

**PEDECIBA
BIOLOGÍA**

**BIOLOGÍA CELULAR
Y MOLECULAR**

TESIS DE MAESTRÍA

**MECANISMO DE SECRECIÓN
DEL ANTIBIÓTICO
MICROCINA H47**

María Fernanda Azpiroz

Orientador: Dra. Magela Laviña

**Sección de Fisiología y Genética Bacterianas
Facultad de Ciencias
Montevideo
Uruguay
2000**

Agradecimientos

A Magela Laviña, mi orientadora de tesis, de quien he recibido una sólida formación en genética bacteriana y quien me ha enseñado el rigor científico que todo trabajo en ciencias requiere. Asimismo, por brindarme un apoyo constante que no tuvo límites de tiempo ni situación.

A Eliana, por familiarizarme con las técnicas básicas de genética bacteriana y por compartir ámbitos favorables de discusión de varios de los resultados presentados en esta tesis.

A Alicia, por su invaluable, consecuente y cariñosa colaboración en la preparación del material con el cual se realizaron los experimentos de la tesis. En especial, por su disposición incondicional y permanente, tanto en los éxitos como en los fracasos.

A los compañeros que han pasado por el laboratorio durante el transcurso de esta tesis, quienes con su amistad hicieron más cálidas las horas de trabajo. En especial, a Andrés González por sus valiosos aportes y fundamentada crítica de algunos abordajes experimentales y resultados.

A Atilio Deana, Patricia Cortazzo y Pierre Anger, por compartir cordiales y amenos ratos de intercambio de conocimientos así como de brindarme consejos útiles para algunos de los abordajes experimentales llevados a cabo en la tesis.

A los integrantes de la sección Evolución de la Facultad de Ciencias -Gabriela, Noel, Álvaro e Ivanna- quienes me brindaron su ayuda en el diseño computacional de algunas figuras para la presentación escrita de la tesis.

A Daniel, quien me brindó material y consejos para la impresión de una figura.

A las secretarías de PEDECIBA Biología, quienes me facilitaron el cumplimiento de los requisitos administrativos necesarios en cada una de las etapas de la tesis.

A Gustavo, por su paciencia, comprensión y aliento durante la realización de la tesis. Asimismo, por su ayuda en la confección de algunos archivos computacionales necesarios para la versión escrita y la presentación oral de esta tesis.

Abreviaturas

aa	aminoácido/s
ABC	“cassette” de unión a ATP
ColV	colicina V
Da	Daltons
kb	kilobase
MccH47	microcina H47
MFP	proteína de fusión de membrana
nt	nucleótido/s
ORF	marco abierto de lectura
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	par de bases de DNA
ufc	unidades formadoras de colonia
ufp	unidades formadoras de placa

Resumen

En este trabajo se estudia el sistema de secreción del antibiótico microcina H47. Se trata de un antibiótico peptídico de síntesis ribosómica producido por una cepa natural de *Escherichia coli* aislada en Uruguay. Sus determinantes genéticos se localizan en el cromosoma bacteriano, agrupándose en un sistema de unas 10 kb de extensión. Dentro de éste, los genes *mchE* y *mchF* están involucrados en la exportación del antibiótico al medio extracelular. Se sabe además, que es necesaria la proteína TolC para una eficiente producción antibiótica.

Se secuenció la región de DNA que contiene los genes *mchE* y *mchF*, se identificaron los marcos abiertos de lectura de estos genes y se dedujo la secuencia aminoacídica de sus productos. MchF resultó tener homología con proteínas exportadoras ABC y, en particular, compartió un 89 % de identidad con CvaB, proteína exportadora ABC del sistema de secreción de la colicina V. MchE presentó homología con proteínas de la familia de las MFPs, compartiendo un 98% de identidad con CvaA, segundo componente del sistema de secreción de la colicina V. Estos altos niveles de identidad permitieron confirmar que la microcina H47 es secretada por un sistema dedicado y específico de sustrato de tipo ABC que estaría conformado por: 1) MchF, como la proteína exportadora ABC, 2) MchE, como el segundo componente, y 3) TolC, como el elemento de membrana externa. Se reconocieron en MchF el cassette de unión a ATP en el extremo carboxilo, la región central integral de membrana y el dominio proteolítico amino terminal que efectuaría el procesamiento del sustrato durante la exportación. En MchE se identificó el único segmento de transmembrana, característico de las MFPs, que dejaría la mayor parte de la proteína en el periplasma. También se reconoció en *mchE* un inicio interno de la traducción, que daría lugar a una proteína más pequeña denominada MchE*. Mediante mutagénesis de *mchE* con *TnphoA* y *Tnlac*, se hizo un estudio de la localización subcelular de MchE y MchE*. Los resultados indicaron que MchE quedaría en su mayor parte en el periplasma mientras que MchE* permanecería en el citoplasma, deduciéndose que ambos productos deben cumplir sus funciones en distintos compartimientos celulares.

Por ensayos de complementación heteróloga se comprobó que los componentes del sistema exportador de la colicina V son capaces de reconocer y secretar el antibiótico microcina H47 en forma eficiente. Dentro de la región secuenciada y a continuación de *mchF* se encontró un segmento de DNA que presentó un 53% de homología con el operón *cvi cvaC* del sistema colicina V, genes estos últimos que codifican para la inmunidad y la actividad colicina. La región homóloga encontrada contiene vestigios de estos genes, sugiriendo que en algún momento pudieron estar adyacentes en el cromosoma los sistemas microcina H47 y colicina V, compartiendo los mismos determinantes de secreción antibiótica.

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. La vía Sec.....	1
I. 2. Los transportadores ABC.....	2
I. 3. Sistemas exportadores ABC bacterianos.....	5
I. 3. 1. Exportadores ABC.....	5
I. 3. 2. Segundos componentes.....	6
I. 3. 3. Elementos de membrana externa.....	7
I. 4. Antibióticos peptídicos de síntesis ribosómica.....	8
I. 4. 1. La colicina V.....	8
I. 4. 2. La microcina H47.....	10
II. HIPÓTESIS.....	12
III. OBJETIVOS.....	13
III. 1. Objetivo general.....	13
III. 2. Objetivos específicos.....	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
IV. 1. Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos.....	14
IV. 2. Medios de cultivo.....	14
IV. 3. Prueba de producción de MccH47.....	14
IV. 4. Prueba de inmunidad a la MccH47.....	16
IV. 5. Manipulación del DNA.....	16
IV. 6. Fusiones génicas con <i>mchE</i>	16
IV. 6. 1. Mutagénesis del plásmido pMVD14 por inserción del transposón <i>TnphoA</i>	17
IV. 6. 2. Mutagénesis del plásmido pMVD14 por inserción del transposón <i>Tnlac</i>	18

IV. 7. Medidas de actividad β -galactosidasa y fosfatasa alcalina.....	19
V. RESULTADOS.....	20
V. 1. Secuencia nucleotídica de <i>mchE</i> y <i>mchF</i> y análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas.....	20
V. 2. Análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.....	25
V. 3. Análisis de complementación heteróloga entre los sistemas exportadores de MccH47 y ColV.....	31
V. 4. Fusiones génicas con <i>mchE</i>	33
V. 4. 1. Fusiones génicas con <i>mchE-phoA</i>	34
V. 4. 2. Fusiones génicas con <i>mchE-lacZ</i>	35
VI. DISCUSIÓN.....	38
VI. 1. MchF es la proteína exportadora del sistema transportador ABC de la MccH47.....	38
VI. 2. MchE es el segundo componente del sistema transportador ABC de la MccH47.....	39
VI. 3. Aportes sobre la localización subcelular de MchE y MchE*.....	39
VI. 4. Complementación heteróloga para la secreción de MccH47 con el sistema transportador de ColV.....	41
VI. 5. Homologías a nivel nucleotídico entre la región de los genes <i>mchEF</i> y el sistema ColV.....	42
VII. CONCLUSIONES.....	44
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	45

I. INTRODUCCIÓN

La supervivencia de toda célula requiere de un pasaje regulado y selectivo de moléculas específicas a través de las membranas, ya sea para adquirir nutrientes, excretar productos de desecho o interactuar con otras células. El transporte a través de las envolturas celulares está mediado por proteínas específicas que se asocian con las membranas llevando a cabo el transporte pasivo o activo de moléculas. Este transporte involucra tanto exportación como importación.

Todas las células exportan proteínas a distintos compartimientos celulares, para lo que éstas deben atravesar las membranas. En bacterias, aproximadamente el 20% de los polipéptidos se localiza parcial o totalmente fuera de su lugar de síntesis -el citoplasma-. Por lo tanto, estos polipéptidos deben ser exportados a su destino final para cumplir sus funciones. El término exportación significa transporte de una sustancia desde el citoplasma a una localización extracitoplásmica.

En el caso de las bacterias Gram-positivas, la envoltura celular que separa el medio intracelular del medio extracelular consiste en la membrana citoplásmica rodeada por la pared celular. En el caso de las bacterias Gram-negativas, la envoltura celular es más compleja, donde, además de la membrana interna o citoplásmica, se encuentra la membrana externa y, entre ambas, el espacio periplásmico, que contiene la pared celular. Las proteínas exportadas por bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, pueden ser exportadas ya sea a la membrana celular, al periplasma, a la membrana externa o al medio extracelular. En el caso de ser exportadas al medio extracelular, hablamos de secreción.

La exportación de proteínas en *E. coli* se puede clasificar esquemáticamente de acuerdo al tipo de sistema involucrado en el transporte. Así encontramos proteínas que son exportadas a través de la vía denominada "Sec" y otras que son secretadas a través de sistemas dedicados o específicos de sustrato, siendo los más conocidos los "transportadores ABC".

I. 1. La vía Sec

La vía Sec se encuentra presente tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas y tiene un equivalente en los organismos eucariotas. Los componentes de la maquinaria de exportación han sido definidos mediante estudios genéticos en *E. coli*. Se trata de un mecanismo de exportación general para proteínas y péptidos. La función de esta vía es la de dirigir las proteínas a ser exportadas hasta la membrana citoplásmica, el periplasma o la membrana externa, no alcanzando a secretarlas al medio extracelular. A continuación se presenta una descripción resumida de este proceso basada en Oliver, 1987; Schatz & Beckwith, 1990 y Pugsley, 1993.

La vía Sec asegura la salida del citoplasma de aquellas proteínas que presentan, en sus extremos N-terminales, una secuencia señal clásica o secuencia señal sec, que está directamente involucrada en el proceso de translocación de la membrana citoplásmica. En las proteínas integrales de membrana (citoplásmica), la secuencia señal no es procesada y forma parte de la proteína madura, mientras que en aquellas otras que atraviesan la membrana para localizarse en el periplasma o la membrana externa, la secuencia señal es procesada durante el pasaje por la membrana citoplásmica. En este último caso, la secuencia señal se denomina péptido señal y éste no forma parte de la proteína madura.

Las proteínas que se exportan vía sec contienen entonces en su extremo N-terminal una secuencia señal de entre 20 y 40 aa. La secuencia señal clásica posee las siguientes

características: (i) el extremo amino contiene uno o dos aminoácidos cargados positivamente, (ii) a continuación se encuentran unos 10 a 20 aminoácidos neutros, principalmente hidrofóbicos, conocidos como el núcleo hidrofóbico y (iii) un tramo final de unos seis aminoácidos. En el caso de los péptidos señal, o sea, cuando existe procesamiento, se añade al final un sitio de corte consenso denominado AXB, donde B es el último aminoácido del péptido señal, que puede ser alanina, glicina o serina, y A puede ser los anteriores o leucina, valina o isoleucina. X sería cualquier aminoácido.

La exportación de proteínas mediante la vía Sec requiere de los productos de los genes *sec* y de las peptidasas señal. La translocación de una proteína a través de la membrana citoplásmica involucra un complejo proteico multimérico, la translocasa, que se localiza en la membrana interna y está formada por los productos de los genes *secD*, *E*, *F* e *Y*. Se postula que SecY interaccionaría con el núcleo hidrofóbico de la secuencia o péptido señal. También son necesarios los productos de otros genes: *secB* codifica para una chaperona que se une a proteínas durante o inmediatamente después de su síntesis, estabilizando una conformación “competente” para la exportación; *secA* codifica para el principal receptor del complejo SecB/preproteína; que se dice “atraca” en la membrana. De este modo, en forma independiente del grado de hidrofobicidad de las proteínas y péptidos a transportar, esta vía permite: 1) la llegada de la proteína a la membrana citoplásmica guiada por las proteínas SecB y/o SecA, 2) la translocación a través del canal de translocación, formado en la membrana citoplásmica por la translocasa, y 3) la liberación de la proteína del complejo translocasa a su destino final.

Para llevar a cabo este proceso se requiere energía, la que no sólo se obtiene de la hidrólisis de ATP, sino también de la fuerza protón-motriz. La hidrólisis de ATP promovería las etapas tempranas de la inserción mientras que la fuerza protón-motriz completaría el proceso una vez iniciada la translocación.

En la mayoría de las proteínas que sufre procesamiento, el corte es efectuado por la peptidasa LepB, presente en la célula en un número de copias de 500, que se aproxima al número estimado de complejos translocasa. Aquellas proteínas que presentan una cisteína inmediatamente después del sitio de procesamiento son procesadas por la peptidasa de señal lipoproteica (LspA) para ser modificadas y constituirse en lipoproteínas.

Si bien la vía Sec parece estar fundamentalmente diseñada para la exportación, se han descrito casos, en bacterias Gram-negativas no relacionadas filogenéticamente entre sí, de proteínas que utilizan esta vía para iniciar su secreción al medio extracelular. Este mecanismo se ha denominado la vía general de secreción (GSP) que permite secretar toxinas e hidrolasas extracelulares. Este tipo de sistema se ha encontrado en bacterias que pertenecen a los géneros *Klebsiella*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. *E.coli* no presenta este sistema de secreción. El ejemplo mejor conocido es el de la pululanasa de *Klebsiella oxytoca*, cuya secreción al medio extracelular requiere de los productos de los 14 genes *pul*, además de las seis proteínas Sec y de la peptidasa de señal lipoproteica.

I. 2. Los transportadores ABC

Los transportadores ABC constituyen una superfamilia de proteínas integrales de membrana capaces de transportar un amplio rango de sustratos tanto en procariotas como en eucariotas. Estas proteínas se caracterizan por poseer un dominio de unión a ATP muy conservado, denominado ABC por “ATP-binding cassette”. Han adquirido interés ya que se asocian con importantes procesos biológicos así como también con problemas clínicos. Hoy en día se conocen más de 50 transportadores ABC distintos, en su mayoría procariotas, y continuamente aparecen nuevas descripciones en la literatura. Cada transportador ABC es específico de su sustrato, siendo la variedad de los mismos enorme. Es así que existen

transportadores ABC de aminoácidos, azúcares, iones inorgánicos, polisacáridos, péptidos y proteínas (Higgins, 1992).

Los transportadores ABC son sistemas de transporte activo que, por lo tanto, requieren de una fuente de energía para cumplir su función. Dicha energía se obtiene mediante la hidrólisis de ATP.

Todo transportador ABC contiene dos dominios proteicos, que pueden ser polipéptidos separados o parte de una misma cadena polipeptídica (Fig. I. 1). Además, se postula que esta estructura básica funcionaría en forma dimérica. A continuación se describen los dos dominios antes mencionados en base a Hyde et al., 1990; Higgins, 1992; Nikaido & Saier, 1992; Fath & Kolter, 1993 y Neidhardt, 1996.

1) En el extremo carboxilo-terminal un dominio que contiene un “cassette” de unión a ATP (ABC) altamente conservado, de unos 200 aa, localizado en el citoplasma, que se encarga de proveer energía mediante la hidrólisis de ATP. Este dominio contiene dos pequeños sitios denominados motivos de Walker -WA y WB-, que están presentes en las proteínas de unión a nucleótidos (Walker et al., 1982). Dentro de éstas, el subgrupo de las proteínas ABC se caracteriza por presentar una similitud mayor que se extiende a todo el “cassette”. Los motivos de Walker forman un “bolsillo” al cual se une el ATP. El sitio WA se encuentra en la porción final de una α -hélice y sus residuos GXGKST forman una vuelta que deja la lisina próxima a los fosfatos de la molécula de Mg^{2+} -ATP. Entonces, un residuo aspártico del sitio WB queda próximo al sitio WA y su carga negativa establece una interacción electrostática con la molécula de Mg^{2+} .

2) En el extremo amino-terminal un dominio predominantemente hidrofóbico, con seis regiones de transmembrana, los extremos amino y carboxilo terminales en el citoplasma, tres bucles periplásmicos y dos bucles citoplásmicos. Se postula que cada región de transmembrana se plegaría en conformación de α -hélice y el conjunto de las mismas formaría un canal de 6 hélices, llamado estructura 6+6, a través del que se reconocería y translocaría el sustrato.

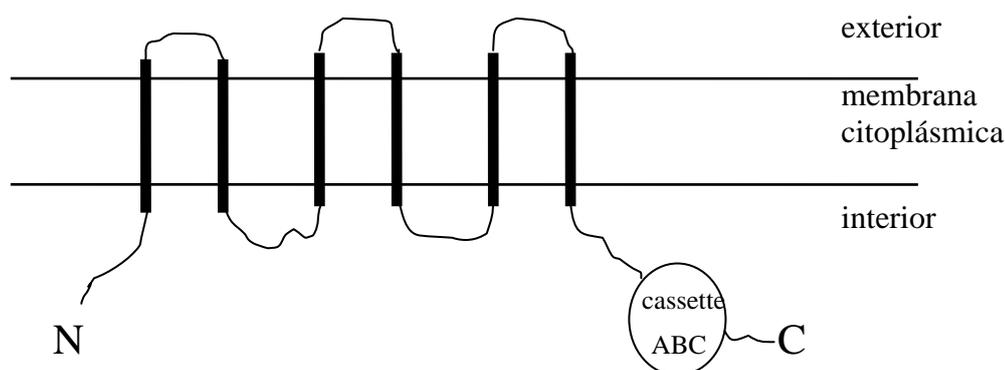


Fig. I. 1. Esquema de un transportador ABC.

Los transportadores ABC se pueden dividir arbitrariamente en tres subfamilias basadas en diferencias evolutivas y de función como importadores o exportadores (Higgins, 1992; Fath & Kolter, 1993).

1) Transportadores ABC eucariotas: están constituídos por proteínas ABC cuyos dominios forman parte de un único polipéptido. La mayoría de estas proteínas presentan una duplicación en tándem de sus determinantes genéticos. Además, no se ha evidenciado la presencia de otros factores proteicos necesarios para que estos transportadores cumplan eficientemente su

función. Algunos de estos sistemas transportadores ABC son de significativa importancia médica. Dentro de estos se incluyen: la proteína de resistencia a multidrogas, glicoproteína P, que exporta drogas quimioterapéuticas desde las células tumorales; el regulador de transmembrana de fibrosis quística, que es defectuoso en pacientes que padecen dicha enfermedad; el exportador pfMD, que exporta drogas anti-malaria desde el *Plasmodium falciparum*; STE6, que exporta el factor de apareamiento tipo **a** de *Saccharomyces cerevisiae*; transportadores involucrados en la presentación de antígeno; etc. (Fig. I. 2).

2) Importadores ABC bacterianos o permeasas periplásmicas: son sistemas de importación que están constituidos por una proteína ABC en la que los dominios, el hidrofóbico que incluye los segmentos transmembrana y el “cassette” de unión al ATP, se presentan como polipéptidos separados. Estas proteínas ABC importan azúcares y otros sustratos que favorecen el crecimiento celular (aminoácidos, vitamina B12, quelantes del hierro, etc). Además, todos ellos se caracterizan por asociarse con una proteína periplásmica. Esta proteína interacciona con el sustrato entrante, se une a él y lo presenta a la proteína ABC, que lo hace ingresar al citoplasma (Fig. I. 2).

3) Exportadores ABC bacterianos: Estas proteínas ABC exportan sustratos de naturaleza proteica al medio extracelular. En bacterias Gram-negativas se han hallado múltiples ejemplos de verdaderos sistemas exportadores ABC, formados por varios componentes proteicos, uno de los cuales es la proteína ABC. A continuación se presenta una descripción detallada de estos sistemas complejos (Fig. I. 2).

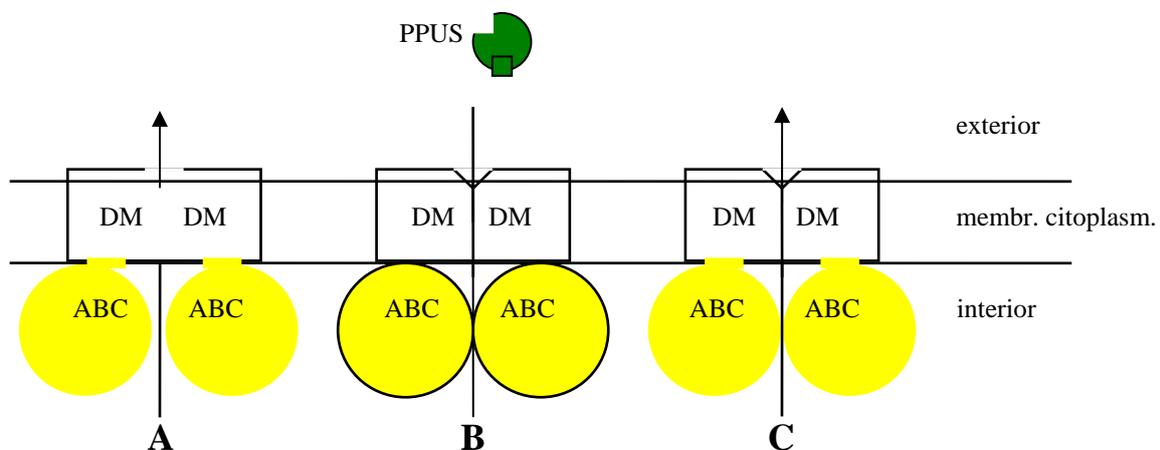


Fig. I. 2. Representación esquemática de los tres tipos de transportadores ABC. **A)** transportador eucariota, ejemplo de exportador; **B)** importador bacteriano; **C)** exportador bacteriano. DM: dominio de membrana; ABC: cassette ABC; PPUS: proteína periplásmica de unión al sustrato. Las flechas indican la dirección en que el sustrato es transportado.

