

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA



“EFECTO DE LA MICROCINA J25 EN LA CADENA
RESPIRATORIA DE *Escherichia coli*”

Lic. Adriana Emilce Galván

2016



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA**

AUTORIDADES

HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Dra. Gabriela del Valle Perdigón
Dra. María Inés Gómez
Dra. María Eugenia Mónaco
Mag. Adriana Correa Zeballos
Máster María Regina Rintoul
Bioq. Cecilia Hebe Noemí Orphée
Lic. Agustín Javier del Valle Paz
Sr. Walter Ricardo Gómez
Sr. Franco Díaz
Sr. Gonzalo Lascano
Srta. Gabriela Abdo

DECANA

Dra. Silvia Nelina González

VICE-DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

SECRETARÍA DE ASUNTOS ACADÉMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros

DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES

DIRECTOR

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR

Dra. Inés del Carmen Ramos
Dra. María Carolina Navarro
Dra. María Cristina Gaudioso
Dra. Paula Andrea Vincent
Dra. María Cristina Rubio

SUPLENTE

Dra. María Graciela Benzal
Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz
Dra. María Inés Nieva Moreno

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO
SUPERIOR DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: Resolución 750- CONEAU -13

DIRECTOR

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

VICE-DIRECTORA

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

COMITÉ ACADÉMICO

Dr. Alfredo Grau

Dr. Raúl Pedraza

Dra. Lucia Clapz

Dra. Silvina Fadda

TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

Efecto de la Microcina J25 en la cadena respiratoria de *Escherichia coli*

TESISTA

Lic. Adriana Emilce Galván

DIRECTOR

Dr. Augusto Bellomio

DIRECTOR ASOCIADO

Dr. Carlos Minahk

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN

Dra. Marcela Ferrero

Dr. Carlos Nieto



Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en el **Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO-CONICET-UNT)** e **Instituto de Química Biológica “Dr. Bernabé Bloj”** de la Facultad de Bioquímica Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi eterno y profundo agradecimiento a mi familia por ser el pilar fundamental de mi vida. A mis padres Juan y Gladys quienes día a día me incentivan a proponerme y a cumplir mis metas. Por ser ejemplo de lucha y perseverancia. A mis hermanas Ivana y Melissa por estar siempre a mi lado. A mi abuela Esther por su incondicional compañía. A mi ahijada Sofia.

Agradezco a mi director Augusto Bellomio por confiar en mí nuevamente y permitirme obtener un logro académico más. Por su generosidad, paciencia y experiencia brindada para concretar este trabajo. A mi codirector Carlos Minahk por sus aportes e invaluable consejos. A ambos, por la confianza y seguridad que me brindaron. Por todo lo que aprendí.

Con un profundo sentimiento quiero expresar mi gratitud a las personas con quienes compartí día a día el box 4: Mili, Silvita, Natalia, Migue y Lu L. Por todas las veces que recibí de ellos la fuerza para seguir adelante. Por todas las charlas y el esfuerzo que realizamos día a día para hacer que el grupo siga avanzando. Por todos los buenos momentos compartidos dentro y fuera del box. Fueron y serán personas muy importantes para mí.

De la misma manera quiero agradecer también el afecto y la ayuda recibida por parte del resto de las chicas: Ceci Vera, Lu M., Moni B., Belén, Sabri, Nil y Pol. A Flor por la confianza plena y la complicidad compartida.

A Emilse con quien inicié este camino y deseo poder compartir su final. Por la mutua compañía que nos brindamos sin importar la hora. A Ale, con quien además solía compartir interesantes charlas deportivas.

Al resto de mis compañeros quienes también fueron de gran ayuda: Leo, Silvina, Benja, Cler, Esteban, Fer D., Caro, Moni M., César, Rox y Juan.

A toda la Planta Baja, por toda la ayuda, compañerismo y largas conversaciones. Por festejar mis logros y por el incondicional apoyo brindado siempre.

Con inmensa alegría y gratitud comparto este momento con mis amigas Dai y Gaby M. A quienes les agradezco todos los momentos compartidos dentro y fuera del INSIBIO. A ambas también les agradezco su lealtad y complicidad constante. La amistad incondicional y la satisfacción que me genera poder terminar juntas esta etapa. Deseo para Uds. mucho éxito profesional pero sobre todo personal. También quiero agradecer a mis amigos María,

Mariano y Kike. A Vicky, Andrés, Caro C., Jesús, Efy y Pri. A Ceci Vallejo por toda la sabiduría y ayuda brindada. Mis amigos "Mcc".

Trabajar en el INSIBIO fue muy gratificante por la buena predisposición de todos los integrantes por eso agradezco también:

A los chicos del grupo Frutilla: Vero, Fer G., Marisa, Nadia, Pili, Rodri, Gus M.Z., Carlos G., Fer R., Gus M., Ramiro y Juli. A todas las chicas del grupo NDH en especial a Gaby O. y Sabri por su generosidad y ayuda en cualquier momento y lugar. Al grupo de la Dra. Mónica Delgado y al grupo Nutrición.

A todos los que en algún momento me ayudaron compartiendo un reactivo, enseñándome una técnica o a usar un equipo y/o simplemente me aconsejaron.

Al director del INSIBIO y a todo el personal docente, no docente e investigadores.

Agradezco a cada uno de mis compañeros por hacer más cálidas y entretenidas las horas de trabajo. Fueron tantos los momentos compartidos que con muchos de ellos terminamos siendo amigos.

A mis amigas de la vida Lore, Claudia, Carla y Flavia.

A mi país por la posibilidad de optar por una educación gratuita.

A Dios.

Los momentos que forman parte de una experiencia determinan el recuerdo que conservaremos de ella...

Guardo en mi los mejores momentos que van a quedar en lo profundo del alma.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

1. **“Study of the lasso peptide microcin J25 effect on the *E. coli* terminal oxidases”**

Galván, A.E.; Chalón, M.C.; Minahk, C.J.; Bellomio, A.

III Latin American Federation of Biophysical Societies (LAFEBs) – IX IberoAmerican Congress of Biophysics – XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica 2016.

Tucumán. Argentina. Noviembre de 2016.

2. **“The role of respiratory oxidases in the mechanism of action of microcin J25”**

Galván, AE; Chalón, MC; Schurig-Briccio, L; Minahk, C; Gennis, R; Bellomio, A.

LII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Celular. Comunicación oral.

Córdoba. Argentina. Noviembre de 2016.

3. **“ROS production induced by microcin J25 is mediated by cytochrome *bd*”**

Galván, AE; Chalón, MC; Schurig-Briccio, L; Minahk, C; Gennis, R; Bellomio, A.

Congreso Nacional: LI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Celular.

Mar del Plata. Argentina. Noviembre de 2015.

4. **“Photoinduced generation of dityrosine by the lasso-peptide microcin J25”**

Galván, AE; Chalón, MC; Minahk, C; Bellomio, A.

Congreso Nacional: XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica.

Santiago del Estero. Argentina. Noviembre de 2015.

Trabajo seleccionado para ser presentado como comunicación oral.

5. **“Microcin J25 inhibits cytochrome *bd* oxidoreductase activity”**

Galván, AE; Chalón, MC; Acuña, L; Schurig-Briccio, L; Minahk, C; Gennis, R; Bellomio, A.

Congreso Nacional: L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Celular.

Rosario. Argentina. Noviembre de 2014.

6. **“Cyanide protects *Escherichia coli* NADH dehydrogenase activity from MccJ25 inhibition”**

Galván, AE; Chalón, MC; Schurig-Briccio, L; Minahk, C; Gennis, R; Bellomio, A.

Congreso Nacional: XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica.

Villa Carlos Paz. Argentina. Diciembre de 2013.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	XIII
Nomenclatura genética.....	XIV
Resumen.....	XV
Abstract.....	XVII
1. Introducción.....	1
a) Generalidades.....	2
b) Clasificación de las bacteriocinas.....	2
i) Bacteriocinas	3
(1) Bacteriocinas de clase I: Lantibióticos	3
(2) Microcinas de clase II.....	4
c) Microcina J25.....	7
i) Estructura	7
ii) Sistema genético de producción e inmunidad de MccJ25.....	9
iii) Entrada de MccJ25 a la célula bacteriana	12
iv) El transportador de tipo ABC, YojI de <i>E. coli</i> exporta MccJ25.....	12
v) Blancos de acción de MccJ25.....	14
(1) Acción sobre la ARN polimerasa.....	14
(2) Acción sobre membranas modelos y membrana celular.....	15
vi) Estudios de estructura-función de la molécula de MccJ25.....	18
d) La cadena respiratoria de <i>E. coli</i>	21
i) Deshidrogenasas.....	22
ii) Quinonas.....	22
iii) Oxidasas terminales.....	23
(1) Citocromo <i>bo</i> ₃	24
(2) Citocromo <i>bdl</i>	26
(3) Citocromo <i>bdII</i>	30
(4) Regulación de la expresión de genes en <i>E. coli</i>	31
iv) Generación de fuerza protomotriz	31
v) ATP Sintetasa.....	32
e) Especies reactivas del oxígeno (ERO)	33
i) Generación de ERO.....	34
ii) Daño producidos por ERO.....	37
iii) Mecanismos de defensa contra ERO	39
(1) Superóxido dismutasa (SOD)	39
(2) Peroxidasas y Catalasas	40

f)	Antibióticos y radicales libres	42
2.	Hipótesis y Objetivos.....	47
3.	Materiales y Métodos.....	49
a)	Cepas bacterianas y plásmidos	50
b)	Medios de cultivo, drogas y reactivos	51
i)	Medios de Cultivo.....	51
ii)	Antibióticos	51
c)	Obtención, purificación y cuantificación de los péptidos.....	51
i)	Purificación de MccJ25 e Y9F.....	51
ii)	Obtención de MccJ25-GA	52
d)	Ensayos de actividad antimicrobiana. Determinación de la CIM.....	53
e)	Técnicas de Ingeniería Genética.....	54
i)	Aislamiento de ADN plasmídico	54
ii)	Preparación de células competentes	54
iii)	Transformación con ADN plasmídico.....	55
f)	Ensayo de consumo de oxígeno en células bacterianas.....	55
g)	Recuento de células viables.....	56
h)	Obtención de membranas bacterianas	56
i)	Producción de ERO en membranas celulares	57
j)	Determinación de la actividad enzimática de la NDH deshidrogenasa.....	57
i)	Actividad NADH deshidrogenasa	57
ii)	Actividad NADH oxidasa.....	58
k)	Purificación de las oxidasas terminales de <i>E. coli</i>	58
i)	Purificación del citocromo <i>bdI</i>	58
ii)	Propiedades espectrales. Cuantificación del citocromo <i>bdI</i>	59
iii)	Purificación del citocromo <i>bo₃</i>	59
iv)	Propiedades espectrales. Cuantificación del citocromo <i>bo₃</i>	60
l)	Detección de la actividad peroxidasa del citocromo <i>bdI</i> en geles de SDS-PAGE	60
m)	Detección del citocromo <i>bo₃</i> por Western blot	61
n)	Actividad ubiquinol oxidasa de los citocromos purificados	61
o)	Reducción de la coenzima Q ₁ a ubiquinol-1 (QH ₂).....	61
p)	Producción de ERO en los citocromos purificados	62
q)	Reducción de los citocromos purificados por MccJ25.....	62
r)	Análisis estadístico.....	63
4.	Resultados y discusión	64

a)	Obtención de MccJ25 y variantes	65
i)	Obtención de MccJ25 y de MccJ25 Y9F	65
ii)	Obtención de la variante MccJ25-GA	66
b)	Efectos <i>in vivo</i> de MccJ25.....	68
i)	Sensibilidad a MccJ25 de <i>E. coli</i> C43 y mutantes en las oxidasas terminales.....	68
ii)	La MccJ25 disminuye la viabilidad celular de las cepas de <i>E. coli</i> C43 (pGC01)	71
iii)	El consumo de oxígeno fue inhibido por MccJ25.....	72
c)	Efectos <i>in vitro</i> de la MccJ25.....	74
i)	MccJ25 causa una sobreproducción de ERO en membranas de <i>E. coli</i>	74
ii)	Determinación de la actividad de la enzima NDH	76
(1)	La MccJ25 no inhibe la actividad NADH deshidrogenasa	76
(2)	La MccJ25 inhibe la actividad NADH oxidasa	77
d)	Purificación de las oxidasas terminales	79
i)	Purificación, propiedades espectrales y cuantificación del citocromo <i>bdI</i>	79
ii)	Revelado del citocromo <i>bdI</i> por actividad peroxidasa	81
iii)	Purificación, propiedades espectrales y cuantificación del citocromo <i>bo₃</i>	82
iv)	Western blot del citocromo <i>bo₃</i>	84
e)	Actividad ubiquinol oxidasa de los citocromos purificados	84
i)	La MccJ25 inhibe al citocromo <i>bdI</i> de manera no competitiva.....	84
ii)	La MccJ25 no inhibe la actividad ubiquinol oxidasa de citocromo <i>bo₃</i>	86
f)	Efecto de los análogos de MccJ25 sobre el citocromo <i>bdI</i>	89
i)	Actividad ubiquinol oxidasa	89
ii)	Producción de superóxido	90
g)	Reducción de los citocromos por MccJ25	92
5.	Discusión general.....	96
6.	Conclusiones	105
7.	Referencias	107

ABREVIATURAS

ARNP	ARN polimerasa
CIM	concentraciones inhibitorias mínimas
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DCFH	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DEAE	dietilaminoetil
DO	densidad óptica
EDAC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
ERO	especies reactivas del oxígeno
FPM	fuerza protón motriz
GME	glicil metil ester
HPR	peroxidasa de rábano picante
Km	constante de Michaelis-Menten (símbolo Km)
Mcc	microcina
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difeniltetrazólio
NDH	NADH deshidrogenasa
NTPs	ribonucleótidos trifosfato
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
UE	unidades enzimáticas
UFC	unidades formadoras de colonias

NOMENCLATURA GENÉTICA

En este trabajo hemos seguido las recomendaciones de Demerec y colaboradores (Demerec *et al.*, 1966) para la nomenclatura genética. Por lo tanto, símbolos de letras minúsculas en *itálica*, son usados para describir los loci genéticos (por ejemplo *met*). Si varios loci gobiernan funciones relacionadas, estos son distinguidos por letras mayúsculas *itálicas* siguiendo el símbolo del locus (por ejemplo, *metA1* y *metA2*). El signo (+) se usa para designar el alelo de tipo salvaje de un locus. Así, *metA+*, o simplemente “+” indica el alelo salvaje del locus *metA*. Un superíndice (-) no es usado para un alelo mutante; así cuando se detalla el genotipo de una cepa, solo los alelos que difieren del tipo salvaje son escritos. Por lo tanto, una cepa con el genotipo *metB proC* tiene mutaciones en cada uno de estos loci.

Las designaciones fenotípicas consisten de símbolos de tres letras; éstas no son *itálicas*, y la primera letra del símbolo es mayúscula. Las características de tipo salvaje son designadas con un superíndice (+) (por ejemplo, *Met+*), mientras que superíndices negativos son usados para designar a las características mutantes. Así, por ejemplo, *Met* indica incapacidad para crecer en ausencia de metionina. Las letras minúsculas como superíndices son usadas para delinear ciertos fenotipos (por ejemplo, *Ap^s* y *Ap^r* indican sensibilidad y resistencia a ampicilina, respectivamente). Las designaciones fenotípicas son usadas además para identificar el producto de un gen, por ejemplo, la proteína TolC es codificada por el gen *tolC*.

RESUMEN

En la actualidad existe una marcada tendencia a la demanda de alimentos naturales con pocos procesamientos. Además, el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro ha provocado el aumento de bacterias patógenas multiresistentes a los antibióticos existentes. Las bacteriocinas son consideradas como una posible solución ante esta problemática. En particular, la microcina J25 (MccJ25) es una bacteriocina muy estable activa frente a patógenos transmitidos por alimentos, entre ellos *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*. Posee dos mecanismos de acción, inhibe la transcripción mediante la unión a la ARN polimerasa e inhibe la cadena respiratoria residente en la membrana plasmática.

El objetivo de esta tesis fue profundizar el conocimiento del efecto de la MccJ25 sobre la cadena respiratoria de *E. coli*. A partir de resultados previos, se planteó la hipótesis de que el péptido actúa sobre los citocromos. En la cadena respiratoria de *E. coli* existen dos tipos de ubiquinol oxidasas, el citocromo bo_3 y los citocromos *bd* (*bdI* y *bdII*). Se demostró, *in vivo*, que estos son fundamentales para la acción inhibitoria de la microcina, siendo las oxidasas más importante los citocromos bo_3 y *bdI*. Empleando cepas de *E. coli* que tienen aumentada la entrada de la MccJ25 mediante el aumento de expresión de la proteína transportadora FhuA, se observó que las mutantes en los citocromos bo_3 y *bdI* mostraron una marcada disminución de la sensibilidad frente al péptido con respecto a la cepa parental. Además, en ensayos llevados a cabo *in vitro* el péptido fue capaz de inhibir la actividad ubiquinol oxidasa y de inducir un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno cuando se utilizó el citocromo *bdI* purificado a partir de la membrana de *E. coli*. Esta inhibición es dosis dependiente y según las constantes cinéticas (K_m y V_{max}) sería de tipo no competitiva. Sin embargo, no se observó este mismo efecto cuando el ensayo fue realizado en presencia del citocromo bo_3 . Por otro lado, el análisis de la diferencia entre los espectros de la forma reducida y oxidada de los citocromos manifestó una reducción directa del citocromo *bdI* por parte de la MccJ25. Estos resultados indicarían que la MccJ25 podría inhibir de manera directa solo al citocromo *bdI*. Actualmente, el citocromo *bdI* es un potencial blanco de acción para antibióticos alternativos ya que solo se encuentra en células procariotas, entre ellas patógenos tales como *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Klebsiella pneumoniae*. Dada la existencia de una relación estructural entre el citocromo bo_3 y el complejo IV de la mitocondria se proyectan estudios más profundos para dilucidar el mecanismo de inhibición de la MccJ25 sobre los citocromos. Esto permitiría el desarrollo de estrategias para dirigir específicamente la actividad del péptido al citocromo *bdI*. De esta manera sería posible diseñar péptidos modificados más eficaces sobre este blanco de acción. La MccJ25 por su naturaleza y por

su capacidad de actuar sobre dos dianas diferentes, una a nivel intracelular y otra a nivel de la cadena respiratoria, es una alternativa prometedora para ser considerada como un nuevo antimicrobiano.

Palabras claves: Microcina J25 - Citocromos - *Escherichia coli*

ABSTRACT

At present there is a pronounced tendency to demand for minimally processed natural foods. Furthermore, misuse of broad-spectrum antibiotics has led to an increase in resistant pathogenic bacteria. Bacteriocins could be considered as a possible solution to this issue. Microcin J25 (MccJ25) is a very stable bacteriocin active against foodborne pathogens, including *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella*. This peptide has two targets, one of them is the RNA polymerase through the binding to its secondary channel and the other is the respiration that involves the inhibition of enzymes of respiratory chain.

The aim of this thesis was to deepen the knowledge of the effect of MccJ25 on *E. coli* respiratory chain. From previous results, we hypothesized that the peptide acts on cytochromes. *E. coli* respiratory chain has two types of ubiquinol terminal oxidases, cytochrome *bo₃* and cytochromes *bd* (*bdI* and *bdII*). In this work, we demonstrated that these are essential for the peptide inhibitory effect, where cytochromes *bo₃* and *bdI* play a fundamental role. The entry of MccJ25 to the target cell was increased by over-expressing the transporter protein FhuA. The cytochromes *bo₃* and *bdI* mutants showed a marked decrease sensitivity to the peptide regarding the parental. Additionally, *in vitro* assays performed using purified cytochrome *bdI* from *E. coli* membrane, revealed that the peptide was able to inhibit its ubiquinol oxidase activity and induced an increase in the reactive oxygen species production. This inhibition is dose dependent and it would be a non-competitive type inhibition according to its kinetic constants (K_m and V_{max}). However, this effect was not observed when assay was performed with cytochrome *bo₃*. Furthermore, the analyses of reduced minus air-oxidized difference spectra of the purified cytochromes manifested a direct reduction of cytochrome *bdI* by MccJ25. These findings indicate that MccJ25 could just inhibit cytochrome *bdI* in a direct way. Cytochrome *bdI* is found only in prokaryotes, including pathogens such as *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Klebsiella pneumoniae*. Currently, this cytochrome is a potential target for alternative antibiotic. There is a structural relationship between cytochrome *bo₃* and mitochondrial complex IV. It exist a growing need for deeper studies to elucidate MccJ25 mechanism of cytochromes inhibition. These would allow a development of strategies to specifically lead the peptide activity to the cytochrome *bdI*. Thereby it would be possible to design modified peptides that are more effective on this target. By its nature and its ability to act on two different cellular targets, one inside the cell and the other at the respiratory chain, MccJ25 is a promising alternative to be considered as a new potential antimicrobials.

Key words: Microcin J25 - Cythocromes - *Escherichia coli*

1. Introducción

a) Generalidades

Los microorganismos a través de la evolución desarrollaron distintas estrategias para competir por los nutrientes y el espacio, por ejemplo mejorando sus sistemas de quimiotaxis y desarrollando compuestos antimicrobianos para inhibir a otros microorganismos competidores. Entre ellas se incluyen los antibióticos clásicos de amplio espectro, algunos productos del metabolismo como ácidos orgánicos, agentes líticos, numerosos tipos de exotoxinas proteicas y las **bacteriocinas** (Riley, M.A. y Chavan, M.A., 2007). Las bacteriocinas representan uno de los sistemas de defensa microbiano mejor estudiado. Aún cuando no se conoce mucho acerca de sus relaciones evolutivas y sus papeles ecológicos, por su abundancia y diversidad se supone que son el armamento de elección microbiana (Muñoz-Rojas, J., 2004).

