttacagg
 V G S G S A S S S A G G G S *
 cactttttcgatagtgctgtaaaatataatccctttcgtttaaagcagatagaagatccatttataagtg
 → ←
 tgtttttatggttcaacacttt actgatgaagatatgattta

3. *cvaC₉₀-mchB₁₁*

cja Fur

cctcctacccttcactcttgactat**g**tt**aa**cgataatcattat**c**ggttagtggttggtggtggaatgggat
 agaaagtaatgggataaaaaagtaatggatagaaaaagaacaaaattagagttggttatttgcatttataat
 M D R K R T K L E L L F A F I I
 aaatgccaccgcaatataatattgcattagctatatatgattgtggttttagaggaaaggactttttatcc
 N A T A I Y I A L A I Y D C V F R G K D F L S
 atgcatacattttgcttctctgcattaatgtctgcaatatgttactttggttggtgataattattattcaa
 M H T F C F S A L M S A I C Y F V G D N Y Y S
 tatccgataagataaaaaaggagatcatatgagaactctgactctaaatgaattagattctgtttctgggt
 I S D K I K R R S Y E N S D S K -
 M R T L T L N E L D S V S G
 gtgcttcagggcgtgatattgcatggctataggaacactatccgggcaatttgttgcaggaggaattgg
 G A S G R D I A M A I G T L S G Q F V A G G I G
 agcagctgctgggggtgtggctggaggtgcaatataatgactatgcatccactcaciaaacctaactcctgca
 A A A G G V A G G A I Y D Y A S T H K P N P A
 atgtctccatccggtttagggggaacaattaagcaaaaacccgaagggataccttcagaagcatggaact
 M S P S G L G G T I K Q K P E G I P S E A W N
MfeI
atgctgcgggaagattggcaat**g**gtagtgccagttcttctgctggtggcggtagctaattataatttta
 Y A A G R L A I G S A S S S A G G G S *
 tttattttacaggcactttttcgatagtgctgtaaaaatataatccctttcgtttaagcagatagaagat
 → ←
 ccatttataagtgtggtttttatggttcaacacttt**actgatgaagatatgattta**

En primer lugar, estirpes derivadas de RYC1000 portadoras de los plásmidos con las fusiones se ensayaron para su capacidad de producir antibiótico. Ninguna de ellas generó halos de antibiosis (Fig. 4.13A). A continuación se ensayó la producción en dos contextos genéticos correspondientes a las dos estrategias, ColV y catecol.

1) Producción antibiótica según la estrategia ColV. Considerando que la producción natural de ColV se basa en la síntesis del péptido antibiótico y su secreción por un sistema ABC, la producción de las quimeras se ensayó en un contexto que incluyó los determinantes para la exportación ABC. Por razones de diseño experimental, convenía utilizar el sistema exportador MccH47 en lugar del de ColV. Para probar si esta secreción heteróloga ocurría, se ensayó primero la capacidad del sistema exportador de MccH47 para secretar ColV salvaje. Se disponía de un plásmido recombinante (pMVD41) con los genes de secreción *mchE* y *mchF* del sistema MccH47, homólogos a los genes de secreción *cvaA* y *cvaB* del sistema ColV. Este plásmido se introdujo en la estirpe RYC1000(Δ pUY270), portadora de los genes *cvaC* y *cvi*. RYC1000(Δ pUY270, pMVD41) produjo eficientemente actividad ColV, a diferencia de RYC1000(Δ pUY270) que no dio lugar a halos de antibiosis (Fig. 4.13).

Se procedió entonces a analizar la producción antibiótica de las cepas portadoras de las fusiones en presencia de los genes *mchE* y *mchF*. Se utilizó la estirpe indicadora FGB099, resistente a MccH47. Las construcciones que codificaban para los péptidos quiméricos ColV₁₀₃-H47₁₁ y ColV₁₀₃-H47₁₉ generaron halos de 4 a 5 mm de diámetro mientras que las codificantes para ColV₉₀-H47₁₁ y ColV₉₀-H47₁₉ no produjeron halos (Fig. 4.13A). Para corroborar la especificidad antibiótica, la misma prueba se realizó sobre una estirpe inmune a ColV [FGB099(pUY*cvi*)], no observándose la aparición de halos. Estos resultados indicaron que los péptidos quiméricos con la porción básica ColV₁₀₃ tenían actividad antibiótica de especificidad ColV, no requerían modificaciones postraduccionales y se sintetizaban según la estrategia ColV. Por otra parte, los péptidos híbridos de base ColV₉₀ no tenían la actividad antibiótica.

Posteriormente, se analizó la captación de los péptidos quiméricos con actividad antibiótica ColV₁₀₃-H47₁₁ y ColV₁₀₃-H47₁₉. Para ello, las estirpes RYC1000(pMVD41, pFC103-11) y RYC1000(pMVD41, pFC103-19) se picaron sobre un conjunto de cepas de *E. coli* K12 mutantes para los receptores de catecoles. No se observó inhibición del crecimiento sobre los tapices mutantes para el receptor de membrana externa Cir (Fig. 4.14). Por lo tanto, las actividades antibióticas utilizaron la vía de captación

determinada por la estrategia ColV, ingresando a las células susceptibles a través de un único receptor de catecoles, Cir.

2) Producción antibiótica según la estrategia catecol. Se ha determinado que la producción de MccH47 comprende la síntesis del péptido precursor, la maduración del mismo y la posterior secreción de la molécula madura por un sistema ABC. Para la etapa de maduración antibiótica se requiere de los productos de los genes *mchA*, *SI*, *C* y *D* así como de la integridad de la vía Ent. De esta forma, se le imprimen modificaciones postraduccionales al péptido precursor que determinan la captación del antibiótico por la vía de los catecoles. En cuanto a la secreción, son necesarios los productos de los genes *mchE* y *mchF*. Se introdujeron entonces los plásmidos portadores de las fusiones en RYC1000(pEX100), un contexto genético eficiente para la síntesis de enterobactina (Ent⁺) y que contenía el sistema MccH47 entero. Al utilizar la estirpe MccH47^R FGB099 como indicadora, sólo se observaría actividad antibiótica de especificidad ColV. En este contexto, ColV₁₀₃-H47₁₁ y ColV₁₀₃-H47₁₉ produjeron halos de entre 3 y 4 mm de diámetro, y ColV₉₀-H47₁₁ y ColV₉₀-H47₁₉ generaron halos de ca. 12 mm y 14 mm de diámetro, respectivamente (Fig. 4.13B). Analizada la producción sobre FGB099(pUY*cvi*), una estirpe resistente a MccH47 e inmune a ColV, no se observó ningún halo, corroborando la especificidad antibiótica ColV de las producciones. Por lo tanto, la capacidad deletérea ColV se manifestó ahora en los péptidos híbridos de base ColV₉₀, que carecían de los 13 aa. C-terminales de CvaC. Además, la actividad antibiótica de los péptidos de base ColV₉₀ dependió de la presencia del sistema MccH47, sugiriendo que estos péptidos se modificarían según la estrategia catecol.