I. 3. Sistemas exportadores ABC bacterianos

Estos sistemas están constituidos por la proteína ABC más otro u otros componentes proteicos. Los más complejos constan de tres elementos: el exportador ABC, el segundo componente y el elemento de membrana externa. El conjunto de los mismos hace posible el transporte, en una única etapa al medio extracelular, de sustratos específicos (Fath & Kolter, 1993), (Fig. I. 3).

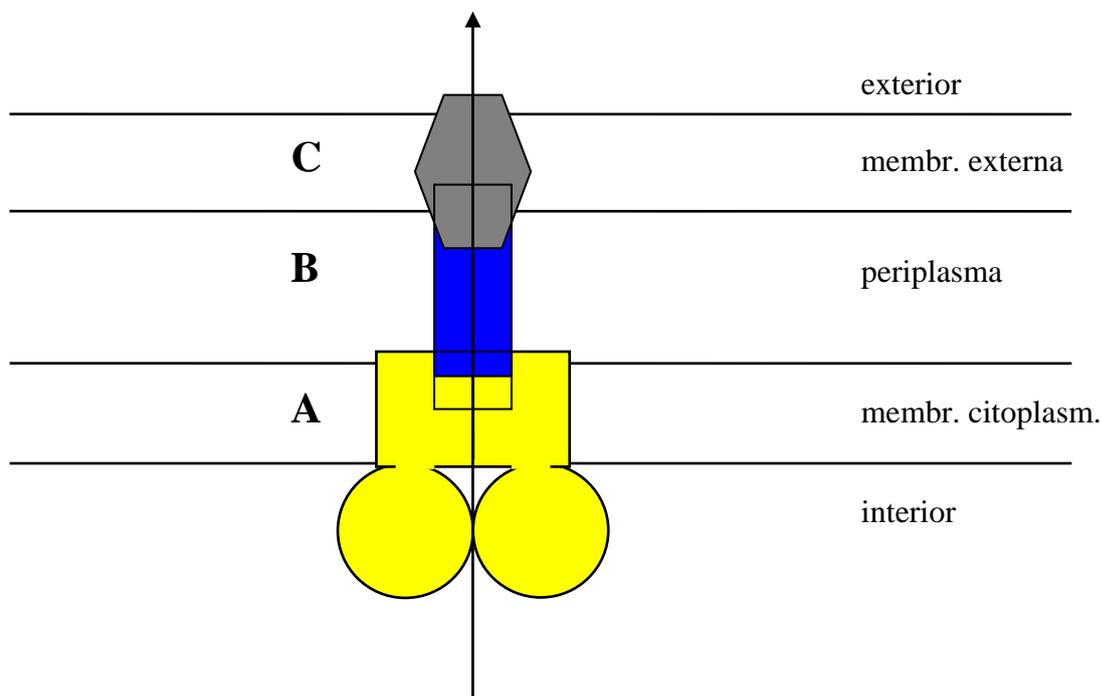


Fig. I. 3. Representación hipotética de un sistema exportador ABC bacteriano. **A:** exportador ABC; **B:** segundo componente de tipo MFP; **C:** elemento de membrana externa. La flecha indica la dirección en que el sustrato es transportado.

I. 3. 1. Exportadores ABC

La mayoría de estas proteínas son de gran tamaño (entre 600 y 750 aa), ya que portan sus dos dominios característicos en un mismo polipéptido. Son capaces de exportar una amplia variedad de sustratos de estructura peptídica o proteica. Es así que se han identificado exportadores ABC de enzimas extracelulares y de toxinas, muchas de ellas de acción antibiótica, producidas por bacterias Gram positivas y negativas (Fath & Kolter, 1993).

Algunas proteínas exportadoras ABC cuyos sustratos son peptídicos presentan un dominio adicional en su extremo amino que tiene actividad proteolítica sobre el sustrato. Dentro de este dominio se identifican dos motivos aminoacídicos ($QX_4D/ECX_2AX_3MX_4Y/FGX_4I/L$ y $HY/FY/VVX_{10}I/LXDP$) que son los involucrados directamente en esta función proteolítica (Havarstein et al., 1995). Los sustratos de estos exportadores son sintetizados como precursores que contienen un péptido líder en su porción amino-terminal. Este péptido líder presenta una secuencia consenso $L(-12)S(-11)XXE(-8)L(-7)XXI(-4)XG(-2)G(-1)$, donde el residuo glicina de la posición -2 está conservado en un 100%, y es procesado luego de los dos últimos residuos glicina (Havarstein et al., 1994). Consecuentemente, se denominó a esta región “péptido líder doble glicina”. La actividad proteolítica y el procesamiento del sustrato han sido fehacientemente probados para el caso de

la Lactococcina G y su proteína exportadora ABC (Havarstein et al., 1995). Las homologías de secuencia, así como el hallazgo de péptidos maduros carentes del péptido líder en otros sistemas, sugiere que todos los péptidos precursores con una secuencia doble glicina serían procesados por el dominio proteolítico de su transportador ABC durante su exportación (Havarstein et al., 1995) (Fig. I. 4).

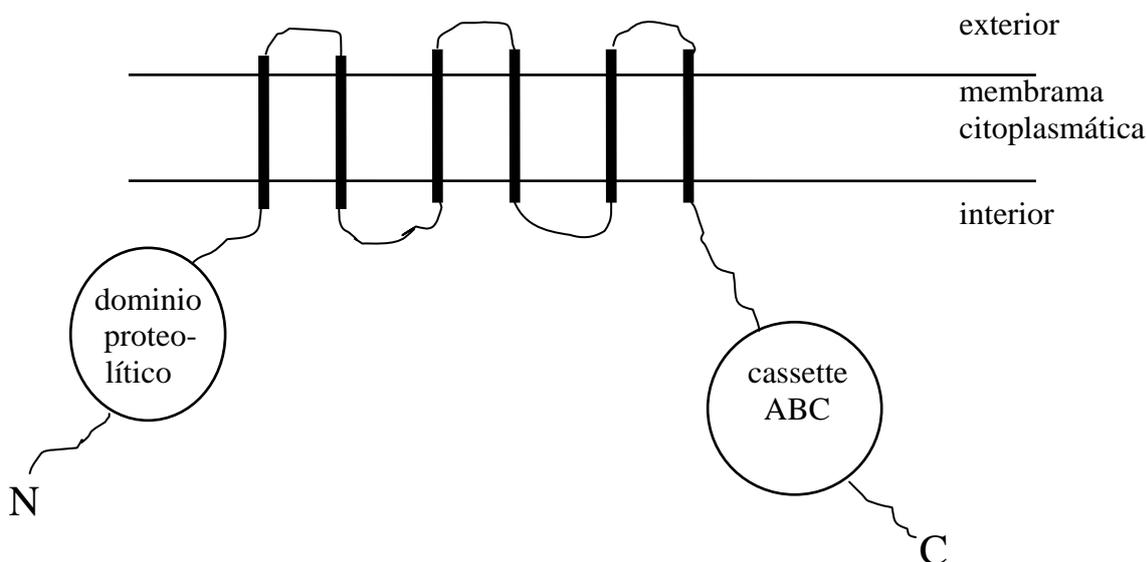


Fig. I. 4. Esquema de un transportador ABC bacteriano que procesa su sustrato peptídico durante la exportación.

I. 3. 2. Segundos componentes

Algunos sistemas transportadores bacterianos necesitan un segundo componente, además de la proteína ABC, para llevar a cabo el transporte de su sustrato específico (Fig. I. 3). Los segundos componentes constituyen una familia de proteínas extracitoplásmicas, de 300 a 450 aa, necesarias para el transporte de moléculas hacia el medio extracelular. Se ha propuesto incluir este conjunto de proteínas accesorias en una nueva familia llamada proteínas de fusión de membrana (MFP) que atravesarían el espacio periplásmico contactando en sus extremos con ambas membranas, citoplásmica y externa. Los miembros de esta familia fueron hallados en bacterias Gram-negativas (Dinh et al., 1994). Sin embargo, en la actualidad se conocen proteínas de este tipo en bacterias Gram-positivas. Estos segundos componentes de transportadores de bacterias Gram positivas no evidencian mayor homología de secuencia con sus contrapartes en bacterias Gram negativas, pero si presentan tamaños y perfiles hidrofóbicos semejantes a los de MFPs (Axelsson et al., 1995; Diep et al., 1996; Franke et al., 1996; Kaur, P., 1997; O’Keeffe et al., 1999). Considerando estos paralelismos y que las bacterias Gram positivas carecen de membrana externa, la función propuesta de fusión de membranas requerirá seguramente ser revisada. En muchos casos estas proteínas funcionan en conjunción con las proteínas ABC para la exportación del sustrato. En otros casos, cooperan en la exportación de drogas con proteínas que forman parte de sistemas diferentes del ABC como lo son las permeasas de la “major facilitator superfamily” (MFS) (Marger et al., 1993) y las permeasas de la “heavy metal resistance/nodulation/cell division family” (RND) (Saier et al., 1994).

En las proteínas MFP se identifican cuatro regiones. En el extremo N-terminal

presentan una secuencia señal sec que cumpliría la función estructural de anclar la proteína a la membrana citoplásmica. Seguidamente, se encuentra una región corta de hidrofobicidad moderada que exhibe una gran conservación de secuencia y que se postula no estaría asociada a membrana. La tercera región abarcaría unos 150 residuos, caracterizándose por su alta hidrofilia y por su baja conservación de secuencia. Las predicciones de estructura secundaria indican que esta región adoptaría la estructura de α -hélice. Hacia el extremo C-terminal, se encuentra una región hidrofóbica, de unos 100 residuos de extensión, que es la más conservada en estas proteínas. Se postula que adopta una conformación de hojas β , como sería de esperar para un dominio de asociación a la membrana externa. Por último, una región corta C-terminal de tamaño variable, que exhibe baja conservación de secuencia (Dinh et al., 1994; Nikaido & Saier, 1992).

Los segundos componentes de bacterias Gram negativas han sido agrupados por criterios filogenéticos según los sistemas de transporte a los cuales están asociados y a la especificidad de sustrato de los mismos. Lo primero sugiere que estas proteínas interactuarían con el exportador ABC a través de su extremo N-terminal, embebido en la membrana citoplásmica. Lo segundo sugiere que las proteínas MFPs podrían interactuar con sus respectivos sustratos. Entonces, de alguna manera crearían un canal desde la cara periplásmica de la proteína ABC hasta la membrana externa, contactando con esta última a través de su región hidrofóbica conservada. Sin embargo, los detalles moleculares de este mecanismo de exportación del sustrato aún no han sido determinados (Dinh et al., 1994).

I. 3. 3. Elementos de membrana externa

Además, en algunos sistemas exportadores ABC bacterianos existe un tercer componente, el elemento de membrana externa, necesario para una eficiente exportación (Fig. I. 3). El elemento de membrana externa puede tratarse de una proteína específica del sistema exportador ABC o de una proteína vinculada a funciones generales de la célula que sería reclutada para integrar el complejo de exportación. En el primer caso, el gen que codifica para el elemento de membrana externa es específico y se encuentra adyacente a los demás determinantes genéticos del sistema exportador. Tal es el caso de los sistemas exportadores ABC de la ciclolisina B de *Bordetella pertussis* (Glaser et al., 1988), de la proteasa alcalina de *Pseudomonas aeruginosa* (Guzzo et al., 1991), de las metaloproteasas B y C de *Erwinia Chrysanthemi* (Létoffé et al., 1990), de la proteína de unión a hemo de *Serratia marcescens* (Binet & Wandersman, 1995), etc. En el segundo caso, el elemento de membrana externa lo constituye la proteína TolC. TolC es una proteína de *E. coli* localizada en la membrana externa. Primeramente, se determinó que la misma era necesaria para una eficiente secreción de hemolisina (Wandersman & Delepelaire, 1990). Luego, se fueron descubriendo otros sistemas exportadores ABC en los que TolC cumple la función de ser el elemento de membrana externa y que su falta resulta en una ineficiente secreción del sustrato (Gilson et al., 1990; Gaggero et al., 1993).

Por otra parte, algunos elementos de membrana externa específicos comparten homología de secuencia entre ellos y con la proteína TolC. Esto hizo pensar que podría existir complementación heteróloga entre componentes de membrana externa de distintos sistemas exportadores ABC. Sin embargo, se demostró experimentalmente que no ocurre complementación, lo que sugiere que podría ser necesaria una interacción entre el segundo componente y el elemento de membrana externa para formar un sistema exportador activo (Binet & Wandersman, 1995).

I. 4. Antibióticos peptídicos de síntesis ribosómica

La producción de antibióticos peptídicos de síntesis ribosómica es un recurso frecuentemente empleado en la naturaleza por organismos eucariotas y procariotas. En general, se trata de moléculas pequeñas, de peso molecular que varía entre 0.5 y 9 kDa. Actualmente hay descrito un número importante de este tipo de antibióticos. Algunos de ellos son modificados postraduccionalmente y contienen aminoácidos inusuales, como por ejemplo los lantibióticos, que contienen didehidroalanina, didehidrobutirina, lantionina y β -metillantionina (Jung, 1991; Freund & Jung, 1992) y algunas microcinas, como la microcina B17 (MccB17), que contiene anillos tiazólicos y oxazólicos (Li et al., 1996), la microcina C7 (MccC7), que tiene modificaciones en sus extremos N y C-terminales (Guijarro et al., 1995), y la microcina J25 (MccJ25), que se estructura en un péptido cíclico (Blond et al., 1999).

Todos ellos son compuestos antibacterianos con un espectro de acción que suele ser reducido, generalmente porque su capacidad de ingresar a las células para interactuar con el blanco depende de la presencia de estructuras específicas en las envolturas celulares. En su mayor parte comparten un mismo mecanismo de acción consistente en la disipación del potencial de membrana (Yang & Konisky, 1984). Sin embargo, las bacterias Gram-negativas se distinguen por producir péptidos antibióticos, llamados microcinas, que presentan una mayor diversidad de mecanismos de acción: la MccC7 bloquea la síntesis proteica, la MccB17 inhibe la síntesis del DNA y la colicina V (ColV) actúa como ionóforo (Kolter & Moreno, 1992).

Toda bacteria productora de un antibiótico de síntesis ribosómica debe poseer los determinantes genéticos necesarios para asegurar tres funciones fundamentales vinculadas con la antibiosis: síntesis del antibiótico, exportación del mismo al medio extracelular e inmunidad para la célula productora. La síntesis depende de la expresión de un gen estructural. En el caso de los antibióticos no modificados, éste es el único determinante genético necesario para dar lugar al antibiótico. En cambio, los antibióticos modificados postraduccionalmente requieren además de la acción de los productos de otros genes del sistema que efectúan el proceso de maduración. La inmunidad está asegurada por una proteína que protege a la célula productora del péptido antibiótico que está sintetizando (Kolter & Moreno, 1992).

En cuanto a la exportación, se trata siempre de un proceso de secreción por el que el antibiótico es vertido al medio extracelular para ejercer su acción sobre bacterias sensibles. Muchos de estos péptidos utilizan un sistema ABC, por lo que son sintetizados como precursores con un “péptido líder doble glicina” en su extremo amino. El exportador ABC reconoce este péptido y lo procesa para llevar a cabo el transporte. De este modo, se obtiene un antibiótico maduro en el medio extracelular. Algunos ejemplos son la nisina, la epidermina y la colicina V (Gilson et al., 1990; Kolter & Moreno, 1992).

A continuación se describen dos microcinas, la colicina V y la microcina H47 (MccH47). ColV constituye el ejemplo clásico de un antibiótico secretado por un sistema exportador ABC por haber sido extensamente estudiado. La MccH47 es el modelo utilizado en el presente trabajo para estudiar su mecanismo de secreción.

I. 4. 1. La colicina V

La colicina V (ColV) es una microcina a pesar de su nombre. Constituye la primera descripción de una sustancia antibiótica producida por *Escherichia coli* (Gratia, 1925). Se trata de un péptido pequeño de aproximadamente 9 kDa que ejerce su acción letal sobre aquellos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* que poseen en su membrana externa el receptor para esta microcina, la proteína Cir. El blanco de acción de ColV es la membrana citoplásmica, sobre la que disipa el potencial electroquímico (Yang & Konisky, 1984).

Los determinantes genéticos ColV están contenidos en un plásmido grande de bajo

número de copias albergado naturalmente por distintas cepas de *E. coli* (Hardy, 1975). Cuatro genes están involucrados en la síntesis, exportación e inmunidad de la colicina V, estando ordenados en dos operones convergentes. Un operón contiene el gen estructural del antibiótico, *cvaC* y el gen que codifica para la inmunidad, *cvi*. El otro operón porta los genes *cvaA* y *cvaB*, que codifican para las proteínas responsables de la secreción de ColV (Fig. I. 5). Además de estos dos genes, se ha visto que el producto del gen *tolC*, no ligado al sistema, es necesario para una eficiente secreción antibiótica (Gilson et al., 1987; Gilson et al., 1990). La expresión de ambos operones se encuentra regulada negativamente por hierro a nivel de la transcripción génica. Dicha modulación de la expresión génica se debe a la presencia de secuencias “upstream” de ambos operones, denominadas “Fur box” (Boyer & Tai, 1998).

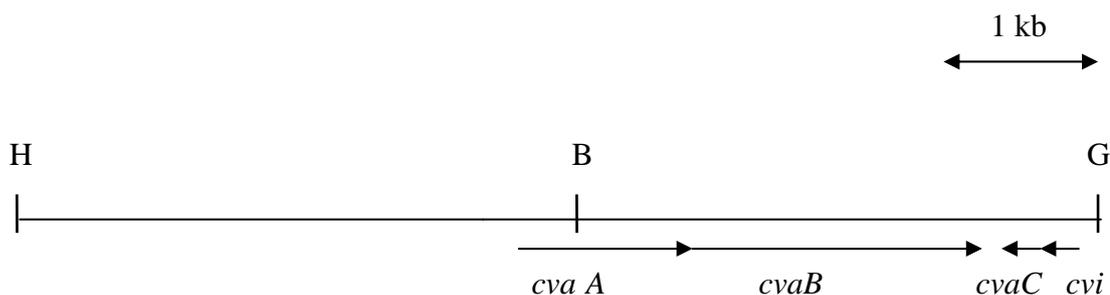


Fig. I. 5. Región de DNA que contiene el sistema genético colicina V, clonada en el plásmido recombinante pUY270. Se muestra el mapa físico para las enzimas B: *Bam*HI; G: *Bgl*III; H: *Hind*III. Abajo se representan los genes del sistema ColV con su dirección de transcripción.

El gen *cvaC* codifica para un péptido precursor antibiótico de 103 aa que posee un “péptido líder doble glicina” en su extremo amino-terminal, característico de aquellos sustratos secretados por sistemas exportadores ABC (Havarstein et al., 1994). En consecuencia, el péptido antibiótico maduro carece de los 15 residuos N-terminales por procesamiento durante su exportación (Fath et al., 1994).

Por otra parte, se constató que las proteínas de transporte, codificadas por los genes *cvaB* y *cvaA*, junto con la proteína TolC, constituyen un sistema transportador ABC. CvaB, de 78 kDa, constituye la proteína ABC, con seis segmentos de transmembrana y el “cassette” de unión al ATP en la porción carboxilo-terminal. El gen *cvaA*, codifica para dos productos proteicos leídos de un mismo marco abierto de lectura (ORF), CvaA y CvaA*, con pesos moleculares estimados de 43 kDa y 27 kDa, respectivamente. La proteína CvaA constituye el segundo componente del sistema transportador ABC, de tipo proteína de fusión de membrana (MFP) (Gilson et al., 1990; Skvirsky et al., 1995). Se identificaron dos posibles inicios de la traducción para el gen *cvaA* distantes en 11 codones. Se determinó por secuenciación amino-terminal que el codón de inicio es el más “downstream” -TTG- (Hwang et al., 1997).

El producto más pequeño, CvaA*, es una proteína sintetizada “de novo”, habiéndose probado que no se trata de un producto de degradación. Carece entonces de los residuos aminoacídicos hidrofóbicos N-terminales presentes en CvaA, por lo que se postula que CvaA* sería de localización citoplásmica. La misma no parece ser esencial para la secreción de ColV, pero se propone que potenciaría dicha función. Probablemente, esta potenciación no consista en afectar la síntesis o estabilidad de la colicina V, sino en estabilizar la proteína CvaA. Se propone que CvaA* interaccionaría, ya sea con CvaA o con el complejo CvaB/CvaA, de modo de mantener un transportador ABC estable y funcional (Hwang et al., 1997). Sin embargo, la función de CvaA* no está aún claramente dilucidada.

I. 4. 2. La microcina H47

La microcina H47 (MccH47) es un antibiótico peptídico producido por una cepa natural de *Escherichia coli* aislada de heces humanas de Uruguay. Tiene un tamaño de aproximadamente 6.000 Da y ejerce un efecto bactericida sobre estirpes filogenéticamente relacionadas a la productora (Laviña et al., 1990). Concretamente, su acción es ejercida sobre bacterias Gram-negativas, actuando sobre el complejo ATP sintetasa (Rodríguez et al., 1999).