Las **bacteriocinas** son péptidos antibacterianos de síntesis ribosomal, de baja masa molecular (menor a los 10 kDa) que son secretados por bacterias Gram positivas (+) y Gram negativas (-) y generalmente inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas filogenéticamente a la cepa productora. En los últimos 20 años han sido identificadas y caracterizadas muchas bacteriocinas obteniéndose información sobre su síntesis, secreción, mecanismo de acción e inmunidad y relación estructura-función. Existe **gran interés biotecnológico** en ellas ya que muchas son producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) consideradas GRAS (*generally recognized as safe*) (Salminen *et al.*, 1998). Debido a su naturaleza estos péptidos antimicrobianos, tienen un potencial uso como nuevos antibióticos y **biopreservantes de alimentos**. Esto implica estudiar en profundidad su mecanismo de acción y su inocuidad en seres humanos.

b) Clasificación de las bacteriocinas

Si bien el término **bacteriocinas** engloba a todos los antibióticos peptídicos, menores a los 10 kDa, producidos por bacterias Gram (+) y Gram (-), actualmente se emplea para hacer referencia a los péptidos producidos por bacterias **Gram (+)**, específicamente por bacterias ácido lácticas (BAL). Los producidos por bacterias **Gram (-)**, como muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son llamados comúnmente **microcinas** (Mcc). La síntesis de microcinas no es letal para la cepa productora, no es inducible por el sistema SOS, son secretadas activamente al medio extracelular durante la fase de crecimiento exponencial tardía y su producción es favorecida en medios nutricionalmente mínimos.

i) Bacteriocinas

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas se clasifican en dos grupos: los de **clase I**, péptidos **lantibióticos** y los de **clase II**, **no lantibióticos**. Las bacteriocinas lantibióticas, se diferencian de las no lantibióticas en que las primeras son modificadas post-traduccionalmente antes de ser secretadas y contienen aminoácidos raros como didehidroalanina, didehidrobutirina, lantionina y β -metillantionina (Håvarstein *et al.*, 1994).

(1) Bacteriocinas de clase I: Lantibióticos

Los **lantibióticos** son péptidos pequeños de 18-39 residuos y se dividen en tres subclases según su estructura y mecanismo de acción. La **nisina** (Rogers, 1928), pertenece a la clase Ia y fue la primera en ser aprobada por la *US Food and Drug Agency* para ser usada como biopreservante en alimentos. La produce *Lactococcus lactis* y es activa contra *Listeria monocytogenes* y otras bacterias Gram (+). En cuanto al mecanismo de acción, la nisina forma poros en la membrana después de unirse al lípido II, el principal transportador de las subunidades precursoras del peptidoglicano. Por lo tanto, inhibe la síntesis de la pared celular además de producir la disipación de la FPM y la liberación de moléculas esenciales para la bacteria blanco (Breukink *et al.*, 1999; Hasper *et al.*, 2006; Wiedemann *et al.*, 2001).

(2) Bacteriocinas de clase II: No lantibióticos

Constituyen un grupo muy diverso. Poseen una variación de tamaño de 30 a 60 aminoácidos, son estables al calor y no contienen lantionina. En general, las bacteriocinas de clase II secretadas por bacterias Gram (+) son péptidos lineales o cíclicos, los cuales tienen menos modificaciones postraduccionales que las de clase I (Cotter *et al.*, 2005).

ii) Microcinas

La actividad antimicrobiana de estos péptidos hidrofóbicos se circunscribe a bacterias Gram (-) filogenéticamente relacionadas a la cepa productora. Son sintetizados y secretados por las bacterias productoras en medios depletados de nutrientes. Las bacterias que son sensibles a las microcinas tienen transportadores en la membrana externa y eventualmente en la membrana interna, para que el péptido pueda llegar hasta el blanco de acción intracelular. (Riley y Gordon, 1999). El sistema de producción de las microcinas incluye una proteína de inmunidad, proteínas para el procesamiento y proteínas necesarias para la exportación al medio extracelular. Con excepción de MccE492

y MccH47, que son de codificación cromosómica (Laviña *et al.*, 1990; Wilkens *et al.*, 1997), el sistema genético de todas las demás es de codificación plasmídica. Los mecanismos de acción de las microcinas son diversos, algunas involucran la formación de poros, inhibición de la síntesis de proteínas o la replicación del ADN (Yang *et al.*, 2014).

(1) Microcinas de clase I

En la **clase I**, se encuentran los péptidos de masa molecular menor a 5 kDa, modificados postraduccionalmente y que ejercen sus funciones antibióticas contra determinados objetivos intracelulares, tienen receptores intracelulares específicos en la célula blanco, a los que se unen interfiriendo de esta manera con alguna función vital (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2002). Pertenecen a esta clase las microcinas B17, C7, J25 y D93.

(2) Microcinas de clase II

Las microcinas de **clase II** poseen una masa molecular mayor, 5 – 10 kDa, su blanco de acción es la membrana plasmática y son sintetizadas como un precursor con un péptido líder N-terminal de tipo doble glicina el cual dirige al precursor al sistema de secreción de tipo ABC (*ATP-binding cassette*) que lo libera al medio externo con el simultáneo procesamiento de la extensión N-terminal (Håvarstein *et al.*, 1994). Se dividen en dos subclases, la **Ila** agrupa a las microcinas no modificadas postraduccionalmente (a excepción de la remoción del péptido líder y la formación de uno o más puentes disulfuro). Dentro de éste grupo se encuentran las microcinas L, V y N. En la subclase **Iib** están las microcinas E492, M y H47 que experimentan o no modificaciones postraduccionales antes de ser secretadas. El precursor se conjuga con un sideróforo tipo-catecol en el extremo C-terminal, el cual usa la microcina modificada para entrar en la célula blanco. Poseen un sistema genético complejo que se encuentra ubicado en el cromosoma de la bacteria.

Las microcinas de clase II comparten propiedades con las bacteriocinas de baja masa molecular producidas por las bacterias Gram (+) (Pons *et al.*, 2002). En general, las propiedades bioquímicas y biofísicas de las bacteriocinas son: baja masa molecular (menor a los 10 kDa), actividad antibacteriana limitada a bacterias filogenéticamente relacionadas a la cepa productora, resistencia a condiciones extremas de temperatura y pH, y algunas son resistentes a proteasas (particularmente aquellas con grandes modificaciones postraduccionales). Sus concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) son del orden picomolar y nanomolar y algunas de ellas generalmente actúan a nivel de membrana disipando la fuerza protón motriz (FPM).

La clasificación anteriormente mencionada divide a las bacteriocinas y las microcinas en clase I y clase II según la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales, y de acuerdo a su tamaño. En el año 2013, Cotter y colaboradores propusieron una nueva clasificación para estos péptidos antimicrobianos que subdivide a las bacteriocinas sobre la base de sus modificaciones, según se detalla en las tablas 1.1 (Cotter *et al.*, 2013).

Tabla 1.1. Clasificación de las bacteriocinas de clase I.

Clase I (modificados)		
Grupo	Características	Ejemplos
Bacteriocinas tipo MccC7-C51	Unidos covalentemente a un ácido aspártico C-terminal	MccC7-C51
Lazo péptidos	Estructura tipo lazo	MccJ25
Péptidos lineales que contienen azoles o azolinas	Poseen heterociclos pero no otras modificaciones	MccB17
Lantibióticos	Poseen aminoácidos inusuales como lantionina y β -metil-lantionina	Nisina, Planosporicina, Mutacina 1140
Linaridinas	Tienen una estructura lineal y contiene aminoácidos deshidratados	Cipemicina
Proteusinas	Contienen hidroxilaciones, epimerizaciones y metilaciones	Politeonamida A
Sactibióticos	Poseen enlaces sulfuro-carbono α	Subtilosina A, Turicina CD
Cianobactinas tipo patelamida	Poseen heterociclos y experimentan macrociclización	Patelamida A
Cianobactinas tipo anaciclamida	Péptidos cíclicos constituidos por aminoácidos prenilados	Anaciclamida A10
Tiopéptidos	Contienen una piridina, dihidropiridina o piperidina central, así como heterociclos	Tiostreptona, Nocatiacina I,
Botromicinas	Contienen una amidina macrocíclica así como un anillo tiazol	Botromicina A
Glicocinas	Contiene glicopéptidos con uniones azufre	Sublancina 168

Tabla 1.2. Clasificación de las bacteriocinas de clase II.

Clase II (no modificados o cíclicos)		
Grupo	Características	Ejemplos
Péptidos IIa (bacteriocinas tipo pediocina PA-1)	Poseen un motivo conservado YGNGV (donde N representa cualquier aminoácido)	Pedocina PA-1, Enterocina CRL35
Péptidos IIb	Requieren dos péptidos modificados para su actividad	ABP118, Lactacina F
Péptidos IIc	Péptido cíclicos	Enterocina AS-48
Péptidos IId	Bacteriocinas de un solo péptido, sin modificaciones, lineales, no tipo pediocina	Microcina V, Microcina S, Epidermicina NI01, Lactococina A
Péptidos IIe	Contienen una región C-terminal rica en serina. Modificados postraduccionalmente por la adición de un sideróforo.	Microcina E492, Microcina M

c) Microcina J25

Según la clasificación anterior la microcina J25 (MccJ25) pertenece al grupo I de microcinas. Es un péptido antimicrobiano de 21 aminoácidos (G¹-G-A-G-H⁵-V-P-E-Y-F¹⁰-V-G-I-G-T¹⁵-P-I-S-F-Y²⁰-G) con un peso molecular de 2.107 Da. Éste péptido fue descubierto a principio de la década de los 90 a partir de cepa entérica de *Escherichia coli* AY25 aislada en nuestro laboratorio (Salomón y Farías, 1992). Tal como su clasificación lo indica, el espectro de acción de este péptido antimicrobiano está limitado a *E. coli* y bacterias Gram (-) filogenéticamente relacionadas a la cepa productora. Entre ellas es activa frente a cepas patógenas de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*, siendo algunas cepas de éstas dos últimas hipersensibles al antibiótico (Portrait *et al.*, 1999; Sable *et al.*, 2000; Salomón y Farías, 1992; Vincent *et al.*, 2004).

i) Estructura

Este péptido altamente hidrofóbico tiene una inusual y extraordinaria estructura. Ésta fue descrita en 2003 cuando se demostró una unión amida de tipo lactámica, entre el N-terminal de la Gly1 y el grupo carboxilo de la cadena lateral del Glu8 formando un anillo de ocho aminoácidos. La cola C-terminal de 13 aminoácidos se pliega sobre sí misma y pasa a través del anillo o lazo formando una horquilla β . Los residuos Tyr20 y Gly21 atraviesan el plano del anillo, y la porción C-terminal del péptido queda estéricamente atrapada por las cadenas laterales voluminosas de los residuos Phe19 y Tyr20, las cuales quedan ubicadas

a ambos lados del plano del anillo y evitan que la estructura se desarme (Bayro *et al.*, 2003; Rosengren *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003). La estructura ha sido descrita, muy gráficamente, como una “cola enlazada” (“lassoed tail”) (Figura 1.1).

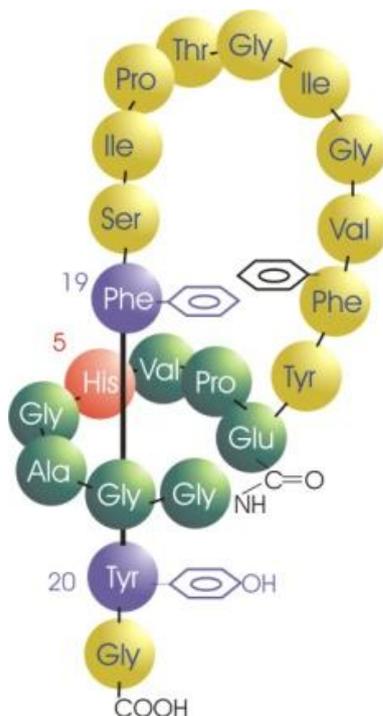


Figura 1.1. Estructura de MccJ25. Se observa la estructura en forma de lazo y la secuencia primaria de aminoácidos, en rojo el único residuo con carga positiva (His5). En verde los aminoácidos que forman el anillo y en azul las Phe19 y Tyr20.

Las principales fuerzas que estabilizan el plegamiento son las interacciones de Van der Waals entre las cadenas laterales hidrofóbicas de los aminoácidos y los puentes de hidrógeno de las dos pequeñas hojas β anti paralelas, cada una de dos hebras (Figura 1.2). Los residuos Val6-Pro7 y Ser18-Phe19 forman la primera hoja β que está formada por parte del anillo y parte de la cola cuando ésta penetra en el mismo. Los residuos Phe10-Val11 y Thr15-Pro16 están involucrados en la segunda hoja. Un giro β comprendido por los residuos Val11-Gly-Ile-Gly14 asocia a ambas. La región I de la MccJ25 está formada por el giro β y la última hoja β descrita, Figura 1.3 (Rosengren *et al.*, 2003).

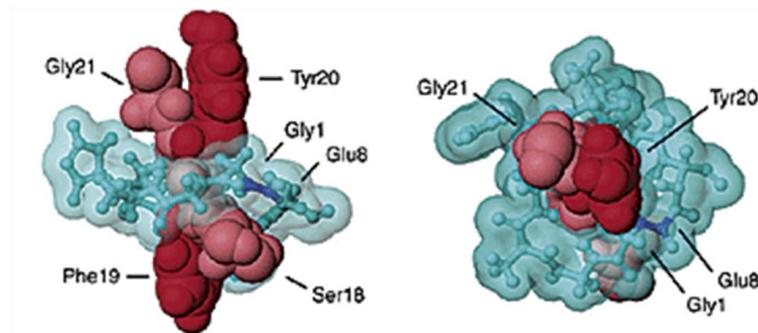


Figura 1.2. Estructura de MccJ25. Estructura tridimensional de MccJ25. Los aminoácidos se hallan numerados de acuerdo al orden en el que se traducen en los ribosomas. A y B, representan vistas ortogonales del segmento enhebrado (los residuos 18 y 21 en rosa y las cadenas laterales de Phe19 y de Tyr20 en rojo) dentro del anillo (celeste y la unión entre Gly1 y Glu8 en azul). Tomado y adaptado de Bayro y colaboradores (2003).

El fragmento C-terminal enhebrado dentro del anillo comprende los residuos 18 a 21. Presenta interacciones múltiples con el anillo: uniones hidrógeno de la región de la hoja β ya descrita; interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de los residuos Val6, Pro7, y Phe19 y por último un puente salino entre His5 y el carboxilo C-terminal, los dos únicos grupos con cargas antagónicas en la molécula. Esta región es por lo tanto una zona muy importante en la molécula y permanece inalterada aún después de tratamientos desnaturalizantes fuertes (Blond *et al.*, 2002).

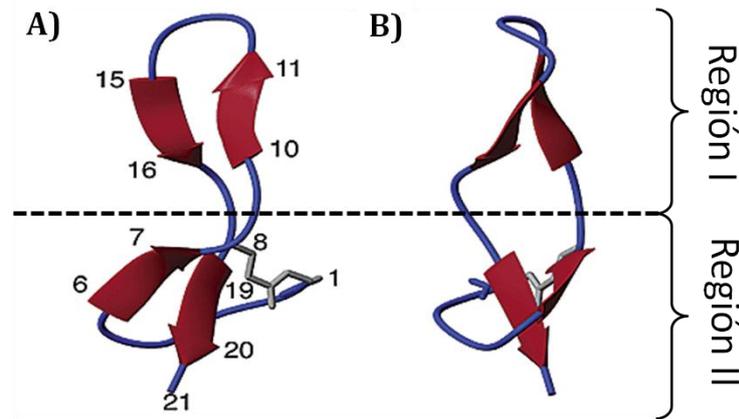


Figura 1.3. Estructura de MccJ25. Representación de cintas de la estructura de menor energía de MccJ25 ilustrando los principales elementos de su estructura secundaria (dos hojas β antiparalelas, en rojo). La línea de trazos separa las dos regiones en que se puede dividir estructuralmente al péptido. Tomado y adaptado de Rosengren y colaboradores (2003).

La estructura tridimensional tan compacta y en lazo de la MccJ25 explica su extrema resistencia a condiciones extremas como la desnaturalización térmica, el calentamiento por autoclave a 120 °C; los pHs extremos; agentes caotrópicos, como urea y guanidina y al tratamiento con enzimas proteolíticas (Blond *et al.*, 2002; Salomón y Farías, 1992).

ii) Sistema genético de producción e inmunidad de MccJ25

El sistema genético para la producción del péptido está codificado en un único plásmido de bajo número de copias y de aproximadamente 60 kb, denominado pTUC100 (Salomón y Farías, 1992). Estudios genéticos determinaron que contiene los genes *mcjA*, *mcjB* y *mcjC*, esenciales para la producción de microcina, y un cuarto gen responsable de la inmunidad de la cepa productora *mcjD* (Figura 1.4). El gen *mcjA* codifica para un precursor de MccJ25, de 58 aminoácidos, el cual consta de una secuencia líder de 37 aminoácidos que es removida durante el procesamiento y la maduración del péptido, y los restantes 21 aminoácidos destinados a convertirse en la MccJ25 madura (Solbiati *et al.*, 1999). El gen *mcjA* se transcribe a partir de su propio promotor en dirección opuesta al resto de los genes en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. Assrir y colaboradores (2016) demostraron que la región N-terminal del péptido líder está implicada en la interacción con las enzimas de maduración, McjB y McjC. Además, identificaron una interacción predominante de los aminoácidos Val43-Ser55, ubicados en el centro de la secuencia de McjA, con McjC; y demostraron que los residuos Lys23-Gln34 en el péptido líder adoptan una conformación helicoidal que direcciona a McjA a la membrana en las proximidades de la maquinaria de síntesis y exportación (Assrir *et al.*, 2016).

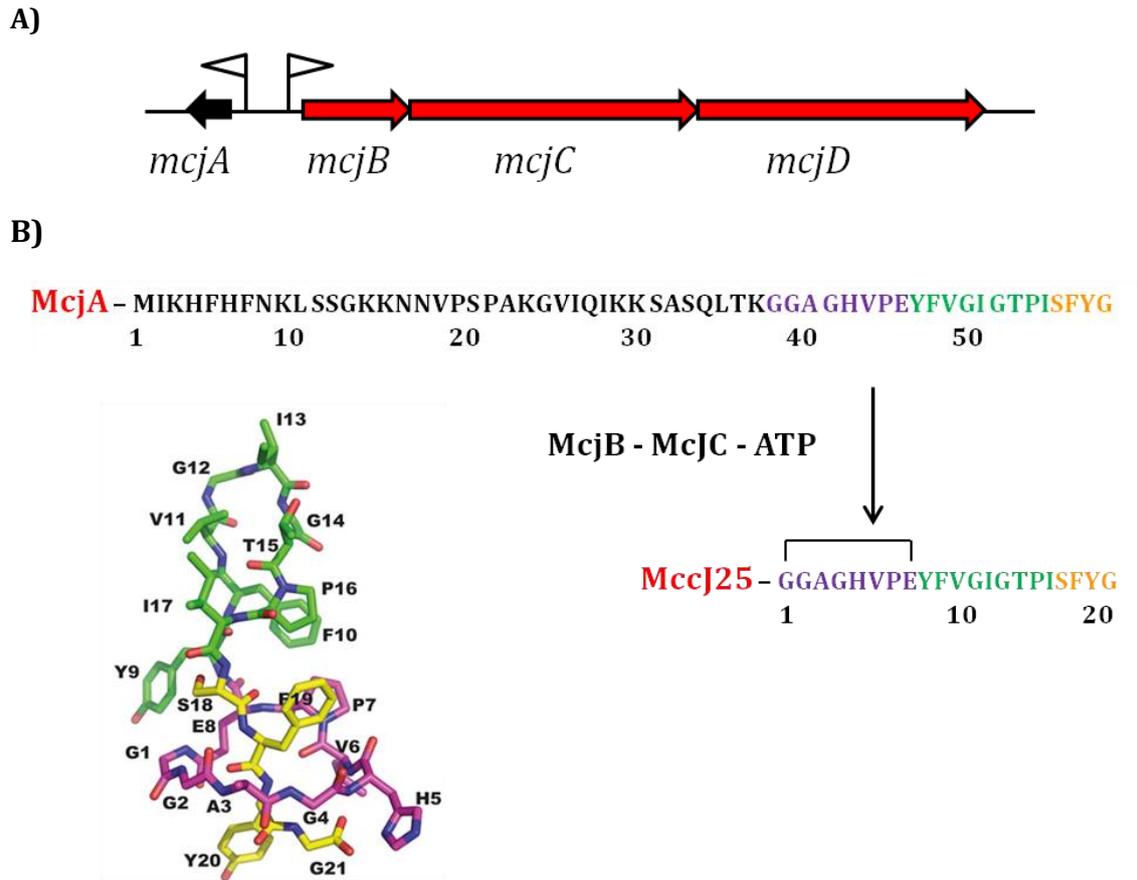


Figura 1.4. Sistema genético de MccJ25. (A) Se observan los 4 genes (*mcjA*, *mcjB*, *mcjC* y *mcjD*) que forman el sistema genético de MccJ25. *mcjA* codifica para el precursor de 58 aminoácidos, que luego es procesado por McjB y McjC para dar el péptido maduro. McjD otorga inmunidad al péptido. Tomado y adaptado de Duquesne y colaboradores (2007). (B) Proceso de maduración de McjA llevado a cabo por las enzimas McjB/McjC en presencia de ATP. La estructura primaria del precursor McjA y de la MccJ25 se muestra con su numeración de aminoácidos correspondiente. El anillo, el lazo, y la región C-terminal de MccJ25 se representan de color violeta, verde y amarillo, respectivamente. Se señaló con los mismos colores los aminoácidos de la MccJ25 de acuerdo con su posición en la estructura de RMN (PDB ID: 1Q71). Tomado y adaptado de Assrir y colaboradores (2016).