Para probar el enrolamiento de los péptidos quiméricos en la estrategia catecol, se procedió a ensayar los requerimientos correspondientes. Teniendo en cuenta que en presencia del sistema MccH47 la actividad de los péptidos híbridos de base ColV₁₀₃ disminuyó sensiblemente, este análisis sólo se realizó para ColV₉₀-H47₁₁ y ColV₉₀-H47₁₉. Es así que se evaluó la necesidad de los genes de modificación, de secreción y de la vía Ent. En primer lugar, los plásmidos portadores de las fusiones se introdujeron en un conjunto de estirpes de base RYC1000 portadoras de derivados de pEX100 con mutaciones en cada uno de los genes de síntesis (*mchA*, *SI*, *B*, *C*, *D*) y en uno de secreción (*mchE*). Las estirpes resultantes se ensayaron para su capacidad de producir antibiótico sobre un tapiz de FGB099 (Fig. 4.13B). No se observaron halos en los contextos deficientes para la síntesis de MchA, MchC, MchD y MchE. Sin embargo, en el mutante para *mchB*, ColV₉₀-H47₁₁ y ColV₉₀-H47₁₉ generaron halos de unos 11 mm

de diámetro y en el mutante para *mchS1* produjeron halos de entre 12 y 14 mm. Por lo tanto, la producción antibiótica de estos péptidos híbridos tuvo los mismos requerimientos de modificación y secreción que la MccH47. En este sentido, todos los ensayos de producción se realizaron también sobre la estirpe MC4100(pUY*cvi*) para detectar actividad MccH47, la que se manifestó por la generación de halos de antibiosis en aquellos contextos que aseguraban su síntesis y secreción (datos no mostrados). Cabe señalar que, en todos los casos, la quimera ColV₉₀-H47₁₉ determinó la producción de halos algo más grandes que los correspondientes a la quimera ColV₉₀-H47₁₁.

Faltaba evaluar el requerimiento de la vía Ent. Antes que nada, se determinó que esta vía no era necesaria para producir ColV salvaje. Se confirmó que esto era así transformando la estirpe Ent⁻ FGB103 con el plásmido pUY270 y ensayando su capacidad de producir ColV: FGB103(pUY270) generó halos de tamaño similar a los producidos por la estirpe control Ent⁺ MC4100(pUY270). Posteriormente, los plásmidos portadores de las fusiones de base ColV₉₀ se introdujeron en la estirpe FGB103(pEX100) y se ensayaron para su capacidad de producir antibiótico. Como era esperado, las quimeras no produjeron halos de antibiosis (datos no mostrados). Por lo tanto, la actividad antibiótica de los péptidos de base ColV₉₀ fue estrictamente dependiente de la integridad de la vía Ent.

En suma, los resultados indicaron que las quimeras ColV₉₀-H47₁₁ y ColV₉₀-H47₁₉ fueron susceptibles de ser modificadas según la estrategia catecol y luego secretadas por el sistema ABC de la MccH47. Estas modificaciones deberían entonces determinar la captación de estos antibióticos quiméricos por cualquiera de los tres receptores de catecoles de *E. coli* K12.

Se analizó la vía de captación de los antibióticos quiméricos de base ColV₉₀ producidos según la estrategia catecol. Para ello, se realizaron ensayos de producción utilizando como indicadoras estirpes mutantes para los receptores de catecoles Cir, Fiu y FepA. Teniendo en cuenta que dichas estirpes son sensibles tanto a ColV como a MccH47, los plásmidos portadores de las fusiones se introdujeron en RYC1000(pEX100::Tn5 76), contexto deficiente para la producción de MccH47. Se observaron halos de antibiosis sobre aquellas cepas que poseían indemne cualquiera de los tres receptores para catecoles mientras que el triple mutante de receptores fue totalmente resistente (Fig. 4.14). Por lo tanto, las actividades antibióticas utilizaron la vía de captación determinada por la estrategia catecol, i.e. ingresaron a las células susceptibles a través de cualquiera de los receptores para catecoles, Cir, Fiu o FepA.