Los determinantes genéticos del fenómeno antibiótico se encuentran en el cromosoma de la estirpe productora original y conforman un sistema de 10 kb de extensión que incluye los genes de biosíntesis de la microcina, los dedicados a su secreción, el gen de inmunidad y una región probablemente involucrada en funciones regulatorias de la expresión génica (Laviña et al., 1990; Gaggero et al., 1993; Rodríguez & Laviña, 1998), (Fig. I. 6).

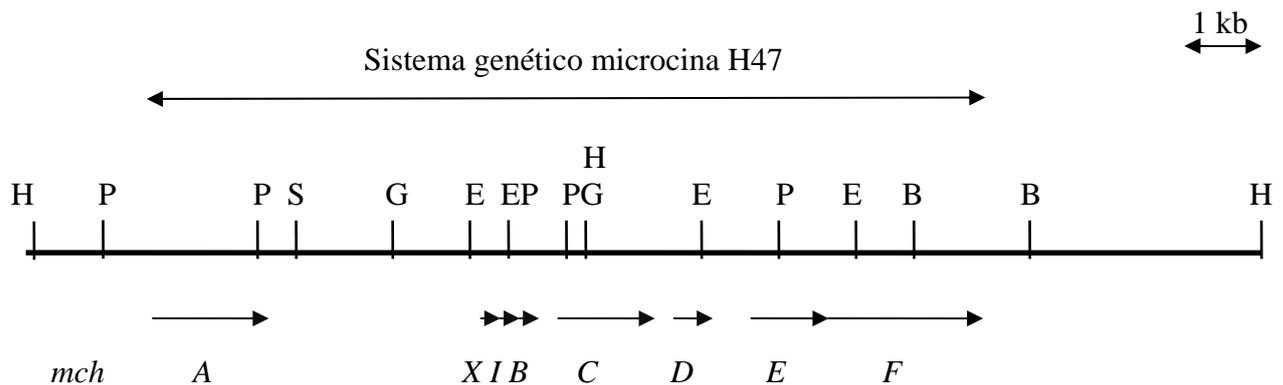


Fig. I. 6. Región de DNA que contiene el sistema genético microcina H47, clonada en los plásmidos recombinantes pEX100 y pEX4. Se muestran el mapa físico y la extensión del sistema antibiótico. Los genes *mch*, con su dirección de transcripción, se representan abajo. E: *EcoRI*; G: *BglII*; H: *HindIII*; P: *PstI*; S: *SalI*. Los mapas de restricción están completos para estas enzimas, salvo para *EcoRI* donde se indican sólo cuatro sitios. Representación según Gaggero et al., 1993 y Rodríguez & Laviña, 1998.

La síntesis de la microcina depende de la expresión de su gen estructural, *mchB*, cuyo producto de 75 aminoácidos es el precursor del antibiótico, y de la expresión de tres genes adicionales -*mchA*, *mchC* y *mchD*- involucrados en modificar MchB para convertirlo en la microcina madura. El precursor MchB posee actividad antibiótica letal al igual que la microcina madura, pero es incapaz de ingresar en las células sensibles. Se deduce que adquiere la capacidad de atravesar las envolturas celulares al ser modificado postraduccionalmente (Gaggero et al., 1993; Rodríguez et al., 1999).

El gen *mchI* codifica para un péptido hidrofóbico localizado en la membrana citoplásmica que le confiere inmunidad a la célula productora (Gaggero et al., 1993; Rodríguez & Laviña, 1998).

La microcina H47 es secretada al medio extracelular por un mecanismo de transporte específico en el que están involucrados los productos de los genes *mchE* y *mchF*. Las mutaciones que afectan los genes *mchE* y/o *mchF* determinan un fenotipo de no producción antibiótica, entendiendo por producción la suma de los procesos de síntesis y exportación. Por lo tanto, estos mutantes no producen halo de inhibición de crecimiento cuando se pican sobre un tapiz de células sensibles a MccH47. Sin embargo, los lisados de estas células permitieron detectar actividad antibiótica intracelular (producen halos de inhibición de crecimiento sobre un tapiz de una cepa sensible), de lo que se dedujo que los mutantes *mchE* y/o *mchF* pueden sintetizar MccH47 activa (Gaggero et al., 1993). Estos resultados indican que las mutaciones en estos dos genes afectan una etapa posterior a la síntesis de la microcina, como lo es su

exportación al medio extracelular.

Se sabe que, además de los productos de los genes *mchE* y *mchF*, el producto del gen *tolC*, no ligado al sistema, es también necesario para una eficiente producción antibiótica. El gen *mchE* codifica para dos proteínas de peso molecular aparente de 45 y 30 kDa y el gen *mchF* codificaría para un producto de al menos 64 kDa. Se ha propuesto que los productos de los genes *mchE* y *mchF* actuarían formando un complejo con la proteína de membrana externa TolC y constituirían así un sistema exportador ABC específico para la secreción de MccH47 (Gaggero et al., 1993).

Las similitudes que presentan los sistemas de exportación ColV y MccH47 sugieren que ambos antibióticos podrían ser secretados por un mecanismo similar, o sea a través de un sistema dedicado de transporte de tipo ABC. Un dato que aboga a favor de esta hipótesis es la identificación, en la secuencia aminoacídica deducida de MchB, de una secuencia señal con un motivo de “doble glicina” (Havarstein et al., 1995; Rodríguez et al., 1999), (Fig. I. 7).

		?	↓
MchB	-----	MREITESQLRVISGA	
LagA	-----	MKELSEKELRECVGG	
PedA	-----	MKKIEKLTEKEMANIIGG	
LagB	-----	MKNNNNFFKGM E I I E D Q E L V S I T G G	
PlnA	-----	MKI Q I K G M K Q L S N K E M Q K I V G G	
CylL1	-----	MENLSVVPS FEELSVEEMEAIQGS	
CylL2	VLNKENQENYYSNKLELVGPS	FEELSLEEMEAIQGS	
LcnA	-----	MKNQLNFNIVSDEELSAENGG	
LcnB	-----	MKNQLNFNIVSDEELAEVNGG	
LcnM	-----	MKNQLNFEILSDEELQGINGG	
LcnN	-----	MKKDEANTFKEYSSSFAIVTDEELENINGS	
LcnDR1	-----	MKEQNSFNLLQEVTESELDLILGA	
CvaC	-----	MRTLTLNELDSVSGG	

Fig I. 7. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas N-terminales correspondientes a los péptidos líder de tipo doble glicina presentes en algunos antibióticos peptídicos secretados a través de transportadores ABC: microcina H47 (MchB), lactococcina G α (LagA), pediocina PA-1 (PedA), lactococcina G β (LagB), plantaricina A (PlnA), hemolisina/bacteriocina de *Enterococcus faecalis* (CylL1 y CylL2), lactococcina A (LcnA), lactococcina B (LcnB), lactococcina M (LcnM y LcnN), lactococcina DR (LcnDR1) y colicina V (CvaC). La flecha vertical indica el sitio consenso de procesamiento de los péptidos líder doble glicina. En rojo se consignan los aminoácidos que son idénticos o similares en cinco o más de los antibióticos bajo comparación. ?: presencia de una glutamina (Q) en lugar del ácido glutámico (E) consenso. Extraído de Rodríguez et al., 1999.

II. HIPÓTESIS

La hipótesis central de este trabajo es que el antibiótico microcina H47 sería secretado al medio extracelular por un mecanismo dedicado de transporte de tipo ABC. El sistema ABC estaría constituido por las proteínas: 1) MchF, que por homología al sistema ColV podría ser la proteína exportadora ABC; 2) MchE, que por igual paralelismo sería el segundo componente de tipo MFP; y 3) TolC, que constituiría el componente de membrana externa.

Particularmente, teniendo como antecedente la identificación de dos productos proteicos del gen *cvaA*, que constituye el segundo componente en el sistema de exportación de ColV, se piensa que el gen *mchE* también codificaría para dos proteínas denominadas MchE y MchE*, según la información obtenida en sistemas PAGE (Gaggero et al., 1993). MchE sería el segundo componente (MFP) del sistema secretor de MccH47, localizándose en el periplasma. MchE* sería el resultado de una iniciación interna de la traducción, dentro del marco de lectura abierta para MchE. Carecería de una señal Sec de exportación en su extremo N-terminal, por lo que se presume que sería de localización citoplásmica. No aventuramos ninguna hipótesis acerca de su función pero sí consideramos de interés abordar su estudio.

III. OBJETIVOS

III. 1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue el de estudiar el mecanismo de secreción del antibiótico microcina H47.

Se pretende obtener conocimiento sobre la función de los genes de secreción de este antibiótico, así como sobre la localización subcelular de algunos de sus productos proteicos. Se espera poder identificar cada uno de estos productos génicos con cada uno de los componentes de un sistema transportador ABC.

Desde este punto de vista, estos estudios podrían contribuir al entendimiento de los procesos de secreción de péptidos en bacterias y más concretamente, de los sistemas transportadores ABC.

III. 2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo han sido:

1. Secuenciar la región de DNA que contiene los genes de secreción de la MccH47, *mchE* y *mchF*. Mediante este procedimiento se identificarán los marcos de lectura abiertos correspondientes a estos genes. Las secuencias nucleotídicas y las deducidas aminoacídicas se analizarán por programas de computación. También se compararán con los bancos de datos buscando analogías con los componentes de otros sistemas transportadores ABC.
2. Analizar los productos del gen *mchE*. Por este procedimiento se intentará identificar los marcos abiertos de lectura de ambos genes solapantes, denominados *mchE* y *mchE**. Se estudiará la localización subcelular de sus productos a través de la obtención de proteínas fusión que involucren parte de la secuencia peptídica de MchE/ MchE* con las proteínas fosfatasa alcalina y β -galactosidasa, de localización periplásmica y citoplásmica, respectivamente.
3. Si se encuentran grandes homologías de secuencia entre el sistema de secreción de MccH47 y otros sistemas bacterianos de secreción, se realizarán estudios de complementación heteróloga.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. 1. Estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos

Los genotipos, fenotipos y procedencia de las estirpes bacterianas, plásmidos y bacteriófagos utilizados se describen en la Tabla IV. 1.

IV. 2. Medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: medio rico LB, medio mínimo M63 adicionado de una fuente de carbono y vitamina B1 según se describe en Miller, 1992.

Los antibióticos se añadieron a las concentraciones finales siguientes:

ampicilina	(Ap)	50 µg/ml
cloranfenicol	(Cm)	30 µg/ml
kanamicina	(Km)	30 µg/ml
kanamicina 10x	(Km 10x)	300 µg/ml
tetraciclina	(Tc)	12 µg/ml

Se utilizaron los siguientes indicadores cromogénicos: XP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) a una concentración final de 40 µg/ml para la actividad fosfatasa alcalina (PhoA) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) a una concentración final de 20 µg/ml para la actividad β-galactosidasa (LacZ).

IV. 3. Prueba de producción de MccH47

Se cubren cajas de medio mínimo M63-glucosa con 3 ml de agar blando conteniendo unas 10^7 ufc de una estirpe indicadora. Los clones a ensayar se inoculan por picada sobre el tapiz de agar blando. Las placas se incuban 18 a 24 horas y se observa la aparición de halos de inhibición del crecimiento de la estirpe indicadora sensible alrededor de las picadas de clones productores. Siempre se incluyeron picadas control de estirpes productora y no productora. Los ensayos se hicieron siempre sobre dos tipos de tapices, uno con una estirpe sensible y otro con una estirpe inmune al antibiótico. De esta forma, se aseguró la especificidad de las actividades detectadas: aquellas picadas que produjeron halo sobre la estirpe sensible y no sobre la inmune, corresponden a cepas productoras de MccH47. En casi todos los casos, los tapices fueron de la pareja de estirpes MC4100 *tolC* (pUC13) y MC4100 *tolC* (pUY69), sensible e inmune a MccH47, respectivamente. Las estirpes defectivas para la proteína de membrana externa TolC se caracterizan por una desestructuración de esta membrana, con discontinuidades que la hacen permeable a las sustancias hidrofóbicas. Por lo tanto, el antibiótico ingresa en mayor cantidad y, como resultado, estas células son hipersensibles a la microcina, obteniéndose halos de mayor tamaño. La prueba de producción colicina V se realizó de igual manera utilizando RYC1000 (pEX100) y RYC1000 (pACYC184), como estirpes sensibles a ColV, y PAP222 como estirpe inmune.

Tabla IV. 1. Estirpes bacterianas, bacteriófagos y plásmidos

Bacterias, Fagos, Plásmidos	Genotipo/Fenotipo	Orígen/referencia
<u><i>E. coli</i> K12</u>		
RYC1000	F <i>araD139 ΔlacU169 rbs7 rpsL relA thiA gyrA</i> (Sm ^R , Nal ^R)	Gaggero et al., 1993
CC118	Δ(<i>ara- leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE (am) recA1</i> (Rif ^R)	Manoil, 1990
CC170	CC118 con una inserción cromosómica Tn <i>lac</i> (Km ^R)	Manoil, 1990
MC4100	F <i>araD139 lacU169 rpsL thiA relA</i> (Sm ^R)	Casadaban, 1976
MC4100 <i>tolC</i>	Transductante Km ^R (<i>tolC::Tn5</i>) de MC4100 infectada con P1(GC7442)	Wandersman & Delepelaire, 1990
PAP222	W3110 (pColV-K270) + (pR538 <i>drd</i>) (Cm ^R)	Pugsley & Oudega, 1987
<u>Bacteriófagos</u>		
λ-Tn <i>phoA</i>	<i>b221 ci857 Pam3</i> con Tn <i>phoA</i> en o cerca de <i>rex</i> (Km ^R)	Manoil & Beckwith, 1985
<u>Plásmidos</u>		
pACYC184	Tc ^R Cm ^R replicón p15A	Miller, 1992
pUC13	<i>bla lacZ'</i> replicón ColE1 (Ap ^R)	Miller, 1992
pEX4	Derivado de pUC13 con el sistema MccH47 (Ap ^R)	Laviña et al., 1990
pEX4::Tn5 49	pEX4 <i>mchE::Tn5</i> (Ap ^R Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX4::Tn5 B58	pEX4 <i>mchE::Tn5</i> (Ap ^R Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX4::Tn5 26	pEX4 <i>mchE::Tn5</i> (Ap ^R Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX100	Derivado de pACYC184 con el sistema MccH47 (Cm ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX100::Tn <i>lac</i> 7.1	pEX100 <i>mchE::Tnlac</i> (Cm ^R Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX100::MudI1681 30.4	pEX100 <i>mchE::MudI1681</i> (Cm ^R Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX100::MudI 1681 30.5	pEX100 <i>mchE::MudI1681</i> (Cm ^R Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX100::MudI 1681 80.9	pEX100 <i>mchE::MudI1681</i> (Cm ^R Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX100::MudI 1681 30.9	pEX100 <i>mchF::MudI1681</i> (Cm ^R Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pEX100::MudI 1681 40.1	pEX100 <i>mchF::MudI1681</i> (Cm ^R Km ^R)	Gaggero et al., 1993
pUY270	Derivado de pUC13 con el sistema ColV (Ap ^R)	Este trabajo
pUY14	Derivado de pUC13 con <i>mchE</i> (Ap ^R)	Gaggero et al., 1993
pUY69	Derivado de pUC13 con <i>mchl</i> (Ap ^R)	Rodríguez & Laviña, 1998
pMVD14	Derivado de pACYC184 con <i>mchE</i> (Tc ^R)	Este trabajo

IV. 4. Prueba de inmunidad a la MccH47

Para determinar la inmunidad/sensibilidad a MccH47, se prepararon tapices de los clones a ensayar, según se describió en el ítem anterior. Sobre cada uno de éstos se inocularon por picada una estirpe productora y una estirpe no productora del antibiótico. De esta forma, se evaluó la sensibilidad al antibiótico por los halos que aparecieron alrededor de la picada de la estirpe productora y la inmunidad al mismo por la ausencia de halos. En todos los casos, las picadas fueron de la pareja de estirpes RYC1000 (pEX100) y RYC1000 (pACYC184), productora y no productora de MccH47, respectivamente.

IV. 5. Manipulación del DNA

El DNA plasmídico se preparó siguiendo el protocolo de lisis alcalina descrito por Sambrook et al., 1989. También se usó el método de lisis rápida descrito por Chowdhury, 1991. Las digestiones con endonucleasas de restricción, ligaciones con T4 DNA ligasa, transformación de células competentes y electroforesis en geles de agarosa se realizaron tal como se describe en Sambrook et al., 1989.

Para secuenciar el DNA en el laboratorio se utilizó el método de los dideoxinucleótidos descrito por Sanger et al., 1977, aplicado a DNA de doble cadena y utilizando oligonucleótidos de síntesis. Se empleó Sequenase 2.0 de US Biochemical, siguiendo las instrucciones del fabricante. Parte de los datos de secuencia se obtuvieron a través del “DNA Sequencing Core Laboratory Service” de la Universidad de Florida, USA.

La determinación de los sitios de unión en las fusiones génicas se realizó por secuenciación desde una secuencia del transposón próxima al extremo involucrado en la fusión. Los oligonucleótidos empleados como iniciadores (“primers”) fueron: “GGC GAA AGG GGG ATG TG” para las fusiones con *lacZ* y “TGC AGT AAT ATC GCC CT” para las fusiones con *phoA*.

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se utilizaron los siguientes programas computacionales: BLAST (Altschul et al., 1997), FASTA (Pearson & Lipman, 1988), SIM (Huang & Miller, 1991), SOAP (Kyte & Doolittle, 1982), Tmpred (Hofmann & Stoffel, 1993), TopPred 2 (Claros & von Heijne, 1994).

IV. 6. Fusiones génicas con *mchE*

El análisis de la localización subcelular de los productos del gen *mchE* se basó en la formación de fusiones génicas, tanto con el gen reportero *lacZ* como con el gen reportero *phoA*. Una fusión génica tiene como producto una proteína híbrida formada por la porción N-terminal del producto del gen de interés y la porción C-terminal del producto del gen reportero. En nuestro caso, se obtuvieron proteínas fusión MchE-LacZ y MchE-PhoA. Cuando se utiliza el gen reportero *lacZ*, las proteínas híbridas tienen actividad β -galactosidasa siempre y cuando se localicen en el citoplasma. Por lo tanto, la obtención de fusiones con esta actividad suele ser indicativa de que el gen de interés codifica para una proteína de localización citoplásmica (Silhavy & Beckwith, 1985). Para obtener la información complementaria a la brindada por las fusiones génicas con *lacZ*, se generaron fusiones génicas con *phoA*. El producto del gen *phoA* es una proteína periplásmica, la fosfatasa alcalina, cuya actividad se pone de manifiesto solamente cuando la enzima se encuentra en el periplasma. Por lo tanto, para que las proteínas híbridas con PhoA posean actividad fosfatasa alcalina, la porción N-terminal codificada por el gen de interés

debe contribuir con secuencias promotoras de exportación. Es así que este gen reportero sirve para detectar señales de exportación y regiones de transmembrana dentro de la estructura de una proteína (Manoil & Beckwith, 1985).

IV. 6. 1. Mutagénesis del plásmido pMVD14 por inserción del transposón *TnphoA*

El transposón *TnphoA* es un derivado del Tn5 construido por Manoil & Beckwith, 1985 (Fig. IV. 1). La secuencia de inserción izquierda del Tn5 se encuentra interrumpida por un fragmento de DNA que contiene casi todo el gen *phoA*, carente de la secuencia que codifica para el péptido señal más cinco aminoácidos adicionales. Seguido a este fragmento de DNA se encuentra el resto de la secuencia de inserción izquierda. De este modo, si el transposón *TnphoA* se inserta en un gen en la orientación y marco de lectura adecuados, es posible generar una fusión génica que codificará para una proteína híbrida con la fosfatasa alcalina en su extremo C-terminal. Se utilizó el fago λ -*TnphoA* como donante de este transposón.

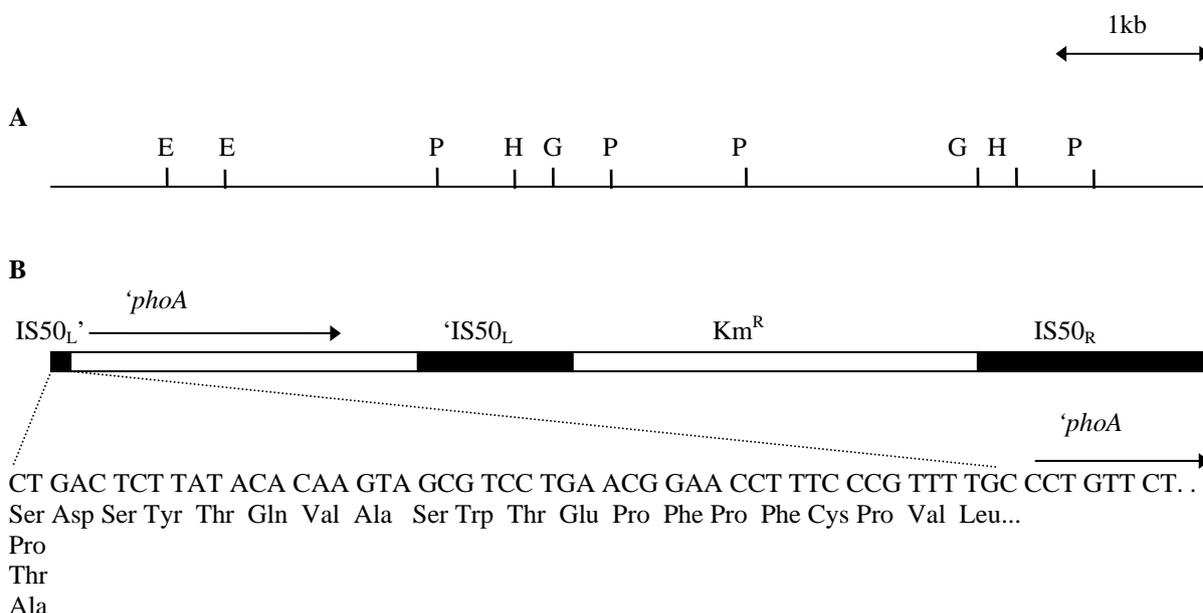


Fig. IV. 1. Representación esquemática del transposón *TnphoA*, de 7.737 pb de extensión. **A)** mapa físico. E: *EcoRI*; G: *BglIII*; H: *HindIII*; P: *PstI*. **B)** mapa genético y secuencia nucleotídica del extremo izquierdo con la secuencia aminoacídica deducida.