Las proteínas McjB y McjC son las responsables de convertir el producto del gen *mcjA* en la microcina madura. Este proceso comprende el corte del precursor, la formación del enlace entre el N-terminal y la cadena lateral del Glu8 y la adquisición de la estructura tridimensional activa. Se propuso que McjB sería responsable del corte del péptido líder y de la estabilización de la estructura del propéptido y que la proteína McjC estaría involucrada en la formación del enlace amida entre la Gly1 y el Glu8 para formar el anillo (Duquesne *et al.*, 2007). Más tarde, en 2012 Yan y colaboradores, *in vitro*, caracterizaron a McjB como una cisteín-proteasa dependiente de ATP y a McjC como lactama sintetasa. Las dos enzimas son funcionalmente interdependientes y probablemente forman un complejo estructural (Yan *et al.*, 2012) (Figura 1.5).

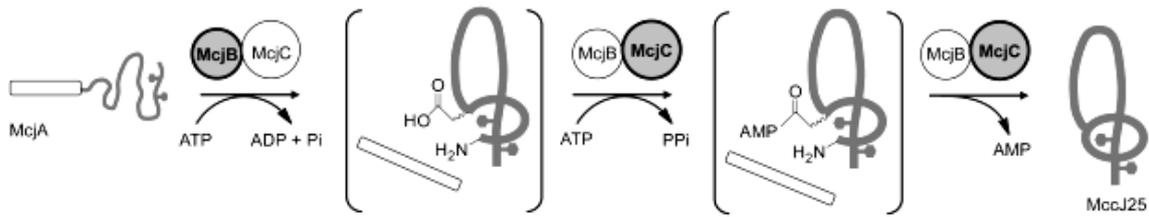


Figura 1.5. Representación de la síntesis de MccJ25. La barra vacía representa el péptido líder. Las enzimas que intervienen en cada paso se indican en negrita. Tomado y adaptado de Yan y colaboradores (2012).

La secuencia de aminoácidos de McjD, deducida del gen, presenta homología con proteínas de la familia de transportadores de tipo ABC, llamados así porque poseen un dominio de unión a ATP (**ATP Binding Cassette**) (Solbiati *et al.*, 1999). McjD tiene una función doble: es un exportador especializado de la microcina y, al mismo tiempo, asegura una rápida secreción del antibiótico desde el citoplasma, protegiendo a las células productoras de la MccJ25 endógena sintetizada, así como de la MccJ25 exógena que reingresa en ellas. Es decir, mantiene los niveles intracelulares de microcina por debajo de la concentración tóxica para la célula productora.

Al igual que otros transportadores de membrana interna, McjD necesita de un canal de membrana externa para exportar sustratos desde el citoplasma hacia el medio externo. La MccJ25 debe ser secretada al medio circundante, por lo que debe cruzar las membranas interna y externa. Se ha demostrado que la proteína TolC es necesaria para que la MccJ25 pueda ser exportada por las cepas productoras por medio de McjD (Delgado *et al.*, 1999). Generalmente, los sistemas exportadores de tipo ABC para la secreción de metabolitos y toxinas en bacterias Gram-negativas requieren dos proteínas, además del transportador en sí mismo. Una de ellas es la proteína accesoria, perteneciente a la familia de proteínas de fusión de membranas (MFP) (Davidson *et al.*, 2008), la cual está anclada en la membrana interna. La otra es una proteína de membrana externa (OMF). Se ha hipotetizado que la proteína accesoria es trimérica y funciona como un adaptador que conecta el transportador específico de la membrana interna con el componente de membrana externa para facilitar el pasaje de sustratos a través del periplasma. En el caso de la MccJ25, la proteína de membrana externa es TolC. La secreción de MccJ25 está severamente impedida en mutantes *tolC* (Delgado *et al.*, 1999). Sin embargo, no se ha identificado todavía un gen en el sistema genético de la MccJ25 que pudiera codificar para las proteínas accesorias que formarían parte del complejo McjD-TolC. Puede ser que este factor sea aportado por la cepa de *E. coli* hospedadora o simplemente no ser necesaria para la secreción de la MccJ25.

iii) Entrada de MccJ25 a la célula bacteriana

La MccJ25 ingresa a la célula bacteriana por medio de la proteína de membrana externa que capta ferricromo denominada FhuA. El ferricromo es un sideróforo del tipo hidroxamato. FhuA es usada también como receptor por los bacteriófagos T1, T5, Φ80 y UC-1 (Braun *et al.*, 2002) y actúa también como transportador de los antibióticos albomicina, rifampicina CGP4832, colicina M, y microcina 24 (Braun *et al.*, 2002; Endriss *et al.*, 2003). FhuA requiere de energía para el transporte, esta energía proviene del gradiente electroquímico de la membrana interna. La energía es transducida por el complejo de proteínas TonB–ExbB–ExbD (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2005). La proteína FhuA presente en *S. enterica* serovar Typhimurium es incapaz de transportar MccJ25 al periplasma por lo que es totalmente resistente. La cepa se vuelve hipersensible cuando es transformada con un plásmido con el gen *fhuA* de *E. coli* clonado (Vincent *et al.*, 2004). Tal como se muestra en la Figura 1.6 la MccJ25 una vez que se encuentra en el periplasma atraviesa la membrana interna por medio de la proteína transportadora SbmA (Corbalán *et al.*, 2013; Salomón y Farías, 1995). La función fisiológica de SbmA en *E. coli* todavía es desconocida, pero esta proteína fue identificada como responsable de la captación de microcina B17 (Laviña *et al.*, 1986) y de bleomicina, un péptido antibiótico de síntesis no ribosomal (Yorgey *et al.*, 1994). También es responsable de la entrada de péptidos antimicrobianos eucarióticos ricos en prolina (Mattiuzzo *et al.*, 2007).

iv) El transportador de tipo ABC, YojI de *E. coli* exporta MccJ25

Un hipotético transportador de tipo ABC de *E. coli*, codificado por el gen cromosómico *yojI*, también puede exportar la MccJ25 al medio extracelular, aunque aparentemente con menor eficiencia que el exportador especializado McjD. Similar a McjD actuaría disminuyendo la concentración intracelular de MccJ25, primer sustrato descrito para la proteína YojI, cuya función es desconocida. La inactivación del gen *yojI* determina la pérdida de la capacidad de eflujo del péptido y un aumento de la sensibilidad a MccJ25. Como es de esperar, la sobreexpresión de *yojI* a partir de un plásmido multicopia confiere una resistencia casi completa a la MccJ25. Por último, al igual que McjD, YojI requiere de la cooperación de TolC para exportar el antibiótico (Delgado *et al.*, 2005).

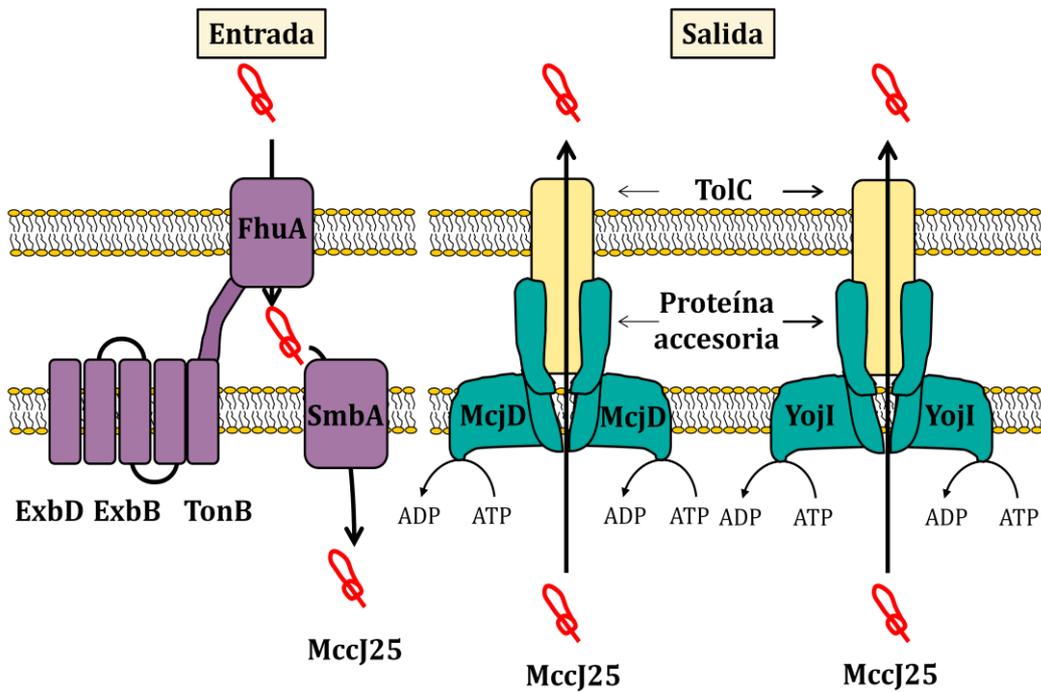


Figura 1.6. Mecanismos de importación y exportación de MccJ25 en *E. coli*. MccJ25 entra a la célula a través de los transportadores de membrana externa e interna, FhuA y SbmA, respectivamente. La energía necesaria para el transporte proviene del sistema Ton (TonB, ExbB y ExbD). Una vez dentro de la célula, MccJ25, puede inhibir la ARNP y/o actuar sobre la membrana celular. MccJ25 es expulsada fuera de la célula por McjD que otorga inmunidad o YojI de codificación cromosomal. Ambas proteínas actúan en conjunto con la proteína TolC (también de codificación cromosomal) manteniendo los niveles celulares de MccJ25 por debajo de un nivel crítico.

v) Blancos de acción de MccJ25

(1) Acción sobre la ARN polimerasa

El blanco de acción intracelular de la MccJ25 en *E. coli* es la ARN polimerasa. La ARNP es clave para la expresión de la información genética. Cataliza la síntesis de ARN a partir de los ribonucleótidos precursores durante la transcripción. El *core* catalíticamente activo consta de 5 subunidades ($\alpha 2\beta\beta'\omega$). Posee una sexta subunidad variable, denominada σ que se une temporalmente a la enzima. Las subunidades mayores, β' y β forman un canal principal, donde se encuentra el sitio activo de la enzima. Otro conducto llamado canal secundario, conecta al sitio activo de la enzima con la superficie exterior (Nelson y Cox, 2012) (Figura 1.7). Una mutación en el gen *rpoC* que codifica para la subunidad β' de la ARNP otorga una resistencia total frente a MccJ25. Esta mutación resulta del reemplazo de la treonina en la posición 931 por isoleucina. Se demostró que la actividad *in vitro* de ARNP nativa de *E. coli* era inhibida en presencia de concentraciones micromolares de MccJ25, mientras que la mutante *rpoC* era totalmente resistente. Estos datos confirmaron que el blanco intracelular de MccJ25 es la ARN polimerasa (Delgado *et al.*, 2001).

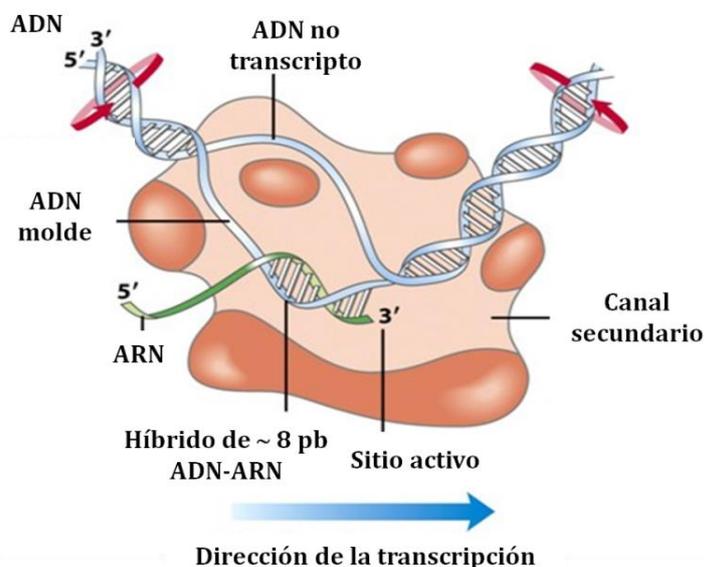


Figura 1.7. Transcripción por la ARNP en *E. coli*. Se muestra un corte de la ARNP, la parte superior fue omitida para permitir ver la burbuja de transcripción. El ADN está momentáneamente abierto en aproximadamente 17 pb. La ARNP y la burbuja de transcripción se mueven de derecha a izquierda y las flechas rojas indican la dirección en la que debe girar el ADN para permitir el proceso. Las pinzas de la ARNP encierran aproximadamente 35 pb. Note el canal secundario por donde se supone que llegan los nucleótidos precursores hasta el sitio activo. Tomado y adaptado del libro Lehninger, Principios de Bioquímica (Nelson y Cox, 2012).

Posteriormente, se aislaron otras mutaciones de resistencia, y se estableció que la MccJ25 no actúa *in vitro* sobre la ARNP mutante original. Estos resultados permitieron delimitar el sitio de unión del antibiótico y confirmaron sin lugar a dudas que la ARNP es un blanco de acción de la MccJ25 (Yuzenkova *et al.*, 2002). Estos resultados permitieron sugerir que MccJ25 actuaría ocluyendo el canal secundario de la ARNP (conecta el sitio activo con el exterior) e impidiendo la entrada de los ribonucleótidos precursores hasta el

sitio activo de la enzima (Adelman *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2004). Estudios cinéticos permitieron concluir que la inhibición por MccJ25 es parcialmente competitiva para los NTPs. Es decir que MccJ25 se une a un sitio distinto al sitio de unión de los ribonucleótidos incrementando la K_m para los mismos.

(2) Acción sobre membranas modelos y membrana celular

(a) Efecto de MccJ25 en liposomas

Microcina J25 es capaz de interactuar con membranas biológicas, *in vitro* e *in vivo*. Por un lado se demostró que es capaz de interactuar con liposomas y monocapas de fosfatidil colina (Bellomio *et al.*, 2005; Rintoul *et al.*, 2000). Los aminoácidos que constituyen el péptido son en su mayoría hidrofóbicos y los únicos dos grupos cargados, el carboxilo terminal y la histidina se encuentran formando un puente salino. La alta hidrofobicidad de MccJ25 y el hecho de que la partición de la misma hacia las membranas ocurra aún en presencia de alta fuerza iónica indican que el efecto hidrofóbico es el que empuja al péptido hacia la bicapa. El grado de orden de la bicapa es un determinante de selectividad de afinidad de MccJ25 hacia la membrana, más importante que la naturaleza o la carga de la cabeza polar de los fosfolípidos. Con respecto a la alteración de la permeabilidad de membrana, se demostró la capacidad del péptido de inducir pérdida de iones pequeños en liposomas de DPPC. Esto se debería a perturbaciones inducidas por el péptido en el empaquetamiento de los fosfolípidos. Sin embargo, no se encontraron evidencias como disminución en la turbidez de suspensiones de liposomas o pérdida de contenido de moléculas orgánicas, como fluorescentes encapsulados, que sugieran una acción de tipo detergente o que la integridad de los liposomas sea afectada en gran medida. Estos resultados indican que el péptido no formaría poros en la membrana ni actuaría por medio de un mecanismo de permeabilización, a pesar de que penetra en la membrana hasta la zona interfásica al igual que otros péptidos antibióticos para los que se han descrito estos mecanismos (Dupuy y Morero, 2011). La MccJ25 produce una estabilización de los estados ordenados de membrana y facilita la formación de dominios condensados en membranas modelos que imitan a la membrana citoplasmática de las bacterias Gram negativas (fosfatidiletanolamina:fosfatidilglicerol 7:3). Lo que explicaría el aumento de la permeabilidad hacia solutos pequeños observados tanto en membranas modelos como en membranas biológicas (Rintoul *et al.*, 2015).

(b) Efecto de MccJ25 en cepas de *Salmonella* Newport

La cepa de *S. enterica* serovariedad Newport es hipersensible a MccJ25. Para esta cepa, la CIM es del orden de los nM al contrario de la CIM en las distintas cepas de *E. coli* donde ronda el orden de los μ M (Salomón y Farías, 1992). MccJ25 en cepas de *S. Newport* despolariza la membrana plasmática, produciendo una alteración de la permeabilidad y afectando el gradiente de la membrana interna con la subsecuente pérdida de la carga energética. Inhibe el consumo de oxígeno y a algunas enzimas de la cadena respiratoria como la NADH, succinato y lactato deshidrogenasas (Rintoul *et al.*, 2001). Sin embargo, *S. Typhimurium*, *S. Derby* y algunas cepas de *S. Enteritidis* son resistentes a MccJ25. Estas cepas poseen una proteína FhuA deficiente para el transporte de MccJ25. *S. Typhimurium*, se volvió sensible a MccJ25 cuando fue transformada con un plásmido de codifica para FhuA de *E. coli*. En esta cepa se demostró que la MccJ25 además de inhibir la ARNP es capaz de actuar sobre la membrana interna de *Salmonella*, donde se vio una inhibición de la respiración celular pero sin dañar la permeabilidad de la membrana. Se propuso que la hipersensibilidad que presentaba esta cepa al antibiótico resulta de un efecto aditivo de estos dos mecanismos de acción. Se describió entonces por primera vez un segundo blanco de acción de MccJ25 (Rintoul *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2004). La inhibición de la respiración celular no se pudo observar en *E. coli* en ese momento.

(c) Efecto de MccJ25 en *E. coli*

Anteriormente en nuestro laboratorio se construyó un derivado amidado en el extremo C- terminal de la molécula de MccJ25, la MccJ25-GA (Bellomio *et al.*, 2003). Este derivado es incapaz de actuar sobre la ARNP. Por otro lado, la cepa de *E. coli* PA232 derivada de AB1133 posee una ARNP resistente a MccJ25. Sin embargo, esta cepa presenta un fenotipo de resistencia parcial frente a MccJ25. La complementación con el plásmido pDJJ12 (derivado de pBR322 portador de un fragmento cromosómico clonado con el gen *rpoC*) restauró el fenotipo de sensibilidad a MccJ25, similar a la parental AB1133. La cepa PA232 también presenta un fenotipo de resistencia parcial frente a MccJ25-GA, lo que demuestra que MccJ25-GA inhibe *in vivo* a una cepa de *E. coli* por un mecanismo que no involucra a la ARNP. Tampoco se pudo observar un efecto inhibitorio de MccJ25 sobre la respiración celular en las cepas AB1133 y PA232 con MccJ25. Como estudios previos habían demostrado que el efecto de MccJ25 sobre la respiración en *S. enterica* serovar Newport se pone de manifiesto con concentraciones muy superiores a la CIM se aumentó la concentración intracelular de MccJ25 aumentando la expresión del transportador de membrana externa FhuA con el plásmido pGC01. La transformante PA232 (pGC01), a

pesar de que porta la mutación en la ARNP, aumentó 100 veces su sensibilidad frente a MccJ25, volviéndose hipersensible; sin embargo frente a MccJ25-GA la sensibilidad aumentó 8 veces. Además, en presencia de MccJ25 y MccJ25-GA se produjo una inhibición de la respiración celular pero no se produjeron alteraciones significativas sobre la permeabilidad celular y el potencial transmembrana. Todo esto sumado a la inhibición de la síntesis de ARN *in vivo* en las cepas AB1133 y AB1133 (pGC01), pero no en las cepas PA232 y PA232 (pGC01) de MccJ25, indica que la actividad antibiótica observada sería independiente de la inhibición de la ARNP. Se demuestra, por primera vez, que MccJ25 es capaz de inhibir la respiración celular en *E. coli* pero para poner en evidencia este efecto sobre las bacterias, MccJ25 debería entrar masivamente y acumularse en las células, además el péptido debe actuar sobre la membrana celular de *E. coli*. Además se vio que una cepa mutante en la proteína SbmA que transporta el péptido desde el periplasma hacia el citoplasma a pesar de sobre-expresar FhuA no es sensible a MccJ25. Por lo que se deduce que el efecto sobre la respiración ocurre también desde el citoplasma. Se observó también que en diferentes cepas de *E. coli* MccJ25 presentó dos fenotipos de inhibición cuando la determinación se realizaba en placas de Petri. Los halos de inhibición que se presentaban eran claros en las cepas más sensibles y turbios en cepas que presentan cierta resistencia intrínseca. En las cepas que daban halos de inhibición turbios no fue posible encontrar el efecto sobre la respiración celular. Se correlacionó este fenotipo con la presencia de una eficiente actividad exportadora de la proteína de membrana externa YojI. Al bajar los niveles críticos de MccJ25 intracelular, impedía que se manifieste el efecto sobre el blanco de membrana. Lo que explica parcialmente la diferencia en la sensibilidad de las cepas de *E. coli* frente a MccJ25 (Bellomio *et al.*, 2007).

Anteriormente, se había observado que MccJ25 no inhibía las actividades NADH, lactato y succinato deshidrogenasas en células de *E. coli* cuando los ensayos se efectuaron con el agregado de cianuro (Rintoul *et al.*, 2001). Sin embargo se pudo ver una inhibición de las actividades enzimáticas NADH (21%) y D-lactato (44%) deshidrogenasas en ausencia de cianuro (los electrones pueden fluir hasta el aceptor final, el oxígeno). La actividad succinato deshidrogenasa no fue afectada por la presencia del péptido. Las actividades NADH y lactato oxidasas también fueron inhibidas mientras que la actividad succinato oxidasa tampoco no se vio afectada. Luego cuando se evaluó la actividad deshidrogenasa de D-LDH en presencia del péptido y de superóxido dismutasa (SOD) el efecto inhibitorio fue revertido, indicando que la producción de ERO estaba involucrada en esta acción. Además, se observó que MccJ25 inducía la producción de radicales superóxido *in vitro* y aumentaba la expresión del gen *katG* el cual actúa como un reportero de la actividad OxyR que sensa los niveles intracelulares de H₂O₂. El agregado de SOD *in vivo*

sobre células de la cepa PA232 (pGC01), tuvo un efecto protector sobre la disminución de las UFC/ml en presencia de MccJ25. Por otro lado, también se vio que en ausencia de O₂ la MccJ25 pierde la actividad antimicrobiana sobre la cepa hipersensible PA232 (pGC01), indicando que es necesaria la presencia del oxígeno para observar el efecto sobre la membrana celular y apoyando la hipótesis de que los radicales superóxido serían un determinante sumamente importante para que esta microcina pueda llevar a cabo la actividad antimicrobiana (Bellomio *et al.*, 2007).