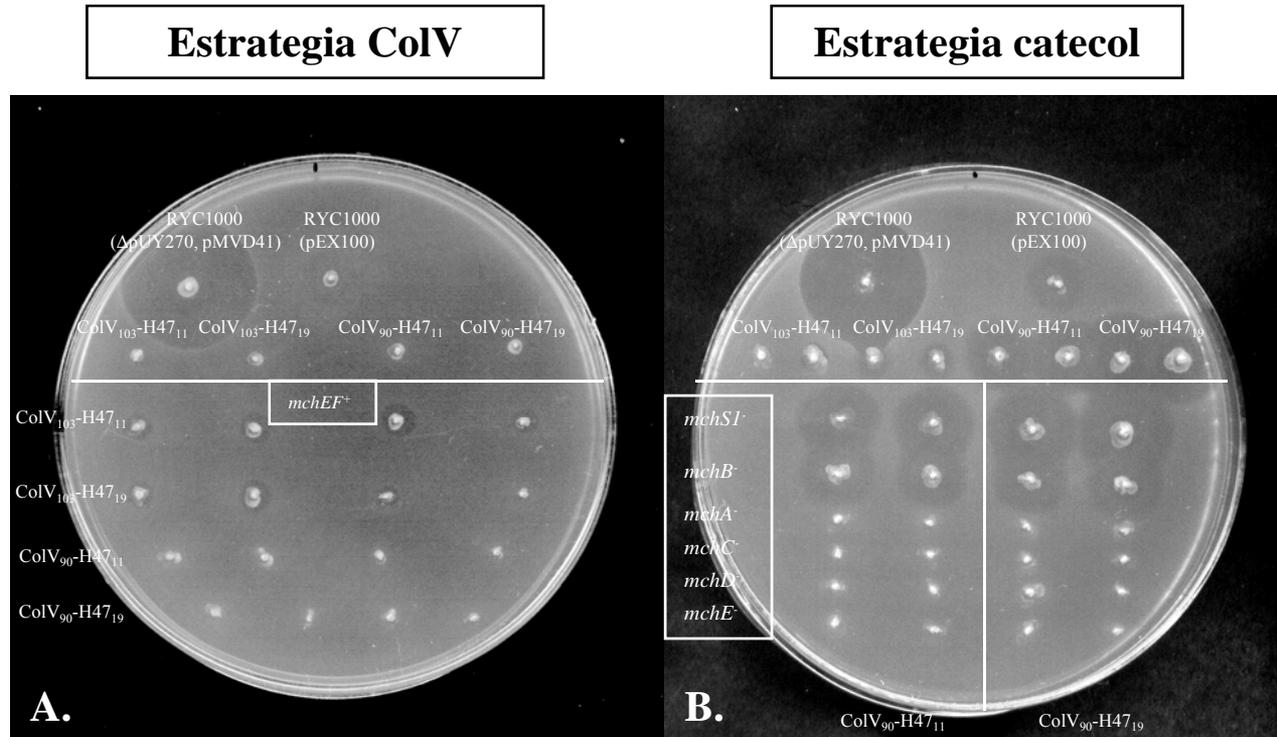


Figura 4.13. Actividad antibiótica de los péptidos quiméricos ColV-MccH47 según las estrategias ColV y catecol. Ensayo de producción antibiótica sobre placas de medio mínimo suplementadas con DPP y sembradas con un tapiz de FGB099. Arriba se muestran las cepas control. Abajo, picadas de cepas experimentales, todas derivadas de RYC1000. **A)** Picadas de las estirpes productoras de las quimeras: en la línea superior, solas; en el resto de la placa, en presencia de los genes de secreción *mchEF* del sistema MccH47 (pMVD41) (cuatro picadas por cepa). **B)** En la línea superior, picadas de las estirpes productoras de las quimeras en presencia del sistema MccH47 (pEX100) (dos picadas por cepa). En el resto de la placa, picadas de las estirpes portadoras de las fusiones para péptidos de base ColV₉₀ en los contextos genéticos mutantes del sistema MccH47 consignados (dos picadas por cepa).

5. DISCUSIÓN

La secuencia nucleotídica del sistema MccH47 y de sus regiones flanqueantes de la cepa *E. coli* H47 exhibió las características típicas del llamado “genoma flexible”; esencialmente, distinto contenido G+C con respecto al promedio del genoma de *E. coli* K12 (Blattner et al., 1997) y ausencia de secuencias pertenecientes al genoma básico. Conociendo que el sistema MccH47 se localiza en el cromosoma bacteriano (Laviña et al., 1990), se deduce entonces que integra una isla genómica. En efecto, en los análisis comparativos, la secuencia analizada exhibió una alta identidad con islas genómicas de distintas cepas de enterobacterias. Más aún, varias de estas islas han sido catalogadas como islas de patogenicidad, destacándose la isla de patogenicidad *serX* de la cepa uropatógena *E. coli* CFT073 (Welch et al., 2002). Además, estos análisis sugirieron una estructura en mosaico dentro de la secuencia analizada, típica del genoma flexible, puesto que los perfiles de similitud fueron distintos para el sistema MccH47 y para cada una de sus regiones flanqueantes. Las secuencias *mch* se encontraron limitadas por un extenso repetido directo que parece señalar los extremos de una unidad genética. Las islas genómicas suelen presentar estructuras de este tipo en sus extremos, las que se interpretan como el resultado de la integración de la isla en el cromosoma bacteriano (Hacker & Kaper, 2000). El conjunto de estos datos indica que el sistema genético MccH47 está integrando una isla genómica de la cepa *E. coli* H47, que tal vez esta isla sea de patogenicidad y que el sistema MccH47, comprendido entre los repetidos directos, sería una pequeña isla dentro de una isla mayor. Esta pequeña isla *mch* podría ser un elemento genético capaz de movilizarse en bloque de un replicón a otro y, de esta forma, transferirse de una cepa a otra. Tales posibilidades son características del genoma flexible, formado por estructuras dinámicas en constante adquisición, pérdida y reorganización de genes (Hacker & Carniel, 2001; Dobrindt et al., 2004).

El sistema MccH47 se halló en otras cuatro cepas de *E. coli* (CA46, CA58, CFT073 y Nissle 1917) (Welch et al., 2002; Patzer et al., 2003; Grozdanov et al., 2004). En ninguna de ellas se encontró el repetido directo, ya sea porque los datos de secuencia no se extendieran lo suficiente (CA46 y CA58) o porque, aunque las secuencias dilucidadas fueron muy extensas, los repetidos no estaban (CFT073 y Nissle 1917). Cabe señalar que en estas dos últimas cepas los genes para la antibiosis MccH47 se encuentran en una isla de unas 97 kb, idéntica en los dos organismos. En la cepa

uropatógena CFT073, esta isla ha sido catalogada como isla de patogenicidad mientras que en la cepa Nissle 1917, comercializada como probiótico, ha sido descrita como isla genómica. A diferencia de CA46 y CA58, en CFT073 y Nissle 1917 los genes MccH47 están distribuidos en dos loci dentro de la misma isla: los genes de tipo *iroB* e *iroD* se hallan integrando el locus *iroA* y los genes restantes están agrupados en un locus *mch* separado del anterior por unas 15 kb (Welch et al., 2002; Grozdanov et al., 2004). Presumimos que esta disposición de los genes MccH47 corresponde a un estadio evolutivo anterior al alcanzado en las cepas H47, CA46 y CA58, en las que estos genes se han compactado en un único sistema. Esto hace pensar que CFT073 y Nissle 1917 en algún momento adquirieron el locus *mch* y que éste alcanzó funcionalidad gracias a la cooperación del locus *iroA* residente, que aportó los productos de los genes *iroB* e *iroD* para la producción antibiótica. De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito que la cepa Nissle 1917 es poco eficiente para la producción de MccH47, siendo esta última de difícil detección (Grozdanov et al., 2004). Seguramente, la compactación de todos los genes para la antibiosis MccH47 en un único locus implique, más allá de su agrupamiento físico, el reclutamiento de los genes *iroBD* para integrar un circuito regulatorio dedicado a la eficiente producción antibiótica.