El bacteriófago λ utilizado tiene el siguiente genotipo: *b221 cI857 Pam3 TnphoA* en o cerca de *rex*. La delección *b221* remueve la región de integración al cromosoma bacteriano; el transposón está insertado en o cerca del gen *rex* que no es esencial para el crecimiento del fago; la mutación *cI857* resulta en un represor cI termosensible que es inactivo a 42° C; la mutación ámbar en el gen de replicación *P* le incapacita para mantenerse como replicón autónomo en una bacteria *su⁻*. Por lo tanto, se trata de un fago incapaz de lisogenizar ni de entrar en ciclo lítico en un contexto *su⁻*, actuando así como donante del transposón *TnphoA*. Si se infectan con este fago células *su⁻* sensibles a λ , el *TnphoA* puede transponerse al DNA bacteriano mutagenizando los genes donde se inserte. El DNA de λ se pierde pues no lisogeniza ni entra en ciclo lítico. La presencia de este transposón se detecta fácilmente porque confiere resistencia a la kanamicina.

La estirpe CC118 (pMVD14) se cultivó en LB Tc (para asegurar el mantenimiento del plásmido), maltosa al 0,4% (para inducir la producción del receptor de λ) y MgSO₄ 10mM (para favorecer la adsorción fágica) hasta fase logarítmica avanzada (2×10^8 ufc/ml). Se mezclaron 0,1 ml de células con una dilución del fago de modo de obtener una multiplicidad de infección igual

a uno. Se utilizó un lisado del fago λ -*TnphoA*, previamente obtenido, con un título de alrededor de 4×10^{10} ufp/ml. Se realizó la adsorción a 30° C durante 20 minutos y luego se añadieron 2 ml de LB Tc. Se incubó a 30° C durante 4 ½ horas para permitir la expresión fenotípica de la Km^R . De esta manera se hicieron 6 experimentos separados para obtener mutantes independientes. Paralelamente, se realizaron los controles bacteria y fago. Se llevaron a cabo controles de células viables antes y después de la mutagénesis, haciendo plaqueos en LB Tc. Luego se plaquearon alícuotas de cada experimento en LB Tc Km^R XP y las placas se incubaron a 30° C durante 3 días. El XP es un indicador cromogénico que sirve de sustrato para la fosfatasa alcalina; al ser hidrolizado genera color azul. Por lo tanto, las colonias $PhoA^+$ serán azules en presencia de XP, mientras que las $PhoA^-$ serán blancas. Se purificaron los clones azules, se extrajo su DNA plasmídico y éste se utilizó para transformar la estirpe CC118. En todas las transformaciones se seleccionaron los clones $Tc^R Km^R$ en presencia de XP, o sea aquellos con una inserción *TnphoA* en pMVD14. Se continuó trabajando con los clones azules en los que seguramente había ocurrido una fusión génica cuyo producto híbrido era exportado fuera del citoplasma.

IV. 6. 2. Mutagénesis del plásmido pMVD14 por inserción del transposón *Tnlac*

El transposón *Tnlac* es un derivado del Tn5 construido por Manoil, 1990 (Fig. IV. 2). La secuencia de inserción izquierda del Tn5 está interrumpida por un fragmento de DNA que contiene casi todo el gen *lacZ*, carente de las señales de iniciación de la transcripción y de la traducción, así como también de sus 8 primeros codones. En el fragmento de DNA que se extiende desde el extremo izquierdo del *Tnlac* hasta el comienzo del gen *lacZ* truncado se eliminaron todos los codones sin sentido en fase con *lacZ*. De este modo, si el transposón *Tnlac* se inserta en un gen en la orientación y marco de lectura correctos es posible generar una fusión génica que codificará para una proteína híbrida con la β -galactosidasa en su extremo C-terminal.

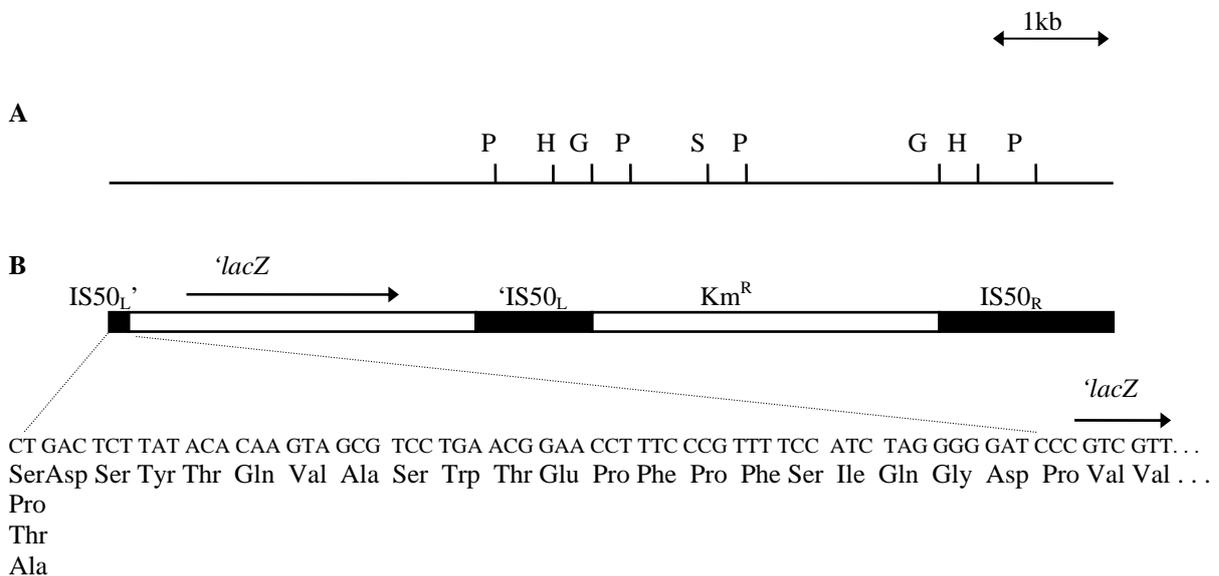


Fig. IV. 2. Representación esquemática del transposón *Tnlac*, de 8.593 pb de extensión. **A)** mapa físico. G: *BgIII*; H: *HindIII*; P: *PstI*; S: *SmaI*. **B)** mapa genético y secuencia nucleotídica del extremo izquierdo con la secuencia aminoacídica deducida.

El protocolo seguido para mutagenizar el plásmido pMVD14 fue el descrito por Manoil, 1990. Se realizaron cinco experimentos independientes que consistieron en la transformación de células competentes de CC170 con el plásmido a mutagenizar, pMVD14. Los transformantes se

seleccionaron en placas de LB Tc Km (10x) X-gal que fueron incubadas durante 48 horas a 30° C. La tetraciclina se adicionó para asegurar el mantenimiento del plásmido pMVD14. Se agregó diez veces la concentración normal de kanamicina de manera de favorecer el crecimiento de aquellas células que portaban una inserción *Tnlac* en el plásmido multicopia pMVD14. El X-gal se adicionó como indicador cromogénico que sirve de sustrato para la β -galactosidasa; éste al ser hidrolizado genera color azul. Por lo tanto, las colonias Lac^+ serán azules en presencia de X-gal, mientras que las Lac^- serán blancas. Se purificaron los clones Lac^+ obtenidos y luego se extrajo su DNA plasmídico, con el que se transformó la estirpe CC118. En todas estas transformaciones se seleccionaron los clones en placas de LB Tc Km X-gal que se incubaron a 30° C. De esta manera, crecerán transformantes sólo cuando la inserción del *Tnlac* haya ocurrido en el plásmido pMVD14. Dentro de este grupo, se continuó trabajando con los transformantes azules, o sea los que portaban fusiones génicas con *lacZ*.

IV. 7. Medidas de actividad β -galactosidasa y fosfatasa alcalina

Se llevó a cabo la determinación de las actividades β -galactosidasa y fosfatasa alcalina en cultivos de las cepas mutantes portadoras de fusiones génicas con los genes reporteros *lacZ* y *phoA*, respectivamente.

Los protocolos realizados fueron el descrito por Miller, 1992 para la actividad β -galactosidasa y por Brickman & Beckwith, 1975 para la actividad fosfatasa alcalina. Las determinaciones se hicieron por duplicado para cada cepa mutante y condición experimental. Las actividades se midieron: 1) en cultivos en fase logarítmica y 2) en cultivos de toda la noche, en fase estacionaria.

V. RESULTADOS

V. 1. Secuencia nucleotídica de *mchE* y *mchF* y análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas

Se determinó la secuencia nucleotídica en ambas cadenas de un fragmento de DNA *EcoRI-BamHI* de 4196 pb que contiene los genes *mchE* y *mchF*. Aproximadamente el 50% de la secuencia fue obtenida en el laboratorio* y el 50% restante mediante un servicio de secuenciación externo. En ambos casos consistió en reacciones de secuencia con distintos plásmidos construídos en el laboratorio, portadores de segmentos parciales de la región a secuenciar. Además, dicha información se completó con la secuenciación de los sitios de unión en las fusiones génicas entre *mchE* y *lacZ* o *phoA* (Figs. V. 1, 2 y 10).

Una vez obtenida la secuencia nucleotídica completa, se procedió a buscar los marcos abiertos de lectura. Teniendo en cuenta datos genéticos anteriores que asignaban a los genes *mchE* y *mchF* una dirección de transcripción de derecha a izquierda (Gaggero et al., 1993), se buscaron ORFs en esta dirección pero no se hallaron. Sin embargo, en la dirección contraria se encontraron dos grandes ORFs, con la localización y extensión esperada para estos dos genes (Figs. V. 1 y 2). El conjunto de los resultados de este trabajo confirmó que estos dos ORFs eran en efecto *mchE* y *mchF* (ver más adelante).

El primer marco abierto de lectura se encontró entre los nucleótidos 351 y 1625, con una extensión de 1275 pb, y se asignó al gen *mchE*. Se consideró el comienzo de este gen en un codón TTG por analogía con el gen *cvaA* del sistema ColV (ver más adelante). Una posible secuencia Shine-Dalgarno (AGGAG), próxima a la consenso, se sitúa seis nucleótidos antes del codón de inicio de la traducción. Además, dentro de este marco abierto de lectura, se encontró un posible inicio interno de la traducción, en fase con el anterior, determinando un ORF entre los nucleótidos 852 y 1625, con una extensión de 774 pb. Estaría precedido a once nucleótidos del codón de iniciación por una posible secuencia de unión a ribosoma AAGG y finalizaría en el mismo codón de terminación que *mchE*. Este segundo ORF fue tenido en cuenta por homología con el sistema ColV (ver más adelante) y se designó provisionalmente *mchE** (Figs. V. 1 y 2).

El segundo marco abierto de lectura se encontró entre los nucleótidos 1618 y 3714, con una extensión de 2097 pb, y se asignó al gen *mchF*. Una posible Shine-Dalgarno (AGGA) se sitúa a siete nucleótidos del codón de inicio ATG. Este marco abierto de lectura tiene un pequeño solapamiento en su inicio con el final de *mchE* (Figs. V. 1 y 2).

La secuencia aminoacídica deducida de *mchE* tiene 424 residuos y daría lugar a un producto MchE de 48.719 Da. Esta proteína sería integral de membrana, presentando un único segmento de transmembrana con unos límites mínimos en los residuos 24 y 44 (Claros & Von Heijne, 1994). El análisis de hidropaticidad muestra una región hidrofóbica N-terminal, coincidente con el segmento de transmembrana, y el resto de la proteína con un perfil predominantemente neutro, sin regiones marcadamente hidrofóbicas o hidrofílicas (Kyte & Doolittle, 1982) (Fig. V. 3). La ORF interna daría lugar a un producto proteico de 257 residuos, de 29.445 Da, que correspondería a MchE*. MchE* sería idéntica en secuencia aminoacídica a MchE, pero carecería de los primeros 167 residuos.

La secuencia aminoacídica deducida de *mchF* tiene 698 residuos y daría un producto MchF de 77.851 Da. Esta proteína sería integral de membrana con los extremos amino y carboxilo localizados en el citoplasma. En efecto, se pudieron identificar en ella con claridad

* Parte de la secuencia fue realizada por Eliana Rodríguez

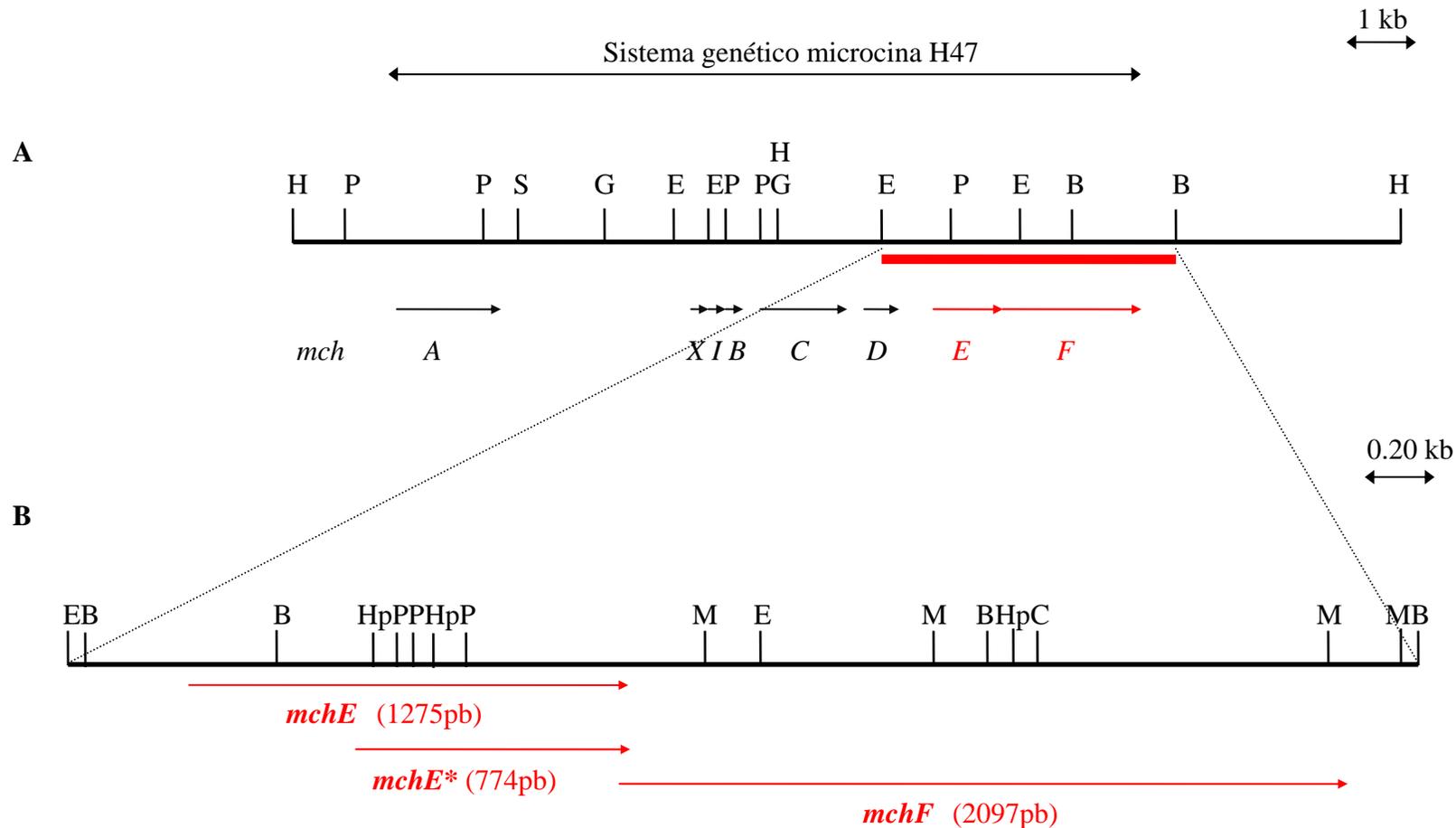


Fig. V. 1. A) Región de DNA que contiene el sistema genético microcina H47. Se muestran el mapa físico y la extensión del sistema antibiótico. Los genes *mch*, con su dirección de transcripción, se representan abajo. Se señala con barra roja el segmento de DNA cuya secuencia *mch* se presenta en este trabajo y que contiene los genes *mchE* y *mchF*. B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; G: *Bg*III; H: *Hind*III; P: *Pst*I; S: *Sal*I. El mapa de restricción está completo para estas enzimas, salvo para *Bam*HI y *Eco*RI donde sólo se indican dos y cuatro sitios, respectivamente. B) ampliación del segmento que contiene los genes *mchE* y *mchF*. Se muestra el mapa físico y los genes, cuya extensión y dirección de transcripción se representan abajo. Los sitios de corte para enzimas de restricción se consignan igual que en A) y se añaden C: *Cla*I; Hp: *Hpa*I y M: *Sma*I. El mapa físico está completo para todas las enzimas consignadas.

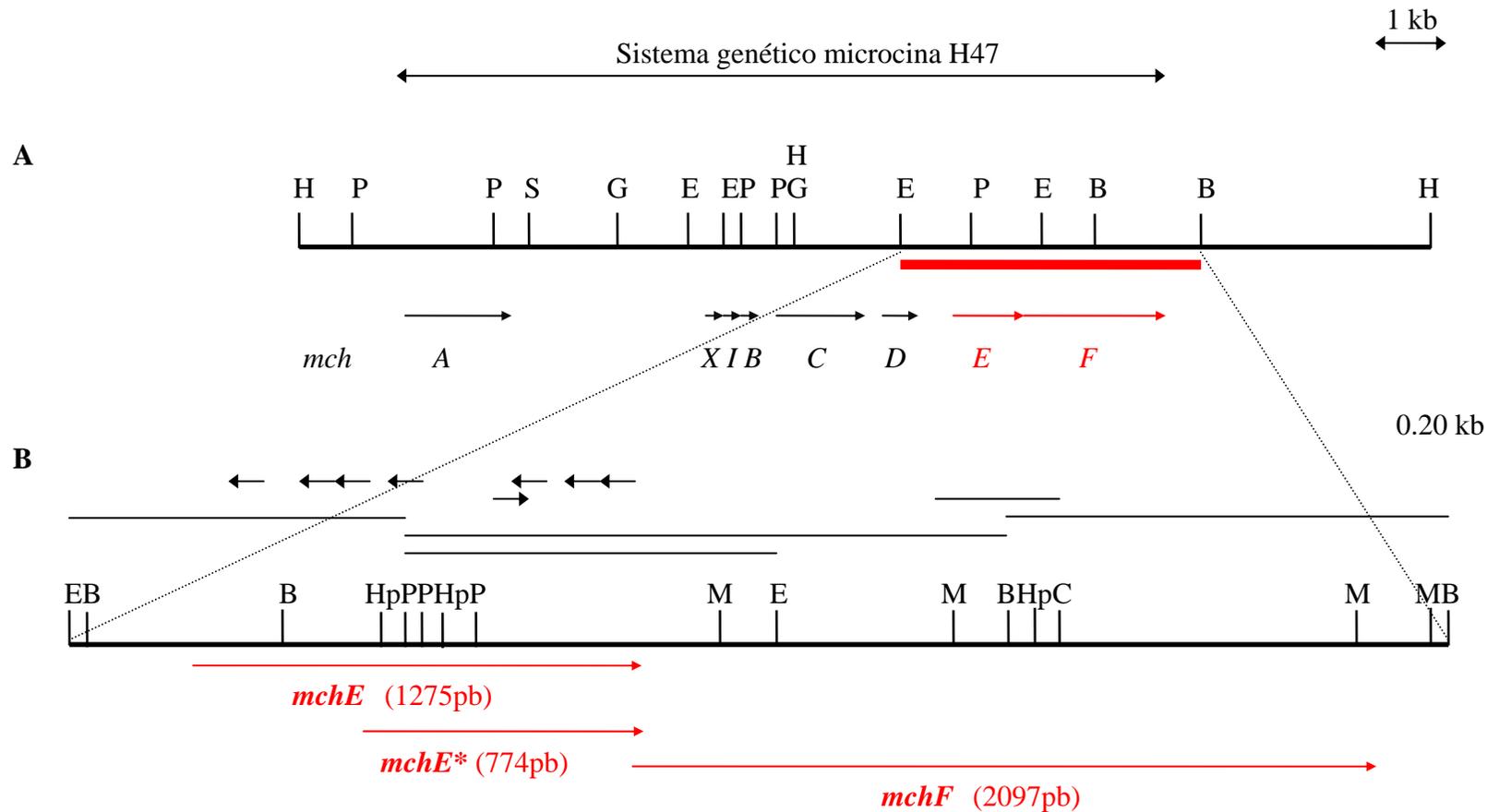


Fig. V. 1. A) Región de DNA que contiene el sistema genético microcina H47. Se muestran el mapa físico y la extensión del sistema antibiótico. Los genes *mch*, con su dirección de transcripción, se representan abajo. Se señala con barra roja el segmento de DNA cuya secuencia *mch* se presenta en este trabajo y que contiene los genes *mchE* y *mchF*. B: *Bam*HI; *E*: *Eco*RI; *G*: *Bg*III; *H*: *Hind*III; *P*: *Pst*I; *S*: *Sal*I. El mapa de restricción está completo para estas enzimas, salvo para *Bam*HI y *Eco*RI donde sólo se indican dos y cuatro sitios, respectivamente. B) ampliación del segmento que contiene los genes *mchE* y *mchF*. Se muestra el mapa físico y los genes, cuya extensión y dirección de transcripción se representan abajo. Los sitios de corte para enzimas de restricción se consignan igual que en A) y se añaden *C*: *Cla*I; *Hp*: *Hpa*I y *M*: *Sma*I. El mapa físico está completo para todas las enzimas consignadas. Arriba se consignan con líneas los segmentos de DNA secuenciados pertenecientes a insertos de varias construcciones recombinantes. Con flechas se indican los segmentos *mch* secuenciados en plásmidos con inserciones *Tnlac* o *TnphoA*, utilizando iniciadores complementarios a un extremo del transposón. En cada caso se diluyó una secuencia *mch* de aproximadamente 300 nucleótidos.