Se puede concluir que la acción antibacteriana de MccJ25 implica dos mecanismos independientes: la inhibición ARNP y la inhibición de la cadena respiratoria mediante la producción de ERO, tales como los aniones superóxido. Sin embargo, el mecanismo exacto de este último fenómeno aún no se ha resuelto.

vi) Estudios de estructura-función de la molécula de MccJ25

Como se mencionó anteriormente, la MccJ25 es un péptido que adopta una estructura compacta bien definida con capacidad de inhibir la ARNP y/o el consumo de oxígeno a través de la generación de ERO. Diferentes partes de la molécula de MccJ25 son responsables de los distintos efectos atribuidos al antibiótico, Figura 1.8.

La MccJ25 posee solo dos residuos cargados: His5 cargado positivamente, localizado en el anillo y Gly21 cargado negativamente en el extremo carboxilo terminal. Los dos grupos cargados se encuentran cerca en la estructura tridimensional y parecen ser importantes para la actividad de MccJ25 (Bellomio *et al.*, 2004). Cuando se modifica químicamente el aminoácido 21 de la MccJ25 mediante una amidación del extremo C-terminal de la molécula localizada en la región del anillo, se bloquea específicamente la acción sobre la ARN polimerasa pero no el efecto sobre la membrana celular ni la entrada de MccJ25 a la célula blanco (Bellomio *et al.*, 2003, 2007; Vincent *et al.*, 2005). Cuando se produjo la carboxilación del anillo imidazólico de la His5 de MccJ25 se disminuyó el efecto inhibitorio tanto sobre el crecimiento como sobre la síntesis de ARN. La actividad biológica de MccJ25 carboxilada fue completamente recuperada luego del tratamiento con hidroxilamina, la cual regenera la microcina nativa (Bellomio *et al.*, 2003). Posteriormente, se probó el efecto inhibitorio sobre la ARNP de mutantes de MccJ25 con sustituciones en la His5 por Lys, Arg o Ala. Los resultados mostraron que todas las mutantes inhibían la ARNP *in vitro*. Sin embargo, no inhibieron el crecimiento celular de cepas sensibles al péptido nativo. Cuando se independizó la entrada de la MccJ25 de la membrana externa se dedujo que el residuo His5 del anillo es importante para el transporte del antibiótico dentro de la célula, a través de su interacción con la proteína de membrana interna SbmA (de Cristóbal *et al.*, 2006).

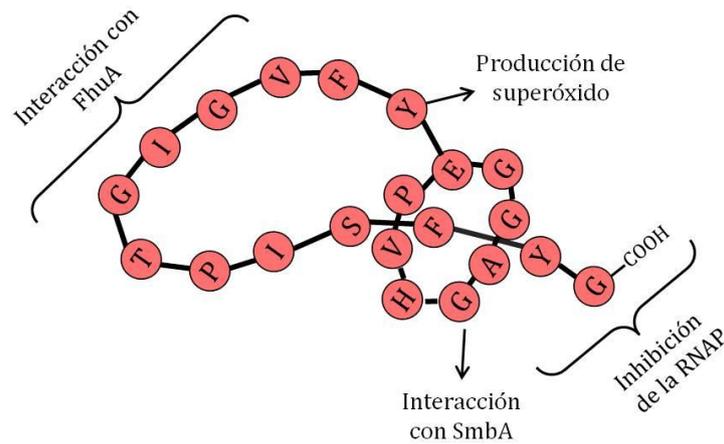


Figura 1.8. Representación esquemática de las diferentes regiones de la molécula de MccJ25. Se indican las zonas involucradas en la acción fisiológica del péptido en *E. coli*.

La única enzima que fue reportada como capaz de digerir a MccJ25 es termolisina (Blond *et al.*, 1999), la cual corta la molécula entre los aminoácidos Phe10 y Val11. El péptido resultante denominado MccJ25-Th19 inhibió la ARNP de *E. coli in vitro*. Sin embargo, no posee actividad antimicrobiana debido a que no se produce la interacción MccJ25-FhuA con el péptido hidrolizado indicando que la región del lazo (Val11-Pro16) es esencial para el reconocimiento de MccJ25 por el transportador de membrana (Bellomio *et al.*, 2004; Destoumieux-Garzón *et al.*, 2005).

Otra mutante de MccJ25 obtenida en nuestro laboratorio, es la microcina Y9F. La cual está reportada como un péptido sin efecto sobre la cadena respiratoria. El reemplazo de la tirosina 9 de MccJ25 por fenilalanina suprimió el incremento en la producción de superóxido y la inhibición del consumo de oxígeno, inducidos por el péptido, indicando que este aminoácido es vital para su acción sobre el blanco de membrana (Chalón *et al.*, 2009). Esta mutación no afectó el transporte del péptido. Por otro lado, Pavlova y colaboradores (2008) reportaron que el residuo de tirosina en la posición 9 del péptido MccJ25 es esencial para la inhibición RNAP. La tirosina 9 de la molécula de MccJ25 permite que el péptido actúe como un péptido redox, interfiriendo en reacciones de transferencia de electrones. Por medio de ensayos de voltametría cíclica se vio que la MccJ25 se oxida de forma irreversible y el potencial determinado para MccJ25 es de aproximadamente 0,95 V correspondiente a la oxidación de un residuo de tirosina. Como era de esperar, este residuo también es capaz de formar un radical tirosilo (Chalón *et al.*, 2011).

Es de amplio conocimiento el interés por el uso de las bacteriocinas como conservantes de alimentos. Como se mencionó anteriormente la MccJ25 nativa pese a su estabilidad y actividad antimicrobiana, presenta una característica que representaría un

problema para su eventual uso como bioconservante de alimentos, que es su resistencia a la digestión por las proteasas digestivas. Esta limitación fue superada en nuestro laboratorio, mediante el desarrollo de una mutante de MccJ25, la microcina J25 G12Y (Pomares *et al.*, 2009). En donde la Glicina de la posición 12 se reemplazó por tirosina. Esta variante de microcina J25 presentó la misma actividad antibiótica que la microcina nativa sobre *S. Newport* y *E. coli* O157:H7 y resultó ser igualmente resistente a pHs extremos y elevadas temperaturas. Sin embargo, fue inactivada por las enzimas digestivas del contenido intestinal de rata, tanto *in vitro* como *in vivo* y no provocó modificaciones sobre la población de coliformes de la microflora intestinal de ratón (Pomares *et al.*, 2009). Además, ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro* mostraron que MccJ25 G12Y fue activa sobre un gran número de bacterias patógenas o alterantes de alimentos. En ensayos llevados a cabo en alimentos se vio una disminución significativa de los patógenos *E. coli* O157:H7, *Enterobacter cloacae* y *Salmonella enterica* (Quiroga, 2014). En la actualidad esta microcina es tema de investigación de una tesis doctoral en la cual se estudia con mayor profundidad su uso como aditivo de alimentos y la producción de “envases activos”.

d) La cadena respiratoria de *E. coli*

La estructura fundamental de la membrana celular es la bicapa de fosfolípidos, que además de funcionar como una barrera de permeabilidad posee dentro de ella proteínas incrustadas que llevan a cabo funciones específicas. Una función importantísima de la membrana celular bacteriana es albergar los componentes de la cadena respiratoria, tal como se observa en la Figura 1.9. *E. coli* tiene una cadena respiratoria flexible que permite a las células procariotas sobrevivir bajo una variedad de condiciones ambientales, desde condiciones aeróbicas hasta condiciones completamente anaeróbicas (Borisov y Verkhovsky, 2015). Este sistema permite a la célula oxidar una amplia variedad de sustratos (NADH, succinato, lactato) por medio de deshidrogenasas, que transfieren los equivalentes de reducción a las quinonas. Las quinonas reducidas son oxidadas por acción de las oxidasas o reductasas terminales en presencia de oxígeno o un oxidante alternativo como aceptor final de electrones. En el proceso, la energía química liberada es transformada en un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. La fuerza protón motriz es luego utilizada para transportar solutos, rotación flagelar o síntesis de ATP (Gennis y Stewart, 1996). Las cantidades de cada componente están estrictamente reguladas para optimizar la cadena respiratoria de acuerdo a los sustratos presentes y a las necesidades de la célula.

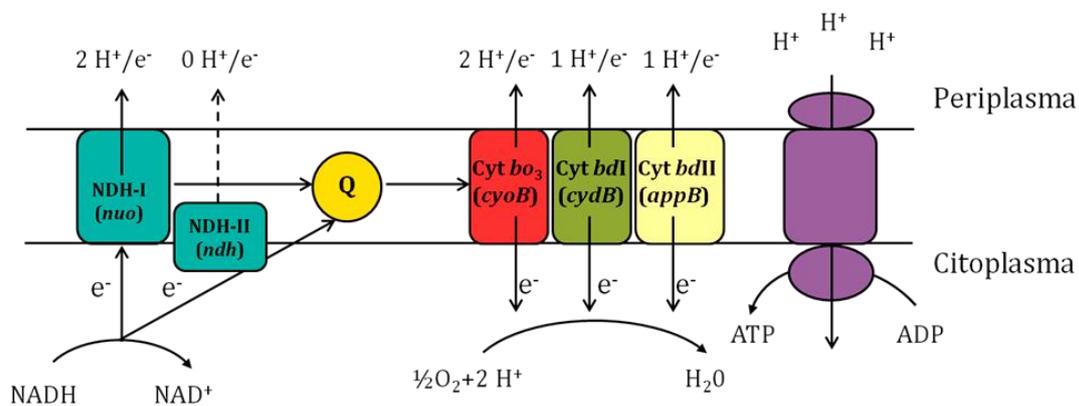


Figura 1.9. Representación esquemática de la cadena respiratoria aeróbica de *E. coli*. Los electrones ingresan a la cadena respiratoria a nivel de las diferentes deshidrogenasas. En la figura se representan solamente las NDH-I y NDH-II. Desde ellas son transportados a las ubiquinol oxidasas terminales por medio de las quinonas. Se indica en cada componente de la cadena la relación de la cantidad de protones exportados al periplasma por cada electrón tomado. Tomado y adaptado de Liu y colaboradores (Liu *et al.*, 2014).

i) Deshidrogenasas

E. coli presenta una gran diversidad de deshidrogenasas primarias (o quinonas reductasas), que oxidan una variedad de sustratos (formiato, NADH, glicerol-3-P, piruvato, lactato, succinato); y de oxidoreductasas terminales (o quinol oxidasas). Las quinonas intermediarias transportan los equivalentes de reducción entre las deshidrogenasas y las oxidoreductasas terminales. Esto produce una gran variabilidad en la composición de las cadenas respiratorias (Unden y Bongaerts, 1997). Sin embargo, las oxidoreductasas terminales así como las deshidrogenasas se expresan sólo en condiciones específicas, por lo tanto la cantidad de enzimas que son realmente capaces de interactuar es restringida. Además, las restricciones energéticas se oponen a la cooperación de algunas deshidrogenasas y reductasas terminales. La expresión de las deshidrogenasas respiratorias está regulada transcripcionalmente por los aceptores de electrones tales como el oxígeno y el nitrato. En presencia de oxígeno se sintetizan las NADH, glicerol, succinato y piruvato deshidrogenasas. En la respiración anaeróbica, en presencia de fumarato o DMSO, las deshidrogenasas utilizadas principalmente son la NADH deshidrogenasa I (NDH-1), glicerol-3-P deshidrogenasa y las hidrogenasas 1 y 2 (Unden y Bongaerts, 1997).

Las dos NADH deshidrogenasas que componen la cadena respiratoria de *E. coli* son las NDH-1 y NDH-2. La enzima NDH-1 es homóloga del complejo I de la mitocondria eucariota (Calhoun *et al.*, 1993). La enzima NDH-2 es una proteína pequeña, asociada a membrana y que no transporta protones al periplasma (Villegas *et al.*, 2011). En condiciones de crecimiento aeróbico el flujo de electrones fluye desde la NADH deshidrogenasa II al citocromo bo_3 , a pesar que la NADH deshidrogenasa I es expresada también. Ésta última es esencial para la respiración con fumarato y DMSO (Unden y Bongaerts, 1997).

ii) Quinonas

Dentro de la membrana plasmática se encuentran disueltas las quinonas, moléculas lipofílicas que median la transferencia de electrones entre los componentes de la cadena respiratoria. La membrana de *E. coli* y de otras bacterias entéricas relacionadas contiene tres tipos de quinonas: una benzoquinona, la ubiquinona (**Q**) o coenzima Q (Figura 1.10), y dos naftoquinonas, la menaquinona (**MK**) y la demetilmenaquinona (**DMK**) (Borisov y Verkhovsky, 2015; Søballe y Poole, 1999). A su vez se diferencian entre sí por tener una cadena lateral isoprenoide de distinta longitud según la especie. En *E. coli*, Q-8, MK-8 y DMK-8 son las quinonas más abundantes, pero se han reportado también pequeñas cantidades de Q-1 a Q-7, MK-6, MK-7, MK- 9 y DMK-7 (Collins y Jones, 1981). En

condiciones de crecimiento aeróbico la UQ-8 es la que predomina, pero en condiciones anaeróbicas es reemplazada por MK-8 o DMK-8 según el oxidante alternativo (Ingledey y Poole, 1984; Unden y Bongaerts, 1997). Las reacciones de oxido-reducción involucran la transferencia de dos electrones y la ganancia o pérdida de dos H^+ para formar la forma reducida (o ubiquinol) o la forma oxidada (o ubiquinona), respectivamente. Las reacciones succinato:ubiquinona oxidoreductasa y menaquinol:fumarato oxidoreductasa involucran la transferencia secuencial de un electrón formando un radical intermediario semiquinona. La selectividad de las quinonas por un particular dador y aceptor de electrones depende de las diferencias en los potenciales de reducción entre los pares Q/QH y MK/MKH (Gennis y Stewart, 1996). Menaquinona es la preferida cuando se utilizan aceptores de electrones de bajo potencial como el fumarato, mientras que ubiquinona es la indicada para aceptores como el oxígeno y el nitrato (Søballe y Poole, 1999).

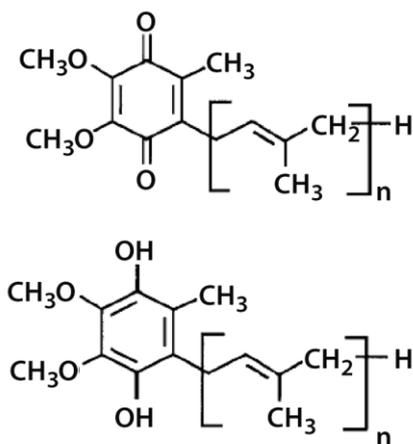


Figura 1.10. Estructura de las formas oxidada (ubiquinona) y reducida (ubiquinol) de la coenzima Q. En el caso de la ubiquinona 8 (Q_8) n es igual a 8.

iii) Oxidasas terminales

En condiciones anaerobias, cuando el oxígeno no está disponible, la célula usa aceptores de electrones terminales alternativos, incluyendo nitrato, nitrito, DMSO, N-óxido de trimetilamina y fumarato. La reacción es catalizada por nitrato y nitrito reductasas, dimetilsulfóxido reductasa, N-óxido de trimetilamina reductasa, y fumarato reductasa, respectivamente. Cuando la bacteria se encuentra bajo condiciones aeróbicas de crecimiento, el oxígeno molecular O_2 es el aceptor final de los electrones. *E. coli* tiene tres oxidasas terminales que reducen O_2 , el citocromo bo_3 , el citocromo bdl y citocromo $bdII$, que transfieren los electrones desde las quinonas reducidas hasta el O_2 formando H_2O como producto final (Borisov y Verkhovsky, 2015; Jesse *et al.*, 2013). Bajo condiciones de crecimiento con alta aireación, el citocromo que predomina es el bo_3 , mientras que, en

condiciones de microaerofilia, el citocromo *bdI* es la reductasa terminal predominante. El citocromo *bdI* también se induce bajo otras condiciones de crecimiento que pueden ser estresantes, como deficiencia de hierro (Borisov *et al.*, 2011^a). Ante situaciones de necesidad de carbono y fosfato se produce la inducción del citocromo *bdII* codificado por los genes *appBC*, conocidos antes como *cyxAB* o *cbdAB* (Borisov *et al.*, 2011b). Tanto el citocromo *bo₃* como el citocromo *bd* catalizan la oxidación de dos electrones de ubiquinol-8 a ubiquinona-8, en el lado periplasmático de la membrana, acoplada a la reducción de O₂ con cuatro electrones para formar H₂O en el lado citoplasmático de la misma. El citocromo *bd* también puede oxidar menaquinol-8, que sustituye a ubiquinol-8 en caso de un cambio de las condiciones de crecimiento de aeróbico a anaeróbico (Borisov y Verkhovsky, 2015). El citocromo *bo₃* es parte de una gran familia de oxidasas respiratorias hemo-cobre y tiene homólogos en casi todas las bacterias así como en las células eucariotas. El citocromo *bd* es la única oxidasa respiratoria caracterizada que no pertenece a la superfamilia de oxidasas hemo-cobre, y se encuentra en una pequeña cantidad de especies bacterianas (Gennis y Stewart, 1996).

(1) Citocromo *bo₃*

El citocromo *bo₃* es una proteína de 144 kDa, compuesta por cuatro subunidades diferentes y está codificada por el operón *cyoABCDE* localizado en el minuto 10 del mapa genético de *E. coli*. La secuencia de ADN de este operón reveló una fuerte relación con la citocromo *c* oxidasa de la membrana interna de las mitocondrias. Ambas oxidasas, comparten la presencia de un centro catalítico binuclear hemo-cobre como así también un grupo hemo hexacoordinado. De hecho, como puede observarse en la Figura 1.11, la estructura tridimensional del citocromo *bo₃* a una resolución de 3,5 Å confirma que la arquitectura general de este complejo es muy similar a los de todos los otros miembros de la familia de oxidasas hemo-cobre (Abramson *et al.*, 2000). Las subunidades CyoA (33,5 kDa), CyoB (75 kDa) y CyoC (20,5 kDa) son homólogas de las subunidades II, I y III, respectivamente, de las citocromo *c* oxidasas (Borisov *et al.*, 2011^a).

Por cada electrón usado para reducir el O₂ a H₂O, dos protones son tomados del citoplasma. Uno es usado para la reducción del O₂ y el otro protón es destinado al periplasma creando el gradiente electroquímico de protones (2 H⁺/e⁻). El citocromo *bo₃* contiene tres grupos prostéticos metálicos. Según la estructura tridimensional, todos los grupos prostéticos están contenidos en la subunidad I (CyoB). Uno es el grupo hemo *b₅₆₂* el cual es mayormente responsable de la absorción en la región visible del espectro y por lo tanto del color rojo de la oxidasa. Su función es la oxidación del ubiquinol. Los electrones fluyen desde el hemo *b₅₆₂* al centro bimetálico llamado Cu_B, conformado por el hemo *o₃* y

cobre. Este es el sitio donde el O_2 se une y es reducido a H_2O y estaría involucrado directamente en el bombeo de protones. Las proteínas CyoC y CyoD (12 kDa) pueden ser removidas del citocromo bo_3 sin pérdida de la actividad, pero parecen ser requeridas para el ensamble de los cofactores metálicos redox de la subunidad (CyoB). CyoE (32 kDa) no constituye una subunidad del citocromo bo_3 . Es una farnesil transferasa requerida para la conversión de hemo *B* a hemo *O* (Borisov y Verkhovsky, 2015; Gennis y Stewart, 1996).

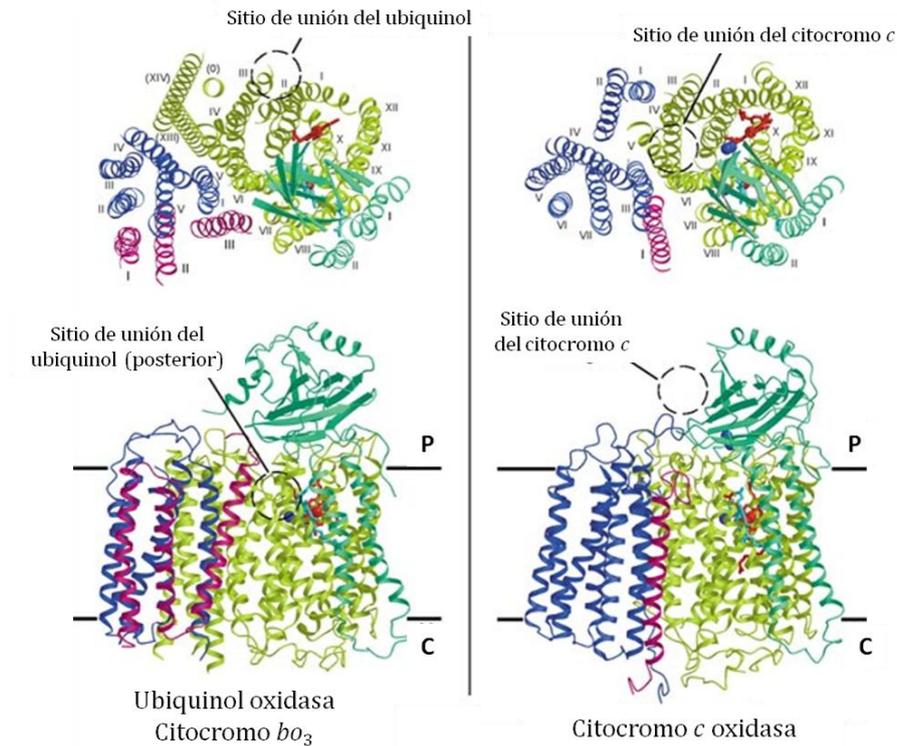


Figura 1.11. Estructura del citocromo bo_3 de *E. coli* y de la citocromo *c* oxidasa de *P. denitrificans*. Para ambas oxidasas las subunidades I, II, III y IV se representan en amarillo, verde, azul y rosa, respectivamente. En la subunidad I, el hemo *b* se representa en rojo y el hemo o_3 en celeste. Las esferas azules en las subunidades I y II son el centro Cu_B y Cu_A , respectivamente. Parte superior: vista del citocromo bo_3 y citocromo *c* oxidasa desde arriba desde un plano paralelo a la membrana. Parte inferior: vista a lo largo de la membrana. El círculo representa la ubicación del donante de electrones. Tomado y adaptado de Abramson y colaboradores (2000).

