

Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Expresión y exportación del fragmento formador de poros de colicina A

Formación de un complejo inactivo con su proteína de inmunidad

Autor:

María Fariña Garmendia

Director:

José Luis Nieva Escandón

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	2
3. Materiales y métodos.....	3
3.1. Subclonaje y generación de fusiones con pf-caa.....	3
3.2. Test de expresión de los componentes del complejo cai-caa.....	4
3.3. Fraccionamiento celular.....	5
3.4. Purificación.....	5
4. Resultados.....	5
4.1. Expresión proteica.....	5
4.1.1. Selección de cepas.....	5
4.1.2. Cuantificación proteica. Componentes del complejo pf-caa / cai.....	6
4.1.2.1. Expresión individual de los componentes del complejo.....	7
4.1.2.2. Expresión conjunta caa-cai.....	8
4.2. Fraccionamiento.....	9
4.3. Purificación.....	9
5. Discusión.....	11
6. Conclusiones.....	12
7. Bibliografía.....	12

1. INTRODUCCIÓN

Las colicinas son bacteriocinas producidas por cepas de *Escherichia coli* y letales para otras cepas relacionadas. Comienzan su acción letal tras unirse a un receptor en la superficie de la célula diana. Estos receptores son porinas de la membrana externa de la bacteria (OM). Sobre esta base se han ido denominando las distintas colicinas, asignando una letra que identifica al receptor al que se une. Cuando más de una colicina se une al mismo receptor se designa con la letra que corresponde a ese receptor seguido de un número (colicinas E1, E2...E9), (Cascales *et al*, 2007). Para alcanzar el periplasma bacteriano las colicinas utilizan los sistemas TonB o Tol (Pilsel & Braun, 1995). Posteriormente, ejercen su función letal bien en la membrana interna (IM) o en el interior de la célula. Cada una de estas funciones es realizada por un dominio de los tres que componen las colicinas. En concreto, la colicina A (caa) interacciona con su dominio central con el receptor BtuB de OM, el dominio N-terminal es el responsable de la traslocación al periplasma por el sistema Tol y es finalmente el dominio C-terminal el que forma canales dependientes de voltaje en IM (Duché, 2002) que provocan la despolarización celular, lo que conlleva la inhibición del transporte activo y la paralización del metabolismo celular (Zhang & Kramer, 1993). La colicina A se encuentra codificada por un pequeño plásmido multicopia (pColA) que presenta un factor de movilización y el operón de colicina. Este último, además del gen estructural de la colicina A, está provisto de los genes estructurales la proteína lítica (cal) y de la proteína de inmunidad (cai). La expresión de caa y cal es inducible por agentes SOS, mientras que cai se produce constitutivamente. La co-producción de caa y cal resulta letal para las propias células productoras. La expresión de cal activa las fosfolipasas A de la membrana externa (OmpLA) y provoca la permeabilización de IM y OM dando lugar a liberación vesicular de caa y la muerte de la célula productora (Cascales *et al*, 2007). Las bacterias vecinas que contienen el plásmido pColA se encuentran protegidas frente a caa liberada por su contenido en cai, mientras que el resto de bacterias serían sensibles a su acción.

Se dice que son **resistentes**, a todas aquellas cepas mutantes que son insensibles a la acción de una determinada colicina. Las mutaciones de éstas, residen en el receptor de la superficie celular (BtuB para caa) al que se une la colicina antes de ejercer su acción letal. Existe otro tipo de insensibilidad a las colicinas que está relacionada con la transmisión de la señal tras la unión de la colicina a su receptor o su internalización. Las mutaciones se localizan en los genes *tol* o *tonB* y se dice que estas cepas son **tolerantes** o refractarias para distinguirlas de las anteriores (Rodríguez-Lemoine, 1999). Finalmente, las cepas que contienen el plásmido colicinéxico pCol son **inmunes** a la acción de la colicina correspondiente, debido a la expresión constitutiva de la proteína de IM, cai (Zhang *et al.*, 2010), que forma un complejo inactivo con caa exógena (Espeset *et al*, 1996).

Este trabajo está enfocado a la interacción proteína-proteína del complejo funcional caa-cai. Las interacciones proteína-proteína dentro de la membrana han sido tradicionalmente muy difíciles de cuantificar. Sin embargo, publicaciones anteriores (Espeset *et al.*, 1996) han demostrado que el sistema caa-cai representa un complejo eficaz a la hora de inhibir la actividad tóxica de caa. Además, este complejo posee dos ventajas principales que facilitan su estudio: la interacción debe tener una alta afinidad y se debe poder medir *in vivo* de forma indirecta.

Hoy en día, todavía se desconoce la conformación que adopta caa en membrana, no obstante, se conocen algunas reestructuraciones que conlleva la formación del poro. La inserción del dominio formador de poros de la colicina A (pf-caa) en membrana interna supone la apertura de la molécula a través del alejamiento de las hélices 1 y 2 del resto de la molécula. Mientras, las hélices 8 y 9 permanecen en la

superficie de la membrana (Duché, 2002). A nivel estructural, también son desconocidos todos los detalles de formación del complejo *caa-cai*.

Con el fin de reproducir *in vitro* la formación del complejo funcional en la membrana interna de *Escherichia coli*, se han co-expresado en el citosol y en plásmidos independientes *pf-caa* y *cai*. Espontáneamente, *cai* se localiza en IM, mientras que *pf-caa* permanece en el citosol. Para que *pf-caa* acceda a IM por la cara externa (monocapa opuesta a la de *cai*) se ha fusionado con dos péptidos señal bacterianos que lo direccionan al periplasma del microorganismo tras su síntesis (**Figura 1**). Por un lado, *pf-caa* se ha fusionado con el péptido señal Pectato liasa B de *Erwinia carotova* (PelB) para ser exportado a través del sistema Sec. Esta translocasa exporta la proteína en su estado desplegado gracias a la acción combinada de un canal conductor proteico embebido en la membrana citosólica, denominado SecYEG y una ATPasa periférica asociada o proteína motora SecA dependiente de ATP. SecA acepta las proteínas secretadas e impulsa la reacción de translocación, introduciendo las proteínas desplegadas en el canal transmembrana estrecho. En este proceso, la energía necesaria está proporcionada por el ATP y la fuerza protón-motriz (Natale *et al.*, 2007). Por otro lado, *pf-caa* en fusión con el péptido de la trimetilamina-N-oxido reductasa (TorA), caracterizado por sus dos residuos de arginina, sería translocado por medio de la translocasa TAT (Palmer and Berks, 2012). El sistema TAT consiste en subunidades separadas que se ensamblan en un poro oligomérico tras la iniciación de la translocación. Esta maquinaria es capaz de adaptarse a grandes perímetros y exporta la proteína completamente plegada y la energía requerida para ello es proporcionada por la fuerza protón-motriz (De Buck *et al.*, 2008).