EcoRI *BamHI*
1 GAATTCAGGTTGCATCCGTCTGAATGGAATGAAGATGGAAGGATCTGGATCCTGGATTTC
61 TGTGTAAACCAGGCTTTGGTCGAAAAGTTATTGACTATCTCATACAGCTTCAGCCATGG
121 GGGGAAGGAGAAGTACGATGGTTAAGCAGGCGAAAGAAAATTGTGACATACATCCCTGAG
181 CGGCTGCATAAAACGTAGTACCTCTGAAGATACAGAGATAATTGTAAATTACGGGGTAAA
241 TGCATCGCTGATACTATTTTGACAGGACTCTGTATTTTCTGGCTTTGATTATAGCGTTTC
301 GGTTAATCAGTGAAGGTATTACAGGAAAAGTGTGAGTAAGAGGAGCTATTTTGGTTTCGTC
MchE M F R
361 AGGATGCTTTAGAAAACAGAAAAATGAAGTGGCAGGGACGGGCAATATTACTTCCCGGAA
Q D A L E N R K M K W Q G R A I L L P G
421 TACCACATGGTTAATCATGCTGGGAAGCATTGTGTTTATTACGGCATTTCGATGTTCA
I P L W L I M L G S I V F I T A F L M F
KpnI *mchE54-phoA*
481 TTATTGTTGGTACCTATAGCCCGCGTGTAAATGTCAGTGGTGAGGTCACAACCTGGCCAA
I I V G T Y S R R V N V S G E V T T W P
541 GAGCTGTCAATATATATTCAGGTGTACAGGGATTTGTTGTGACAGCAATTTGTTTCATGAAG
R A V N I Y S G V Q G F V V R Q F V H E
BamHI
601 GGCAGTTGATAAAAAAAGGGATCCTGTTTTATCTGATTGACATCAGTAAAAGTACACGTA
G Q L I K K G D P V Y L I D I S K S T R
PvuII
661 GTGGTATTGTCACTGATAATCATCGGCGGGATATAGAAAATCAGCTGGTTCGTGTGGACA
S G I V T D N H R R D I E N Q L V R V D
721 ACATTATTTCCCGTCTGGAAGAAAGTAAAAAATAACGTTAGATACCCTGGAAAAACAAC
N I I S R L E E S K K I T L D T L E K Q
mchE158-phoA mchE162-phoA
781 GTCTGCAATACACAGATGCGTTTCGTGCTCATCAGATATTATACAGCGTGCAGAGGAAG
R L Q Y T D A F R R S S D I I Q R A E E
841 GGATAAAAAATAATGAAAAACAATATGGAGAATTACAGAACTATCAGGCAAAAGGGCTGA
G I K I M K N N M E N Y R N Y Q A K G L
MchE* *HpaI*
901 TTAATAAAGATCAGTTAACTAACCAGGTGGCATTATATTATCAGCAACAAAACAATCTTC
I N K D Q L T N Q V A L Y Y Q Q Q N N L
PstI
961 TCAGCCTGAGCGGACAGAACGAAACAGAATGCCCTGCAGATAACCACTCTGGAGAGTCAGA
L S L S G Q N E Q N A L Q I T T L E S Q
PstI
1021 TTCAGACTCAGGCTGCAGATTTTGATAACCGTATCTACCAGATGGAAGTGCACCGGTACG
I Q T Q A A D F D N R I Y Q M E L Q R Y
HpaI mchE253-phoA
1081 AGTTACAGAAAGAACTGGTTAACTACTGATGTGGAGGGCGAAATTATTATCCGGGCGTTGA
E L Q K E L V N T D V E G E I I I R A L
1141 CTGACGGGAAAGTTGACTCCCTGAGTGTCACTGTGCGGGCAATGGTCAATACCGGAGACA
T D G K V D S L S V T V G Q M V N T G D
EcoNI/PstI
1201 GCCTTCTGCAGGTTATTCCCTGAGAACATTGAAAATATTATCTTATTCTCTGGGTCCCAA
S L L Q V I P E N I E N Y Y L I L W V P
1261 ATGATGCTGTTCCCTTATATTTCCGCTGGTGACAAAGTGAATATTCGTTATGAAGCCTTTC
N D A V P Y I S A G D K V N I R Y E A F
mchE343-phoA
1321 CGGCAGAAAAATTTGGGCGATTCTCTGCTACGGTTAAAATATATCCAGGACTCCTGCGT
P A E K F G Q F S A T V K T I S R T P A
1381 CAACACAGGAAATGTTGACCTATAAGGGTGCACCACAGAATACGCCGGGCGCCTCTGTTC
S T Q E M L T Y K G A P Q N T P G A S V
mchE367-lacZ
1441 CCTGGTATAAAGTCATTGCGATGCCTGAAAAGCAGATTATCAGATATGACGAAAAATACC
P W Y K V I A M P E K Q I I R Y D E K Y

1501 TCCCTCTGGAAAATGGAATGAAAGCCGAAAGTACACTATTTCTGGAAAAAAGGCGTATTT
L P L E N G M K A E S T L F L E K R R I
mchE407-lacZ

1561 ACCAGTGGATGCTTTCTCCTTTCTATGACATGAAACACAGTGAACAGGACCGCTCAATG
Y Q W M L S P F Y D M K H S A T G P L N
MchF M

1621 ACTAACGGGAGTTTCAGACAAATTATAAATCAGCTTGATATGCGCTGGCGACGTCGTGTT
D *
T N G S F R Q I I N Q L D M R W R R R V

1681 CCGGTTATTCATCAGACGGAGACCGCTGAATGTGGACTGGCCTGCCTGGCAATGATATGC
P V I H Q T E T A E C G L A C L A M I C

1741 GGTCATTTTGGTAAGAATATTGACCTGATATCTCTTCGCCGGAAGTTTAATCTCTCGGCC
G H F G K N I D L I S L R R K F N L S A
PvuII SmaI

1801 CGTGGAGCAAACCTTGCAGGAATCAATGGAATAGCGGAGCAGCTGGGGATGGTCA^{CCCCG}
R G A N L A G I N G I A E Q L G M V T R

1861 GCTCTTTCCTGAGCTGGATGAACTTGGTGCCTCAAAATGCCGTGATTCTCCACTGG
A L S L E L D E L G A L K M P C I L H W

1921 GATTTCACTACTTTGTCTGCTGGTCAGCGTAAAGCGTAACCGTTATGTACTGCATGAT
D F S H F V V L V S V K R N R Y V L H D

1981 CCGGCCAGAGGCAGAAGATATCTCGGTCCGGGAGGAAATGAGCCGGTATTTTACGGGCATT
P A R G R R Y L G R E E M S R Y F T G I
EcoRI

2041 GCACTTGAGGTCTGGCCTGGAAGTGAATTCCTGGCGAAACCCAGCAGATCCGCATAAGT
A L E V W P G S E F L A E T Q Q I R I S

2101 CTCCGTTCACTGATTAACAGTATTTACGGTATTAAGAAGAACTGGCGAAAATTTCTGT
L R S L I N S I Y G I K R T L A K I F C
PvuII

2161 CTGTCAGTTGTAATTGAAGCAATCAATCTGGTAATGCCGGTGGGGACTCAGCTGGTTATG
L S V V I E A I N L V M P V G T Q L V M

2221 GATCATGCGATTCCGGCGGGGGACAGAGGGCTGCTGACGCTTATTTCTGCTGGCCTGATG
D H A I P A G D R G L L T L I S A G L M

2281 TTCTTTATATTGCTCAGGGCCGGGTGAGTATGCTGCGTGCATGGTCCCTCACTGTTATG
F F I L L R A A V S M L R A W S S L V M

2341 AGCACGCTCATCAATATACAGTGGCAGTCGGGTCTGTTAACCATCTTCTCAGACTGCCG
S T L I N I Q W Q S G L F N H L L R L P

2401 CTGGCGTTTTTTTGAACGCCGTAAATTAGGTGATATCCAGTCCGCTTTTGGCTCCCTTGAC
L A F F E R R K L G D I Q S R F G S L D

2461 ACTTTGAGGGCCACCTTTACCACCTGTGTGGTTGGGGCAATCATGGACAGTATTATGGTT
T L R A T F T T C V V G A I M D S I M V

2521 GTGGGGGTTTTTGTGATGATGCTGTTATATGGAGGATATCTTACCTGGATAGTGCTCGGT
V G V F V M M L L Y G G Y L T W I V L G

2581 TTTACCATGGTTTACGTTCTTATTCGTCTGGTGACATACGGCTATTACCGGCAAATATCG
F T M V Y V L I R L V T Y G Y Y R Q I S
SmaI / AvaI

2641 GAAGAACTCTTGTGAGGGGG^{CCCGGG}CCAGCTCCTATTTTATGGAAAGCCTGTATGGT
E E T L V R G A R A S S Y F M E S L Y G
BamHI

2701 ATTGCCACGGTAAAAATCCAAGGTATGGCTGGGATCCGGGGAACACACTGGCTTAACCTG
I A T V K I Q G M A G I R G T H W L N L
HpaI

2761 AAAATAGATGCGATCAATTCAGGTATTAAGTTAACCAAGATGGATTTGCTCTTCGGGGGG
K I D A I N S G I K L T K M D L L F G G

2821 ATAAATACTTTTGTTCGCCCTGTGATCAGGTGGCGATTTTATGGCTGGGTGCAAGCCTT
I N T F V A A C D Q V A I L W L G A S L
ClaI

2881 GTGATCGATAATCAGATGACAATAGGGATGTTGTGGCATTGGTTCTTTTCTGGGGCAG
V I D N Q M T I G M F V A F G S F R G Q

2941 TTTTCGGATCGGGTTGCTTCGCTGACCAGTTTCTTCTTCAACTGAGAATAATGAGTCTG
F S D R V A S L T S F L L Q L R I M S L

3001 CATAATGAGCGCATTGCAGATATTGCACTACATGAAAAGGAAGAAAAGAAACCGGAAATT
H N E R I A D I A L H E K E E K K P E I

3061 GAAATCGTTGCTGACATGAGCCCGGTTTCACTGGAAACCACTGATTTAAGCTACCGGTAT
 E I V A D M S P V S L E T T D L S Y R Y
 3121 GACAGCCAGTCAGCACAGGTATTCAGTGGTCTGAATTTGTCTGTGGCTCCGGGAGAAAGT
 D S Q S A Q V F S G L N L S V A P G E S
 3181 GTGGCTATAACTGGTGCCTCCGGTGCCGGAAAAACACATTAATGAAAGTATTATGTGGA
 V A I T G A S G A G K T T L M K V L C G
 3241 CTGTTTGAACCAGATAGTGGAAAAGTACTGGTTAATGGCACGGATATACGTCAACTTGGG
 L F E P D S G K V L V N G T D I R Q L G
 3301 ATAAATAATTATCACCGTATGATAGCCTGTGTTATGCAGGACGACCGGCTATTTTCAGGA
 I N N Y H R M I A C V M Q D D R L F S G
 3361 TCAATTCGTGAAAATATCTGTGGGTTTGCAGAAGAAACAGACGACGAATGGATGACAGAA
 S I R E N I C G F A E E T D D E W M T E
 3421 TGTGCCAGAGCAAGTCATATTCATGATGTGATAATGAAAATGCCAATGGGGTATGAAACG
 C A R A S H I H D V I M K M P M G Y E T
 3481 TTAATAGGTGAACTGGGGGAAGGTCTTTCCGGCGGTCAAAAACAGCGTATATTCATTGCC
 L I G E L G E G L S G G Q K Q R I F I A
 3541 CGAGCTTTATACCGGAAACCTGGAATATTATTTATGGATGAGGCTACAAGTTCTCTTGAT
 R A L Y R K P G I L F M D E A T S S L D
SmaI / AvaI
 3601 ACAGAAAGTGAACGTTTCGTGAATGCTGCCATAAAAAAATGAATATCACCCGGGTGATT
 T E S E R F V N A A I K K M N I T R V I
 3661 ATTGCACACAGAGAAACTACGTTGAGAACTGTTGACAGGATTATTTCTATTTAAAATCCA
 I A H R E T T L R T V D R I I S I *
 3721 CTGGTGAACCTTTGTAAGGAGTTTGTGTCGATGGGGGAGGTTAAGAAGGATATAAAAATAA
 3781 CAGTGATTGCTTTTGTATCAATTATCTGTTCTTTTATATTCGGGTGTCATTATATCTTA
 3841 GTTATTACTATAGATATAATTTTAACTATATATGTTTTTTTATCACTTGTAGTTAC
 3901 ATTTTTATCGTTGTGGTTAAACGTGAATTTTACTTCTTCACAAATTTTATAGCGAAGGT
 3961 GTTGAAATGAGAAAATCTGAAAATGAAATAAAAACAAATATCTGGAGGTGACGGGAAT
SmaI / AvaI
 4021 GACGGGCAGGCAGAATTAATTGCTATTGGTTCACTTGCAGGTACGTTTATTAGCCCGGGA
 4081 TTTGGTTCTATTGCAGGGGCTTATATAGGTGATAAAGTACATTCATGGGCAACGACTGCG
BamHI
 4141 ACGGTTAGTCCCTCCATGTCTCCCTCAGGTATAGGATTATCATCCTAGTTTGGATCC

Fig. V. 2. Secuencia nucleotídica del fragmento *EcoRI-BamHI* de 4196 pb que contiene los genes *mchE* y *mchF*. Abajo se consigna la secuencia aminoacídica deducida de MchE y MchF. Los números a la izquierda se refieren a las posiciones nucleotídicas. Las posibles secuencias Shine-Dalgarno se subrayan. Con “negrita” se indican los codones de inicio de la traducción y con asterisco los de terminación. Con color rojo y azul se pinta el nucleótido previo al sitio de unión en las fusiones génicas con *phoA* y *lacZ*, respectivamente.

tres dominios característicos de una proteína ABC: el dominio proteolítico amino-terminal, la región integral de membrana y el “cassette ABC” de unión a ATP (ver más adelante). El análisis de hidropaticidad muestra una amplia región con segmentos fuertemente hidrofóbicos y una región final de perfil fundamentalmente neutro (Fig. V. 4). Los análisis computacionales sugieren la presencia de seis segmentos de transmembrana en la región hidrofóbica central. Estos se localizarían entre los residuos: 1) 177 y 197, 2) 210 y 230, 3) 235 y 255, 4) 298 y 318, 5) 403 y 423 y 6) 427 y 461. Los cinco primeros corresponden a la predicción según el programa TopPred 2 (Claros & Von Heijne, 1994) y el sexto fue agregado según el análisis con el programa TMpred (Hofmann & Stoffel, 1993). Considerando que los extremos de la proteína, conteniendo las regiones proteolítica y cassette ABC, deben estar en el citoplasma (Higgins et al., 1992; Havarstein et al., 1995), es necesario un número par de segmentos de transmembrana. Los segmentos 1, 3 y 5 tendrían una orientación fuertemente preferencial de citoplasma a periplasma; el segmento 2 presentaría una orientación preferencial contraria y, para el segmento 4, el más hidrofóbico, no se predice una preferencia de orientación. Se requeriría entonces un sexto segmento final para que el cassette ABC quede en el citoplasma. Así se incluye el propuesto por el programa TMpred, aún cuando éste le asigna un bajo nivel de significación.

V. 2. Análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

Las secuencias aminoacídicas deducidas para MchE y MchF fueron comparadas contra bancos de datos con el programa BLAST (Altschul et al., 1997).

En cuanto a la proteína MchE, se encontraron porcentajes de identidad superiores al 20% con MFPs de varios sistemas exportadores ABC bacterianos, identidad que se extendió a lo largo de casi la totalidad de la secuencia. En particular, la identidad fue muy alta con CvaA, segundo componente del sistema exportador de la colicina V (98% de identidad, 99% de similitud), y con MtfA, segundo componente del sistema exportador de la microcina 24 (71% de identidad, 86% de similitud), (Gilson et al., 1990; Hwang et al., 1997; AC:U47048). MchE y CvaA tienen ambos 424 residuos. El alineamiento de sus secuencias aminoacídicas permitió comprobar una total correlación entre ambas proteínas a todo nivel, incluyendo el segmento hidrofóbico N-terminal de anclaje a membrana y el inicio interno de la traducción para CvaA* con el propuesto para MchE* (Fig. V. 5).

La secuencia de MchF mostró porcentajes de identidad superiores al 25% con diversas proteínas transportadoras ABC pro y eucariotas, a lo largo de la mayor parte de su extensión. La identidad fue alta con CvaB, proteína ABC del sistema exportador de la colicina V (89% de identidad, 93% de similitud), y con MtfB, proteína ABC del sistema exportador de la microcina 24 (75% de identidad, 88% de similitud) (Gilson et al., 1990; AC:U47048). MchF y CvaB tienen la misma extensión, 698 residuos, y su alineamiento permitió identificar en MchF un dominio proteolítico N-terminal y el cassette ABC en la porción C-terminal de la secuencia. Los residuos centrales comprenderían la región integral de membrana (Fig. V. 6).

Teniendo en cuenta los altos porcentajes de identidad aminoacídica encontrados entre MchEF y CvaAB, se procedió a comparar las secuencias nucleotídicas correspondientes. Analizadas con el programa FASTA (Pearson & Lipman, 1988), estas secuencias presentaron entre sí un 92% de identidad, que se extendió desde el nucleótido 318 al 3715 de la secuencia *mch*. Esta identidad abarca toda la secuencia codificante de los genes *mchEF* y *cvaAB* y cesa abruptamente a un lado y a otro de la misma (Fig. V. 7). Las homologías cesaron, por el lado izquierdo a 33 nucleótidos del inicio de *mchE* y por el lado derecho a un nucleótido después del codón de terminación de *mchF*. Además, esta comparación permitió identificar un posible codón de inicio TTG para el gen *mchE* por analogía con el gen *cvaA* (Hwang et al., 1997).

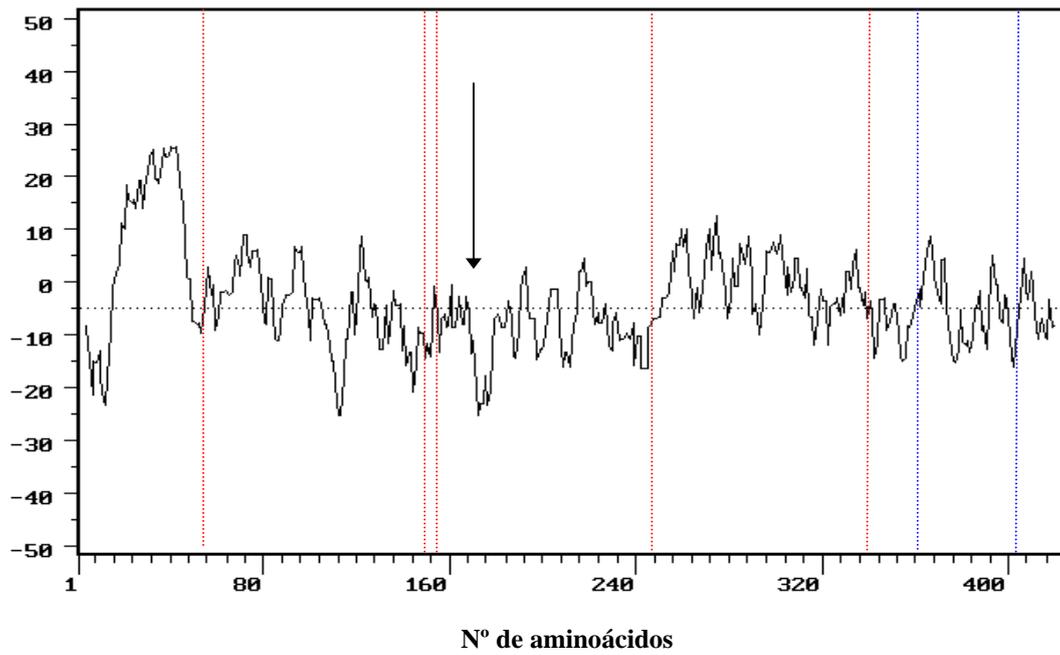


Fig. V. 3. Perfil de hidropaticidad de MchE. La secuencia fue analizada usando una ventana de nueve residuos y un índice de hidropaticidad según se describe en Kyte & Doolittle, 1982. La flecha indica el inicio de MchE*. Las líneas en rojo y azul indican los sitios de unión en las fusiones génicas con *phoA* y *lacZ*, respectivamente.