(a) Citocromo bo_3 y citocromo *c* oxidasa: Comparación

Las citocromo *c* oxidasas han sido caracterizadas en eucariotas (plantas y animales) como así también en numerosas bacterias. Todos los miembros de la familia de las oxidasas hemo-cobre tienen en la subunidad I, subunidad catalítica análoga, tres centros metálicos redox. Un grupo hemo de bajo *spin* hexacoordinado y un centro binuclear compuesto por un grupo hemo de alto *spin* pentacoordinado (en el sitio de coordinación

libre se une el oxígeno) y un ión Cu conocido como Cu_B. Los grupos hemo que posee el citocromo *bo*₃ son el hemo *b* y el hemo *o* el cual forma el centro binuclear con Cu_B, respectivamente. Dentro de las citocromos *c* oxidasas las más estudiadas son las citocromo *c* oxidasas tipo *aa*₃ de la membrana mitocondrial interna de eucariotas y la de la membrana citoplasmática de *Paracoccus denitrificans* y *Rhodobacter sphaeroides*. Estos citocromos *aa*₃ tienen además un centro metálico adicional llamado Cu_A dentro del dominio soluble de la subunidad II, el consta de dos átomos de Cu y es el aceptor de electrones inicial del citocromo *c*. *E. coli* no posee la enzima citocromo *c* oxidasa y tampoco muestra actividad citocromo *c* oxidasa detectable *in vitro*. (Wikström y Verkhovsky, 2007). A pesar de la relación estructural entre el citocromo *bo*₃ y las citocromo *c* oxidasas, citocromo *bo*₃ carece tanto del dominio Cu_A como de los residuos implicados en la unión de citocromo *c*, Figura 1.12. En lugar de ello, posee dos sitios de unión a quinona (Sato-Watanabe *et al.*, 1994; Yap *et al.*, 2010).

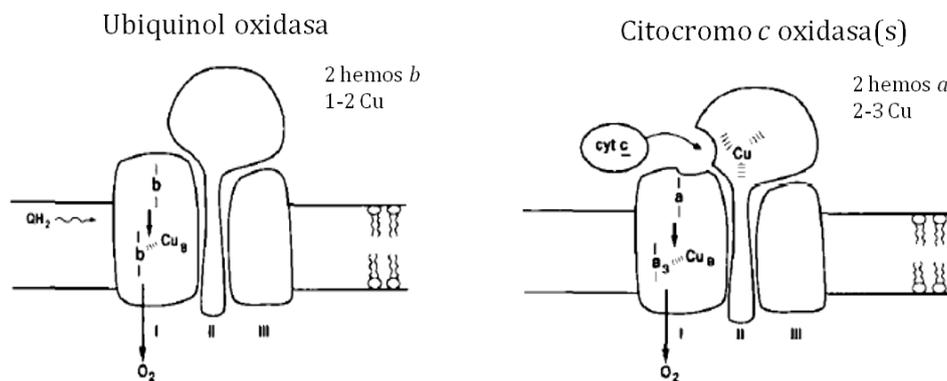


Figura 1.12. Esquema comparativo de las subunidades análogas del citocromo *bo*₃ de *E. coli* y las citocromo *c* oxidasas.

Por lo tanto, estas oxidasas tienen diferentes donadores de electrones. El citocromo *bo*₃ de *E. coli* oxida ubiquinol y las citocromos *c* oxidasas reducen citocromo *c*, que contrariamente al ubiquinol es soluble en agua. Ambos grupos de oxidasas funcionan como bombas de protones, transportando protones a través de la membrana citoplasmática estableciendo un gradiente electroquímico de protones (Borisov *et al.*, 2011^a; Chepuri *et al.*, 1990).

(2) Citocromo *bdl*

El citocromo *bdl* es una oxidasa terminal de 100 kDa codificada por el operón *cydABX* ubicado en el minuto 16,6 del mapa genético de *E. coli*. Este citocromo es expresado por diferentes bacterias patógenas tales como *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Klebsiella*

pneumonia, lo que hace lo convierte en un blanco atractivo para el descubrimiento de nuevos antibióticos. Parece jugar un papel crucial en la protección contra el estrés oxidativo, así como en la virulencia, la capacidad de adaptación y la resistencia de estas bacterias. Por lo tanto, es un potencial blanco de acción para el descubrimiento de nuevos inhibidores (Fournier *et al.*, 2016). Se caracteriza por su alta afinidad por el O₂ y su relativa falta de sensibilidad a la inhibición por cianuro (Krasnoselskaya *et al.*, 1993). Como se puede observar en la Figura 1.13 el citocromo *bdI* tiene tres subunidades. La subunidad I de 57 kDa está codificada por *cydA* y *cydB* codifica para la subunidad II de 43 kDa. Ambas subunidades son proteínas integrales de membrana que no muestran homología de secuencia con las subunidades de otras oxidasas de la familia hemo-cobre. Por último, *cydX* codifica para una tercera subunidad que consta de una sola hélice transmembrana de aproximadamente 4 kDa y desempeña un papel crucial en la actividad de la enzima (Allen *et al.*, 2014; Hooser *et al.*, 2014). Además del operón *cydABX*, otros dos genes, *cydC* y *cydD* del operón *cydCD*, situado en el minuto 19 del mapa genético de *E. coli*, son esenciales para el ensamblaje de citocromo *bdI* activo. CydC y CydD, sin embargo, no son subunidades del citocromo *bdI*. Se demostró que el operón *cydCD* codifica transportador de tipo ABC, un sistema de transporte cisteína/glutación (Pittman *et al.*, 2005; Yamashita *et al.*, 2014).

El citocromo *bdI* no contiene cobre en su sitio activo y genera una fuerza protón motriz por separación de carga pero lo hace sin actuar como una bomba de protones (Borisov *et al.*, 2011^a). Contribuye a la generación del potencial transmembrana mediante la adopción de los cuatro protones necesarios para la reducción de O₂ desde el lado citoplasmático de la membrana y la transferencia de los protones liberados de la oxidación quinol al lado periplásmico (1 H⁺/e⁻).

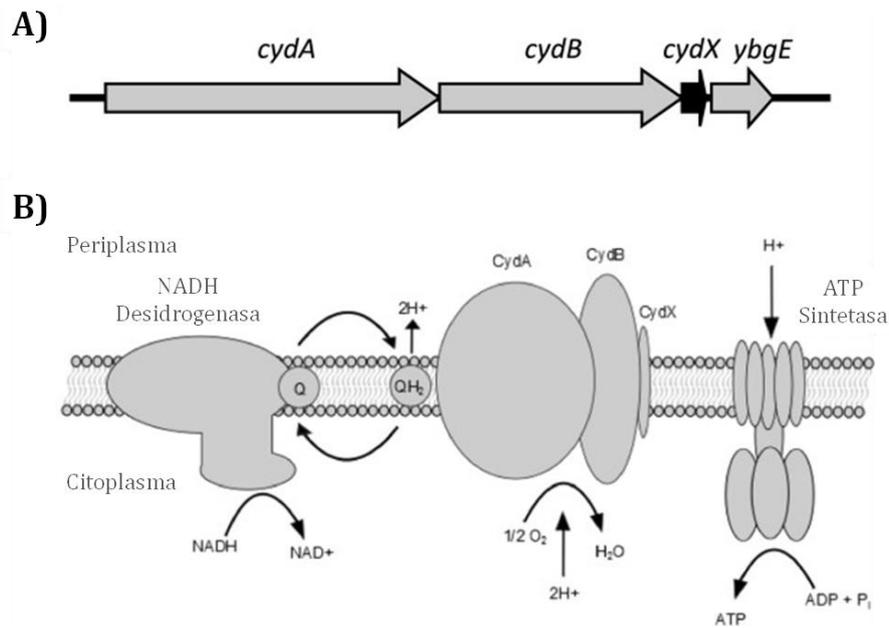


Figura 1.13. Organización del operón *cydABX* y función del citocromo *bdI*. (A) Organización del operón *cydABX* del citocromo *bdI*. (B) Función del complejo *CydABX* en la cadena de transporte de electrones. Tomado y adaptado de Allen y colaboradores (2014)

La enzima contiene tres grupos prostéticos: hemo *b*₅₅₈, hemo *b*₅₉₅ y hemo *d* los cuales se encuentran en una estequiometría 1:1:1 por complejo enzimático. El hemo *b*₅₅₈ está situado dentro de la subunidad I. Las subunidades I y II son necesarias para el ensamblaje de los hemos *b*₅₉₅ y *d*, lo que sugiere que estos dos pueden residir en la interfase de la subunidad (Newton y Gennis, 1991). La estructura tridimensional del citocromo *bdI* de *E. coli* por rayos X no ha sido determinada. Estudios de la topología de la proteína en la membrana sugieren que los tres hemos se encuentran cerca del lado periplasmático de la membrana. La Figura 1.14 muestra modelos topológicos de subunidades I y II. La subunidad II se compone de ocho hélices transmembrana con ambos extremos, N y C terminal hacia el citoplasma (Osborne y Gennis, 1999). La subunidad I consta de nueve hélices transmembrana con el extremo N-terminal en el periplasma y el C-terminal en el citoplasma. Además, contiene un gran dominio hidrófilo denominado bucle-Q, que conecta las hélices transmembrana VI y VII y está directamente implicado en la unión y en la oxidación de QH₂. Por lo tanto, el único sitio para la unión y oxidación del quinol en citocromo *bdI* está situado en el lado periplasmático de la membrana. El quinol se une inicialmente a través del bucle-Q expuesto. Posteriormente, se oxida y el hemo *b*₅₅₈ actúa como un aceptor primario de electrones, mientras que dos protones se liberan hacia el lado extracelular. Los electrones son transferidos al sitio activo *b*₅₉₅/*d*, donde tienen lugar la unión de O₂ y su reducción a agua (Borisov *et al.*, 2011^a).

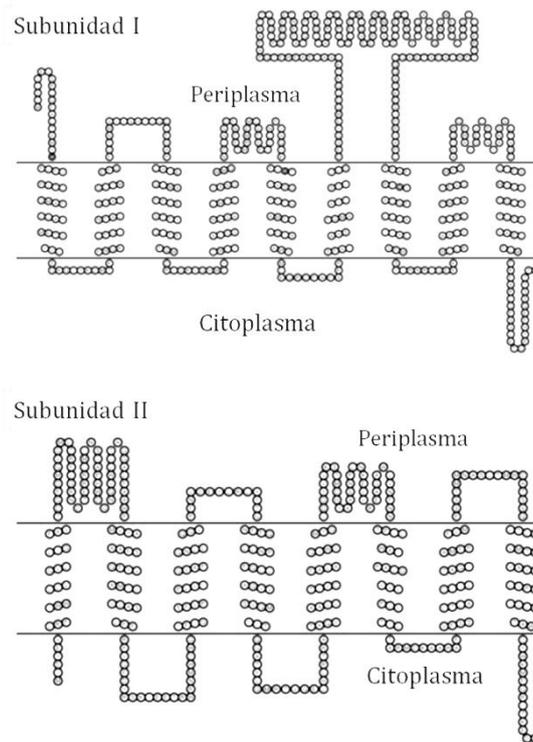


Figura 1.14. Topología propuesta de subunidades I y II de la citocromo *bdI* de *E. coli*. Tomado y adaptado de Osborne y Gennis (Osborne y Gennis, 1999).

Recientemente fue publicada la primera estructura tridimensional de un citocromo *bd*, la cual se muestra en la Figura 1.15 (Safarian *et al.*, 2016). La estructura del citocromo *bd* de *Geobacillus thermodenitrificans* K1041 tiene 19 hélices. CydA y CydB tienen 9 hélices cada una siendo la hélice faltante un péptido llamado CydS, que jugaría un rol análogo a CydX de *E. coli*. CydS probablemente estabiliza al hemo b_{558} durante los posibles reordenamientos estructurales del bucle-Q tras la unión y oxidación de quinol. CydA además de tener el sitio para la oxidación del quinol abarca también los tres grupos hemo que se encuentran en una disposición triangular y no lineal como se esperaba. Se sugiere que la transferencia de electrones procede desde el hemo b_{558} al hemo *d*, seguido de un equilibrio con el hemo b_{595} . Se requieren enfoques experimentales más detallados así como estructuras de alta resolución de otras oxidasas tipo citocromo *bd* para saber con precisión el mecanismo de reducción del oxígeno y cómo los dos canales de protones propuestos en CydA y CydB convergen en el citocromo b_{595} para la llegada de protones desde el citoplasma (Cook y Poole, 2016).

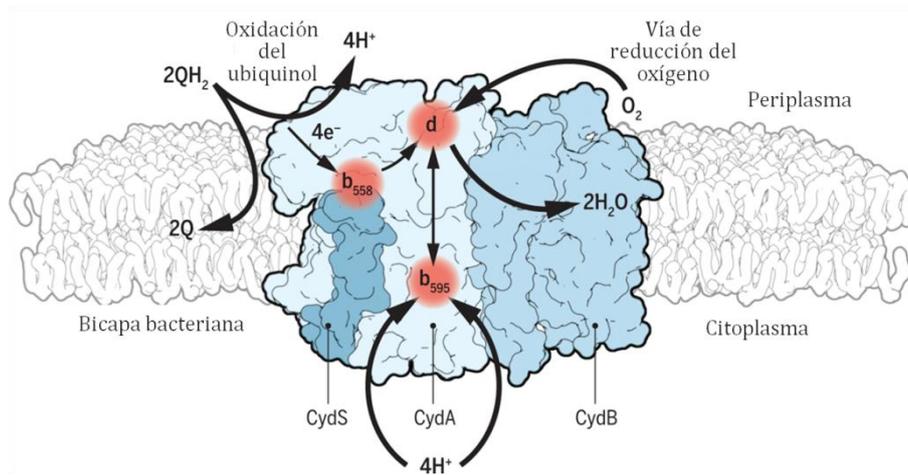


Figura 1.15. Estructura de alta resolución del citocromo *bd* de *Geobacillus thermodenitrificans*. Se muestran las subunidades CydA y CydB así como la tercera subunidad, CydS, la cual estabilizaría al hemo *b*₅₅₈. El ubiquinol (QH₂) se oxida a ubiquinona (2Q) en el sitio de la oxidación del ubiquinol situado en CydA, liberando protones al periplasma; los electrones luego pasan al hemo *d* y al hemo *b*₅₉₅. Anteriormente se consideraba que los hemo *d* y *b*₅₉₅ formaban un sitio binuclear donde ocurría la activación del oxígeno para reducirse a agua, como sucede en oxidasas mitocondriales. Sin embargo, la nueva estructura revela un arreglo de grupos hemo como una tríada (en lugar de lineal); la distancia entre los dos hemo de tipo *b* es mayor que la distancia entre los hemo *b*₅₅₈ y *d*, lo que sugiere que la transferencia de electrones del hemo *b*₅₅₈ al hemo *d*, seguido por un equilibrio con el hemo *b*₅₉₅. Los protones pueden moverse desde el citoplasma bacteriano al lugar de reducción del oxígeno a través de dos vías posibles identificadas en CydA y CydB. Tomado y adaptado de Safarian y colaboradores (2016).

(3) Citocromo *bdII*

Los genes *cyxAB* que codifican para el citocromo *bdII* están localizados en el minuto 22 en el mapa genético de *E. coli*. No se ha estudiado demasiado al citocromo *bdII*, pero se ha demostrado que sus propiedades espectrales se parecen mucho a las de citocromo *bdI* (Sturr *et al.*, 1996). Los genes *cyxA* y *cyxB* codifican para proteínas integrales de membrana de 58 y 42 kDa, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de ambas subunidades, deducidas de los productos génicos *cyxA* y *cyxB*, muestran una identidad del 60 y 57 %, respectivamente, con respecto a las secuencias de la subunidad I (CydA) y la subunidad II (CydB) del citocromo *bdI*. De los quinoles probados, el citocromo *bdII* utiliza menadiol como sustrato preferido (aunque el ubiquinol-1, el sustrato más eficiente *in vitro* para el citocromo *bdI* no fue probado) (Sturr *et al.*, 1996). En un principio se reportó que el citocromo *bdII* no era capaz de generar una fuerza protón motriz ($H^+/e^- = 0$). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que el citocromo *bdII* genera una fuerza protón motriz por un mecanismo idéntico al citocromo *bdI* (Borisov *et al.*, 2011b). Los datos muestran que por cada electrón que utiliza para reducir el O₂ resulta en la liberación de un protón ($H^+/e^- = 1$). El citocromo *bdII* al igual que el citocromo *bdI* no es una bomba de protones.

Una separación de carga acompaña al recambio catalítico de la enzima debido a que los electrones y protones utilizados para reducir el O_2 a dos moléculas de H_2O provienen de lados opuestos de la membrana. El quinol se oxida en el lado periplasmático, liberando protones al periplasma.

(4) Regulación de la expresión de genes en *E. coli*

Bajo condiciones de alta tensión de oxígeno, *E. coli* expresa al citocromo bo_3 (*cyoABCDE*), mientras que el citocromo *bdI* (*cydABX*) se reprime moderadamente. La expresión de los operones *cyoABCDE* y *cydABX* está controlada por los reguladores transcripcionales globales Arc y Fnr. Arc es un sistema regulador de dos componentes que incluye a la proteínas: ArcA, que responde al estado de oxidación del *pool* de quinonas y ArcB, que se activa en el curso de la transición de crecimiento aeróbico a microaeróbico (tensión de oxígeno de 2 a 15% de saturación de aire) y permanece activa durante el crecimiento anaeróbico (tensión de oxígeno de menos de 2% de saturación de aire). Tras la estimulación, ArcB se autofosforila y luego transfiere los grupos fosfatos a ArcA. En condiciones microaeróbicas, el aumento del nivel de ArcA fosforilada reprime al operón *cyoABCDE* y activa al operón *cydAB*. Otro regulador global es el factor de transcripción Fnr, que controla la inducción de procesos anaeróbicos en *E. coli*. La proteína Fnr tiene un centro de Fe-S que sirve como un sensor del estado redox de la célula. Si bien los niveles de la proteína Fnr son similares tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas la proteína es activa sólo durante el crecimiento anaeróbico. Cuando hay una transición a condiciones anaeróbicas reprime a los operones *cyoABCDE* y *cydABX* (Borisov *et al.*, 2011^a).

La expresión del citocromo *bdII* es inducida por la entrada en la fase estacionaria y la carencia de fosfato (Atlung y Brøndsted, 1994). Los genes *cyxAB* también son inducidos por el crecimiento anaerobio. Esta inducción es controlada por los reguladores transcripcionales AppY y ArcA pero es independiente de Fnr, a diferencia de la inducción del operón *cyd*. (Atlung y Brøndsted, 1994; Brøndsted y Atlung, 1996).

iv) Generación de fuerza protomotriz

Una de las principales funciones de la cadena respiratoria es generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana citoplasmática mediante el bombeo de protones hacia el espacio periplasmático. Se produce una acumulación de cargas positivas en el periplasma y cargas negativas en el citoplasma.

La cadena respiratoria de *E. coli* contiene 4 enzimas que generan la fuerza protomotriz: (i) la bomba de protones NADH deshidrogenasa I (NDH-I) ($H^+/e^- = 2$) (Bogachev *et al.*, 1996); (ii) el citocromo bo_3 ($H^+/e^- = 2$) (Puustinen *et al.*, 1989) y (iii) los citocromos *bd*

($H^+/e^- = 1$), incapaces de bombear de protones pero que generan una fuerza protón motriz por una separación de cargas transmembrana resultante de la utilización de protones y electrones procedentes de lados opuestos de la membrana. La enzima, NADH deshidrogenasa II (NDH-II) no es electrogénica ($H^+/e^- = 0$), Figura 1.16 (Borisov *et al.*, 2011b).

Como se podrá concluir las oxidasas terminales son diferentes en cuanto a sus eficiencias bioenergéticas. Es decir, la cantidad de protones entregados al lado periplasmático de la membrana por cada electrón usado para reducir al O_2 . Esta diferencia se debe a que el citocromo bo_3 es una verdadera bomba de protones mientras que los citocromos bd no lo son.