En este trabajo se encontró que existe una relación entre la síntesis del antibiótico MccH47 y la de sideróforos de tipo catecol. En principio, cuatro líneas de evidencia sostienen esta vinculación: 1) la presencia del sistema genético MccH47 determina que las cepas que lo contienen hiperproduzcan enterobactina; 2) la vía de síntesis de enterobactina es necesaria para la producción de MccH47; 3) el sistema MccH47 contiene genes homólogos de *iroB* e *iroD*, y 4) la MccH47 utiliza para su captación en *E. coli* K12 cualquiera de los tres receptores de catecoles Cir, Fiu o FepA.

Se demostró que el gen *entF*, enzima responsable del ensamblaje final de la enterobactina (Crosa & Walsh, 2002), es necesario para la producción de MccH47. Por lo tanto, si bien no se analizó el requerimiento de otras enzimas de la vía Ent, este resultado sugiere que la propia molécula de enterobactina estaría involucrada en alguna de las etapas de la producción de MccH47. Se pudo descartar la participación de la vía Ent en la síntesis del precursor peptídico MchB así como en la secreción de MccH47. En el proceso de producción antibiótica sólo resta la etapa de maduración, por la que se imprimirían modificaciones postraduccionales al péptido precursor. Consideramos entonces que la vía Ent podría aportar un grupo catecol para la síntesis antibiótica en esta etapa. Se había determinado anteriormente que las modificaciones

postraduccionales confieren al antibiótico la capacidad de ingresar en las células (Rodríguez et al., 1999), de modo que ahora proponemos que el supuesto componente catecol sería responsable de la captación antibiótica a través de los receptores de catecoles.

Otro elemento importante en la discusión de estos aspectos es la presencia de los genes *iroB* (*mchA*) e *iroD* (*mchSI*) en el sistema MccH47. En 2003 se describió que el locus *iroA* era un sistema genético para la síntesis y captación de unos sideróforos de tipo catecol que se denominaron salmoquelinas. Este locus es un integrante permanente del cromosoma de *S. enterica* y también se le ha encontrado en el cromosoma de algunas cepas de *E. coli*, frecuentemente uropatógenas (Hantke et al., 2003; Grozdanov et al., 2004). La estructura de las salmoquelinas ha sido recientemente determinada: se trata de derivados C-glucosilados de enterobactina, con una, dos o tres glucosas adicionadas a los anillos catecol. También se han observado derivados lineales de estas estructuras en los sobrenadantes de los cultivos (Fig. 5.1). Se ha postulado que la producción de salmoquelinas sería un factor de virulencia: el carácter hidrofílico de estos sideróforos impediría su secuestro por parte de las defensas del huésped, con lo que el microorganismo podría adquirir el hierro necesario para progresar en la infección. La síntesis de salmoquelinas depende únicamente de la glucosiltransferasa IroB, que adiciona glucosa a enterobactina. A juzgar por datos de secuencia, IroD sería una esterasa de enterobactina y, seguramente, también de salmoquelinas, pero su función específica permanece en el terreno de las hipótesis (Bister et al., 2004; Fischbach et al., 2005).

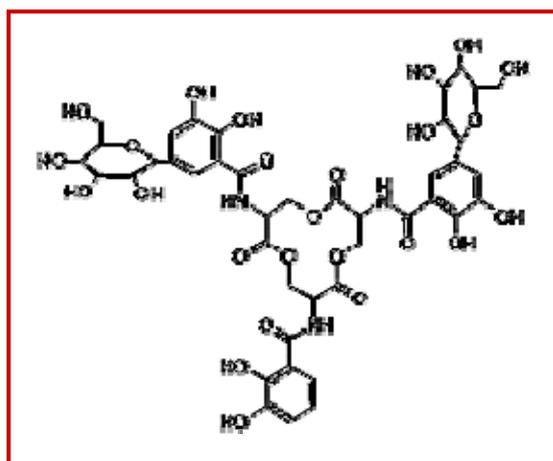


Figura 5.1. Samoquelina diglucosilada. Forma más abundantemente producida.

Cabe suponer entonces que en el fenómeno MccH47, el homólogo de IroB, MchA, está encargado de producir salmoquelinas, siendo este aporte indispensable para la síntesis antibiótica. Por el contrario, el homólogo de IroD, MchS1, ha resultado ser prescindible en este sentido. Se presentan aquí, por primera vez, datos experimentales acerca de la función de un miembro de la familia IroD: la introducción de *mchS1* en un contexto hiperproductor de enterobactina determinó una drástica reducción de la cantidad de sideróforo detectado. Se observó un efecto similar cuando se empleó *fes* en vez de *mchS1*, indicando que ambos productos génicos actuarían de manera similar, i.e. MchS1 sería capaz de hidrolizar enterobactina y ambos, MchS1 y Fes, lo harían antes que la molécula fuera secretada. Consideramos altamente probable que ambas enzimas hidrolicen salmoquelinas y que IroD esté especialmente orientado a actuar sobre estos compuestos. Nos preguntamos entonces cómo participaría IroD en el fenómeno MccH47. Si bien un mutante nulo en *mchS1* es capaz de producir MccH47, cabe señalar que esta prueba siempre se realizó en un contexto *fes*⁺, por lo que *fes* podría haber complementado para la producción antibiótica. La prueba en células *ent*⁺ *fes*⁻ no ha sido posible pues se trata de un contexto inviable (Azpiroz & Laviña, 2004). No podemos descartar entonces que MchS1 -eventualmente asistido por Fes- participe en la síntesis de MccH47. Si la maduración antibiótica implica la adición de una molécula de salmoquelina al péptido precursor, la contribución de MchS1 podría consistir en linearizar dicha salmoquelina. En este sentido, se ha dilucidado recientemente la estructura de la MccE492, consistente en un péptido unido por su extremo C-terminal a la glucosa de una salmoquelina trimérica lineal (Thomas et al., 2004). De todas formas, no podemos descartar que la MccH47 sea en realidad una mezcla de moléculas que difieran en la salmoquelina que tienen adicionada. Esta posibilidad podría explicar que el antibiótico sea capaz de utilizar los tres receptores Cir, Fiu y FepA, de los que se conoce que tienen afinidades diferenciales por los distintos catecoles (Hantke, 1990; Nikaido & Rosenberg, 1990).