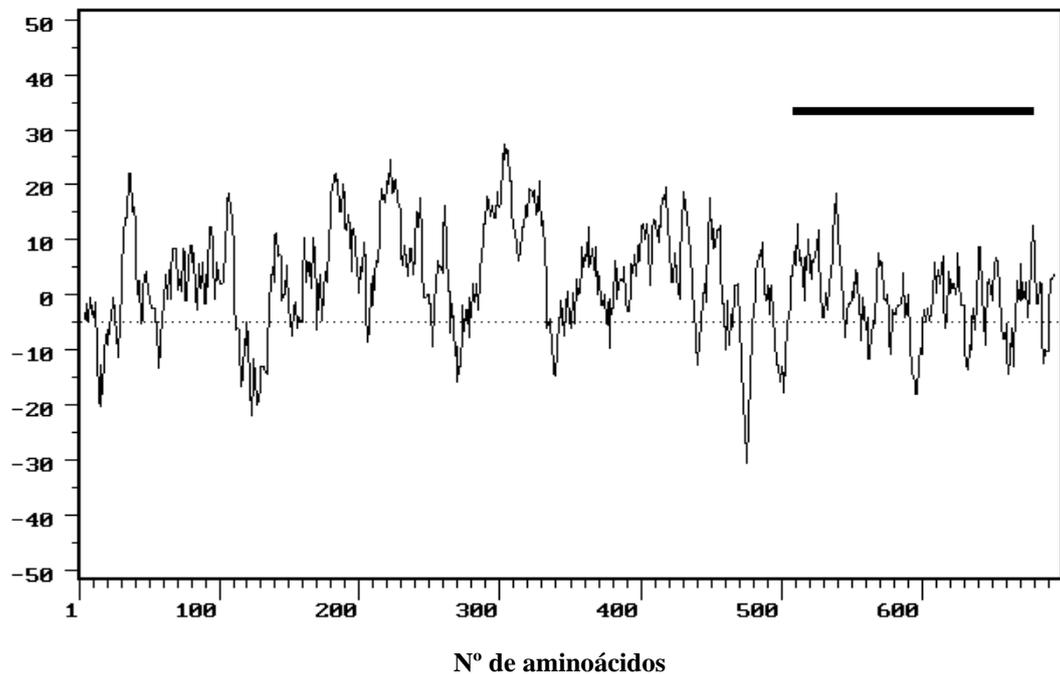


Fig. V. 4. Perfil de hidropaticidad de MchF. La secuencia fue analizada usando una ventana de nueve residuos y un índice de hidropaticidad según se describe en Kyte & Doolittle, 1982. La barra indica la localización del “cassette ABC”.

Secuencia 1: MchE (424 residuos)
 Secuencia 2: CvaA (424 residuos)

98% de identidad en 424 residuos solapados; Score:2120.0;frecuencia de gap:0.0%

```

                                     MchE51-PhoA
MchE-ECOLI      1 MFRQDALENRKMKWQGRAILLPGIPLWLIMLGSIVFIITAFLMFIIIVGTYSRRVNVSGEVT
CvaA-ECOLI      1 MFRQDALENRKMKWQGRAILLPGIPLWLIMLGSIVFIITAFLMFIIIVGTYSRRVNVSGEVT
*****

MchE-ECOLI      61 TWPRAVNIYSGVQGFVVRQFVHEGQLIKKGDVPVYLIDISKSTRSGIVTDNHRDIENQLV
CvaA-ECOLI      61 TWPRAVNIYSGVQGFVVRQFVHEGQLIKKGDVPVYLIDISKSTRNGIVTDNHRDIENQLV
*****

                                     MchE155-PhoA
MchE-ECOLI      121 RVDNIISRLEESKKITLDTLEKQRLQYTDAFRRSSDIIQRAEEGIKIMKNNMENYRNYQA
CvaA-ECOLI      121 RVDNIISRLEESKKITLDTLEKQRLQYTDAFRRSSDIIQRAEEGIKIMKNNMENYRYYQS
*****

                                     MchE159-PhoA
MchE-ECOLI      181 KGLINKDQLTNQVALYYQQNNLLSLSGQNEQNALQITTTLESQIQTQAADFDNRIYQMEL
CvaA-ECOLI      181 KGLINKDQLTNQVALYYQQNNLLSLSGQNEQNALQITTTLESQIQTQAADFDNRIYQMEL
*****

                                     MchE250-PhoA
MchE-ECOLI      241 QRYELQKELVNTDVEGEIIRALTDGKVDLSVTVGQMVNTGDSLLQVIPENIENYYLIL
CvaA-ECOLI      241 QRLLELQKELVNTDVEGEIIRALSDGKVDLSVTVGQMVNTGDSLLQVIPENIENYYLIL
** *****

                                     MchE340-PhoA
MchE-ECOLI      301 WVPNDVVPYISAGDKVNIRYEAFPAEKFGQFSATVKTISRTPASTQEMLTYKGAPQNTPG
CvaA-ECOLI      301 WVPNDVVPYISAGDKVNIRYEAFPAEKFGQFSATVKTISRTPASTQEMLTYKGAPQNTPG
*****

                                     MchE364-LacZ
MchE-ECOLI      361 ASVPWYKVIAMPEKQIIRYDEKYLPLENGMKAESTLFLEKRRIYQWMLSPFYDMKHSATG
CvaA-ECOLI      361 ASVPWYKVIATPEKQIIRYDEKYLPLENGMKAESTLFLEKRRIYQWMLSPFYDMKHSATG
*****

MchE-ECOLI      424 PLND
CvaA-ECOLI      424 PLND
* **

```

Fig. V. 5. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de MchE y CvaA con el programa SIM, según el algoritmo descrito por Huang & Miller, 1991. Matriz de comparación: BLOSUM62, “gap open penalty” 12 y “gap extension penalty” 4. Los números a la izquierda se refieren a las posiciones aminoacídicas. Con asteriscos se indican los residuos idénticos, con azul las sustituciones conservadas y con rojo las sustituciones no conservadas. Se pinta en amarillo el posible segmento de transmembrana y se indica con una flecha y en negrita el residuo metionina, inicio de MchE* y de CvaA*. Con una línea vertical se indica el sitio de unión en las fusiones génicas, nombrando encima la proteína fusión resultante.

Secuencia 1: MchF-ECOLI (698 residuos)
 Secuencia 2: CVAB-ECOLI (698 residuos)

89% de identidad en 698 residuos solapados; Score: 2120.0; frecuencia de gap:0.0%

MchF-ECOLI	1	MTNGSFRQIINQLDMRWRRRVPVIHQETETAECGLACLAMICGHFGKNIDLISLRRKFNLS
Cvab-ECOLI	1	MTNRNFRQIINLLDLRWQRRVPIHQETETAECGLACLAMICGHFGKNIDLILYLRKFNLS
		*** ***** * * ***** *****
MchF-ECOLI	61	ARGANLAGINGIAEQLGMPVTRALSLELDELGALKMPCILHWDFSHFVVLVSVKRNRYVLH
CVAB-ECOLI	61	ARGATLAGINGIAEQLGMAVTRALSLELDELRVLKTPCILHWDFSHFVVLVSVKRNRYVLH
		**** ***** ***** * ***** *****
MchF-ECOLI	121	DPARGRRYLGREEMSRIFTGIALEVWPGSEFLAETQQIRISLRSLSINSIYGIKRTLAKIF
CVAB-ECOLI	121	DPARGIRYISREEMSRIFTGVALEVWPGSEFQSETLQTRISLRSLSINSIYGIKRTLAKIF
		***** * ***** ***** * * ***** *****
MchF-ECOLI	181	CLSVVIEAINLVMPVGTQLVMDHAIPAGDRGLLTLISAGLMFFILLRAAVSMLRAWSSLV
CVAB-ECOLI	181	CLSVVIEAINLLMPVGTQLVMDHAIPAGDRGLLTLISAAALMFFILLKAATSILRAWSSLV
		***** ***** ***** ***** ***** * * *****
MchF-ECOLI	241	MSTLINIQWQSGLFNHLRLPLAFFERRKLGDIQSRFGSLDTRLATFTT CVVGA IMDSIM
CVAB-ECOLI	241	MSTLINVQWQSGLFDHLLRLPLAFFERRKLGDIQSRFDSLDTLRATFTT SVIGF IMDSIM
		***** ***** ***** ***** ***** * * *****
MchF-ECOLI	301	VVGVFVMMLLYGGYLTWIVLGF TMVYV LIRLVTYGYRQISEETLVRGARASSYFME SLY
CVAB-ECOLI	301	VVGV CV MMLLYGGYLTWIVL CF T TIY IFIRLVTYGNRQISEE CLVRE ARAASYFMET LY
		***** ***** * * ***** ***** * * *****
MchF-ECOLI	361	GIATVKIQGMAGIRGTHWLNKIDAINSGIKLTKMDLLFGGINTFVAACDQVAAILWLGAS
CVAB-ECOLI	361	GIATVKIQGMVIRGAHWLNKIDAINSGIKL TR MDLLFGGINTF V TACDQVIVILWLGAG
		***** ***** * * ***** ***** ***** *****
MchF-ECOLI	421	LVIDNQMTIGMFVAFGSFRGQFSDRVASLTSFLLQLRIMSLHNERIADIALHEKEEKPE
CVAB-ECOLI	421	LVIDNQMTIGMFVAFSSFRGQFSERVASLTSFLLQLRIMSLHNERIADIALHEKEEKPE
		***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
MchF-ECOLI	481	IEIVADMSPVSLET TD LSYRYSQSAQVFSGLNLSVAPGESVAITGASGAGKTTLMKVLC
CVAB-ECOLI	481	IEIVADMGPISLET NGL SYRYSQSAPIFSALSLSVAPGESVAITGASGAGKTTLMKVLC
		***** * * * * ***** * * * ***** ***** *****
MchF-ECOLI	541	GLFEPDSGKVLVNGTDIRQLGINNYHRMIACVMQDDRLFSGSIRENICGFAEETDDEWMT
CVAB-ECOLI	541	GLFEPDSGRV L INGIDIRQIGINNYHRMIACVMQDDRLFSGSIRENICGFAEEMDEW MV
		***** * * * * ***** ***** ***** ***** * * * *
MchF-ECOLI	601	ECARASHIH V IMKMPMGYETLIGELGEGLSGGQQRIFFIARALYRKP GILFM DEATSS L
CVAB-ECOLI	601	ECARASHIH V IMNMPMGYETLIGELGEGLSGGQQRIFFIARALYRKP GILFM DEATSS AL
		***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** * *
MchF-ECOLI	661	DTESERFVNAAIKMNI TRV IAHRETTLRTVDR I ISI
CVAB-ECOLI	661	DESEHFVNVAIKMNI TRV IAHRETTLRTVDR V ISI
		* *

Fig. V. 6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de MchF y CvaB con el programa SIM, según el algoritmo descrito por Huang & Miller, 1991. Matriz de comparación: BLOSUM62, “gap open penalty” 12 y “gap extension penalty” 4. Los números a la izquierda se refieren a las posiciones aminoacídicas. Con asteriscos se indican los residuos idénticos, con azul las sustituciones conservadas y con rojo las sustituciones no conservadas. Se pintan en amarillo los posibles segmentos de transmembrana. Se subraya la región que comprende el “cassette ABC” y dentro de ésta, se indican con negrita aquellos residuos que conforman los sitios de Walker.

92% de identidad en 3401 nt de solapamiento (318-3715:182-3583)

```

      300      310      320      330      340      350
mchEF TTTCGGTTAATCAGTGAAGGTATTACAGGAAAAGTGTGAGTAAG--AGGAGCTAT--TTT
      :: :      :: :      :: :      :: :      :: :      :: :
cvaAB TATTTTCCATCATTAATCCAGATAAACAACTAATAGTATGCAAGGAGACATTATT
      170      180      190      200      210      220

      360      370      380      390      400      410
mchEF GTTTCGTCAGGATGCTTTAGAAAACAGAAAATGAAGTGGCAGGGACGGGCAATATTACT
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
cvaAB GTTTCGCCATGATGCTTTAGAAAACAGAAAATGAAGTGGCAGGGACGGGCAATATTACT
      230      240      250      260      270      280

      420      430      440      450      460      470
mchEF TCCCGGAATACCACTATGGTTAATCATGCTGGGAAGCATTGTGTTTATTACGGCATTCT
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
cvaAB TCCCGGAATACCACTGTGGTTAATCATGCTGGGAAGCATTGTGTTTATTACGGCATTCT
      290      300      310      320      330      340

      480      490      500      510      520      530
mchEF GATGTTCAATTATTGTTGGTACCTATAGCCGCCGTGTTAATGTCAGTGGTGAGGTCACAAC
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
cvaAB GATGTTCAATTATTGTTGGTACCTATAGCCGCCGTGTTAATGTCAGTGGTGAGGTCACAAC
      350      360      370      380      390      400

      .....
      .....

      3540      3550      3560      3570      3580      3590
mchEF TCATTGCCCGAGCTTTATACCGGAAACCTGGAATATTATTTATGGATGAGGCTACAAGTT
      : :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
cvaAB TTATTGCACGAGCCTTATACCGGAAACCAGGAATATTATTTATGGATGAGGCAACCAGTG
      3410      3420      3430      3440      3450      3460

      3600      3610      3620      3630      3640      3650
mchEF CTCTTGATACAGAAAGTGAACGTTTCGTGAATGCTGCCATAAAAAAATGAATATCACCC
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
cvaAB CTCTTGATTACAGAGAGTGAACATTTTCGTGAATGTTGCCATAAAAAACATGAATATCACCA
      3470      3480      3490      3500      3510      3520

      3660      3670      3680      3690      3700      3710
mchEF GGGTGATTATTGCACACAGAGAACTACGTTGAGAACTGTTGACAGGATTATTTCTATT
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
cvaAB GGGTAATTATTGCACACAGAGAAACAACGTTGAGAACTGTTGATAGAGTTATTTCTATT
      3530      3540      3550      3560      3570      3580

      3720      3730      3740      3750      3760      3770
mchEF AAAATCCACTGGTGTAACCTTGTAAAGGAGTTTTGTCGATGGGGGAGGTTAAGAAGGATAT
      :: :
cvaAB AAACCATAGAGGAATTACAAGCGTATGAGGAATATTTCTTCTGTTATAATTCCTCGTTA
      3590      3600      3610      3620      3630      3640

```

Fig. V. 7. Comparación de las secuencias nucleotídicas de *mchEF* y *cvaAB* analizadas con el programa FASTA (Pearson & Lipman, 1988). La secuencia *cvaAB* procede del “EMBL nucleotide sequence database library” N° X57524. Los números se refieren a las posiciones nucleotídicas. En rojo se indican el codón de inicio de *mchE* y *cvaA* y el de terminación de *mchF* y *cvaB*. Sólo se muestra el alineamiento en el comienzo y en el final de las secuencias comparadas. La porción central se representa por puntos. Los dos puntos verticales indican los nucleótidos idénticos.

Considerando que los genes *cvaAB* están regulados transcripcionalmente por la disponibilidad de hierro y presentan una “caja Fur” 320 nucleótidos por delante de *cvaA* (Boyer & Tai, 1998), se buscó una secuencia de este tipo por delante de *mchE*. No se encontró ninguna similitud con la secuencia consenso de una “caja Fur”.

Se buscaron homologías de secuencia de las regiones de DNA que flanquean el bloque *mchEF*, comparándolas contra bancos de datos (Pearson & Lipman, 1988). Por el lado izquierdo, se compararon los 151 nucleótidos correspondientes a la región intergénica entre *mchE* y *mchD* (nuestros resultados no publicados) y no se encontraron homologías importantes ni significativas. Por el lado derecho, se compararon los 483 nucleótidos posteriores al codón de terminación de *mchF*, obteniéndose un 53% de identidad con la secuencia nucleotídica de *cvi* y *cvaC*, genes de inmunidad y actividad de la colicina V, respectivamente. De izquierda a derecha, primero ocurre la homología con el gen de inmunidad *cvi* y después con el gen de actividad *cvaC*. Específicamente, esta homología comienza 49 nucleótidos después del fin de *mchF* y cesa 22 nucleótidos antes del final de la secuencia analizada (datos no mostrados). En esta región, en la dirección de izquierda a derecha (la indicada por las homologías nucleotídicas), se identificaron dos marcos abiertos de lectura: de los nucleótidos 3750 a 3894 (48 codones) y 3967 a 4186 (73 codones), que se denominaron ORF48 y ORF73. Ambos ORFs presentan secuencias de tipo Shine-Dalgarno a una distancia adecuada del codón de inicio. El ORF48 se comparó con la proteína de inmunidad a la colicina V (IMMV_ECOLI), de 78 residuos, obteniéndose un 25,6% de identidad en 43 aa de solapamiento y el ORF73 con la proteína de actividad colicina V (CEAV_ECOLI), de 103 residuos, con la que compartió un 41,4% de identidad en un tramo de 70 residuos (Fig. V. 8).

V. 3. Análisis de complementación heteróloga entre los sistemas exportadores de MccH47 y ColV.

Teniendo en cuenta las grandes homologías, tanto de secuencia nucleotídica como aminoacídica entre los sistemas exportadores de MccH47 y ColV, se procedió a realizar un análisis de complementación heteróloga para la función de secreción del antibiótico MccH47.

Para llevar a cabo este procedimiento se clonaron los determinantes genéticos del sistema ColV en un plásmido multicopia. En el laboratorio se disponía de la estirpe PAP222, portadora del plásmido natural pColV-K270 que contiene el sistema ColV completo (Fig. I. 5, Tabla IV. 1). Esta estirpe es productora de colicina V e inmune a este antibiótico. Se purificó el DNA plasmídico pColV-K270, se digirió conjuntamente con las enzimas *HindIII* y *BglII* y la mezcla de digestión se ligó con el vector pUC13 digerido con *HindIII* y *BamHI*. La mezcla de ligación se utilizó para transformar la estirpe RYC1000 y los transformantes se seleccionaron en placas de LBAp. Para detectar aquellos clones que fueran productores de colicina V, sobre las placas con los transformantes ya crecidos, se sembró con agar blando un tapiz de RYC1000 (pUC13), una estirpe sensible a ColV y resistente a ampicilina. De esta forma, los clones transformantes que generaron halos de inhibición del crecimiento sobre el tapiz, fueron aquellos que albergaban plásmidos recombinantes portadores del sistema genético ColV completo. Se procedió a la purificación y al análisis fisiológico de este tipo de clones, realizando con ellos una prueba de producción de colicina V (ver materiales y métodos). Los clones en estudio generaron halos de inhibición del crecimiento de 14 a 18 mm sobre las estirpes RYC1000 (pACYC184) y RYC1000 (pEX100), sensible e inmune a MccH47, respectivamente, y ambas sensibles a ColV. Paralelamente, se ensayaron sobre un tapiz de PAP222 (ColV inmune, MccH47 sensible) sobre el que no produjeron halos, confirmándose así que las actividades detectadas correspondían a la producción específica de colicina V. Posteriormente, se extrajo el DNA plasmídico de uno de estos clones y se analizó físicamente,

comprobandose que tenía la estructura buscada. Este plásmido fue denominado pUY270 y contiene el sistema genético ColV completo clonado en el vector pUC13.

El plásmido pUY270 se utilizó para transformar un conjunto de cepas portadoras del sistema MccH47 completo con mutaciones en *mchE* o *mchF*. En todos los casos las mutaciones en estos genes eran por inserción de elementos transponibles. Estas cepas son capaces de producir antibiótico maduro pero no pueden secretarlo al estar mutado alguno de los genes que conforman la maquinaria de exportación. Por lo tanto, ninguna de ellas es capaz de generar halos de inhibición del crecimiento sobre un tapiz de una estirpe sensible a MccH47. Todos los mutantes fueron derivados de RYC1000, portadores de los siguientes plásmidos: pEX100::MudI1681 30.9 y pEX100::MudI1681 40.1, con *mchF* mutado y pEX100::MudI1681 30.4, pEX100::MudI1681 30.5, pEX100::MudI1681 80.9 y pEX100::Tnlac 7.1, con *mchE* mutado (Tabla IV. 1). Los transformantes fueron seleccionados en placas de LBCmAp que fueron incubadas a 30° C durante 24 hs. Se añadió cloranfenicol para asegurar el mantenimiento del plásmido residente mutado y la mitad de dosis de ampicilina para seleccionar aquellos clones que habían incorporado pUY270. Se debió trabajar con una dosis reducida de ampicilina ya que la viabilidad de los clones era baja y con una dosis normal no crecían transformantes.

Se preveía que los clones transformantes obtenidos producirían MccH47 madura intracelular y sólo podrían exportarla al medio exterior si el sistema transportador ABC de la colicina V fuera capaz de reconocer la MccH47 y de secretarla, o sea, si se producía una complementación heteróloga para la función de secreción de este antibiótico. Se ensayó entonces la capacidad de estos clones de producir halos de inhibición del crecimiento por producción de MccH47. Considerando que todos ellos eran también productores de ColV, la prueba de producción se realizó sobre un tapiz de PAP222, estirpe inmune a ColV. Todos los clones ensayados produjeron halos de inhibición del crecimiento de unos 10 a 17 mm de diámetro, siendo su tamaño inferior al del halo producido por la estirpe control RYC1000 (pEX100), que tuvo un diámetro de 17 mm. La picada control de la estirpe RYC1000 (pUY270) no dio lugar a halo (Fig. V. 9A). Paralelamente, se hicieron picadas sobre un tapiz de una cepa inmune a MccH47, RYC1000 (pEX100), para comprobar que estos clones conservaban la capacidad de producir y secretar colicina V. Todos ellos produjeron halos de unos 17 a 20 mm de diámetro, RYC1000 (pUY270) de 22 mm y RYC1000 (pEX100) no produjo halo (Fig. V. 9B). Por último, se realizó una prueba sobre un tapiz de una estirpe sensible a ambos antibióticos, RYC1000 (pACYC184), condiciones en las que los halos serían el resultado del efecto acumulado de ambas actividades antibióticas. Los clones experimentales produjeron halos de 13 a 17 mm de diámetro, RYC1000 (pEX100) un halo de 19 mm y RYC1000 (pUY270) de 16 mm (Fig. V. 9C).