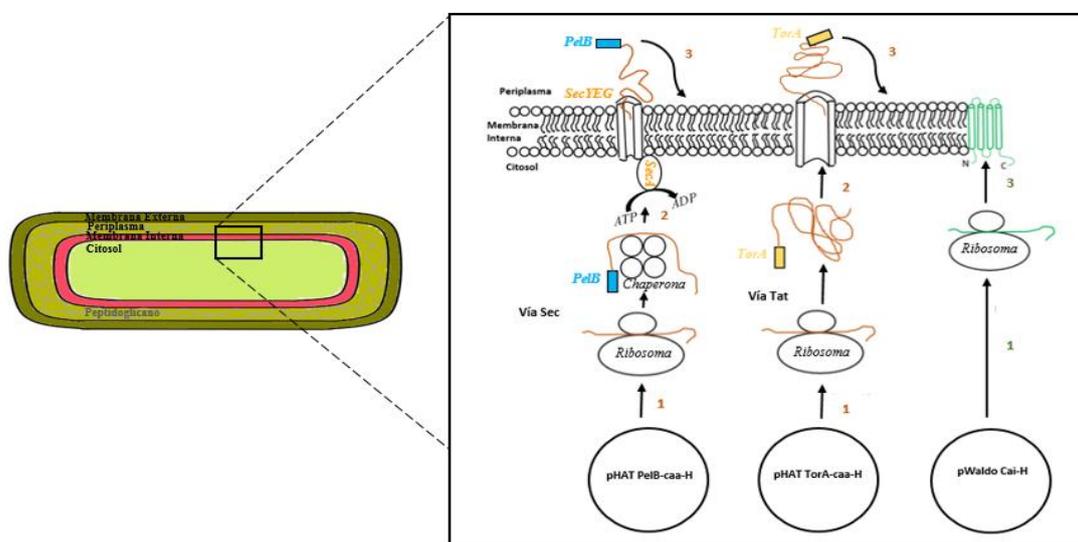


Figura 1. Proceso de inserción de la proteína de inmunidad de Colicina A (*cai*) y de la Colicina A (*caa*) en la membrana interna de *Escherichia coli*. La inclusión de *cai* en la membrana citosólica (2) requiere la expresión previa o simultánea de la proteína (1). La incorporación de *caa*, depende de la expresión proteica (1), posterior mecanismo de translocación al periplasma por diversos mecanismos de exportación (2) y finalmente la inserción a la membrana citosólica desde la cara periplásmica (3).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta memoria reside en la optimización de las condiciones de sobreexpresión del complejo funcional *caa-cai*. La formación del complejo en el sistema natural implica el acceso de ambas

proteínas desde lados opuestos de la IM de la bacteria. Con el fin de mimetizar este escenario es necesario inducir la exportación del fragmento pf-*caa* al periplasma celular tras su sobreexpresión. Los objetivos parciales concretos son:

1.- Generación de mutantes

- 1.1 Generar fusiones de pf-*caa* con péptidos señal que direccionalicen la proteína hacia el periplasma. Posicionamiento de los péptidos señal pelB y TorA en el extremo N-terminal de las construcciones, que dirigen la secuencia de aminoácidos a los sistemas de exportación Sec y TAT respectivamente.
- 1.2 Construir versiones con y sin colas de histidinas que permitan purificar la proteína directamente o de forma indirecta tras su unión a *cai*.
- 1.3. Combinar las variantes exportables de *caa* con la proteína fluorescente Cherry para facilitar la detección y cuantificación de la proteína.

2.- Cuantificación de la expresión proteica en función de:

- 2.1 El tipo celular
- 2.2 La concentración del agente inductor , la temperatura y tiempo de la expresión proteica.
- 2.3 Las distintas variantes de la proteína
- 2.4 La co-expresión con la proteína de inmunidad

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SUBCLONAJE Y GENERACIÓN DE FUSIONES CON PF-CAA

Los últimos 206 residuos de la colicina A constituyen el fragmento formador de poros pf-*caa*:

MEVAEKAKDERELLEKTSSELIAGMGDKIGEHLGDKYKAI AKDIADNIKNFQGKTIRS FDDAMASLNKITA
NPAMKINKADR DALVN AWKHVDAQDMANKLGNLSKAFKVADVVMKVEKVKREKSI EGYETGNWGPLMLEVE
SWVLSGIASSVALGIFSATLGAYALS LGVPAIAVGIAGILLA AVVVGALIDDKFADALNNEIIRPAH

La secuencia de la proteína de inmunidad *cai* contiene 179 aminoácidos:

MGMNEHSIDTDNRKANALYLFIIIGLIPLLCIFVVYYKTPDALLLRKIATSTENLPSITSSYNPLMTKV
MDIYCKTAPFLALILYILTFKIRKLINNTDRNTVLRSCLLSPLVYAAIVYLF CFRNFELTTAGRPVRLMA
TNDATLLLFYIGLYSIIFFTTYITLFTPVTAFKLLKKRQ

Se señalan en color las zonas helicoidales en la estructura de la forma soluble de *caa* (pdb: 1col) y las regiones que se predicen como hélice en *cai* cuya estructura se desconoce. Estas dos secuencias han sido combinadas con (i) colas de histidinas para su purificación (H) (ii) proteínas fluorescentes para su seguimiento y cuantificación (Cherry y GFP) y (iii) señales de exportación al periplasma (pelB y TAT). Cada serie de secuencias ha sido clonada en un plásmido de expresión. Los plásmidos utilizados han sido: pWaldo-d, pET22b(+) y pHAT. pWaldo-d confiere resistencia a kanamicina y se ha utilizado para clonar las variantes de *cai*. pET22b(+) y pHAT proporcionan resistencia a ampicilina y se han utilizado para las formas de pf-*caa*. Los tres plásmidos contienen el promotor T7 inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Para este estudio se han generado las siguientes variantes de pf-*caa*:

- 1) H-*caa*

- 2) PelB-*caa*
- 3) PelB-*caa*-H
- 4) PelB-*caa*-Cherry-H
- 5) TAT-*caa*
- 6) TAT-*caa*-H
- 7) TAT-*caa*-Cherry-H

El plásmido pColA-CA31 que codifica para la proteína *caa* se empleó como molde, para amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la secuencia de DNA que codifica para *pf-caa*. La PCR se llevó a cabo a través de un programa estándar de 30 ciclos. Los cebadores 5' y 3' utilizados, fueron diseñados para introducir, en los extremos 5' y 3' de los *pf-caa* amplificados, los sitios de restricción *NcoI* y *HindIII* o *BamHI*, respectivamente, en función de si se deseaba obtener una cola *His₆* en el extremo C-terminal o no. Los productos de PCR y los plásmidos de expresión pHAT y pET22b(+) fueron digeridos con *NcoI* y *HindIII* o *BamHI*. Posteriormente, los fragmentos se ligaron a los plásmidos de interés cortados con las mismas enzimas de restricción con los que se digirieron los insertos. Para la ligación de las construcciones con *caa* citosólica, se empleó el plásmido pHAT. Sin embargo, para todas las construcciones provistas de *pf-caa* exportable, se usó el plásmido pET22b(+) provisto de la secuencia codificante de las señales de exportación (*TorA* o *PelB*). Para la generación de las variantes fluorescentes, se introdujo la secuencia de la proteína Cherry entre los sitios *BamHI* y *HindIII* de pET22b(+), quedando en el extremo C-terminal de *caa*. Para el clonaje y selección de mutantes, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con los plásmidos correspondientes.

Las versiones de *cai*-H y *cai*-GFP-H se encontraban disponibles con anterioridad al inicio de este trabajo. Concretamente, estaban clonadas en el plásmido de expresión pWaldo-d (Drew *et al.*, 2001).

3.2. TEST DE EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEJO CAI-CAA

La expresión de las proteínas se ensayó en las cepas de *Escherichia coli*: BL21-DE3, C43-DE3 y C41-DE3. De forma rutinaria, las células crecieron a 37 °C en aerobiosis y en medio Luria Bertani (LB) líquido. Además, en los casos requeridos, el medio ha sido suplementado con los antibióticos ampicilina (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y/o kanamicina (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). La expresión de las proteínas se ha inducido con IPTG 0.1 mM o 1 mM.

Cultivos de 5 ml de LB se incubaron en tubos falcon de 50 ml de capacidad. El crecimiento bacteriano se monitorizó a través de la absorbancia del cultivo a 600 nm (OD_{600}) en un espectrometro Cary 6000. Se centrifugaron alícuotas de 1 ml y se resuspendieron en 0.1 PBS (*phosphate buffer saline*, fosfato sódico 50 mM NaCl 100 mM pH 7.4). Tras un lavado en el mismo tampón y se midió la fluorescencia en un lector de placas Synergy HT (Biotech, USA).

Alternativamente, en especial para realizar las medidas de la cinética de crecimiento celular y expresión proteica, se registró la absorbancia y la fluorescencia en un lector de placas Synergy HT directamente, a partir de cultivos crecidos en placas de 96 pocillos a 37 °C o a 25 °C con agitación de 300 revoluciones por minuto (r.p.m). Los preinóculos crecidos durante 12 horas hasta alcanzar la saturación, se diluyeron hasta OD 0.1 y se distribuyeron en alícuotas de 150 μl en los pocillos correspondientes de cada placa. A un grupo de pocillos no se le añadió IPTG, otra serie se indujo a OD 0.2 con IPTG 0.1 mM o IPTG 0.5 mM y a otro grupo se le añadió las mismas cantidades de IPTG a OD 0.5.

La densidad óptica del cultivo se midió como absorbancia a 600 nm. Los cultivos control se midieron también con paso óptico de 1 cm en un espectrofotómetro convencional para obtener la correspondencia en valores habituales de las medidas de crecimiento bacteriano. La fluorescencia de la proteína GFP se midió a una sensibilidad de 70 a través de filtros de ventana óptica: $\lambda_{ex} = 485 \pm 20$ nm y $\lambda_{em} = 508 \pm 20$ nm. La fluorescencia de la proteína Cherry se detectó con una sensibilidad de 70 con filtros $\lambda_{ex} = 560 \pm 20$ nm y $\lambda_{em} = 620 \pm 40$.

3.3. FRACCIONAMIENTO CELULAR

Cultivos de 50 ml se incubaron a 30 °C en agitación en frascos de 250 ml tras su inducción a OD 0.3 con 0.5 mM IPTG durante 12 horas. Se cosecharon las células por centrifugación a 6000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C en rotor beckman 25.50 Ti, y el sedimento se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en 7.5 ml del tampón compuesto por: Tris-HCl (pH8.0) 0.01 M, Sacarosa 20% y EDTA 0.1 mM. Se recogieron nuevamente las células por centrifugación y se incubaron 20 min en hielo en MgSO₄ 5 mM y se volvió a someter la preparación una centrifugación similar. El periplasma o fase soluble se reservó para su análisis posterior y el sedimento, que contenía los esferoplastos, se sonicó en 5 ciclos de 10 micrón de 20 s (SONIPREP 2000). El citoplasma (soluble) y membrana interna (sedimento) de la bacteria se separaron en una ultracentrifugación de 1 h a 40000 r.p.m en un rotor KONTRON TFT50.38.