Otro hallazgo interesante que vinculó la MccH47 a la enterobactina fue la promoción ejercida por MchS4 de la síntesis de este sideróforo. Si bien desconocemos aún a qué nivel se ejercería esta regulación, presumimos que su acción asegura una suficiente producción de enterobactina como para abastecer ambas funciones: captación de hierro y producción antibiótica. Más aún, el efecto de MchS4 se mantuvo, aunque disminuido, en condiciones de alta disponibilidad de hierro, lo que podría explicar que los tamaños de los halos MccH47 no variaran en estas condiciones. Se podría especular

sobre un efecto amortiguador (“buffer”) de MchS4 para garantizar la eficiente producción antibiótica en distintas condiciones de disponibilidad de hierro.

En base a estos resultados y consideraciones, se propone el siguiente modelo de síntesis de MccH47 (Fig. 5.2). Por un lado, se sintetiza ribosómicamente el péptido precursor de 75 aminoácidos, MchB. Por otro lado, MchS4 promueve la síntesis de enterobactina y parte del sideróforo producido es glucosilado por la acción de MchA, transformándose en salmoquelina. Posteriormente, se adiciona salmoquelina al péptido MchB, proceso probablemente realizado por los productos de los genes *mchC* y *mchD*, necesarios para la maduración de MccH47. Se forma así el antibiótico maduro con una porción peptídica, donde reside la actividad tóxica, y una porción catecol, que le otorga la capacidad de ingresar en las células susceptibles por la vía de los catecoles. Cabe la posibilidad de que MchS1 participe en la síntesis de MccH47 linearizando la salmoquelina por hidrólisis de uno o más de sus enlaces éster. El hecho que la MccH47 sea capaz de ingresar por los receptores Cir y Fiu, que no operan con la enterobactina cíclica y supuestamente tampoco con las salmoquelinas cíclicas, parece indicar que podrían existir eventos de linearización del grupo catecol. Por lo tanto, la MccH47 se sintetizaría según un esquema dual, combinando la síntesis ribosómica de su péptido precursor con la síntesis enzimática de una molécula de tipo catecol. A este modo de síntesis, que determina la captación antibiótica por la vía de los catecoles, lo denominamos “estrategia catecol”.

En este trabajo se pudo determinar que la estrategia catecol es un recurso de síntesis antibiótica utilizado no sólo por la MccH47 sino también por la MccI47, siendo ambas codificadas desde el sistema MccH47. Cada uno de estos dos fenómenos de antibiosis está en principio determinado por una pareja de genes de actividad-inmunidad, en la que reside la especificidad antibiótica. A partir de allí su producción converge en una misma vía de maduración y secreción. Coherentemente, la MccI47 cumple la estrategia catecol en todos sus aspectos, siendo captada por los receptores de catecoles Cir, Fiu y FepA.

Se encontró entonces que la cepa *E. coli* H47 tiene el potencial de producir dos antibióticos, MccH47 y MccI47. Los determinantes para esta última se buscaron en los sistemas MccH47 de otras cepas, encontrándose indemnes en CA46, en proceso de desaparición en CA58 y ausentes en Nissle 1917 y CFT073. Estas observaciones parecen señalar la gran plasticidad genética de estos sistemas antibióticos, que adquirirían y perderían información para producir diversos antibióticos, en un constante