V. 4. Fusiones génicas con *mchE*

Para obtener las fusiones génicas con *mchE* se construyó el plásmido pMVD14, derivado del vector pACYC184 con el gen *mchE* clonado (Fig. V. 10). Se disponía en el laboratorio del plásmido pUY14, derivado de pUC13 con el inserto *EcoRI-EcoRI* de 2064 pb que contiene *mchE* completo, la porción final de *mchD* y el segmento inicial de *mchF* (Gaggero et al., 1993), (Fig. V. 10). Por su elevado número de copias, pUY14 resultaba inadecuado para la obtención de fusiones génicas, por lo que se procedió a clonar su inserto en el vector de número intermedio de copias pACYC184. El plásmido pUY14 y el vector pACYC184 se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI*, la mezcla de digestión se ligó y se utilizó para transformar la estirpe CC118. Los clones transformantes se seleccionaron en placas de LBTc y aquellos que eran recombinantes se detectaron luego por su incapacidad de crecer en presencia de cloranfenicol (inactivación insercional). Posteriormente, se realizó el análisis físico de los plásmidos de algunos clones Tc^R Cm^S con la enzima *EcoRI* y se encontró uno de ellos con la estructura

deseada. Se determinó la orientación del inserto dentro del vector por medio de una digestión *Bam*HI, comprobándose que *mchE* tenía la misma dirección de transcripción que el gen interrumpido de resistencia al cloranfenicol. Para corroborar la expresión de *mchE* en la nueva construcción, se transformó con este plásmido la cepa RYC1000 (pEX4::Tn5 49), portadora de todo el sistema antibiótico con una mutación en *mchE*. Se seleccionaron los transformantes en placas de LBTcAp y luego se los probó para la producción de MccH47 (ver materiales y métodos). Los clones en estudio generaron halos de inhibición del crecimiento sobre el tapiz de una estirpe sensible al antibiótico. Por lo tanto, en estos transformantes ocurrió una complementación para la secreción de MccH47, comprobándose la expresión de *mchE* en el plásmido recombinante construido, que fue denominado pMVD14 (Fig. V. 10). La estirpe CC118 (pMVD14) resultó tener un crecimiento inestable con abundantes sobrecrecimientos cuando fue cultivada a 37° C. Por ello, se cultivó a 30° C en todos los experimentos, temperatura en la cual mostró un crecimiento pobre pero estable.

Para obtener fusiones génicas de *mchE* con los genes reporteros *phoA* y *lacZ*, la estirpe CC118 (pMVD14) se mutagenizó con los transposones Tn*phoA* y Tn*lac*, respectivamente. De esta forma, se buscó obtener información complementaria sobre la localización subcelular de los productos del gen *mchE*, o sea, de MchE y MchE*. Se esperaba obtener fusiones génicas activas de *mchE* con *phoA*, puesto que MchE contiene una señal de exportación, y de *mchE** con *lacZ*, puesto que MchE*, al carecer de una señal de exportación, se localizaría en el citoplasma.

V. 4. 1. Fusiones génicas *mchE-phoA*

La cepa CC118 (pMVD14) fue mutagenizada con el transposón Tn*phoA* por medio de una infección con el fago λ Tn*phoA*, según se describió en la sección IV. 6. 1. La multiplicidad de infección (m.o.i.) fue de 1,33, ya que el número de fagos empleado fue de 4×10^{10} ufp/ml y la cantidad de células iniciales fue de $3,0 \times 10^{10}$ ufc/ml. Luego de la expresión fenotípica, se plaquearon alícuotas del control bacteria y de un par de tubos experimentales en LBTc para evaluar la viabilidad de las células después del tratamiento mutagénico. En el control bacteria había $2,7 \times 10^8$ ufc/ml, mientras que en las mezclas experimentales había $3,2 \times 10^6$ ufc/ml, con lo que la viabilidad fue de $8,0 \times 10^{-4}$. Paralelamente, se plaquearon alícuotas de los seis tubos experimentales y del tubo control en LBTcKmXP. Crecieron abundantes clones en cada placa experimental, la mayoría blancos y alrededor de una decena de color azul intenso. Se purificaron todas las colonias azules de cada placa experimental en el mismo medio en que habían sido seleccionadas. Para distinguir entre inserciones en el cromosoma e inserciones en el plásmido, se extrajo el DNA plasmídico de 16 clones azules y se utilizó para transformar la estirpe CC118. Los transformantes se seleccionaron en LBTcKmXP. En tres transformaciones no crecieron colonias, indicando que el plásmido introducido era pMVD14 y que los clones mutantes correspondientes tenían una inserción del Tn*phoA* en el cromosoma. En los trece casos restantes hubo abundante cantidad de colonias transformantes azules (PhoA⁺) y algunas blancas (PhoA⁻), indicando que la inserción Tn*phoA* había ocurrido en el plásmido pMVD14. Se purificaron clones transformantes azules de cada experimento y se analizó físicamente su DNA plasmídico con la enzima de restricción *Eco*RI, basándose en los mapas físicos de Tn*phoA* y pMVD14 (Figs. IV. 1 y V. 10). Todas las inserciones se localizaron en el inserto de pMVD14. Se continuó trabajando con seis de estos plásmidos mutantes, en los que las inserciones se distribuían a lo largo de *mchE*. Estas inserciones se situaron, a nivel de secuencia nucleotídica, dentro del gen *mchE*, confirmándose que se trataba de fusiones génicas *mchE-phoA* por coincidir los marcos de lectura de ambos genes. Las fusiones se denominaron según el codón de *mchE* involucrado en la fusión: *mchE51-phoA*, *mchE155-phoA* (dos fusiones iguales), *mchE159-phoA*, *mchE250-phoA* y *mchE340-phoA* (Figs. V. 2 y V. 10). Cada una de ellas debe dar lugar a una proteína híbrida formada por la porción amino de MchE unida a la fosfatasa alcalina carente de su péptido señal. Las proteínas híbridas se denominaron de igual manera que sus correspondientes fusiones

génicas (Fig. V. 5). Para corroborar que las fusiones génicas dan lugar a un fenotipo deficitario MchE, los seis plásmidos pMVD14::Tn*phoA* se utilizaron para transformar la cepa RYC1000 (pEX4::Tn5 49), seleccionándose los transformantes en placas de LBTcKmAp. Los clones transformantes se ensayaron para la producción de MccH47 y ninguno de ellos produjo halos de inhibición del crecimiento sobre un tapiz de células sensibles a este antibiótico.

Se procedió a la determinación de las actividades fosfatasa alcalina de cultivos de las cinco cepas CC118 (pMVD14::Tn*phoA*) portadoras de distintas fusiones, según se describe en la sección IV. 7. Las determinaciones se realizaron en cultivos en fase logarítmica (DO₆₀₀ 0,3-0,4) y en fase estacionaria (DO₆₀₀ 2,2-2,7). La actividad fosfatasa alcalina de los cultivos en fase logarítmica fue baja mientras que en fase estacionaria la actividad enzimática se incrementó cuatro a siete veces dependiendo de la fusión (Tabla V. 1).

Tabla V. 1

Actividad fosfatasa alcalina en las cepas con fusiones *mchE-phoA*

Fusiones génicas	Unidades actividad fosfatasa alcalina		
	F. L.*	F.E.*	F.E./F.L.*
<i>mchE51-phoA</i>	131,1	504,4	3,85
<i>mchE155-phoA</i>	49,3	355,3	7,21
<i>mchE159-phoA</i>	59,2	324,1	5,47
<i>mchE250-phoA</i>	46,1	298,8	6,48
<i>mchE340-phoA</i>	28,1	164,2	5,84

* F.L.: fase logarítmica; F.E.: fase estacionaria

V. 4. 2. Fusiones génicas *mchE-lacZ*

La estirpe CC170, portadora de una inserción Tn*lac* en su cromosoma, fue transformada con el plásmido pMVD14 según se describió en la sección IV. 6. 2. En cada uno de los cinco experimentos de transformación se obtuvo abundante número de colonias, la mayoría blancas y aproximadamente una decena de color azul intenso. Se purificaron todas las colonias azules en el mismo medio en que habían sido seleccionadas. Para distinguir entre inserciones en el cromosoma e inserciones en el plásmido, se extrajo el DNA plasmídico de 29 clones azules y se utilizó para transformar la estirpe CC118. Los transformantes se seleccionaron en LBTcKmXP. En 17 transformaciones no crecieron colonias, indicando que el plásmido introducido era pMVD14 y que los clones mutantes correspondientes tenían una inserción del Tn*lac* en el cromosoma. En las 12 transformaciones restantes crecieron colonias: en tres casos sólo unas pocas colonias blancas, en cuatro casos sólo unas pocas azules y en las cinco transformaciones restantes abundante cantidad de colonias azules. Se purificó un clon de cada una de las nueve transformaciones en las que crecieron colonias azules y se analizó físicamente su DNA plasmídico con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SmaI*, basándose en los mapas físicos de Tn*lac* y pMVD14 (Figs. IV. 2 y V. 10). Cinco inserciones se localizaron en el DNA vector y las cuatro restantes en el inserto de pMVD14. Se continuó trabajando con los últimos cuatro plásmidos, precisándose la localización de sus inserciones por secuenciación del DNA. Las cuatro inserciones se situaron dentro del gen *mchE*, pero sólo para dos de ellas se confirmó que se trataba de fusiones génicas *mchE-lacZ* por coincidir los marcos de lectura de ambos genes. Las fusiones se denominaron según el codón de *mchE* involucrado en la fusión: *mchE364-lacZ* y *mchE404-lacZ* (Figs. V. 2 y V. 10). Cada una de ellas debe dar lugar a una proteína híbrida formada por la porción amino de MchE/MchE* unida a la β -galactosidasa. Las proteínas híbridas se denominaron de igual manera que sus correspondientes fusiones génicas (Fig. V. 5).

Para corroborar que las inserciones *Tnlac* dan lugar a un fenotipo deficitario MchE, cada plásmido portador de una fusión génica se utilizó para transformar la cepa RYC1000 (pEX4::Tn5 49), seleccionándose los transformantes en placas de LBTcKmAp. Los clones transformantes se ensayaron para la producción de MccH47 y ninguno de ellos produjo halos de inhibición del crecimiento sobre un tapiz de células sensibles a este antibiótico.

Se procedió a la determinación de las actividades β -galactosidasa de cultivos de las dos cepas CC118 (pMVD14::Tnlac) portadoras de fusiones y también de las otras dos cepas en las que las inserciones *Tnlac* no generaron fusiones (E1-3 y E3-5), según se describe en la sección IV. 7. Las determinaciones se realizaron en cultivos en fase logarítmica (DO_{600} 0,35-0,45) y en fase estacionaria (DO_{600} 2,80-2,90). La actividad β -galactosidasa de los mutantes con fusiones fue aproximadamente el doble en fase estacionaria que en fase logarítmica, siendo siempre superior a los niveles de actividad en los mutantes no portadores de fusiones (Tabla V. 2).

En busca de nuevos mutantes portadores de fusiones activas *mchE-lacZ*, se realizó una nueva mutagénesis en las mismas condiciones que la anterior. En particular, se procuraba aislar mutantes con sitios de inserción del transposón más próximos al inicio de *mchE** y que exhibieran actividad β -galactosidasa. Los plásmidos de los mutantes así obtenidos fueron analizados físicamente, comprobándose en todos ellos que los sitios de fusión volvían a ocurrir en la región final de *mchE/mchE**, por lo que no se continuó su estudio.

Tabla V. 2.

Actividad β -galactosidasa en las cepas con inserciones *Tnlac* en *mchE*

Fusiones/estirpes	Unidades actividad β -galactosidasa		
	F.L. *	F.E. *	F.E./F.L. *
<i>mchE364-lacZ</i>	345,1	611,3	2,15
<i>mchE404-lacZ</i>	356,4	765,8	1,77
E1-3	32,0	17,0	0,53
E3-5	108,9	43,3	0,40

* F.L.: fase logarítmica; F.E.: fase estacionaria

En la región de *mchE* se había aislado previamente una inserción *Tnlac* que confería actividad β -galactosidasa a las células y que se presumió originaba una fusión génica *mchE-lacZ*. Por análisis de restricción, se había determinado que la supuesta fusión génica se leía de derecha a izquierda, o sea, en la dirección contraria a la hallada en este trabajo para *mchE* (Gaggero et al., 1993). Esta inserción había sido obtenida sobre el plásmido pEX100, portador del sistema MccH47 entero, y el plásmido mutante fue designado pEX100::Tnlac 7.1. El sitio de inserción del *Tnlac* en este plásmido fue ahora localizado por secuenciación entre los nucleótidos 1253 y 1254 de la región secuenciada, dentro del ORF para *mchE* y con la secuencia *lacZ* en dirección contraria a este gen. En el marco de lectura en que esta inserción podría haber dado lugar a una fusión génica no se encontró ningún ORF. La estirpe CC118 (pEX100::Tnlac 7.1) presentó una actividad β -galactosidasa de 81,0 y 126,4 unidades en fases logarítmica y estacionaria, respectivamente.

VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el sistema de exportación al medio extracelular del antibiótico MccH47, comprobándose que se trata de un sistema transportador ABC. Se identificaron dos genes *mchF* y *mchE*, cuyos productos constituyen la proteína exportadora ABC y el segundo componente de tipo MFP, respectivamente. Se pudo confirmar que las proteínas MchF y MchE constituyen los elementos de un sistema transportador ABC por: 1) el análisis de las secuencias nucleotídicas de sus genes y de las secuencias aminoacídicas deducidas y 2) la complementación heteróloga con el sistema transportador ABC de la colicina V.

En estudios anteriores se había asignado una dirección de lectura para los genes *mchE* y *mchF* de derecha a izquierda, en base al análisis de fusiones transcripcionales con MudI1681 y de una supuesta fusión génica producida por la inserción 7.1 del *Tnlac* en *mchE*. Esta última mutación daba lugar a actividad β -galactosidasa, confiriendo color azul a las colonias en presencia de X-gal, de lo que se dedujo que originaba una fusión génica *mchE-lacZ* (Gaggero et al., 1993). En este trabajo se confirmó que estos genes se expresan en la dirección contraria, o sea, de izquierda a derecha. Para esclarecer esta aparente contradicción, se mapeó la inserción 7.1 por secuenciación nucleotídica, comprobándose que se encuentra en *mchE*, que la dirección de lectura de *lacZ* es, en efecto, de derecha a izquierda, pero que *lacZ* no está en fase con ningún posible ORF, por lo que la inserción no generó una fusión génica. Sin embargo, el nivel de actividad β -galactosidasa en el correspondiente mutante no es bajo, alrededor de unas 100 unidades Miller. En otros mutantes con inserciones *Tnlac* que no originaron fusiones génicas se alcanzaron niveles semejantes de actividad enzimática (Tabla V. 2), por lo que consideramos que este alto nivel de base debe corresponder al contexto multicopia en que se encuentran las inserciones, posible amplificador de expresiones aberrantes.

Los genes *mchE* y *mchF* se transcriben entonces con igual dirección, de izquierda a derecha, presentando un pequeño solapamiento entre ellos y, seguramente, integrando un operón. Su dirección de lectura coincide también con la de los genes precedentes del sistema *-mchC* y *mchD-* por lo que eventualmente podrían conformar con ellos una unidad transcripcional.

VI. 1. MchF es la proteína exportadora del sistema transportador ABC de la MccH47

La secuencia aminoacídica deducida de MchF predice una proteína de 77.851 Da, peso molecular que concuerda con el estimado, de al menos 64.000 Da, según previos estudios (Gaggero et al., 1993). El peso molecular asignado a MchF lo cataloga como una proteína de gran tamaño, siendo ésta una característica que comparten los miembros de la familia de proteínas exportadoras ABC procariontas (Higgins, 1992; Fath & Kolter, 1993). La comparación de la secuencia aminoacídica de MchF contra bancos de datos indica que esta proteína comparte homologías significativas con exportadores de distintos sistemas ABC tanto pro como eucariotas. Dicha homología se acota principalmente al "cassette" de unión al ATP que está altamente conservado en los miembros de esta familia de proteínas. En particular, se encontró un altísimo porcentaje de identidad (89%) entre MchF y CvaB, proteína exportadora ABC del sistema colicina V (Gilson et al., 1990), que hizo posible alinear sus secuencias aminoacídicas a lo largo de los 698 residuos de ambas proteínas. Esta gran similitud permitió reconocer en MchF los dominios característicos de una proteína exportadora ABC. De esta forma, se identificaron en la secuencia de MchF el dominio proteolítico amino-terminal; la

región hidrofóbica central con seis segmentos de transmembrana, número común en este tipo de proteínas, y el “cassette” ABC carboxilo-terminal. Estos resultados concuerdan con los datos de secuencia del precursor antibiótico MchB, en el que se identificó un péptido líder doble glicina en sus primeros 15 residuos N-terminales (Rodríguez et al., 1999). Esta señal de doble glicina es característica de muchos péptidos secretados por sistemas ABC procariotas y sería procesada concomitantemente con la exportación (Havarstein et al., 1995). El conjunto de estos resultados aboga a favor de un procesamiento N-terminal de la MccH47 durante su secreción.

Por lo tanto, MchF sería la proteína exportadora ABC del sistema transportador de la MccH47, que además procesaría su sustrato durante la translocación.

VI. 2. MchE es el segundo componente del sistema transportador ABC de la MccH47

De acuerdo a la secuencia aminoacídica deducida para MchE, éste presentaría un peso molecular de 48.719 Da, cercano al tamaño de 45.000 Da estimado previamente en sistemas PAGE (Gaggero et al., 1993). La comparación de la secuencia aminoacídica de MchE contra bancos de datos resultó en que esta proteína presenta, en la mayor parte de su extensión, homologías importantes con MFPs de varios sistemas transportadores ABC bacterianos. En particular, el altísimo porcentaje de identidad (98%) encontrado entre MchE y CvaA, segundo componente del sistema de secreción de colicina V (Gilson et al., 1990), permitió alinear completamente sus secuencias aminoacídicas. Por este análisis se reconoció en MchE un dominio N-terminal que contiene la señal de exportación. De acuerdo a las predicciones computacionales, dentro de la señal de exportación habría un segmento de transmembrana que anclaría la proteína a la membrana citoplásmica, quedando el resto de la misma en el periplasma. Dicha localización está en acuerdo con la esperada para un segundo componente de un sistema transportador ABC (Dinh et al., 1994). También por homología con *cvaA* y su producto, se estableció un TTG como codón de inicio de la traducción de *mchE*, considerando que se había deducido por secuenciación N-terminal de CvaA que su metionina inicial correspondía a un codón TTG (Hwang et al., 1997).

Se consideró la existencia de la proteína MchE*, como producto de un inicio interno de la traducción de *mchE*, teniendo en cuenta datos previos sobre el estudio del sistema MccH47. Se había identificado con sistema PAGE un producto menor del gen *mchE*, de unos 30.500 Da (Gaggero et al., 1993). En la secuencia aminoacídica deducida del gen *mchE* se encontró un posible inicio interno de la traducción a partir del cual se produciría una proteína de 29.445 Da. Existe un análogo en el sistema transportador ColV denominado CvaA* cuya existencia fue fehacientemente comprobada. Esta proteína carece de la porción amino-terminal que la anclaría a la membrana por lo que varios autores han postulado que sería de localización citoplásmica. Aunque su función no está aún claramente dilucidada, se ha descrito que CvaA* incrementaría la estabilidad de CvaA (Gilson et al., 1990; Hwang et al., 1997).

Por lo anterior, se puede concluir que MchE formaría parte de la familia de proteínas de fusión de membrana (MFP), siendo el segundo componente del sistema transportador ABC de la MccH47.

VI. 3. Aportes sobre la localización subcelular de MchE y MchE*

Se procedió a estudiar la localización subcelular de MchE y MchE* por medio del aislamiento y caracterización de fusiones génicas de *mchE* con los genes reporteros *phoA* y *lacZ*.

Las fusiones génicas con *phoA* codifican para proteínas híbridas que darán lugar a actividad fosfatasa alcalina si alcanzan el periplasma. Esto es posible si la porción amino de la proteína híbrida provee una señal de exportación (Manoil & Beckwith, 1995). Por lo tanto, esperábamos obtener fusiones génicas *mchE-phoA* activas, puesto que MchE contiene una señal de exportación en su extremo amino. En efecto, se aislaron mutantes productores de proteínas híbridas activas MchE-PhoA en las que los puntos de unión se localizaron después de la señal de exportación de MchE (Figs. V. 3 y V. 5 y Tabla V. 1) Las cuatro primeras fusiones se distribuyeron entre los residuos 51 y 250, encontrándose en la porción a la que se ha asignado una localización periplásmica en las proteínas de la familia MFP. La última fusión, ubicada a continuación del residuo 340, estaría en un segmento algo más hidrofóbico, de probable localización en membrana externa (Nikaido & Saier, 1992). Coincidentemente, esta fusión confirió niveles muy bajos de actividad fosfatasa alcalina. Estas últimas consideraciones también podrían explicar el hecho que no se aislaron fusiones activas con PhoA en la porción C-terminal de MchE. Nuestros datos coinciden con los obtenidos por Skvirsky et al., 1995, que aislaron fusiones génicas activas *cvaA-phoA* en la región comprendida entre los codones 40 y 340 de *cvaA*. También hubo una buena correlación de nuestros resultados con los de estos autores en cuanto a que la actividad fosfatasa alcalina conferida por las fusiones fue disminuyendo a medida que las proteínas híbridas aumentaban de tamaño (Tabla V. 1). Ellos midieron la estabilidad de los productos CvaA-PhoA mediante experimentos de pulso y caza, no encontrando diferencias significativas en la vida media de estos; propusieron entonces que las diferencias encontradas en actividad enzimática podrían deberse a distintos niveles de expresión de las fusiones. En nuestro caso consideramos probable que un fenómeno semejante ocurra con las fusiones *mchE-phoA*. Por otra parte, se observó una diferencia importante en la actividad fosfatasa alcalina de las cepas portadoras de las fusiones *mchE-phoA* cuando se medía en cultivos en fase logarítmica y en fase estacionaria. Considerando que las fusiones están portadas por plásmidos multicopia, las medidas de actividad obtenidas sugieren que el gen *mchE* tendría una expresión muy baja en fase logarítmica y que ésta se incrementaría notoriamente en fase estacionaria. Este comportamiento podría vincularse al momento de producción antibiótica, que en general ocurre en fase estacionaria y en el que se requeriría una eficiente secreción (Kolter & Moreno, 1992). Por lo tanto, los resultados sugieren que la expresión del gen *mchE* estaría sometida a una regulación.