3.4. PURIFICACIÓN

La fracción a partir de la que se realizó la ulterior purificación de las versiones fluorescentes de ambas proteínas pelB-*caa*-H, TAT-*caa*-H, *cai*-GFP-H fue en todos los casos la fracción de membrana interna de cultivos de 1 L de LB con expresión de 20 h a 25 °C. Esta fracción se resuspendió en PBS hasta quedar homogénea, se mezcló con distintos detergentes hasta una concentración final de éstos del 1% y se suplementó con inhibidores de proteasas (Pierce EDTA free PI). Tras retirarse la fase insoluble en detergente por ultracentrifugación (1 h a 40000 r.p.m TFT50.38), se incubó la fracción soluble con resina His Trap™ FF y tras varios lavados en el mismo tampón PBS, 1 % detergente, 20 mM imidazol pH 7.4, se sometió a un gradiente de elución manual con el tampón final PBS, 1 % detergente, 400 mM imidazol pH 7.4. Las muestras se analizaron por su señal de fluorescencia y por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Los detergentes empleados fueron: N,N-dimethyldodecylamine N-oxide (LDAO), Tritón X-100, Oleil-liso-fosfatidilglicerol (OLPG), n-dodecil- β -D-maltopiranosido (DDM) y n-dodecil-fosfocolina (FOS-PC). El Tritón X-100 y SDS se adquirieron de Sigma-Aldrich (UK) el resto de detergentes eran de Affimetrix (USA).

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESIÓN PROTEICA

4.1.1. Selección de cepas

Se transformaron independientemente células competentes de las cepas C41-DE3 y BL21-DE3 con plásmidos que codifican para *pf-*caa** y *cai*-GFP-H y que confieren resistencia a ampicilina y kanamicina. Se inoculó una colonia individual en 5 ml de LB y se incubó a 37 °C con agitación hasta OD 0.2 o OD 0.4 y se indujo con IPTG 0.5 mM final. Se retiraron alícuotas de 100 μ l cada hora después de transcurridas

desde 1 h hasta 7 h después de la inducción. El residuo de células se resuspendió en tampón de carga, se cargó en el gel de poliacrilamida y se sometió a electroforesis. En la **Figura 2**, se muestran los geles tras su tinción en azul de Coomassie (pf-caa) o tras la detección de la fluorescencia (cai-GFP-H).

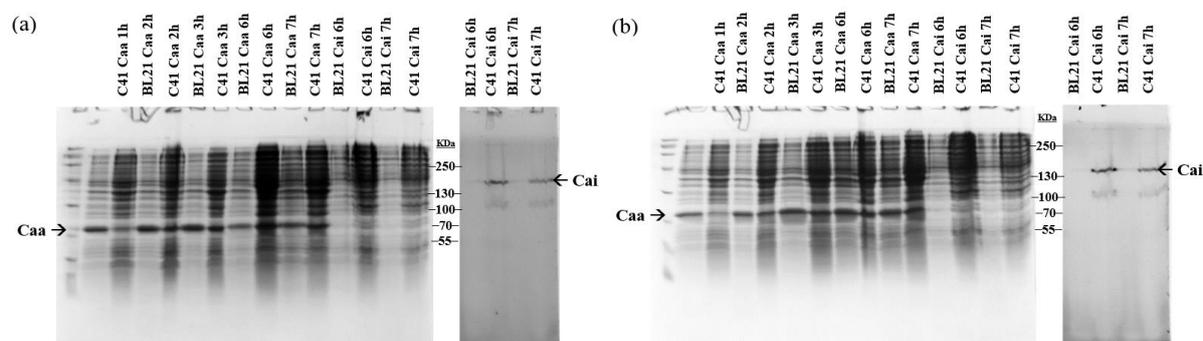


Figura 2. SDS PAGE en geles de 12.5 % poliacrilamida. Células C41 y BL21 transformadas con con pf-caa y cai-GFP-H de forma independiente cosechadas 1, 2, 3, 6 y 7 horas tras la inducción con IPTG. La inducción en se llevó a cabo a OD 0.2 (a) y OD 0.4 (b). Para la detección de pf-caa los geles se tiñeron con azul de Coomassie, mientras que Cai-GFP-H se detectó por fluorescencia en gel.

La forma soluble citosólica de pf-caa (22 kDa) se expresó sustancialmente mejor en la cepa BL21-DE3 tras una inducción temprana. Sin embargo, para tiempos de expresión largos, superiores a 6 horas la cantidad de pf-caa detectada en C41-DE3 aumentaba notablemente, aunque también se incrementó la proporción de proteínas contaminantes.

La expresión de la proteína intrínseca de membrana cai-GFP-H (49.8 kDa) fue más selectiva en cuanto al tipo celular. Sólo se detectó expresión de la proteína cuando se realizaba el experimento en la cepa *E. coli* C41-DE3. Este comportamiento es habitual para las proteínas de membrana.

Como solución de compromiso, los ensayos de co-expresión de los componentes del complejo se realizaron a continuación en las cepas de *E. coli* C41-DE3 y C43-DE3.

4.1.2. Cuantificación proteica. Componentes del complejo pf-caa / cai

Se transformaron células competentes de *E. coli* C41-DE3 y C43-DE3, con los plásmidos que contenían las construcciones que se recogen en la **Tabla I**. Se seleccionaron colonias resistentes a los antibióticos ampicilina y kanamicina y se dejaron crecer hasta saturación durante la noche. Los preinóculos se diluyeron 20 veces y se distribuyeron en placas de 96 pocillos que se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se procedió según lo indicado en la sección de materiales y métodos en la cuantificación del crecimiento y la expresión de las proteínas fluorescentes. Los resultados se recogen en las **Figuras 3-6**.

Tabla I. Construcciones y cepas de *E. coli* empleadas para el test de expresión.

Cepa	Construcción	Cepa	Construcción
C41	1) TAT-caa-Cher-H + pWaldo	C43	8) TAT-caa-Cher-H + pWaldo
	2) TAT-caa-Cher-H + cai-H		9) TAT-caa-Cher-H + cai-H
	3) TAT-caa-Cher-H + cai-GFP-H		10) TAT-caa-Cher-H + cai-GFP-H

4) H- <i>caa</i> + <i>cai</i> -GFP-H	11) H- <i>caa</i> + <i>cai</i> -GFP-H
5) PelB- <i>caa</i> -Cher-H + pWaldo	12) PelB- <i>caa</i> -Cher-H + pWaldo
6) PelB- <i>caa</i> -Cher-H + <i>cai</i> -H	13) PelB- <i>caa</i> -Cher-H + <i>cai</i> -H
7) PelB- <i>caa</i> -Cher-H + <i>cai</i> -GFP-H	14) PelB- <i>caa</i> -Cher-H + <i>cai</i> -GFP-H

Para la detección de la expresión de las formas exportables del *pf-*caa** fusionadas con los dos péptidos señal seleccionados, se utilizaron las fusiones con la proteína fluorescente Cherry (pelB-*caa*-Cher-H y TAT-*caa*-Cher-H, Tabla I) subclonadas en el plásmido pET22b(+), que confiere resistencia a ampicilina. La expresión de *cai* se midió por la fluorescencia de la proteína GFP en la fusión *cai*-GFP-H, subclonada en el plásmido pWaldo-d, resistente a kanamicina. En todos los casos, se realizó una transformación con los dos plásmidos y la selección de las colonias transformadas y el crecimiento bacteriano se realizaron en presencia de dos antibióticos. Para comprobar la expresión de las versiones de *caa* en ausencia de la proteína de inmunidad, la resistencia a kanamicina se conservó mediante el plásmido pWaldo-d sin inserto adicional. Asimismo, la expresión de *cai* se comprobó en presencia de la forma citosólica de *caa*.