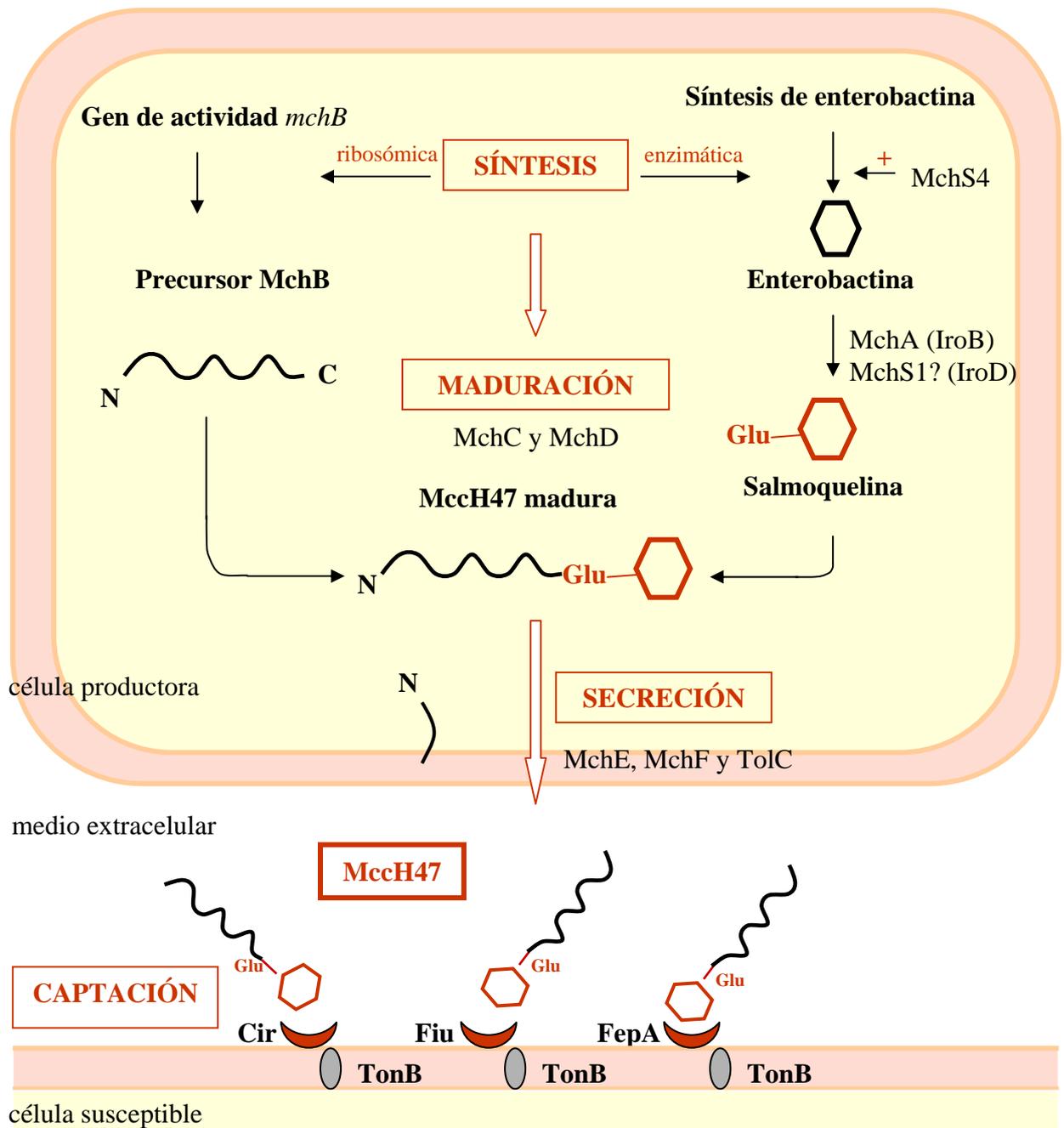


Figura 5.2. Modelo de síntesis y captación de MccH47 según la estrategia catecol.

proceso de prueba y error. Algo similar estaría pasando con los determinantes para MccM, presentes en todas estas cepas y en desaparición en H47. Nos preguntamos entonces qué ventaja podría otorgar a *E. coli* H47 la producción de dos antibióticos. Siendo que la MccI47 se produce en condiciones de deprivación de hierro, situación que no afecta la producción de MccH47, cabe suponer que refuerce la acción deletérea de la MccH47 en ambientes limitados en este metal. Al compartir la estrategia catecol, ambas microcinas atacarían un mismo tipo de bacterias, i.e. aquellas Gram negativas que posean receptores para catecoles. Sin embargo, una vez en el interior celular, cada antibiótico se diferenciaría por su blanco de acción: aunque no se identificó la diana de la MccI47, sí se pudo determinar que no actúa sobre la ATP sintetasa, blanco de acción de la MccH47. Considerando que los halos de antibiosis MccI47 son sumamente turbios a las 24 horas de incubación e incrementan su claridad a lo largo de los días, resulta necesario pensar que la acción antibiótica culmina con la lisis celular. Teniendo en cuenta que el medio interno de los animales superiores es uno de los ambientes más pobres en hierro, se podría especular que la MccI47 esté dedicada a incidir en la capacidad de *E. coli* H47 de colonizar e invadir este nicho. Es así que no descartamos que la doble producción antibiótica, de MccH47 y de MccI47, sea un fenómeno involucrado en la eventual patogenicidad del microorganismo.

En este trabajo se describe una nueva estrategia de síntesis antibiótica que se basa en la adición de un grupo catecol a un péptido tóxico para determinar su captación por la vía de los catecoles. Se encontró en la porción peptídica de estos antibióticos un dominio dedicado a hacer posible esta adición, a cuyo nivel ocurre el reconocimiento y probablemente también la modificación por parte de la maquinaria de maduración antibiótica. Se determinó que los 11 aa. C-terminales del péptido precursor MccH47 son suficientes para enrollar al antibiótico en las dos vertientes de la estrategia catecol, síntesis y captación, identificándose entonces como un dominio de captación. La prueba de ello se alcanzó convirtiendo el péptido antibiótico ColV a la estrategia catecol con la sola adición de dicho dominio. Esto se pudo comprobar en ciertos péptidos quiméricos ColV-MccH47 que debieron ser producidos en presencia del sistema de modificación MccH47 para cumplir la estrategia catecol. Dichas quimeras, con especificidad tóxica ColV y propiedades de captación MccH47, carecían de los 13 aa. C-terminales del péptido ColV. Generaron halos de antibiosis con el tamaño y la definición suficientes como para que la hipótesis sobre el dominio de captación del péptido MccH47 haya quedado probada.

Considerando que las quimeras mencionadas anteriormente mantuvieron la actividad tóxica ColV, se deduce que los 13 aa. C-terminales de ColV no son indispensables para su toxicidad y, más aún, que podrían estar involucrados en otra función. Proponemos que la porción C-terminal de ColV sea un dominio de captación que determine el ingreso del antibiótico por el receptor Cir. Esto explicaría por qué las quimeras ColV₉₀-H47₁₁ y ColV₉₀-H47₁₉ no evidenciaron actividad antibiótica alguna en presencia del aparato de secreción, i.e. en las condiciones requeridas para la estrategia ColV. Coherentemente, las quimeras que contenían todo el péptido ColV (ColV₁₀₃-H47₁₁ y ColV₁₀₃-H47₁₉) produjeron halos de antibiosis en dicho contexto y demostraron ser captadas exclusivamente por el receptor Cir.

Si analizamos las quimeras en cuanto a su capacidad de producir halos de antibiosis, observamos dos tipos de comportamiento dependiendo de la extensión de la porción básica ColV: las de base ColV₁₀₃ sólo siguieron la estrategia ColV y las de base ColV₉₀ se enrolaron exclusivamente en la estrategia catecol. En las primeras estarían presentes los dominios de captación de ColV y de MccH47 y en todos los contextos analizados se impuso la estrategia ColV. Todo parece indicar que las señales de captación interfieren entre sí, predominando el dominio de captación ColV. Por un lado, el dominio de captación MccH47 entorpecería significativamente la interacción entre el dominio de captación ColV y el receptor Cir, explicando así el tamaño tan reducido de los halos de antibiosis; por otro lado, el dominio de captación ColV anularía la funcionalidad del dominio de captación MccH47. Las quimeras de base ColV₉₀ sólo poseen el dominio de captación MccH47, por lo que la única alternativa fue producir antibiótico según la estrategia catecol.