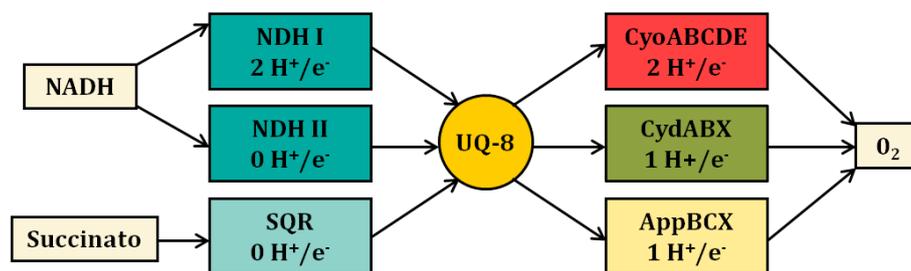


Figura 1.16. Esquema de la cadena respiratoria de *E. coli*. La eficiencia bioenergética de las oxidasas terminales se indica como el número de protones liberados en el periplasma por electrón usado para reducir el oxígeno (H^+/e^-). Las enzimas NADH-quinona oxidoreductasa (NDH-I y NDH-II) y succinato-quinona oxidoreductasa (SQR) transfieren los equivalentes de reducción a la ubiquinona-8 para producir ubiquinol-8. Las quinol-oxígeno oxidoreductasa citocromo bo_3 (CyoABCDE), citocromo bdl (CydABX) y citocromo $bdII$ (AppBCX) oxidan el ubiquinol-8 y reducen el oxígeno a agua. La enzima NDH-I, el citocromo bo_3 , bdl y $bdII$ acoplan el transporte de electrones al bombeo de protones (generan $\Delta\mu_{H^+}$). Sin embargo, las enzimas NDH-II y SQR no son generadoras de $\Delta\mu_{H^+}$. Tomado y adaptado de Borisov y Verkhovsky (Borisov y Verkhovsky, 2015).

v) ATP Sintetasa

La ATP sintetasa lleva a cabo la síntesis de ATP a expensas de la fuerza protón motriz generada en la cadena respiratoria. Este proceso es llamado fosforilación oxidativa. La enzima bacteriana es similar a su homóloga de las mitocondrias y los cloroplastos. Está formada por ocho subunidades organizadas en dos complejos diferentes, el complejo F_0 , que se encuentra embebido en la membrana, y el complejo F_1 unido periféricamente. El complejo F_0 está compuesto por las subunidades a , b y c y forma un canal de protones transmembrana. El complejo F_1 comprende 5 subunidades (α , β , γ , δ y ϵ), y tiene actividad tanto para sintetizar como para degradar ATP.

e) Especies reactivas del oxígeno (ERO)

El oxígeno molecular (O_2) es una molécula pequeña y no polar, que difunde a través de las membranas biológicas tan rápido como a través del agua. El oxígeno tiene una estructura molecular con unas características especiales en cuanto a su reactividad en los sistemas biológicos. Si se contempla el concepto de radical libre como el de cualquier especie molecular que contenga uno o más electrones desapareados (Halliwell y Whiteman, 2004), se entiende que la propia molécula de oxígeno es en realidad, un di-radical estable. La estructura de la molécula tiene dos electrones desapareados en sus orbitales π antienlazantes (Figura 1.17). Gran parte de la conducta del oxígeno y sus especies parcialmente reducidas deriva de sus potenciales de reducción y de las estructuras de sus orbitales moleculares (Imlay, 2003).

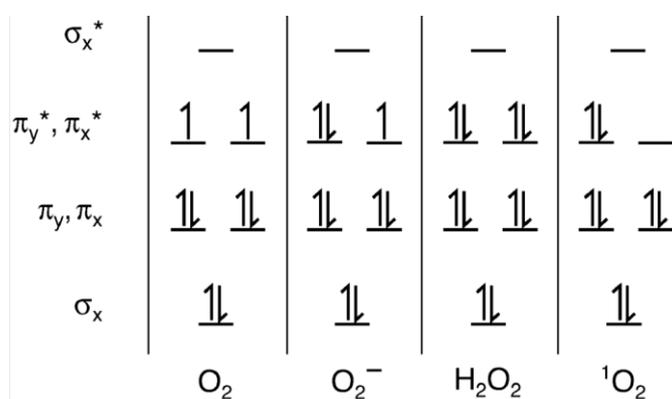


Figura 1.17. Orbitales moleculares del oxígeno molecular (O_2), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y del oxígeno singlete (1O_2).

Una consecuencia importante de esta estructura es que las moléculas orgánicas con electrones con espines apareados no pueden transferir más de un electrón por vez al oxígeno. Es decir, el oxígeno molecular puede aceptar un electrón a la vez. Esta característica genera una restricción importante a la reactividad del oxígeno porque la afinidad del oxígeno para el primer electrón es bastante baja. El oxígeno es un receptor de electrones univalente relativamente débil (potencial de reducción -0,16 V). En un sistema biológico donde la mayoría de las moléculas orgánicas son dadores pobres de electrones monovalentes, el oxígeno no tiene la capacidad de oxidar de manera eficiente a la mayoría de los componentes celulares, como aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos. Por lo tanto, la combinación de su disposición orbital y su modesta afinidad electrónica univalente controlan la reactividad del oxígeno con las biomoléculas estructurales. Sin embargo, los electrones no apareados del oxígeno pueden interactuar fácilmente con los electrones no

apareados de metales de transición y los radicales orgánicos (Imlay, 2003). La transferencia de un electrón al oxígeno produce el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), los cuales son especies parcialmente reducidas. Las ERO pueden oxidar biomoléculas con facilidad. Estas especies del oxígeno reducidas son productos inevitables del metabolismo aeróbico y si no son eliminadas, pueden dañar críticamente a las células. Los potenciales de reducción del superóxido, peróxido de hidrógeno y del radical hidroxilo indican que son oxidantes mucho más fuertes que el oxígeno debido a sus potenciales de reducción +0,94 V, +0,38 V y +2,33 V respectivamente (Figura 1.18). (Halliwell y Whiteman, 2004; Imlay, 2003).

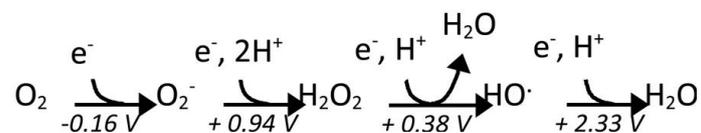


Figura 1.18. Estados redox del oxígeno con sus potenciales de reducción estándar. Se muestra la serie de reducción del oxígeno con cuatro electrones. La cual produce directa o indirectamente: peróxido de hidrógeno, superóxido y radical hidroxilo (HO^{\cdot}) que en determinadas condiciones son las responsables de la toxicidad del O_2 . Tomado y adaptado de Imlay (Imlay, 2013).

Para prevenir los efectos lesivos de la producción *in vivo* de ERO y radicales libres, la evolución ha dotado a los organismos superiores de sistemas antioxidantes complejos y eficaces que incluyen mecanismos antioxidantes enzimáticos y moléculas antioxidantes. A pesar de la poderosa y compleja maquinaria antioxidante, cuando la capacidad de los mecanismos protectores es superada por la intensidad o duración de las agresiones oxidativas, se produce una situación denominada estrés oxidativo, que se define como una alteración en el equilibrio entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes. La célula sufre entonces un daño oxidativo (Halliwell y Whiteman, 2004).

i) Generación de ERO

Los microorganismos generan $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en condiciones normales si crecen en un ambiente con O_2 , a través de su reducción univalente. La cantidad de estrés oxidativo que experimenta un microorganismo depende de la velocidad a la que se genera el superóxido y el peróxido de hidrógeno. Contrariamente a las suposiciones originales, estas especies no se forman como intermediarios durante la reducción del oxígeno por las citocromo oxidasas (Minghetti y Gennis, 1988). Sin embargo, las otras enzimas de la cadena respiratoria son donantes de electrones univalentes y son las fuentes más probables de la reducción involuntaria del oxígeno. En los sistemas *in vitro* el superóxido y el peróxido de hidrógeno se forman principalmente por la autooxidación de las deshidrogenasas

respiratorias (Imlay, 2013; Messner y Imlay, 1999, 2002; Seaver y Imlay, 2004). Estas enzimas contienen flavinas y, complejos de hierro-azufre o quinonas, como grupos prostéticos los cuales son competentes en reacciones redox univalentes. Las flavinas parecen ser las principales responsables de la transferencia de electrones al O_2 . Esto puede ser debido a la accesibilidad al disolvente de las mismas, que están situadas en la superficie de las proteínas para poder interactuar con los sustratos solubles. Por el contrario, los grupos de hierro-azufre están enterrados dentro de la cadena polipeptídica, y las quinonas están confinadas en la membrana, de donde pueden ser secuestradas por regiones hidrofóbicas de la interfaz de la proteína, adonde la formación de superóxido, una molécula con carga neta -1 es desfavorecida (Messner y Imlay, 2002). Las flavoenzimas aceptan iones hidruro de los sustratos orgánicos, luego las flavinas reducidas transfieren los electrones de a uno por vez a otros componentes redox, ya sean los centros de hierro-azufre o las quinonas unidas a la enzima. Cuando el oxígeno choca con la flavina reducida, un electrón puede saltar desde la flavina al oxígeno. Se forma entonces una mezcla de superóxido y peróxido de hidrógeno (Messner y Imlay, 2002; Seaver y Imlay, 2004). No obstante, la velocidad a la que las células producen H_2O_2 no disminuye sustancialmente en mutantes que carecen de las enzimas respiratorias, lo que llevó a la conclusión de que tanto el $O_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 se producen principalmente por la auto-oxidación accidental de flavoproteínas que no pertenecen a la cadena transportadora de electrones. Tales flavoproteínas se encuentran en todo el metabolismo, y muchas de ellas producen ERO *in vitro*, incluyendo la glutatión reductasa y glutamato sintasa (Imlay, 2013). Cuando el O_2 choca con la dihidroflavina de la enzima reducida (Figura 1.19) se genera superóxido y una flavosemiquinona. A veces el $O_2^{\cdot-}$ difunde inmediatamente y la flavosemiquinona reacciona rápidamente con otra molécula de oxígeno para generar un segundo $O_2^{\cdot-}$ (vía derecha). Pero la mayoría de las veces hay una segunda transferencia de electrones antes de que el $O_2^{\cdot-}$ escape del sitio activo, y se genera H_2O_2 (vía izquierda) (Imlay, 2003; Messner y Imlay, 2002; Seaver y Imlay, 2004).

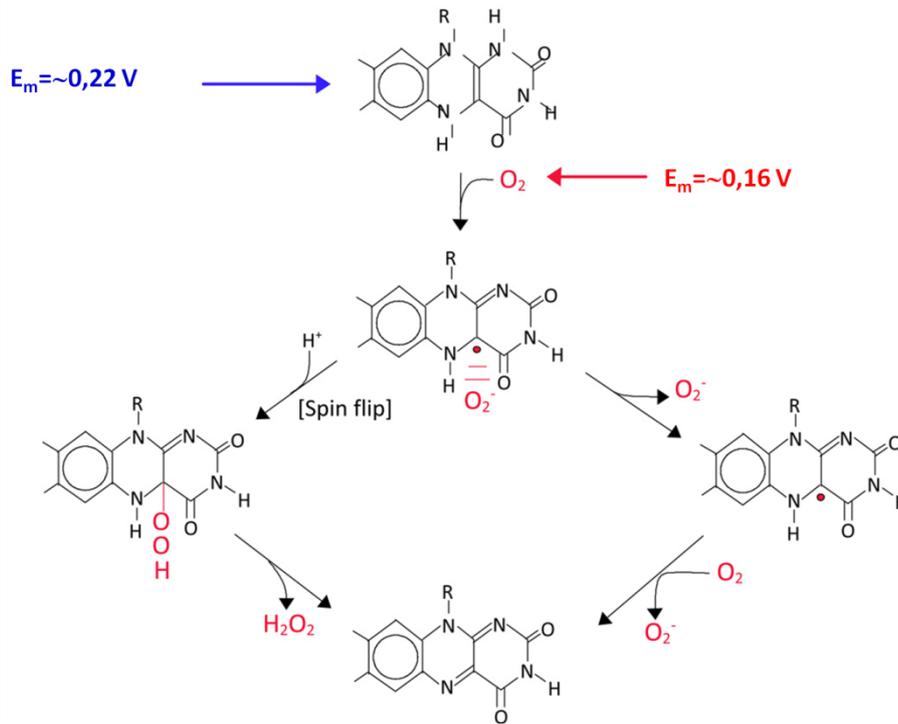


Figura 1.19. Vías de oxidación del FADH₂ en las flavoproteínas. La autooxidación de la flavina es posible debido a que las flavinas enzimáticas comúnmente tienen potenciales de reducción univalentes tan bajos como el O₂. La vía representada en la izquierda predomina en la mayoría de las enzimas estudiadas hasta la fecha. Tomado y adaptado de Imlay (Imlay, 2013).

Aunque la mayor parte de superóxido se convierte finalmente en H₂O₂ por la enzima superóxido dismutasa (SOD), el hecho de que algunas enzimas produzcan superóxido como un producto inicial es fisiológicamente importante porque el superóxido puede dañar biomoléculas con las que el H₂O₂ no reacciona.

Otro componente de la cadena respiratoria capaz formar superóxido en menor medida, es la menaquinona (Korshunov y Imlay, 2006). Cualquier mutación que altere el estado redox de la menaquinona, ya sea afectando el transporte de electrones hacia ella o fuera de ella, tiene un fuerte impacto en la formación de superóxido.

Otra de las especies reactivas del oxígeno es el radical hidroxilo, este se forma cuando el ion ferroso transfiere sus electrones a H₂O₂ mediante la reacción de Fenton:



El hierro que cataliza la reacción de Fenton es el hierro que se encuentra libre en la célula, es decir el que no está incorporado en enzimas o en proteínas (Imlay, 2003).

ii) Daño producidos por ERO

El O_2^- interrumpe las vías de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (Leu, Ile, Val), aromáticos (Tyr, Trp, Phe) y azufrados (Met, Cys). El origen de la auxotrofia de aminoácidos de cadena ramificada se debe a que O_2^- inactiva a la dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD) que cataliza la penúltima etapa en la ruta biosintética. En el segundo caso se debe a que el superóxido es capaz de oxidar un intermediario en la biosíntesis de estos aminoácidos y así disminuir la síntesis de los mismos (Benov y Fridovich, 1999). La mayoría de las enzimas citosólicas que sufren daño por superóxido, pertenecen a la familia de las deshidratasas. El superóxido se une al centro catalítico [4Fe-4S] expuesto al solvente y toma un solo electrón del mismo oxidándolo y volviéndolo inestable. La disociación de un átomo de hierro es lo que lleva a la inactivación a la enzima. *E. coli* posee varias deshidratasas que son inactivadas por superóxido, entre ellas se encuentran la aconitasa B y las fumarasas A y B pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El H_2O_2 también ataca a las deshidratasas Fe-S dependientes, aunque lo hace por medio de la reacción de Fenton. El H_2O_2 directamente se une y oxida el átomo de hierro produciendo la disociación del mismo y la inactivación de la enzima. Sin embargo, la mayoría de las proteínas que contienen estos centros Fe-S, incluidas las que participan en las reacciones de transferencia de electrones no son dañadas. Esto se debe a que sus centros están protegidos por las cadenas polipeptídicas o porque directamente no pueden ser oxidadas. El O_2^- y el H_2O_2 también pueden desactivar una familia de enzimas que utilizan un único átomo de hierro como un grupo prostético. Esta familia de enzimas incluye a las epimerasas, deshidrogenasas, desformilasas y deaminasas (Imlay, 2013).

Otra molécula que sufre el daño oxidativo es el ADN. Una parte del hierro intracelular se encuentra asociado al ADN pero puede reaccionar con el H_2O_2 mediante la reacción de Fenton y generar el radical hidroxilo. Este oxidante muy fuerte es probable que no difunda muy lejos del sitio donde se forma antes de reaccionar, siendo así el ADN su principal blanco. El radical hidroxilo puede atacar tanto las bases nitrogenadas como a la ribosa del ADN, dando lugar a una amplia variedad de lesiones (Imlay, 2013). La Figura 1.20 esquematiza una visión general de lo arriba mencionado.

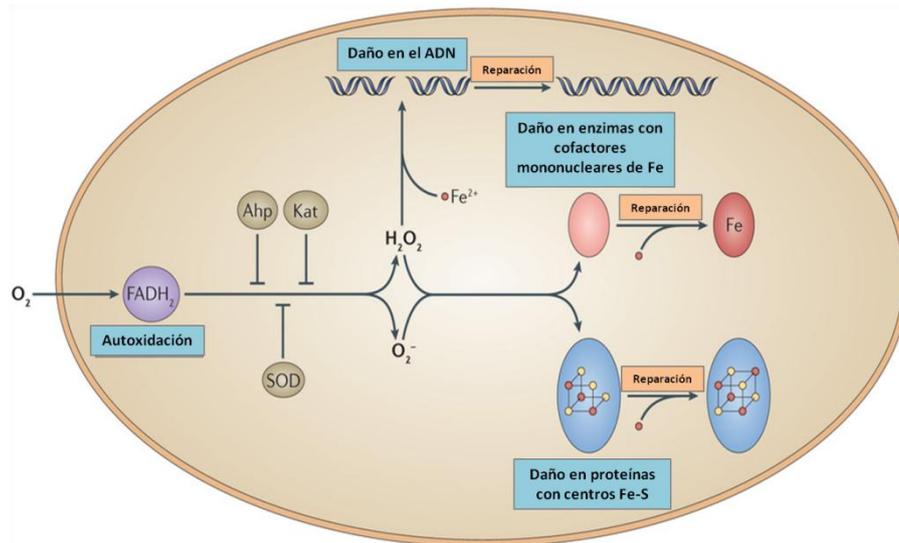


Figura 1.20. Visión general de los daños causados por las especies reactivas del oxígeno en *Escherichia coli*. La auto-oxidación de enzimas redox (como la oxidación del $FADH_2$ en flavoproteínas) conduce a la formación continua de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Las catalasas (Kats), peroxidasa (tales como la alquil hidroperóxido reductasa (Ahp)) y superóxido dismutasa (SOD) reducen al mínimo la acumulación de estos dos oxidantes. Sin embargo, ambas especies dañan a las deshidratasas con centros $[4Fe-4S]$ y a enzimas con cofactores mononucleares de hierro. Las enzimas dañadas se reparan de forma continua, por lo que sus actividades en el estado estacionario representan el equilibrio entre los procesos de daño y reparación. El H_2O_2 también reacciona directamente con el Fe^{2+} libre, que es el que se asocia débilmente a las biomoléculas, incluyendo el ADN. El radical hidroxilo resultante de la reacción de Fenton producida daña al ADN, lo que requiere la acción de las enzimas de reparación. Las defensas basales de la célula mantienen las tasas de estas lesiones lo suficientemente bajas de manera tal que el crecimiento y la viabilidad celular no son notablemente afectadas. Sin embargo, cuando entran en la célula compuestos redox que generan $O_2^{\cdot -}$ o ingresa H_2O_2 , los niveles intracelulares de estos oxidantes aumentan; y en consecuencia, las enzimas vulnerables se dañan por lo que las vías metabólicas empiezan a fallar. Bajo estas condiciones, la inducción de los regulones de defensa OxyR y SoxRS son esenciales para la recuperación celular. Tomado y adaptado de Imlay (Imlay, 2013).

También el peróxido de hidrógeno puede oxidar los residuos de cisteína y metionina de las proteínas. Sin embargo, en las reacciones de oxidación catalizadas por metales se produce un proceso oxidativo irreversible, la carbonilación de proteínas. Lo que resulta en la pérdida de la función y en la alteración estructural de las mismas. Algunas proteínas parecen ser más vulnerables que otras a este tipo de daño, debido quizás a su tendencia a unir metales. Los iones Fe^{2+} y Cu^+ se unen a sitios de unión a metal específicos en las proteínas y reaccionan con H_2O_2 para generar radical hidroxilo que oxida las cadenas laterales de los aminoácidos. Por ejemplo, de la oxidación de prolina y arginina se produce semialdehído glutámico, mientras que la lisina se oxida a semialdehído aminoadípico y la treonina a ácido 2-amino-3-cetobutírico. La formación de grupos carbonilos ha sido utilizada metodológicamente para evaluar el grado de daño oxidativo en diferentes sistemas biológicos (Fedorova *et al.*, 2014; Requena *et al.*, 2001).

El superóxido también produce sensibilidad a azúcares de cadena corta, como las triosas, que son incapaces de ciclarse para formar un hemiacetal y se vuelven muy susceptibles al daño oxidativo generando finalmente un compuesto dicarbonilo, el cual es tóxico debido a su alta reactividad con los aminoácidos y los ácidos nucleicos. Las cepas mutantes en SOD son más propensas a sufrir este tipo de daño (Okado-Matsumoto y Fridovich, 2000).

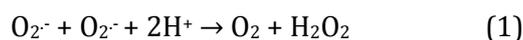
La vulnerabilidad natural de los organismos frente a las especies reactivas del oxígeno ha sido explotada por plantas y microbios que buscan inhibir el crecimiento de sus competidores. Ellos excretan compuestos redox cíclicos, que son agentes químicos tóxicos que penetran las células bacterianas y catalizan la transferencia de electrones desde las enzimas redox al oxígeno molecular, generando superóxido y peróxido de hidrógeno. Entre estos compuestos se encuentran el paraquat y las fenazinas o quinonas, los cuales pueden elevar la velocidad de formación de ERO en varios órdenes de magnitud cuando se encuentran presentes (Imlay, 2008).

Cuando se alcanza una concentración de ERO suficiente para dañar a la célula se inducen una serie de respuestas muy reguladas. El sistema de defensa frente al estrés oxidativo en *E. coli* está organizado en tres regulones principales, OxyR, SoxRS y Fur.

iii) Mecanismos de defensa contra ERO

(1) Superóxido dismutasa (SOD)

Cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ según la siguiente reacción:



E. coli contiene tres SOD: dos SOD citoplasmáticas, una Mn-SOD (*sodA*) y otra Fe-SOD (*sodB*) y una enzima periplásmica, Cu-Zn SOD (*sodC*). El $O_2^{\cdot -}$ no puede atravesar las membranas biológicas por lo que éste no puede fluir entre estos dos compartimentos y el rol fisiológico de las enzimas citoplasmáticas y de la periplasmática debe ser considerado en forma separada.