4.1.2.1. Expresión individual de los componentes del complejo

La **Figura 3**, muestra los valores de fluorescencia de Cherry en función del tiempo en las combinaciones de las dos formas exportables de *pf-*caa**, TAT-*caa*-Cher-H y PelB-*caa*-Cher-H con el plásmido vacío pWaldo-d en las cepas C41-DE3 y C43-DE3. La inducción se realizó a OD 0.2 y 0.45 con IPTG 0.1 y 0.5 mM final. No se detecta expresión proteica en ninguna de las condiciones ensayadas. Tampoco se detecta que el crecimiento celular se encuentre alterado con respecto a los cultivos no inducidos.

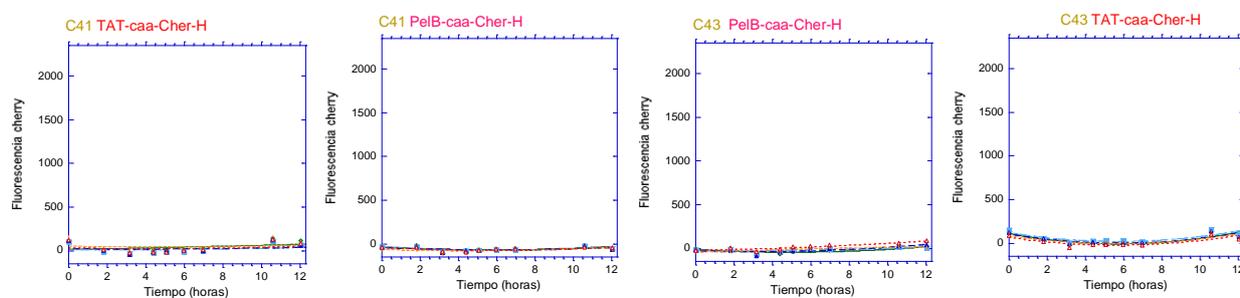


Figura 3. Comparación de la cinética de fluorescencia de Cherry en cepas C41 y C43 transformadas con dos tipos de construcción: PelB-*caa*-Cher-H y TAT-*caa*-Cher-H en condiciones variables de la inducción: OD 0.2 (t=0.5 horas) con IPTG 0.1 mM (celeste), OD 0.45 (t=1.4 horas) con IPTG 0.1 mM (azul), OD 0.2 (t=0.5 horas) con IPTG 0.5 mM (naranja) e inducción a OD 0.45 (t=1.4 horas) con IPTG 0.5 mM (roja) y sin IPTG (verde).

Por otro lado, *cai*-GFP-H en presencia de la versión no exportable de *pf-*caa**, H-*caa*, sigue un patrón de expresión distinto en las cepas C41-DE3 y C43-DE3 (**Figura 4**). La observación más notable es que en la cepa C43-DE3 la mayor cantidad de proteína se produce en ausencia de IPTG. En C41-DE3, la expresión es mayor en los cultivos inducidos, aunque no se detectan diferencias entre las distintas condiciones de inducción ensayadas.

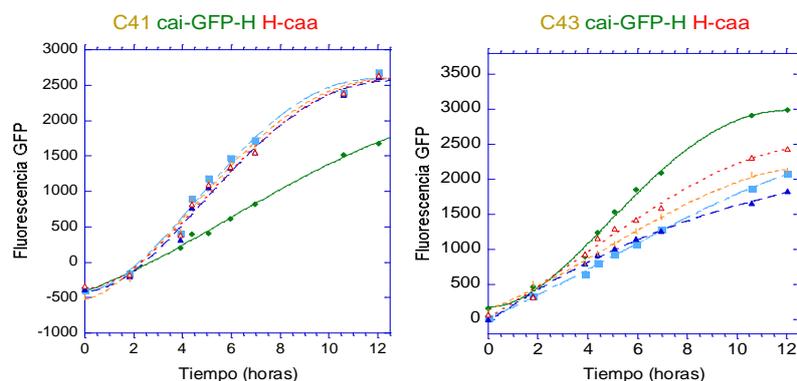


Figura 4. Comparación de la cinética de fluorescencia emitida por GFP en cepas C41-DE3 y C43-DE3 transformadas con las construcciones cai-GFP-H y H-caa. Las condiciones de inducción fueron: OD 0.2 ($t=0.5$ horas) con IPTG 0.1 mM (celeste), OD 0.45 ($t=1.4$ horas) con IPTG 0.1 mM (azul), OD 0.2 ($t=0.5$ horas) con IPTG 0.5 mM (naranja) e inducción a OD 0.45 ($t=1.4$ horas) con IPTG 0.5 mM (roja) y sin IPTG (línea verde).

4.1.2.2. Expresión conjunta caa-cai

En la **Figura 5**, se muestra la evolución en el tiempo de la fluorescencia de la proteína Cherry que refleja la expresión de las versiones exportables de pf-caa cuando simultáneamente se induce la expresión de la proteína de inmunidad en sus formas cai-H y cai-GFP-H.