Estos primeros resultados de síntesis antibiótica combinatoria parecen sugerir que la porción C-terminal de los péptidos antibióticos podría estar frecuentemente dedicada a la función de captación. Dicho hallazgo, junto con la previa identificación de un dominio de secreción en varios de estos péptidos (Havarstein et al., 1995; Rodríguez et al., 1999), revela una estructura modular de los mismos. Se trata sin duda de un hecho sorprendente considerando que estos péptidos no suelen alcanzar la centena de aminoácidos. Resta entonces la región central, entre los dominios de secreción y captación, para que allí resida la especificidad antibiótica, i.e. el dominio de interacción con la diana y presumiblemente también con el péptido de inmunidad. Precisamente es en esta región donde los péptidos antibióticos no exhiben similitudes de secuencia.

Por último, discutiremos la posible vinculación entre la producción antibiótica según la estrategia catecol y la patogenicidad bacteriana. Se han acumulado varias observaciones que relacionan la producción de MccH47 con la uropatogenicidad. En primer lugar, la conocida cepa uropatógena CFT073, cuyo genoma ha sido totalmente secuenciado, contiene el sistema genético MccH47 (Welch et al., 2002). En un estudio de su transcriptoma se detectó que el gen estructural para MccH47, *mchB*, duplicaba su expresión cuando el microorganismo se crecía en orina humana (Snyder et al., 2004). Por otra parte, en una búsqueda de secuencias correspondientes a la región de los genes *mchCD* realizada en una amplia colección de cepas de *E. coli* se observó una frecuencia muy alta de las mismas en cepas uropatógenas. Se detectaron mayoritariamente en las de serotipo O6:K5 (97,1%), entre las que se encuentra CFT073. Por el contrario, en cepas causantes de meningitis, sepsis, infecciones intestinales así como en cepas no patógenas las secuencias *mch* aparecieron con una frecuencia de entre 0 y 3,6% según el caso (Grozdanov et al., 2004). Otro dato que aboga en este sentido es la participación de las salmoquelinas en la síntesis antibiótica. La producción de estos sideróforos es actualmente considerada un factor de urovirulencia en *E. coli* (Grozdanov et al., 2004; Valdebenito et al., 2005). En base a todos estos antecedentes, planteamos la posibilidad de que la producción antibiótica según la estrategia catecol pueda ser un factor que contribuya a la uropatogenicidad en *E. coli*. Considerando las características de la estrategia catecol, estos antibióticos serían más efectivos en ambientes pobres en hierro, en los que la producción de los receptores para catecoles estaría inducida, determinando así una mayor susceptibilidad de las bacterias. En este sentido, se ha comprobado que la orina es un ambiente pobre en hierro, lo que sugiere entonces que la producción de este tipo de antibióticos podría ser un elemento importante en las infecciones del tracto urinario (Russo et al., 1999). Por otra parte, una producción antibiótica sólo cobra sentido en ambientes en los que la bacteria encuentra competidores. Se sabe que el tracto urinario es mayoritariamente estéril a excepción de su porción inferior, la uretra. En esta última habitan microorganismos comensales, que eventualmente pueden llegar a generar una infección cuando las defensas del huésped están disminuidas. Consideramos entonces que las microcinas que siguen la estrategia catecol podrían integrar el repertorio de factores de virulencia de las cepas uropatógenas de *E. coli* atacando la flora residente de la uretra e impidiendo que ésta, en una estrategia oportunista, también se enrole en el proceso infeccioso. Aunque las infecciones mixtas del tracto urinario han sido muy poco estudiadas, se ha señalado que *E. coli* ocasiona

infecciones simples y no se le encuentra involucrado en los procesos infecciosos múltiples (Siegman-Igra et al., 1994). Su capacidad de producir microcinas podría explicar estas observaciones.

En conclusión, en este trabajo se dilucidó un nuevo mecanismo de síntesis antibiótica que se ha denominado estrategia catecol. Las semejanzas en un principio señaladas entre la fisiología de los sideróforos y de los antibióticos encuentran en esta estrategia un primer ejemplo de fenómeno mixto entre un péptido tóxico y un grupo catecol. El primero aporta la actividad deletérea y el segundo determina la vía de captación, asegurando entre ambos el mecanismo de acción antibiótica.

6. REFERENCIAS

- Altschul, S.F., W.T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Asensio, C., J.C. Pérez-Díaz, M.C. Martínez y F. Moreno.** 1976. A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**: 7-14.
- Azpiroz, M.F. y M. Laviña.** 2004. Involvement of enterobactin synthesis pathway in production of microcin H47. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **48**: 1235-1241.
- Azpiroz, M.F., E. Rodríguez y M. Laviña.** 2001. The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 969-972.
- Bäumler, A.J., R.M. Tsolis, A.W.M. van der Velden, I. Stojiljkovic, S. Anic, y F. Heffron.** 1996. Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Gene.* **183**: 207-213.
- Bäumler, A.J., T.L. Norris, T. Lasco, W. Voigt, R. Reissbrodt, W. Rabsch, y F. Heffron.** 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **180**: 1446-1453.
- Bister, B., D. Bischoff, G.J. Nicholson, M. Valdebenito, K. Schneider, G. Winkelmann, K. Hantke y R.D. Süssmuth.** 2004. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals.* **17**: 471-481.
- Blattner, F.R., G. Plunkett III, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Villes, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau, y Y. Shao.** 1997. The complete genome of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**: 1453-1462.
- Braun, V.** 1999. Active transport of siderophore-mimicking antibacterials across the outer membrane. *Drug Resist. Updates.* **2**: 363-369.
- Combet, C., C. Blanchet, C. Geourjon y G. Deléage.** 2000. NPS@: Network protein sequence analysis. *TIBS.* **25**: 147- 150.
- Crosa, J.H. y C.T. Walsh.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 223-249.
- Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, y J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature.* **2**: 414-424.