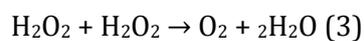
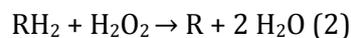
Como muchos mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, la SOD periplasmática es regulada positivamente por RpoS (ARN polimerasa, factor sigma alternativo) y es fuertemente inducida en fase estacionaria. Sin embargo, la formación del anión superóxido periplasmático se produce cuando las células se encuentran en una fase de crecimiento exponencial (Gort *et al.*, 1999; Korshunov y Imlay, 2006). La presencia de la SodC en *E. coli* juega un rol adicional en muchas bacterias patógenas mediante la

protección de las células contra fuentes exógenas de superóxido, tales como el estallido oxidativo en los fagocitos. La presencia de SodC podría ser uno de los factores de virulencia bacteriana (Sanjay *et al.*, 2011).

Las dos isoenzimas Fe-SOD y Mn-SOD se regulan de forma coordinada en respuesta a los niveles de hierro. Cuando los niveles de hierro son altos el represor Fur inhibe la síntesis de Mn-SOD. Cuando los niveles de hierro son bajos, la desactivación de Fur estimula la síntesis de Mn-SOD y la transcripción de un ARN de interferencia pequeño (ARNip) RyhB, que se une por complementariedad a los ARNm que codifican la Fe-SOD (Massé y Gottesman, 2002; Tardat y Touati, 1991). Por lo tanto, Fe-SOD es producida en forma constitutiva incluso en condiciones anaeróbicas. Provee una defensa constante contra la toxicidad producida por oxígeno, mientras que Mn-SOD es inducible y se sintetiza cuando Fe-SOD no puede ser activada (Carlioz y Touati, 1986). La síntesis de Mn-SOD también se induce ante la presencia de antibióticos que generan superóxido, con el control que se ejerce por el sistema *soxRS*. El sistema *soxRS*, es inactivo durante el crecimiento normal, pero se vuelve muy activo cuando las células se exponen a una amplia variedad de compuestos redox. SoxR es una proteína reguladora homodimérica que contiene un centro sensorial [2Fe-2S] en cada subunidad. Durante la exposición a los fármacos con actividad redox, el clúster se oxida. La forma oxidada de SoxR estimula la transcripción de *soxS* que actúa como un factor de transcripción secundario, aumentando la expresión de muchos genes repartidos por todo el cromosoma, entre ellos *sodA* (Imlay, 2013).

(2) Peroxidasas y Catalasas

El peróxido de hidrógeno es eliminado en la mayoría de los microorganismos por peroxidasas (Ecuación 2) y catalasas (Ecuación 3):



El capturador principal de H_2O_2 en *E. coli* es la alquil hidroperóxido reductasa AhpCF. AhpCF es una oxidoreductasa muy eficiente que puede capturar a la mayoría de los peróxidos endógenos generados durante el crecimiento aeróbico (Seaver y Imlay, 2001). Cuando la célula se expone a H_2O_2 la transcripción de los genes *ahpCF* se induce por OxyR. OxyR es un factor de transcripción inactivo en condiciones normales de aerobiosis. Cuando la concentración de peróxido de hidrógeno se eleva aproximadamente a 200 nM, OxyR se oxida. La forma oxidada se une a regiones promotoras de genes y promueve

activamente la transcripción de una docena de operones de todo el cromosoma. AhpC también es inducida por RpoS (Jung y Kim, 2003). Cuando los niveles extracelulares de H_2O_2 son altos y difunde dentro de la célula y la capacidad de captura de AhpCF puede ser sobrepasada. Entonces las catalasas cumplen un rol fundamental (Imlay, 2008). En *E. coli* K-12, KatG se expresa muy poco en células en fase exponencial de crecimiento, pero predomina cuando los niveles de H_2O_2 son altos. KatG es una catalasa/peroxidasa que al igual que AphCF es fuertemente inducida por OxyR. También se induce durante la transición a la fase estacionaria de una manera RpoS-dependiente. KatE es una segunda catalasa no inducida por peróxido sino por RpoS durante la fase de crecimiento estacionaria, es independiente de la regulación OxyR (Imlay, 2013). La siguiente figura engloba el accionar de las catalasas y peroxidasas:

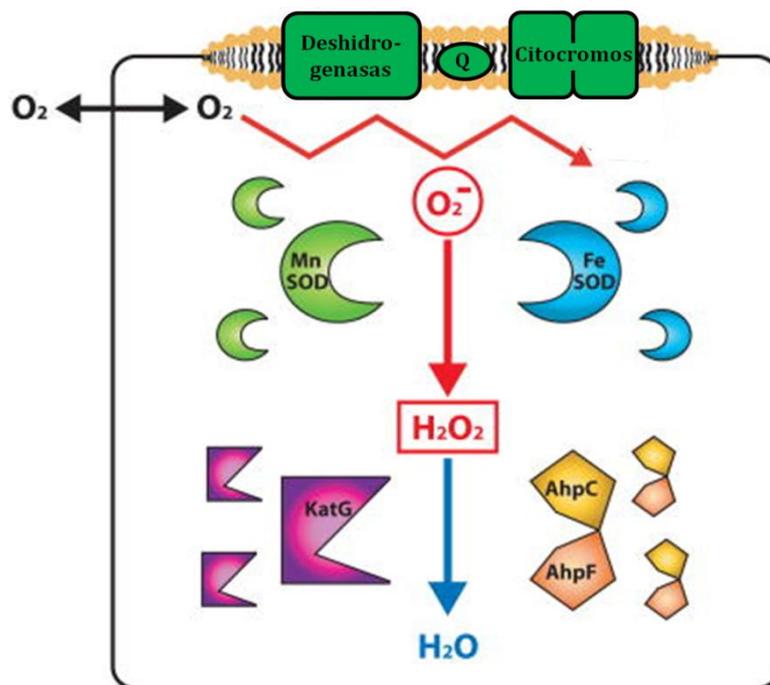


Figura 1.21. Generación de ERO y mecanismos de defensa enzimáticos. El oxígeno molecular puede difundir sin impedimentos dentro de la bacteria y reducirse parcialmente tomando electrones de las enzimas respiratorias produciendo superóxido (O_2^-). Las enzimas superóxido dismutasa citoplasmáticas (Mn-SOD y Fe-SOD) convierten el superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual también es tóxico para la célula. Este es eliminado principalmente por la alquil hidropéroxido reductasa (Ahp), la cual está compuesta por dos subunidades (AhpC y AhpF), convirtiendo el H_2O_2 en H_2O . Concentraciones de peróxido de hidrógeno más altas inducen la expresión de *katG*, que también convierte el H_2O_2 en H_2O . Tomado y adaptado de Dywer y colaboradores (2007).

f) Antibióticos y radicales libres

La alarmante aparición de bacterias resistentes a muchos antibióticos ha creado la necesidad de entender mejor los mecanismos básicos de los antimicrobianos existentes. Se sabe cómo los antibióticos interfieren con los procesos bacterianos mediante la unión a blancos específicos. Sin embargo, recientemente los estudios se dirigieron a entender las respuestas fisiológicas inducidas por los antibióticos en las bacterias. Se observó que el bloqueo de los blancos de acción específicos lleva a una alteración del estado redox celular. Estas perturbaciones pueden contribuir (no son la única causa) a la nocividad de los antibióticos. Básicamente, el interés se centra en cómo los antibióticos perturban el metabolismo celular y cómo éste influye en la actividad antibiótica. Un conocimiento profundo de las respuestas fisiológicas inducidas por los antimicrobianos es fundamental para determinar los medios para mejorar a los que actualmente existen (Dwyer *et al.*, 2014; Lobritz *et al.*, 2015).

Los antibióticos bactericidas son capaces de inducir un daño a la célula por medio de la interferencia de procesos específicos dando como resultado la muerte celular. Durante este proceso se genera una respuesta que induce una alteración del estado redox de la célula. Esta se basa en varios aspectos fundamentales de la fisiología

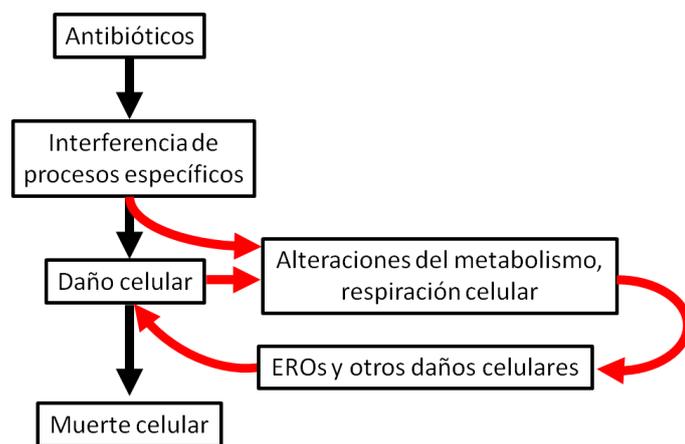


Figura 1.19. Modo de acción de los antibióticos bactericidas.

celular, como ser alteraciones en el metabolismo central, en la respiración celular y en el metabolismo del hierro. Finalmente resultan en la formación de especies reactivas tóxicas, incluyendo ERO, contribuyendo de esta manera al daño celular y a la muerte, Figura 1.19. Se ha creado una gran controversia ante la propuesta de que los antibióticos bactericidas independientemente de sus blancos de acción generan diferentes niveles de ERO que contribuyen a la muerte celular. Sin embargo, los estudios recientes en lugar de refutar el tradicional punto de vista de acción de los antibióticos sugieren la existencia de un componente adicional de toxicidad, la generación de ERO. Estos son una consecuencia fisiológica de la interacción de los antibióticos con sus blancos tradicionales y contribuyen a la letalidad (Dwyer *et al.*, 2014).

En los últimos años, se ha estudiado la relación que existe entre el tratamiento con ciertos tipos de antibióticos y la producción de ERO, que contribuyen a la muerte celular. En cepas de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Enterococcus faecalis* se vio un aumento en la producción de superóxido cuando las células fueron incubadas en presencia de cloranfenicol. Este aumento solo se produjo en aquellas cepas que fueron sensibles al antibiótico mientras que la síntesis de este radical no se indujo en las cepas resistentes. Albesa y colaboradores (2004) plantearon que la alteración del metabolismo oxidativo y el aumento de superóxido podían ser importantes en el mecanismo de acción de los diferentes antibióticos, debido a que un aumento de superóxido fue observado en todas las cepas sensibles y con todos los antibióticos seleccionados (Albesa *et al.*, 2004).

Goswami y colaboradores (2006) estudiaron el efecto de la ciprofloxacina en cepas *E. coli*. La susceptibilidad frente a este antibiótico disminuyó en presencia de agentes antioxidantes, glutatión y ácido ascórbico. El glutatión también protegió contra el efecto nocivo de otras fluoroquinolonas sin embargo, no protegió frente a otros tipos de antibióticos como las ampicilina, el cloranfenicol y la tetraciclina, sugiriendo que este compuesto interfiere con algún paso que las fluoroquinolonas tienen en común para llevar a cabo su acción antibacteriana (Goswami *et al.*, 2006).

Dwyer y colaboradores (2007) caracterizaron un nuevo mecanismo de daño celular que involucra la producción de ERO. Un desbalance en la dinámica de la regulación del hierro luego del daño inducido por norfloxacina, un inhibidor de la ADN girasa. La interacción del antibiótico con la ADN girasa induce la formación de superóxido el cual ataca los centros 4Fe-4S de las proteínas. La oxidación y reparación repetitiva de estos centros origina la regulación deficiente del hierro, generando hierro libre. El Fe^{+2} promueve la formación de radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton, contribuyendo así a la muerte celular, Figura 1.22 (Dwyer *et al.*, 2007).

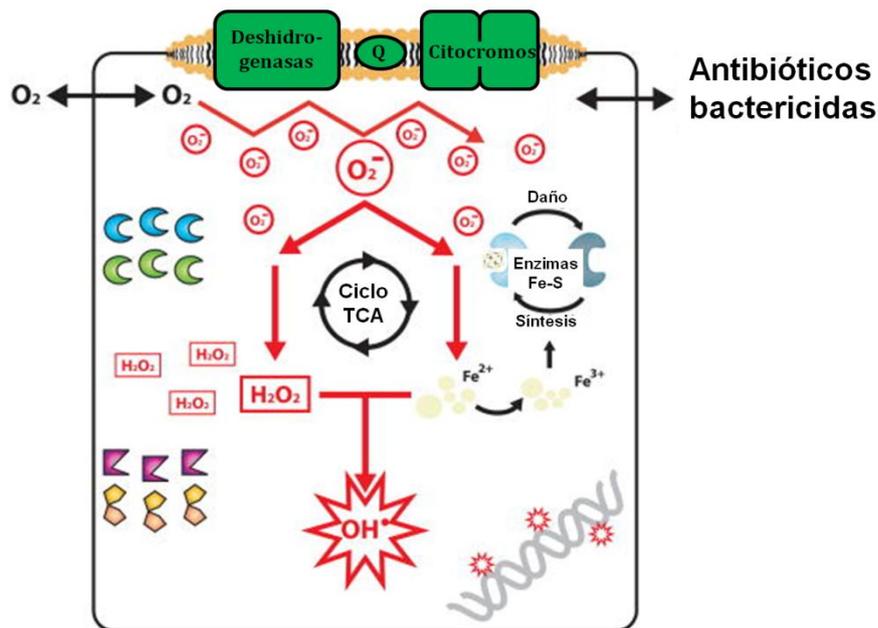


Figura 1.22. Generación de ERO durante el tratamiento con antibióticos. Cuando la bacteria es tratada con un antibiótico bactericida, este actúa sobre su blanco de acción específico induciendo cambios en el metabolismo que llevan a la producción de ERO que contribuyen a la muerte celular. El superóxido producido oxida los centros Fe-S de las enzimas desestabilizándolos y liberando Fe^{2+} , el cual reacciona con H_2O_2 , mediante la reacción de Fenton, para producir radical hidroxilo. El ciclo de ácidos tricarbónicos y la síntesis de *novo* de los centros de Fe-S, juegan un importante papel en esta serie de eventos. Finalmente, los radicales hidroxilos pueden atacar al ADN. Tomado y adaptado de Dwyer y colaboradores (2007).

Kohanskiy y colaboradores (2007) trabajaron con tres clases principales de antibióticos bactericidas: un β -lactámico (ampicilina), un aminoglicósido (kanamicina) y una quinolona (norfloxacina) que inhiben la síntesis del peptidoglicano, la síntesis de proteínas y la maquinaria de replicación del ADN, respectivamente. A pesar de la diversidad de sus mecanismos de acción, estos investigadores presentaron la evidencia de que estas tres clases de antibióticos, estimulan la producción de radicales hidroxilo en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, que en última instancia favorecen a la muerte celular. La formación del radical hidroxilo es el producto final de una vía de daño oxidativo celular que involucra una estimulación de la oxidación de NADH a través de la cadena de transporte de electrones dependiente del ciclo de ácidos tricarbónicos. La hiperactivación de la cadena de electrones estimula la formación de superóxido, el cual desestabiliza los centros Fe-S generando Fe^{2+} disponible para la oxidación por la reacción de Fenton. La toxicidad fue substancialmente disminuida cuando se inhibió esta reacción por la presencia de un agente quelante de hierro y de un capturador del radical hidroxilo. También se observaron cambios metabólicos y genéticos que sugieren que distintos eventos intracelulares acompañan el modo de acción primario del antibiótico. Y además

que una cepa mutante en la proteína involucrada en la respuesta al daño en el ADN, RecA aumentó la muerte celular lo que plantea que estas tres clases de antibióticos bactericidas pueden ser potenciados si se eliminan los sistemas de protección contra daño oxidativo (Kohanski *et al.*, 2007).

En 2014 Dwyer y colaboradores profundizaron el estudio de las alteraciones fisiológicas en el estado redox de la célula inducidas por los antibióticos como parte de su letalidad. Vieron que éstas son sensibles al tipo de antibióticos utilizados y además ponen de manifiesto la influencia de las condiciones ambientales, como el nivel de aireación y la disponibilidad de aceptores de electrones terminales. Por ejemplo, la presencia de nitrato potencia la letalidad de los antibióticos en cultivos anaeróbicos, apoyando la noción de que la respiración celular está implicada en la nocividad del antibiótico y que los compuestos capaces de activar la cadena transportadora de electrones pueden mejorar la letalidad de los mismos. Esto sugiere que la manipulación extrínseca del metabolismo de la célula bacteriana puede ser utilizada para mejorar la eficacia en la letalidad de los antibióticos existentes (Dwyer *et al.*, 2014).

Lobritz y colaboradores (2015) estudiaron la interacción entre antibióticos bacteriostáticos y bactericidas. Las dos clases de antibióticos fueron capaces de perturbar la respiración celular. La mayoría de los antibióticos bacteriostáticos inhiben uno de los procesos metabólicos que consume gran parte de la energía celular, la síntesis de proteínas. Esto se asocia a una disminución de la respiración celular y a la supresión del metabolismo central. Los autores sugieren que la inhibición de procesos celulares tales como la transcripción del ADN o traducción del ARN puede reducir la demanda de energía y secundariamente suprimir las tasas de respiración celular y la producción de ATP. Esto lleva a la célula a un estado metabólico que no provoca su muerte. Por otro lado, la muerte celular ocasionada por los antibióticos bactericidas se asocia a una aceleración de la respiración. De hecho la actividad bactericida puede ser detenida mediante la atenuación de la respiración o se puede mejorar la eficacia de estos antibióticos mediante el aumento de la respiración basal. Los antibióticos alteran el estado metabólico de las bacterias, lo que contribuye a la letalidad o a la tolerancia resultante y las condiciones ambientales influyen en la susceptibilidad a los antibióticos (Lobritz *et al.*, 2015).

La Figura 1.23 esquematiza un resumen de la letalidad de los antibióticos bactericidas.

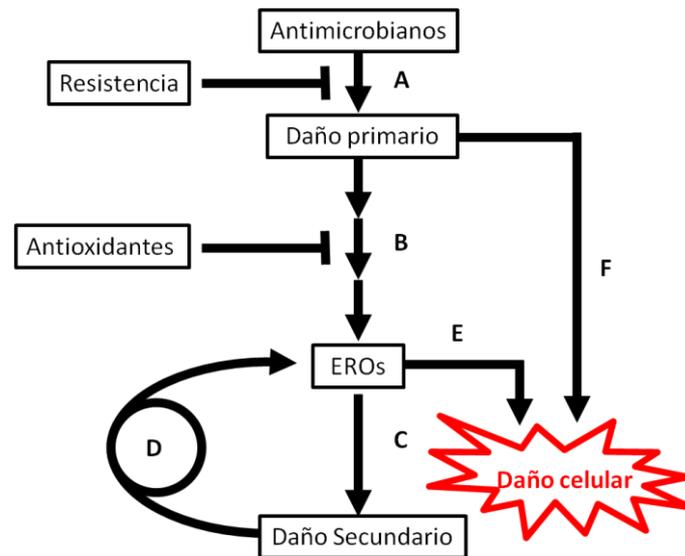


Figura 1.23. Principales pasos en acción letal de los antibióticos. **(A)** El tratamiento con un antimicrobiano letal conduce a daño primario que es característico del tipo de antibiótico usado. **(B)** El daño primario estimula una alteración del estado redox de la célula que finalmente resulta en la formación de ERO. Esto puede ser bloqueado tratando a las células con quelantes de hierro y antioxidantes. **(C)** Las ERO terminan por causar un daño secundario que afecta a los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. **(D)** A su vez el daño secundario estimula la producción adicional de ERO. Cuando el daño secundario supera un umbral crítico, se auto-amplifica. **(E)** Esta auto-amplificación de ERO asegura la muerte celular. **(F)** Si el daño primario es lo suficientemente grave, puede causar la muerte directamente, es decir, sin la necesidad de ERO a pesar de la acumulación de ERO.

2. Hipótesis y Objetivos

Se plantea la hipótesis de este trabajo con base en los siguientes antecedentes:

- La microcina es capaz de inhibir enzimas de la cadena respiratoria de *E. coli* involucrando un aumento de la producción de superóxido (Bellomio *et al.*, 2007).
- En condiciones de anaerobiosis la MccJ25 pierde actividad antimicrobiana, indicando que es necesaria la presencia de oxígeno para observar el efecto sobre la membrana celular (Bellomio *et al.*, 2007).
- La microcina inhibe la actividad enzimática del complejo III (citocromo *c* reductasa) de la membrana interna de la mitocondria (Niklison Chirou *et al.*, 2004; Niklison-Chirou *et al.*, 2010).

HIPÓTESIS

La microcina J25 actúa a nivel de las oxígeno-reductasas terminales de la cadena respiratoria de *E. coli*.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el mecanismo de acción de la MccJ25 sobre la cadena respiratoria de *E. coli*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el efecto *in vivo* de la MccJ25 sobre bacterias mutantes en las oxidasas terminales analizando la sensibilidad en medio sólido y medio líquido como así también el efecto sobre la respiración celular.
- Evaluar el efecto *in vitro* de la MccJ25 sobre enzimas de la cadena respiratoria de *E. coli* y la producción de especies reactivas del oxígeno utilizando membranas celulares aisladas de las cepas mutantes.
- Purificar y caracterizar a los citocromos *bdI* y *bo₃* para estudiar el efecto de la MccJ25 y análogos en la actividad enzimática.

3. Materiales y Métodos

a) Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y plásmidos que se usaron en este trabajo de tesis se muestran en la tabla 2.1. De cada una/o de ellas se destacan las características relevantes y la fuente de procedencia o referencia bibliográfica.

Tabla 2.1. Descripción de cepas bacterianas y plásmidos empleados en este trabajo de tesis.