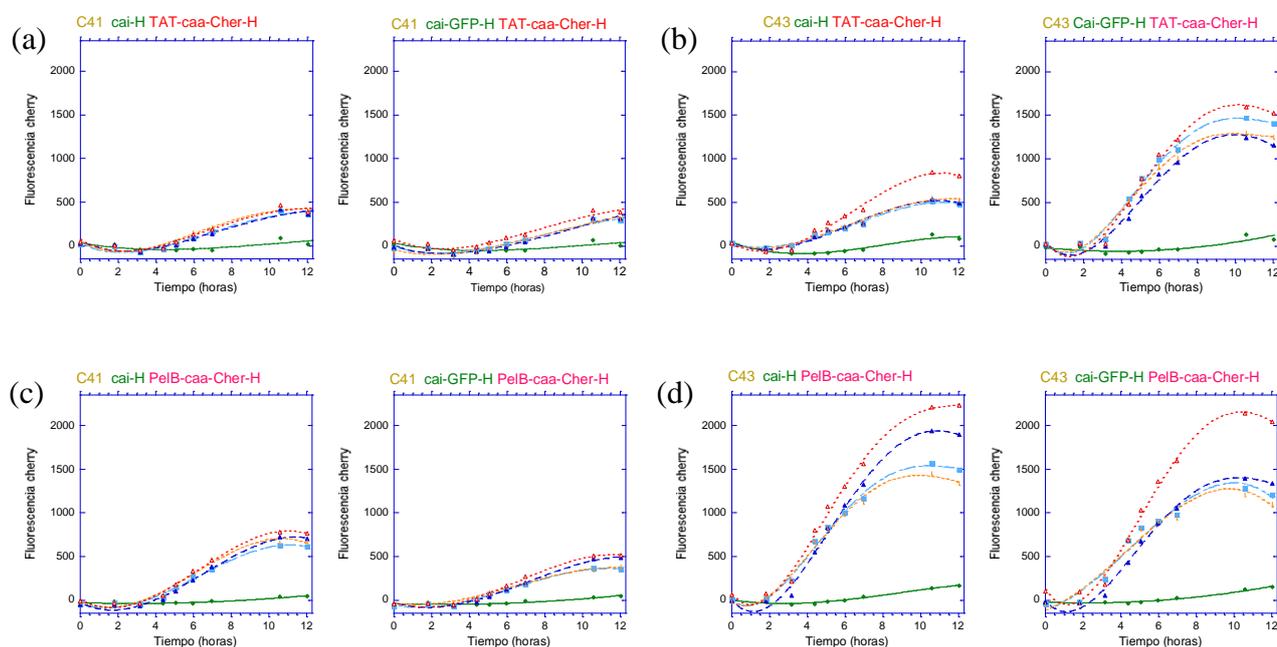


Figura 5. Cinética de evolución de la fluorescencia de Cherry en las 12 horas posteriores a la primera inducción de las cepas de *E. coli* C41-DE3 y C43-DE3 provistas de las construcciones: (a) TAT-caa-Cher-H y cai-H, (b) TAT-caa-Cher-H y cai-GFP-H, (c) PelB-caa-Cher-H y cai-H y (d) PelB-caa-Cher-H y cai-GFP-H. Distribución de colores como en **Figura 4**.

Las observaciones más relevantes podrían resumirse como sigue: (i) en general la expresión de TAT-caa-Cher-H Y PelB-caa-Cher-H es mayor en C43-DE3 que en C41-DE3. (ii) La

sensibilidad a las condiciones de inducción es escasa en la mayor parte de los casos. (iii) Las dos versiones de la proteína de inmunidad, cai-H y cai-GFP-H, protegen a la bacteria permitiendo la expresión de la toxina y (iv) ambas versiones de la toxina TAT-caa-Cher-H y PelB-caa-Cher-H expresan en cantidades no sustancialmente diferentes.

Cuando la expresión de proteína se expresa en base a la cantidad de células (O.D. del cultivo) la combinación más efectiva es PelB-caa-Cher-H en presencia de cai-H en C43-DE3 (**Figura 6**).

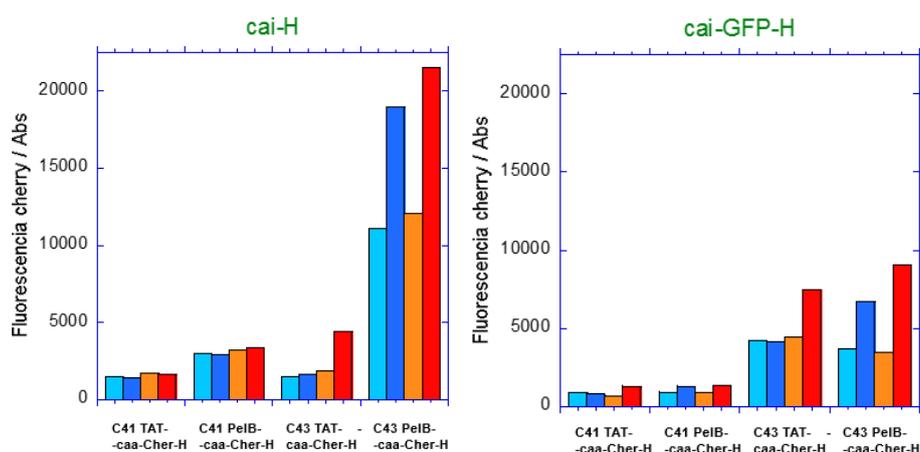


Figura 6. Comparación de la fluorescencia de Cherry en PelB-caa-Cher-H y TAT-caa-Cher-H por unidad de O.D. en cepas C41-DE3 y C43-DE3 provistas de cai-H y cai-GFP-H. Distribución de colores como en Figura 4

4.2. FRACCIONAMIENTO

Las formas exportables y por tanto tóxicas de pf-caa sólo pueden sobre-expresarse en el caso de que la bacteria se encuentre inmunizada por la presencia de cai. Esta circunstancia sugiere que el complejo inactivo se está produciendo de forma eficaz. Para determinar el grado de eficacia de la exportación e inserción se realizó un fraccionamiento de los cultivos de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos. En la **Figura 7**, se muestra la fluorescencia de las proteínas Cherry y GFP de geles que contienen las distintas fracciones resultantes.