- Earhart, C.F.** 1996. Uptake and metabolism of iron and molybdenum, p. 1075-1090. In F.C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.
- Fischbach, M.A., L. Hening, D.R. Liu, y C.T. Walsh.** 2005. *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **102**: 571-576.
- Furrer, J., D. Sanders, I. Hook-Barnard y M. McIntosh.** 2002. Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. Mol. Microbiol. **44**: 1225-1234.
- Gaggero, C., F. Moreno y M. Laviña.** 1993. Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. J. Bacteriol. **175**: 5420-5427.
- Gehring, A.M., K.A. Bradley y C.T. Walsh.** 1997. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. Biochemistry. **36**: 8495-8503.
- Genilloud, O., F. Moreno y R. Kolter.** 1989. DNA sequence, products, and transcriptional pattern of the genes involved in production of the DNA replication inhibitor microcin B17. J. Bacteriol. **171**: 1126-1135.
- Gilson, L., H.K. Mahanty y R. Kolter.** 1987. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export and immunity. J. Bacteriol. **169**: 2466-2470.
- Gilson, L., H.K. Mahanty y R. Kolter.** 1990. Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. EMBO J. **9**: 3875-3884.
- González-Pastor, J.E., J.L. San Millán, M.A. Castilla y F. Moreno.** 1995. Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. J. Bacteriol. **177**: 7131-7140.
- Groisman, E.A. y M.J. Casadaban.** 1986. Mini-Mu bacteriophage with plasmid replicons for in vivo cloning and *lac* gene fusing. J. Bacteriol. **168**: 357-364.
- Grozdanov, L., C. Raasch, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker y U. Dobrindt.** 2004. Analysis of the genome structure of the non-pathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. J. Bacteriol. **186**: 5432-5441.
- Guijarro, J.I., J.E. González-Pastor, F. Baleux, J.L. San Millán, M.A. Castilla, M. Rico, F. Moreno y M. Delepierre.** 1995. Chemical structure and translation inhibition studies of the antibiotic microcin C7. J. Biol. Chem. **270**: 23520-23532.
- Hacker, J. y J.B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu. Rev. Microbiol. **54**: 641-679.

- Hacker, J. y E. Carniel.** 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO reports*. **2**: 376-381.
- Hantke, K.** 1990. Dihydroxybenzoylserine -a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 5-8.
- Hantke, K., G. Nicholson, W. Rabsch, y G. Winkelmann.** 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor Iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 3677-3682.
- Havarstein, L.S., H. Holo y I.F. Nes.** 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology.* **140**: 2383-2389.
- Havarstein, L.S., D.B. Diep y I.F. Nes.** 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* **16**: 229-240.
- Huang, X. y W. Miller.** 1991. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* **12**: 337-357.
- Kolter, R. y F. Moreno.** 1992. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 141-164.
- Konisky, J.** 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**: 125-144.
- Lagos, R., M. Baeza, G. Corsini, C. Hetz, E. Strahsburger, J. A. Castillo, C. Vergara y O. Monasterio.** 2001. Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**: 229-244.
- Laviña, M., C. Gaggero y F. Moreno.** 1990. Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 6585-6588.
- Miller, J.H.** 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Nikaido, H. y E.Y. Rosenberg.** 1990. Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with β -lactam antibiotics containing catechol and analogous groups. *J. Bacteriol.* **172**:1361-1367.
- Patzer, S.I., M.R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno y K. Hantke.** 2003. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron. *Microbiology* **149**: 2557-2570.

- Pfeifer, B.A., y C. Khosla.** 2001. Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 106-118.
- Pons, A., F. Delalande, M. Duarte, S. Benoit, I. Lanneluc, S. Sablé, A. Van Dorsselaer y G. Cottenceau.** 2004. Genetic analysis and complete primary structure of microcin L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 505-513.
- Rodríguez, E. y M. Laviña.** 1998. Genetic analysis of microcin H47 immunity. *Can. J. Microbiol.* **44**: 692-697.
- Rodríguez, E. y M. Laviña.** 2003. The proton channel is the minimal structure of ATP synthase necessary and sufficient for microcin H47 antibiotic action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 181-187.
- Rodríguez, E., C. Gaggero y M. Laviña.** 1999. The structural gene for microcin H47 encodes a peptide precursor with antibiotic activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2176-2182.
- Russo, T. A., U.B. Carlino, A. Mong y S.T. Jodush.** 1999. Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. *Infect. Immun.* **67**: 5306-5314.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schwyn, B. y J.B. Neilands.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.
- Siegman-Igra, Y., T. Kulka, D. Schwartz y N. Konforti.** 1994. Polymicrobial and monomicrobial bacteraemic urinary tract infection. *J. Hosp. Infect.* **28**: 49-56.
- Snyder, J.A., B.J. Haugen, E.L. Buckles, C.V. Lockett, D.E. Johnson, M.S. Sonnenberg, R.A. Welch, y H.L.T Mobley.** 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect. Immun.* **72**: 6373-6381.
- Thomas, X., D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi, C. Afonso, A. Blond, N. Birlirakis, C. Goulard, L. Dubost, R. Thai, J.C. Tabet, y S. Rebuffat.** 2004. Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.* **279**: 28233-28242.
- Trujillo, M., E. Rodríguez y M. Laviña.** 2001. ATP synthase is necessary for microcin H47 antibiotic action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 3128-3131.
- Valdebenito, M., B. Bister, R. Reissbrodt, K. Hantke y G. Winkelmann.** 2005. The detection of salmochelin and yersiniabactin in uropathogenic *Escherichia coli* strains by a novel hydrolysis-fluorescence-detection (HFD) method. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**: 99-107.

- Vizán, J.L., C. Hernández-Chico, I. del Castillo y F. Moreno.** 1991. The peptide antibiotic microcin B17 induces double strand cleavage of DNA mediated by gyrase. *EMBO J.* **10**: 467-476.
- Welch R.A., V. Burland, G. Plunkett III, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E.L. Buckles, S.-R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G.F. Mayhew, D.J. Rose, S. Zhou, D.C. Schwartz, N.T. Perna, H.L.T. Mobley, M.S. Sonnenberg, y F.R. Blattner.** 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 17020-17024.
- Yorgey, P., J. Davagnino y R. Kolter.** 1993. The maturation pathway of microcin B17, a peptide inhibitor of DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* **9**: 897-905.