Las fusiones génicas con *lacZ* codifican para proteínas híbridas que darán lugar a actividad β -galactosidasa si permanecen en el citoplasma. Esto es posible si la porción amino de la proteína híbrida no aporta una señal de exportación (Manoil, 1990). Por lo tanto, esperábamos obtener fusiones génicas *mchE-lacZ* activas, productoras de proteínas híbridas MchE*-LacZ, puesto que MchE* carece de señal de exportación. En efecto, se aislaron dos mutantes productores de fusiones activas cuyos puntos de unión se localizaron a continuación de los residuos 364 y 404, o sea, próximos al extremo carboxilo de MchE/MchE* (Fig. V. 3 y V. 5 y Tabla V. 2). Las estirpes portadoras de las fusiones presentaron niveles de actividad β -galactosidasa relativamente altos, en particular cuando las medidas se realizaron en cultivos en fase estacionaria. También se observó que los cultivos en fase estacionaria tenían mayor actividad enzimática que en fase logarítmica, aunque este incremento no alcanzó la magnitud del exhibido por las fusiones *mchE-phoA*. Cabe señalar que la primera fusión con LacZ se localizó 24 residuos después de la última fusión con PhoA, o sea, que no hubo solapamiento entre las regiones en que se distribuyeron ambos tipos de fusiones. Se podría entonces considerar que MchE tuviera una conformación en horquilla, con los extremos amino y carboxilo en el citoplasma, dos segmentos de trasmembrana y un gran bucle periplásmico. Para ello sería necesario que entre la última fusión con PhoA y la primera con LacZ se encontrase un segmento hidrofóbico que pudiese atravesar la membrana. En el análisis de hidropaticidad de MchE se observa que el segmento de 24 residuos que separa ambos puntos de fusión no es

hidrofóbico, por lo que se puede razonablemente descartar esta interpretación de los resultados (Fig. V. 3). Consideramos entonces que las fusiones génicas con *lacZ* podrían estar dando lugar a proteínas híbridas con MchE*, es decir que *mchE364-lacZ* y *mchE404-lacZ* fuesen también *mchE*199-lacZ* y *mchE*239-lacZ*, respectivamente. Las actividades enzimáticas de las correspondientes proteínas híbridas darían cuenta de una localización citoplásmica de MchE*. Si consideramos que una célula portadora de una de estas fusiones en realidad albergaría dos fusiones génicas, *mchE-lacZ* y *mchE*-lacZ*, se estarían produciendo en su interior dos proteínas híbridas MchE-LacZ y MchE*-LacZ. Al localizarse en el citoplasma, la proteína MchE*-LacZ sería la responsable de la actividad β -galactosidasa detectada. Previsiblemente, MchE-LacZ no tendría actividad enzimática al ser dirigida a la membrana citoplásmica por la señal de exportación de MchE. Es sabido que la β -galactosidasa no puede ser translocada a través de la membrana, en la que entonces quedaría atrapada e impedida de adquirir su conformación final activa (Lee et al., 1989; van Geest & Lolkema, 2000). Probablemente, esto sea lo que ocurre con las proteínas MchE-LacZ. Resulta llamativa la ausencia de fusiones con *lacZ* a todo lo largo de *mchE**, a pesar de haber realizado una búsqueda exhaustiva a través de dos series de mutagénesis con *Tnlac*. Existen descripciones de toxicidad ocasionada por proteínas híbridas con LacZ en las que la porción N-terminal provee una señal de exportación. Esta acción deletérea se manifiesta por la baja viabilidad o por la inviabilidad de las células que contienen este tipo de fusiones, efecto que depende de la magnitud de la expresión de la fusión. Cuando la expresión es alta, las proteínas híbridas, atascadas en la membrana, alcanzarían a saturar los sitios de exportación de proteínas, conduciendo a la muerte celular (Bassford et al., 1979; Schwartz et al., 1981). Tomando esto en consideración, se podría pensar que las fusiones generadas por inserciones del transposón más cerca del inicio de *mchE** podrían tener niveles de expresión más altos y producir más MchE*-LacZ y MchE-LacZ que las fusiones aisladas. Este es un fenómeno encontrado con cierta frecuencia: las fusiones génicas se expresan más cuanto más pequeñas son, probablemente por diferencias en la vida media de sus mRNAs (Froshauer et al., 1988; Skvirsky et al., 1995). La abundante producción de MchE-LacZ podría ser entonces la responsable de la inviabilidad de las células en que ello ocurriera, lo que explicaría el fracaso en nuestra búsqueda de fusiones MchE*-LacZ más cortas. Paralelamente a lo que ocurre con las fusiones *lacZ*, las fusiones *mchE250-phoA* y *mchE340-phoA* también codificarían, cada una de ellas, para dos proteínas híbridas, una con MchE y otra con MchE*. En este caso, las proteínas híbridas con MchE* permanecerían en el citoplasma, serían inactivas enzimáticamente y aparentemente no supondrían un desafío para la viabilidad celular.

En suma, se propone la existencia de un producto MchE*, de localización citoplásmica, que ha sido visualizado en geles de poliacrilamida (Gaggero et al., 1993) y con el que se han obtenido proteínas híbridas con la β -galactosidasa que dieron lugar a actividad enzimática. Habiéndose demostrado que CvaA* es producto de una iniciación interna de la traducción de *cvaA* (Hwang et al., 1997) y considerando la homología casi total entre CvaA* y MchE*, proponemos que MchE* es producto de un inicio interno de la traducción del gen *mchE*. Si bien en este trabajo no se aportan datos sobre la función de MchE*, consideramos que la misma debe ser cumplida en el citoplasma.

VI. 4. Complementación heteróloga para la secreción de MccH47 con el sistema transportador de Col V

En este trabajo se demuestra que la MccH47 puede ser secretada en forma heteróloga por el sistema transportador ABC de la colicina V. Los componentes de este sistema transportador son capaces de reconocer la MccH47 y de exportarla al medio extracelular en su forma activa. La secreción antibiótica se detectó por la aparición de halos de antibiosis, cuyo

tamaño fue claramente indicativo de que la secreción heteróloga era altamente eficiente (Fig. V. 9). Los clones ensayados para la complementación contenían el sistema MccH47 con una mutación en *mchE* o en *mchF* y el sistema ColV completo. Se comprobó que todos ellos producían ambos antibióticos. Este resultado condice con la alta homología de secuencia entre los componentes de estos sistemas exportadores. Sin embargo, sus sustratos, los péptidos antibióticos ColV y MccH47, no comparten significativa homología de secuencia. Estudios de complementación realizados entre otros sistemas transportadores ABC demostraron que cuanto mayor es la homología entre los transportadores, mayor es la eficiencia de secreción heteróloga, aún cuando los sustratos transportados no compartieran homologías de secuencia importantes (Binet & Wandersman, 1995; Duong et al., 1996). En cuanto al sustrato, se han descrito dos grandes familias: las proteínas, que portan la señal de secreción en el extremo carboxilo-terminal, y los péptidos, que la contienen en el amino-terminal. En el caso de las proteínas, la señal de exportación estaría contenida en los últimos 50 residuos y presentaría motivos repetidos ricos en glicina (Mackman et al., 1987; Duong et al., 1996). Los péptidos, por su parte, tienen una señal de exportación de tipo doble glicina que sería procesada por la proteína ABC durante la exportación (Havarstein et al., 1994 y 1995). Existen resultados que indican que la señal de secreción en los péptidos abarcaría más que el péptido doble glicina en la región N-terminal (Gilson et al., 1990). Se han realizado experimentos de complementación heteróloga entre sistemas transportadores de sustratos proteicos, comprobándose la regla de mayor secreción cuanto mayor es la homología entre los transportadores (Binet & Wandersman, 1995; Duong et al., 1996), y también entre el sistema transportador del péptido colicina V y transportadores de proteínas, donde la eficiencia de secreción de ColV fue muy reducida (Fath et al., 1991). En este trabajo se realiza la primera complementación heteróloga entre sistemas transportadores de péptidos. Los altos niveles de secreción de MccH47 alcanzados por los transportadores ColV, junto con la casi identidad de secuencia de estos dos sistemas, nos permite concluir que la MccH47 es secretada, al igual que ColV, por un sistema transportador ABC. La proteína exportadora ABC sería MchF; el segundo componente, MchE y el elemento de membrana externa, TolC. Al igual que ColV, la MccH47 sería procesada durante su secreción a nivel del péptido doble glicina (Gaggero et al., 1993; Rodríguez et al., 1999; Havarstein et al., 1994).

VI. 5. Homologías a nivel nucleotídico entre la región de los genes *mchEF* y el sistema ColV

La muy alta homología aminoacídica entre MchEF y CvaAB nos condujo a comparar las secuencias nucleotídicas con el fin de identificar la extensión de la homología a nivel de DNA. Se encontró un 92% de identidad en un segmento que comprende ambos genes de cada sistema de forma muy ajustada. Este alineamiento casi perfecto se extiende desde un nucleótido antes del codón de iniciación de *mchE* y *cvaA* hasta un nucleótido después del codón de terminación de *mchF* y *cvaB* (Fig. V. 7).

La expresión de los genes *cvaAB* está regulada por hierro y se encontraron dos secuencias “Fur box” por delante del inicio de *cvaA*, a nivel de las cuales operaría la regulación transcripcional (Boyer & Tai, 1998). Se buscó entonces, por delante de la secuencia de *mchE*, un posible “Fur box” en base a la secuencia consenso “GATAATGATAATCATTATC”, incluso admitiendo varios mal apareamientos y alguna adición de nucleótidos. No se encontró, aún en estas laxas condiciones en que se realizó la búsqueda, ningún posible “Fur box” por delante de *mchE*, lo que indicaría que la expresión de *mchEF* no está sometida a la misma regulación que *cvaAB*.

Por otra parte, después de *mchF* se encontró una homología del 53% con secuencias de

los genes *cvi* y *cvaC* del sistema ColV, dato que nos condujo a la búsqueda e identificación de dos marcos abiertos de lectura cuyos posibles productos presentaron homologías con los péptidos de inmunidad y de actividad de colicina V (Fig. V. 8). Cabe señalar que las cepas portadoras del sistema antibiótico MccH47 no producen colicina V ni ninguna otra actividad antibiótica: el laboratorio posee una colección de mutantes no productores de MccH47, en los que no se detectó nunca una actividad antibiótica adicional (Laviña et al., 1990; Gaggero et al., 1993). Por lo tanto, la región posterior a *mchF* no da lugar a actividad ColV. Si consideramos que el extremo derecho del sistema MccH47 contiene secuencias de cierto nivel de homología con los determinantes de inmunidad y actividad de la colicina V, adyacentes a los genes de secreción de MccH47 a su vez casi idénticos a los de secreción de ColV, podemos reconocer entonces la presencia de un sistema ColV vestigial. El sistema MccH47 y los vestigios del sistema ColV estarían adyacentes, unidos por los genes de secreción *mchE* y *mchF*, sugiriendo que en algún momento pudieron estar ambos funcionalmente activos, compartiendo un mismo sistema transportador ABC. Por último, este hallazgo indicaría que el sistema ColV tuvo en algún momento una localización cromosómica, al igual que el sistema MccH47.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo han permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

1. La MccH47 es exportada al medio extracelular por un sistema transportador ABC formado por MchF, como la proteína exportadora ABC; MchE, como el segundo componente y TolC, como el elemento de membrana externa.
2. En la proteína MchF se reconocieron tres dominios: el cassette de unión a ATP, característico de las proteínas exportadoras ABC, una región central integral de membrana y un dominio proteolítico amino terminal que procesaría el sustrato durante su exportación. En consecuencia, la MccH47 sufriría un procesamiento amino terminal a nivel del péptido líder doble glicina que previamente había sido detectado.
3. MchE forma parte de la familia de proteínas de fusión de membrana (MFP), reconociéndose en ella un único segmento de transmembrana, seguido de una extensa porción de localización periplásmica.
4. El gen *mchE* da lugar a dos productos, MchE y MchE*. MchE es el segundo componente del sistema transportador ABC. MchE* sería el resultado de un inicio interno de la traducción, carecería de señal de exportación y se localizaría en el citoplasma. Su función aún no está dilucidada.
5. El sistema transportador de la MccH47 tiene una altísima homología con el sistema correspondiente de la colicina V. A nivel funcional, se pudo comprobar que el sistema transportador ABC de la colicina V es capaz de reconocer y exportar la MccH47 en forma eficiente.
6. El segmento final de la región secuenciada contiene vestigios de los genes de inmunidad y actividad colicina V, sugiriendo que en algún momento los sistemas MccH47 y ColV se encontraron adyacentes en el cromosoma, compartiendo los determinantes de secreción antibiótica.

VIII. 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.
- Axelsson, L. Y A. Holck. (1995) The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* 177(8): 2125-2137.
- Bassford, P.J., T.J. Sylhavy y J.R. Beckwith. (1979) Use of gene fusion to study secretion of maltose-binding protein into *Escherichia coli* periplasm. *J. Bacteriol.* 139: 19-31.
- Binet, R. y C. Wandersman. (1995) Protein secretion by hybrid bacterial ABC-transporters: specific functions of the membrane ATPase and the membrane fusion protein. *EMBO J.* 14(10): 2298-2306.
- Blond, A., J. Péduzzi, C. Goulard, M.J. Chiuchiolo, M. Barthélémy, Y. Prigent, R.A. Salomón, R.N. Farías, F. Moreno y S. Rebuffat. (1999) The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 259: 747-755.
- Boyer, A.E. y P.C. Tai. (1998) Characterization of the *cvaA* and *cvi* promoters of the colicin V export system: iron-dependent transcription of *cvaA* is modulated by downstream sequences. *J. Bacteriol.* 180(7): 1662-1672.
- Brickman, E. y J. Beckwith. (1975) Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and Φ 80 transducing phages. *J. Mol. Biol.* 96: 307-316.
- Casadaban, M. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *E. coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104: 541-555.
- Chowdhury, K. (1991) One step "miniprep" method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 19: 2792.
- Claros, M.G. y G. von Heijne. (1994) TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *CABIOS Application Notes* 10: 685-686.
- Diep, D.B., L.S. Havarstein y I.F. Nes. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178(15): 4472-4483.
- Dinh, T., I.T. Paulsen y M.H. Saier, Jr. (1994) A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 176: 3825-3831.
- Duong, F., A. Lazdunski y M. Murgier. (1996) Protein secretion by heterologous bacterial ABC-transporters: the C-terminus secretion signal of the secreted protein confers high recognition specificity. *Mol Microbiol.* 21(3): 459-470.

- Fath, M. J. y R. Kolter. (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57: 995-1017.
- Fath, M.J., R. Skvirsky y R. Kolter. (1991) Functional complementation between bacterial MDR-like export systems: colicin V, α -hemolysin, and *Erwinia* protease. *J. Bacteriol.* 173: 7549-7556.
- Fath, M.J., L.-H. Zhang, J. Rush y R. Kolter. (1994) Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochemistry* 33: 6911-6917.
- Franke, C.M., K.J. Leenhouts, A.J. Haandrikman, J. Kok, G. Venema y K. Venema. (1996) Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 178(6): 1766-1769.
- Freund, S. y G. Jung. (1992) Lantibiotics: an overview and conformational studies on gallidermin and Pep5. In *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics*. 75-92. Editado por R. James, C. Lazdunski y F. Pattus. Berlin: Springer-Verlag.
- Froshauer, G., N. Green y D. Boyd. (1988) Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, α cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 200: 501-511.
- Gaggero, C., F. Moreno y M. Laviña. (1993) Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J. Bacteriol.* 175: 5420-5427.
- van Geest, M. y J.S. Lolkema. (2000) Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(1): 13-37.
- Gilson, L., H.K. Mahanty y R. Kolter. (1987) Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export and immunity. *J. Bacteriol.* 169(6): 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(12): 3875-3884.
- Glaser, P., H. Sakamoto, J. Bellalou, A. Ullmann y A. Danchin. (1988) Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 7: 3997-4004.
- Gratia, A. (1925) Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol.* 93: 1040-1041.
- 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.
- Guzzo, J., F. Duong, C. Wandersman, M. Murgier y A. Lazdunski. (1991) The secretion genes of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease are functionally related to those of *Erwinia chrysanthemi* proteases and *Escherichia coli* α -haemolysin. *Mol. Microbiol.* 5: 447-453.

- Hardy, K.G. (1975) Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.* 39: 464-515.
- 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(2): 229-240.
- 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. *Microbiol.* 140: 2383-2389.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 67-113.
- Hofmann, K. y W. Stoffel. (1993) TMbase-A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 347, 166.
- Huang, X. y W. Miller. (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* 12: 337-357.
- Hwang, J., M. Manuvakhova y P.C. Tai. (1997) Characterization of in-frame proteins encoded by *cvaA*, an essential gene in the colicin V secretion system: CvaA* stabilizes CvaA to enhance secretion. *J. Bacteriol.* 179: 689-696.
- Hyde, S.C., P. Emsley, M. Hartshorn, M.M. Mimmack y U. Gileadi. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 362-365.
- Jung, G. (1991) Lantibiotics-ribosomally synthesized biologically active polipeptides containing sulfide bridges and alpha-beta-didehydroamino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30: 1051-1068.
- Kaur, P. (1997) Expression and characterization of DrrA and DrrB proteins of *Streptomyces peuceitius* in *Escherichia coli*: DrrA is an ATP binding protein. *J. Bacteriol.* 179(3): 569-575.
- Kolter, R. y F. Moreno. (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:141-164.
- Kyte, J. y R.F. Doolittle. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Laviña, M., C. Gaggero y F. Moreno. (1990) Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 6585-6588.
- Lee, J.L., A. Boman, S. Chuanxin, M. Andersson, H. Jornvall, V. Mutt y H.G. Boman. (1989) Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 9159-9162.

- Létoffé, S., P. Delepelaire y C. Wandersman. (1990) Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* α -haemolysin. *EMBO J.* 9(5): 1375-1382.
- Li, Y.-M., J. C. Milne, L. L. Madison, R. Kolter, y C. T. Walsh. (1996) From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science* 274: 1188-1193.
- Mackman, N., K. Baker, L. Gray, R. Haigh, J.M. Nicaud y I.B. Holland. (1987) Release of a chimeric protein into the medium from *Escherichia coli* using the C-terminal secretion signal of haemolysin. *EMBO J.* 6(9): 2835-2841.
- Manoil, C. (1990) Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J. Bacteriol.* 172: 1035-1042.
- Manoil, C. y J. Beckwith. (1985) *TnphoA*: A transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8129-8133.
- Marger, M.D. y M.H. Saier, Jr. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18: 13-20.
- Miller, J. H. (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Neidhardt, F.C., R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H.E. Umbarger. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. Sec. Ed. ASM. Washington, D.C.
- Nikaido, H. y M. H. Saier, Jr. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science.* 258(6): 936-942.
- O'Keeffe, T., C. Hill y R.P. Ross. (1999) Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *App. Environ. Microbiol.* 65(4): 1506-1515.
- Oliver, D.B. (1987) Periplasm and Protein Secretion. *In: Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. Ed. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K. Brooks Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger. ASM. Washington, D.C. p. 56-69.
- Pearson, W. R. y D.J. Lipman. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2444-2448.
- Pugsley, A.P. Y B. Oudega. (1987) Methods for studying colicins and their plasmids, p.105-161. *In: K.G. Hardy (ed.), Plasmids, a practical approach.* IRL Press, Oxford.
- Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50-108.

- Rodríguez, E. y M. Laviña. (1998) Genetic analysis of microcin H47 immunity. *Can. J. Microbiol.* 44: 692-697.
- Rodríguez, E., C. Gaggero y M. Laviña. (1999) The structural gene for microcin H47 encodes a peptide precursor with antibiotic activity. *Ant. Ag. Chem.* 43(9): 2176-2182.
- Saier, M.H., Jr., R. Tam, A. Reizer y J. Reizer. (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11: 841-847.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen y A.R. Coulson. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
- Schatz, P.J. y J. Beckwith. (1990) Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Gen.* 24: 215-248.
- Schwartz, M., M. Roa y M. Debarbouille. (1981) Mutations that affect *lamB* gene expression at a posttranslational level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 2937-2941.
- Silhavy, T.J. y J.R. Beckwith. (1985) Uses of *lac* fusions for the study of biological problems. *Microbiol. Rev.* 49: 398-418.
- Skvirsky, R.C., S. Reginald y X. Shen. (1995) Topology analysis of the colicin V export protein CvaA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177(21): 6153-6159.
- Walker, J.E., M. Saraste, M.J. Runswick y N.J. Gay. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases, and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.
- Wandersman, C. y P. Delepelaire. (1990) TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4776-4780.
- Yang, C. C. y J. Konisky. (1984) Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J. Bacteriol.* 158: 757-759.