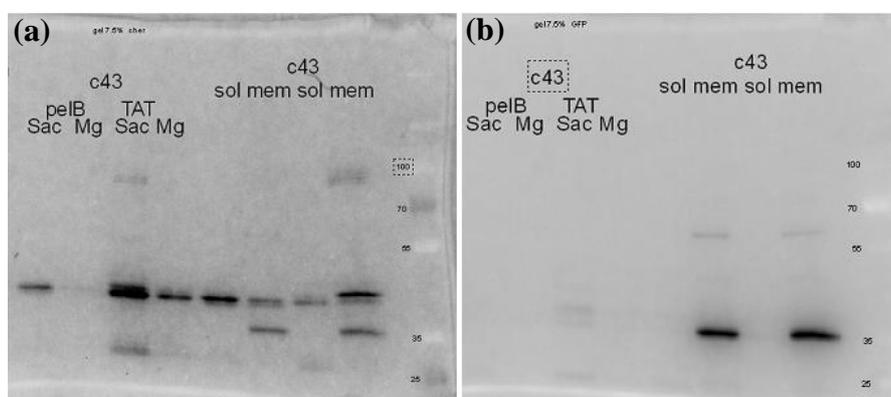


Figura 7. Electroforesis en gel SDS-PAGE 7.5% de las muestras obtenidas tras el fraccionamiento: a) Fluorescencia de GFP y b) Fluorescencia de Cherry.

4.3. PURIFICACIÓN

Tras la expresión de pelB-*caa-Cherry* + *cai-GFP-H* y TAT-*caa-Cherry* + *cai-GFP-H* en *E. coli* C43-DE3 durante 12 horas a 25°C, se seleccionó la fracción que contiene la membrana bacteriana y se solubilizó en LDAO, el detergente que ha resultado adecuado para la purificación de *cai*. En la **Figura 8** se muestra que la elución de las proteínas fluorescentes no coincide, indicando que el complejo no es estable en este detergente.

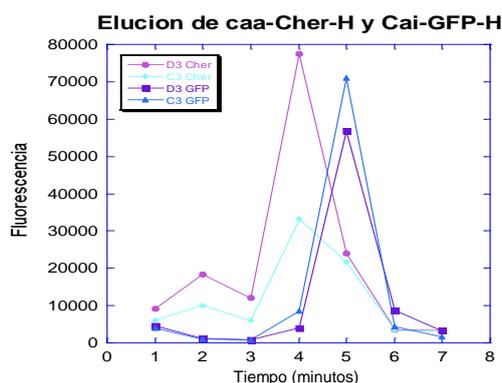


Figura 8. Elución de *caa* y *cai* de la resina de NI-NTA de pelB-*caa-Cherry* (celeste, F_{CHE} ; azul, F_{GFP}) y TAT-*caa-Cherry* H (rosa, F_{CHE} ; violeta, F_{GFP}) combinadas con *cai-GFP-H*.

El mismo experimento se realizó otros detergentes en la solubilización de la membrana y posterior purificación: Tritón X-100, SDS, DDM y FOS-PC.

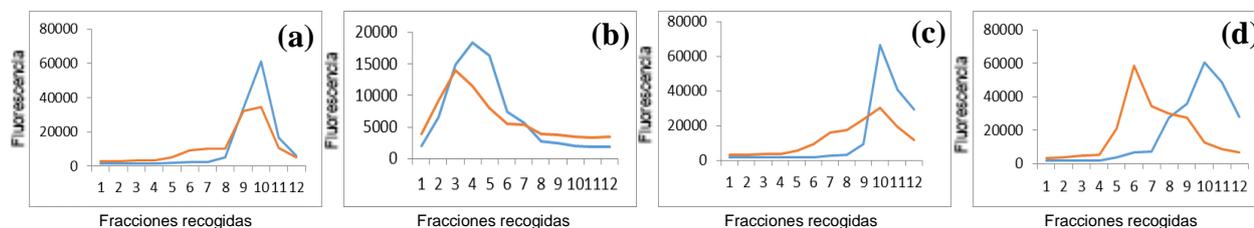


Figura 9. Elución de *caa* y *cai* de la resina de NI-NTA de las fracciones de membrana de las muestras solubilizadas en a) Tritón X-100, b) SDS, c) DDM y d) FOS-PC. La fluorescencia de GFP de las fracciones se indica en azul y la de Cherry en naranja.

El FOS-PC el resultado es similar al obtenido en LDAO compatible con la destrucción del complejo. Del resto de detergentes, sólo para DDM se demuestra que las proteínas coeluyen en un gel nativo (**Figura 10**).

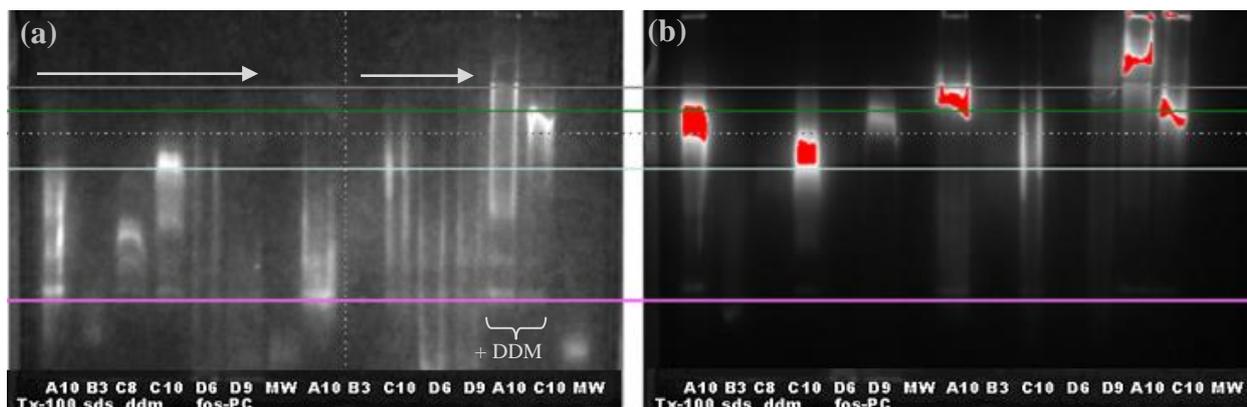


Figura 10. Fluorescencia en gel nativo las fracciones de la cromatografía de afinidad. Las muestras corresponden a las fracciones de la elución representada en la **Figura 9**, A: Tritón X-100, B: SDS, C: DDM y D: FOS-PC. El número indica la fracción. Las muestras de las calles 1-4 contienen adicionalmente 1 ul de OLPG 1 mM y las calles 5-8, 0.1 mM de OPLG para facilitar la migración de las proteínas hacia el ánodo en la electroforesis. a) Filuorescencia de Cherry y b) fluorescencia emitida por GFP.

5. DISCUSIÓN

En las circunstancias que concurren en la situación natural, una molécula de colicina de la célula productora debe alcanzar el periplasma de la célula diana (Cascales *et al*, 2007). Para ello, ha de reconocer a la bacteria y atravesar su membrana externa. Los dos dominios N terminales de la molécula son responsables del éxito del transporte del dominio C-terminal de 22 kDa hasta las proximidades de la IM, donde finalmente generará un poro iónico. Por otra parte, la proteína de inmunidad permanece en la célula productora como proteína intrínseca de membrana (Duché, 2002). Esto se refleja en su mayor simplicidad: es una proteína monodominio de 20 kDa. El complejo que se forma en la bacteria inmunizada que se encuentra en un contexto tóxico está formado por caa exógena y cai producida endógenamente (Cascales *et al*, 2007). Son muy pocas las unidades de complejo formado por unidad celular. El objetivo marcado en este estudio de sobre-producir el complejo pf-caa/cai, supone un reto importante ante la complejidad implícita del sistema. Nuestro planteamiento contempla producir ambas proteínas en la misma unidad celular. Con el fin de preservar la orientación adecuada pf-caa debe ser exportada al espacio periplásmico y hemos utilizado los dos sistemas de exportación mejor caracterizados.

Según nuestros resultados, las bacterias no inmunizadas no producen cantidades detectables de las formas exportables de pf-caa, mientras que las bacterias que co-expresan cai dan lugar a cantidades no despreciables de ambas proteínas. De esta observación, podemos deducir las tres etapas que se anticipaban en la **Figura 1**: expresión, exportación e inserción en IM tienen cierta eficacia. Las bacterias no inmunes se defienden de la toxicidad de pf-caa exportada inhibiendo su expresión, mientras que la formación del complejo inactivo permite la sobreproducción proteica. Resulta curioso que el crecimiento celular es superior en aquellos casos en los que no existe inmunidad, lo que indica que la inhibición de la expresión es tan eficaz que no se alcanzan niveles que puedan llegar a ser tóxicos. El menor crecimiento de los cultivos se observa en aquellas bacterias que están expresando el complejo inactivo. En parte esto puede explicarse por el coste energético que implica la sobre-expresión aunque el sostenimiento del estado inmunizado en presencia de altas cantidades de toxina pueden ser también responsables de esta observación.

Sin embargo la eficacia de las etapas mencionadas no es absoluta, de forma que pueden detectarse formas intermedias solubles de las fusiones de caa localizadas tanto en el citosol como en el periplasma de la bacteria. Esto ha sido observado con anterioridad por otros autores en experimentos semejantes (Thomas *et al* 2001). La proporción de pf-caa que se inserta en la membrana interna tras su exportación y forma complejo con cai es variable en torno al 30 % del total producido.

La posterior purificación del complejo se realiza sólo a partir de la fracción de membrana interna que contiene el complejo que ha sufrido el procesado global. La elección del detergente óptimo se ha realizado a través de los criterios de co-elución de ambas proteínas de la columna Ni-NTA y por la co-migración en geles de acrilamida nativos. Finalmente, la purificación del complejo caa/cai es posible tras la solubilización en DDM de la fracción de membrana de bacterias *E. coli* C43-DE3 que sobre-expresan ambos componentes.

6. CONCLUSIONES

- 1- El complejo pf-caa / cai puede sobre-expresarse en *E. coli* C43-D3 con una eficacia razonable.
- 2- La señal de exportación TorA que dirige la proteína al sistema TAT es más eficaz que pelB que la dirige al sistema Sec.
- 3- El complejo puede purificarse mediante colas His₆ por afinidad a la resina Ni-NTA tras la solubilización de la membrana interna bacteriana en el detergente DDM.

Este estudio tendrá su continuidad en la purificación de cantidades de complejo que permitan su caracterización estructural de baja resolución por difracción de rayos X.

7. BIBLIOGRAFÍA

Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleantous, C., Lloube's, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. and Cavard, D. (2007) "Colicin biology." *Microbiol.Mol Biol. Rev.* 71, 158-229.

De Buck, E., Lammertyn, E. and Anné, J. (2008) "The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence." *Trends in microbiology* 16, 442-453.

Drew, D.E., von Heijne, G., Nordlund, P. and de Gier, J.W. (2001) "Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*." *FEBS Lett.* 507, 220–224.

Duché, D. (2002) "The pore-forming domain of colicin A fused to a signal peptide: a tool for studying pore-formation and inhibition." *Biochimie* 84, 455-464.

Espeset, D., Duché, D., Baty, D. and Géli, V. (1996) "The channel domain of colicin A is inhibited by its immunity protein through direct interaction in the *Escherichia coli* inner membrane." *EMBO .J* 15, 2356-2364.

Natale, P., Brüser, T. and Driessen, A.J.M. (2008) "Sec-and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms." *Biochim.Biophys.Acta Biomembranes* 1778, 1735-1756.

Palmer, T. and Berks, B.C. (2012) "The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway" *Nature Rev. Microbiol.* 10, 483-496.

PilsI, H. and Braun, V. (1995) "Evidence that the Immunity Protein Inactivates Colicin 5 Immediately prior to the Formation of the Transmembrane Channel." *J Bacteriology* 177, 6966–6972.

Rodríguez-Lemoine, V. (1992) "PacB, a plasmid-encoded property which confers to E. coli K12 resistance to channel-forming-colicins." *Zentralblatt für Bakteriologie* 276, 374-379.

Thomas, J.D., Daniel, R.A., Errington, J. and Robinson C. (2001) "Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in Escherichia coli." *Mol Microbiol.* 39, 47-53.

Zhang, Y.L. and Kramer, W.A. (1993) "Intramembrane helix-helix interactions as the basis of inhibition of the colicin E1 ion channel by its immunity protein." *J Biol. Chem.* 268, 10176-10184.

Zhang, X.Y.Z., Lloubès, R. and Duché, D. (2010) "Channel domain of colicin A modifies the dimeric organization of its immunity protein." *J Biol.Chem.* 285, 38053-38061.