Cepas	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> AB259	HfrH <i>supQ80</i> λ . <i>relA1 spoT1 thi-1</i>	CGSC
<i>E. coli</i> C43 (Todos los citocromos presentes)	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)(DE3)</i>	Lucigen
<i>E. coli</i> C43 Δ <i>bdI</i> (Citocromos presentes: <i>bo₃</i> y <i>bdII</i>)	C43 (DE3) <i>cydABX</i>	R.B. Gennis*
<i>E. coli</i> C43 Δ <i>bdI</i> Δ <i>bdII</i> (Citocromo presente: <i>bo₃</i>)	C43 (DE3) <i>cydABX, appBCX</i>	(Hoeser <i>et al.</i> , 2014)
<i>E. coli</i> C43 Δ <i>bo₃</i> (Citocromos presentes: <i>bdI</i> y <i>bdII</i>)	C43(DE3) <i>cyo::kan, Km^r</i>	(Yap <i>et al.</i> , 2007))
<i>E. coli</i> C43 Δ <i>bo₃</i> Δ <i>bdII</i> (Citocromo presente: <i>bdI</i>)	C43(DE3) <i>cyo::kan, appBCX, Km^r</i>	R.B. Gennis*
<i>Salmonella enteritidis</i> Serovar Newport	Aislamiento clínico	FBQF-UNT
Plásmidos	Descripción	Referencia
pTUC200	pBR322 <i>mcjABCD</i> ⁺ , Ap ^r	(Delgado y Salomón, 2005)
pTopoY9F	pCR2.1-Topo <i>mcjA</i> ⁺ (Tyr ⁹ xPhe), Ap ^r	(Chalón <i>et al.</i> , 2009)
pTUC203-6	pACYC184 <i>mcjBCD</i> ⁺ <i>mcjA::Tn5, Km^r</i>	(Solbiati <i>et al.</i> , 1996)
pGC01	pBR322 <i>fhuA</i> ⁺ , Ap ^r	(Carmel <i>et al.</i> , 1990)
pET <i>bdI</i>	pET17-b <i>cydABX</i> ⁺ , Ap ^r	(Yang, Ke, 2007)
pET <i>bo₃</i>	pET17-b <i>cyoABCD</i> ⁺ , Ap ^r	(Frericks <i>et al.</i> , 2006)

Ap^r, resistencia a ampicilina; Km^r, resistencia a kanamicina. CGSC, *E. coli* Genetic Stock Center.

*Colaboración del Dr. R.B. Gennis. Departamento de Bioquímica, Universidad de Illinois, Urbana, EEUU.

b) Medios de cultivo, drogas y reactivos

i) Medios de Cultivo

El agar y los medios de cultivo LB (Luria Bertani) y medio mínimo de sales M9 así como los suplementos usados, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. El medio mínimo M9 fue suplementado con glucosa o glicerol (0,2%, p/v); vitamina B1 (1 µg/ml); MgSO₄·7H₂O (1mM), luego de autoclavar. El medio mínimo también se suplementó con 0,05 % de hidrolizado enzimático de caseína (casaminoácidos, Sigma-Aldrich).

Para medios sólidos se agregó agar al 1,5 % (p/v) y para realizar los tapices para los ensayos de actividad antimicrobiana se usó agar semisólido, al 0,6%.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a una atmósfera de sobrepresión (121°C) durante 20 minutos.

ii) Antibióticos

Los antibióticos se utilizaron en las siguientes concentraciones finales: Ampicilina (Ap), 50 µg/ml; Kanamicina (Km), 30 µg/ml. Las soluciones madre de los antibióticos se prepararon a la concentración de 10 mg/ml con agua destilada estéril. Las soluciones stock de antibióticos se conservaron a 4°C y se agregaron a los medios de cultivo después de esterilizar.

c) Obtención, purificación y cuantificación de los péptidos

i) Purificación de MccJ25 e Y9F

Los péptidos MccJ25 y MccJ25 (Y9F) fueron purificados mediante cromatografía de fase reversa (Blond *et al.*, 1999) a partir de sobrenadantes de cultivos de cepas de AB259 transformadas con los respectivos plásmidos, pTUC200 y pTopoY9F- pTUC203-6. Se inocularon tres litros y seis litros de medio mínimo M9 suplementado con cultivos de las células productoras de MccJ25 y MccJ25 (Y9F) respectivamente crecidos toda la noche a 37 °C con agitación. Los cultivos para la producción fueron llevados a cabo en erlenmeyers de dos litros conteniendo un litro de medio mínimo M9 suplementado con glucosa, tiamina y sulfato de magnesio. Después de 36 horas de incubación a 37 °C con agitación, las células fueron separadas del sobrenadante mediante centrifugación a 6000 x *g* durante 45 minutos a 4 °C en centrifuga Sorvall RC5B equipada con rotor GSA. El sobrenadante se filtró dos veces por un embudo filtrante conteniendo tierra de diatomea (Sigma-Aldrich) entre tres capas de papel de filtro para remover detritos celulares y células no sedimentadas. Finalmente, el sobrenadante fue filtrado mediante una membrana de

nitrate de celulosa con tamaño de poro 0,45 μm o 0,22 μm . El filtrado libre de células fue sembrado en un cartucho de fase reversa C8 (StrataTM, Phenomenex). Se realizó elución isocrática en etapas, usando soluciones de metanol grado pro-análisis (Cicarelli, Argentina) en agua destilada al 20 %, 40 %, 80 % y 100 % (v/v). Las fracciones eluidas con metanol 20 y 40 % fueron descartadas, mientras que la fracción al 80 % y 100 %, libre de pigmentos y que contenían actividad antibiótica, fueron reducida al vacío mediante un equipo rotavapor (Heidolph – Hei-VAP advantage) para eliminar el metanol. La fracción acuosa conteniendo actividad antibiótica fue filtrada en membrana de nitrate de celulosa con tamaño de poro de 0,22 μm y sembrada mediante una bomba de inyección (Waters) en una columna de HPLC semipreparativa de fase reversa C18, RP-HPLC (Waters μ BondapakTM C18 – 10 μm de 300 x 19 mm) a un flujo de 4 ml.min⁻¹. La muestra fue sometida a cromatografía de fase reversa de alto rendimiento en equipos Gilson. Como fase móvil se usó H₂O bidestilada con TFA 0,1 % (v/v) como solvente A y acetonitrilo al 100 % para cromatografía de fase líquida (Merck) con TFA 0,1 % como solvente B. La elución se realizó a un flujo de 4 ml.min⁻¹ mediante un gradiente lineal de 0 a 46 % de B en 10 minutos, manteniendo constante la composición de la fase móvil a 46 % de B durante 18 minutos. Se siguió el desarrollo cromatográfico midiendo la absorbancia del eluido a 275 nm. Las fracciones de 2 ml colectadas que mostraron actividad antibiótica contra la cepa indicadora de *Salmonella enterica* serovar Newport y que formaban parte de un único pico cromatográfico fueron colectadas y concentradas en rotavapor a fin de remover el solvente orgánico de la fase móvil. La muestra acuosa fue liofilizada y conservada a -20 °C hasta su uso. La composición de los péptidos fue analizada mediante espectrometría de masa. Los resultados mostraron picos con la relación masa/carga (m/z) esperada para cada una de las muestras y confirmaron la correcta formación del anillo de los péptidos.

ii) Obtención de MccJ25-GA

El derivado amidado en el extremo C-terminal de la molécula de MccJ25, MccJ25-GA, incapaz de actuar sobre la ARNP fue purificado de acuerdo a una modificación del procedimiento descrito por Bellomio y colaboradores (2003). Para llevar a cabo la amidación, a una solución de MccJ25 (1 mg/ml) preparada en fosfato de sodio 200 mM (pH 4,75), se le agregó GME sólido (Sigma-Aldrich), para obtener una concentración final de 1,0 M. Una vez solubilizado el GME, se agregó EDAC (Sigma-Aldrich) sólida, recién pesada para evitar que se hidrate, hasta alcanzar una concentración final de 0,1 M. Al cabo de una hora la reacción se detuvo con el agregado de igual volumen de buffer acetato de sodio 1,0 M (pH 4,75). Para resolver el problema de separar cada uno de los péptidos de la mezcla se prefirió modificar el protocolo original y realizar una cromatografía de

intercambio aniónico usando un equipo de FPLC (Pharmacia Biotech) y una columna Protein-Pak™ DEAE 8HR (Waters AP-1) en lugar de una RP-HPLC. Como fase móvil se usó buffer Hepes 10 mM (pH 8) (buffer A) y buffer Hepes 10 mM - NaCl 500 mM (pH8) (buffer B). La elución se realizó a un flujo de 1 ml.min⁻¹. Una vez sembrada la muestra se pasaron dos volúmenes y medio de columna de buffer A y luego se realizó un gradiente lineal de 0 a 100 % de B en 20 minutos. La cromatografía de intercambio iónico permitió usar la diferencia de carga de los péptidos sin modificar y modificados como herramienta de separación. La MccJ25 nativa tiene una carga negativa por arriba de un pH 4-4,5 debido a la desprotonación del carboxilo terminal. Llevando a cabo una cromatografía a pH 8 y usando un buffer de baja fuerza iónica el carboxilo de la MccJ25 nativa interacciona con la matriz de la columna. Por el contrario, la MccJ25-GA modificada en su extremo C-terminal no es capaz de unirse a la columna al no tener carga negativa debido a la amidación del grupo carboxilo. La MccJ25-GA eluye con el volumen muerto de la columna (volumen de fase móvil que se requiere para eluir una especie no retenida) y el análogo amidado eluye apenas comienza el gradiente. Se siguió el desarrollo cromatográfico midiendo la absorbancia del eluido a 278 nm. Las fracciones de 1 ml colectadas que mostraron actividad antibiótica contra la cepa indicadora de *Salmonella* Newport fueron colectadas y concentradas a sequedad en un evaporador rotatorio al vacío (Thermo Scientific™ Savant™ SPD111V SpeedVac™ Concentrator). La muestra fue finalmente resuspendida en metanol 100 % y centrifugada a máxima velocidad durante 30 minutos para separar las sales precipitadas. Se conservó a -20 °C hasta su uso. La composición del péptido modificado fue analizada mediante espectrometría de masa. El espectro mostró una relación masa/carga (m/z) esperada.

iii) Determinación de la concentración de los péptidos

Los distintos péptidos liofilizados se resuspendieron en metanol grado HPLC para preparar soluciones madre. La concentración de la solución madre se determinó espectrofotométricamente a 278 nm en cubetas de cuarzo (Beckman DU7500). El coeficiente de extinción en metanol empleado para MccJ25 y MccJ25-GA que poseen dos residuos de tirosina y dos de fenilalanina fue de $\epsilon_{278\text{nm}} = 3340 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Bellomio *et al.*, 2005), mientras que para el péptido Y9F el coeficiente de extinción molar usado fue de $\epsilon_{278\text{nm}} = 1680 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

d) Ensayos de actividad antimicrobiana. Determinación de la CIM

La determinación de la sensibilidad bacteriana hacia los péptidos se determinó calculando la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los mismos en medio sólido. Se

prepararon diluciones dobles seriadas en detergente tween 80 al 0,1 % de los péptidos a ensayar a partir de una solución de concentración conocida (500 μ M). Se depositó 10 μ l de cada dilución en una placa de M9 sólido secada en una estufa a 50 °C durante 20 minutos. Las gotas se dejaron absorber y se esparció sobre la placa un tapiz de agar semisólido (5 ml) inoculado con 20 μ l de la cepa a ensayar crecidas hasta una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,8. Al cabo de 16 horas de incubación se examinaron los halos de inhibición del crecimiento. La CIM se calculó a partir de la última dilución capaz de producir un halo visible de inhibición de crecimiento bacteriano. Por la sensibilidad del ensayo usado, para afirmar que dos CIMs son diferentes, estas deben diferir al menos en una magnitud de dos diluciones.

e) Técnicas de Ingeniería Genética

i) Aislamiento de ADN plasmídico

Para la purificación de plásmidos se partió de un cultivo en LB en fase estacionaria con el (los) antibiótico adecuado, inoculados con una colonia de la cepa bacteriana que contenía el plásmido de interés y crecidos con agitación a 37 °C. Los plásmidos fueron purificados con un kit de extracción de ADN comercial (*AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit*, BIONEER), siguiendo las instrucciones del fabricante.

ii) Preparación de células competentes

Para preparar células competentes, se inocularon 10 ml de LB con 200 μ l de un cultivo en fase estacionaria de la cepa a transformar. Se cultivó con agitación vigorosa a 37 °C hasta fase exponencial temprana ($DO_{600} \sim 0,1-0,2$). Se transfirió asépticamente a tubo estéril previamente enfriado en hielo. Las células se cosecharon por centrifugación a 4000 $\times g$, durante 10 minutos. Luego de descartar el sobrenadante se invirtió el tubo sobre papel absorbente durante 1 minuto y el precipitado celular se resuspendió, sin vortex, en 4 ml de $CaCl_2$ 0,1 M previamente enfriado en hielo, dejándose luego en baño de hielo durante 20 minutos. Las células se recuperaron por centrifugación a 4000 $\times g$, a 4 °C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y nuevamente se pusieron los tubos en posición invertida por un minuto para permitir el drenaje de las últimas trazas de líquido. Finalmente, el precipitado celular fue resuspendido suavemente en 0,5 ml de una solución de $CaCl_2$ 75 mM, KCl 10 mM y glicerol 15 % previamente enfriada en un baño de hielo. Las células competentes así obtenidas, se conservaron a -70 °C hasta el momento de la transformación.

iii) Transformación con ADN plasmídico

Para realizar las transformaciones, se transfirieron 100 μl de la suspensión de células competentes obtenidas previamente y descongeladas en baño de hielo, a un tubo de vidrio estéril de paredes delgadas previamente enfriado en hielo. Se añadieron 3 μl de ADN plasmídico y se mezcló por agitación suavemente. Se incubó en hielo durante 30 minutos y rápidamente se transfirió el tubo a un baño de agua precalentado a 42 °C, donde se incubó exactamente durante 90 segundos. Rápidamente se llevó nuevamente el tubo al baño de hielo para permitir que las células se enfriaran durante 15 minutos y se agregó 900 μl de LB. Posteriormente, las células se incubaron 1 hora en un baño a 37 °C con agitación, para permitir la recuperación de las bacterias y la expresión de la resistencia antibiótica codificada por el plásmido. Finalmente, se diseminó una alícuota de 100 μl de las células competentes transformadas sobre placas de LB conteniendo el antibiótico adecuado para la selección de las transformantes. Como control, se trataron de la misma manera 100 μl de células competentes sin el agregado de ADN plasmídico.

f) Ensayo de consumo de oxígeno en células bacterianas

Se midió polarográficamente el consumo de oxígeno de células bacterianas mediante un oxígrafo equipado con un electrodo tipo Clark sumergido en una cámara termosatizada a 37 °C y con agitación constante (Respirómetro de alta resolución - OROBOROS Oxygraph-2k). Los electrodos se calibraron saturando el buffer de muestra con aire, burbujeando vigorosamente y hasta obtener una señal estable, la cual se tomó como 100 % de saturación de O₂. El 0 % de saturación se consiguió con el agregado de un cultivo celular. Los cultivos bacterianos fueron crecidos en medio LB hasta una DO_{600nm} de 0,8. Fueron cosechados mediante centrifugación a 8500 x *g* durante 10 min y lavados dos veces con medio M9. Las células fueron resuspendidas a una DO_{600nm} de 0,2 en LB y luego se dividieron en alícuotas de 2,5 ml en tubos de vidrio con tapa a rosca de 150 x 20 mm. Los péptidos estudiados disueltos en metanol (20 μM) se agregaron lentamente mientras se agitaba vigorosamente. La proporción de metanol en el medio nunca fue mayor al 1 %. Luego de 30 minutos de preincubación a 37 °C, las células fueron transvasadas a la celda del oxígrafo para determinar la concentración de O₂. Se inició el ensayo agregando glicerol 0,2 % (p/v) como fuente de carbono. Se midió la velocidad de consumo de oxígeno calculando la pendiente de las curvas de cantidad de oxígeno disuelto en función del tiempo. Como el ensayo se llevó a cabo en medio líquido LB, luego de cada medición se leyó nuevamente la DO_{600nm} para referir los valores de velocidad obtenidos a la misma.

Para calcular el porcentaje de cambio de la tasa de consumo de O₂ en los diferentes ensayos, siempre se refirieron los valores obtenidos en presencia del péptido a un control metanólico sin péptido de la siguiente manera:

$$\% = \frac{\text{Valor obtenido en presencia de péptido} - \text{Valor del control}}{\text{Valor del control}} \times 100$$

g) Recuento de células viables

Las curvas de crecimiento se realizaron en frascos de vidrio conteniendo 10 ml de medio de cultivo M9 suplementado, inoculados con 100 µl de un cultivo de la cepa de *E. coli* C43 (pGC01) a estudiar, crecido aeróbicamente durante toda la noche con ampicilina. Los cultivos fueron incubados con agitación a 37°C. Cuando se alcanzó una DO_{600nm} de 0,8 los cultivos fueron divididos en dos. Una parte representaba la situación control y la otra el tratamiento con MccJ25 20 µM. Se incubó durante 30 minutos más y luego se extrajeron alícuotas para realizar el recuento de viables. Las alícuotas extraídas fueron diluidas en M9 sin suplementar y 100 µl de cada dilución fueron esparcidos en placas de LB con ampicilina, las cuales se incubaron toda la noche a 37 °C. Una vez crecidas las colonias se procedió al recuento de las mismas.

h) Obtención de membranas bacterianas

Las membranas bacterianas fueron obtenidas como se describió previamente (Evans, 1969). Las células fueron cultivadas en medio LB, con agitación a 37°C hasta fase exponencial tardía del crecimiento (DO_{600nm}~0,6). Las células se cosecharon por centrifugación (4.000 x g durante 40 minutos) y se resuspendieron en un volumen mínimo de buffer Tris-HCl 20 mM - MgCl₂ 1 mM (pH 7,5) (buffer T). Luego fueron lisadas usando una prensa French a 1100 psi (Thermo French Press – Cell Disrupter). Las mismas se mantuvieron en baño de hielo durante todo el proceso. Los restos celulares fueron separados de la suspensión de membranas por centrifugación (8.000 x g, 4°C, 10 min). La suspensión de membranas se centrifugó 1 hora a 76.000 x g a 4°C en una ultracentrífuga (Beckman Coulter - USA) y el precipitado de membranas fue luego resuspendido en buffer T. Las membranas fueron nuevamente centrifugadas en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en buffer T; en un volumen 1000 veces menor que el volumen del cultivo bacteriano original. Finalmente, se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

i) Producción de ERO en membranas celulares

Para evaluar la producción de ERO producidas por las suspensiones de membranas bacterianas se empleó la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). La sonda en una forma diacetilada, diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA, Molecular Probes-Invitrogen), se emplea para determinar la formación de ERO intracelular. Esta sonda es un derivado de la fluoresceína que no presenta fluorescencia en su estado reducido y es capaz de ingresar pasivamente dentro de las células. Una vez en el interior, esterasas intracelulares clivan los grupos acetato, impidiendo que la sonda difunda fuera de la célula (DCFH). En presencia de agentes oxidantes como las especies reactivas del oxígeno (H_2O_2 , $O^{\cdot-}$, HO^{\cdot}), la sonda es oxidada (DCF) y emite fluorescencia entre 517-520 nm al ser excitada entre 492-495 nm. De esta manera, puede ser usada como un sensor inespecífico de estrés oxidativo intracelular (LeBel *et al.*, 1992). Como se quería llevar a cabo las mediciones con membranas celulares aisladas por lo tanto no se contaba con las esterasas propias de la célula se realizó una hidrólisis de la DCFH-DA para eliminar los grupos acetatos por el método de Cathcart y colaboradores (1983). El mismo consiste en poner la 500 μ l de DCFH-DA 1 mM preparada en etanol en condiciones alcalinas, 2 ml NaOH 0,01 N, durante 30 minutos a temperatura ambiente. El hidrolizado (DCFH) luego fue neutralizado con 10 ml de 25 mM de NaH_2PO_4 (pH 7,4) y almacenado en hielo (Cathcart *et al.*, 1983). Esta solución se preparó rutinariamente en el momento previo de las determinaciones. Las membranas celulares purificadas (0,1 mg/ml) se incubaron con DCFH (3 μ M) y MccJ25 (20 μ M) en buffer fosfato de potasio 20 mM pH 7,4. Se llevó a cabo un control con metanol. La reacción se inició mediante el agregado de succinato de sodio 10 mM y se llevó a cabo a 37 °C con agitación. El ensayo se realizó en presencia y en ausencia de superóxido dismutasa (SOD) 10 UE concentración final. Las reacciones fueron seguidas durante 30 minutos en un espectrofluorómetro para microplaca usando un filtro de emisión con un corte a 515 nm.

j) Determinación de la actividad enzimática de la NDH deshidrogenasa

i) Actividad NADH deshidrogenasa

La actividad NADH deshidrogenasa presente en los extractos de membrana bacteriana, se determinaron como se describió previamente en buffer fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4) (Rodríguez-Montelongo *et al.*, 1995). La mezcla de reacción conteniendo extracto de membranas (concentración final 10 μ g/ml de proteínas), MTT (50 μ g/ml) y cianuro de potasio (6 mM), fue preincubada durante 10 min a 37 °C con MccJ25 (20 μ M). Siempre se incluyó un control con metanol y sin péptidos. El volumen de metanol nunca fue mayor al

1 % de la mezcla de reacción. Luego, se transvasó a una cubeta para espectrofotometría, se agregó el sustrato (NADH 0,5 mM) y se registró la absorbancia a 570 nm del formazán que se forma por la reducción del aceptor de electrones artificial MTT.

ii) Actividad NADH oxidasa

La actividad NADH oxidasa se determinó de manera similar a la actividad NADH deshidrogenasa. Sin embargo, en este caso no se realizó el agregado de MMT y KCN y la absorbancia del NADH se detectó a 340 nm.

k) Purificación de las oxidasas terminales de *E. coli*

i) Purificación del citocromo *bdl*

El citocromo *bdl* se purificó a partir de la cepa de *E. coli* (pET-*bdl*). Las células fueron cultivadas en medio LB, con agitación a 37°C hasta fase exponencial tardía del crecimiento ($DO_{600nm} \sim 0,6$). En ese momento se agregó IPTG 0,5 mM y se dejó durante 4 horas. Las células se cosecharon por centrifugación ($4.000 \times g$ durante 40 minutos) y se resuspendieron en un volumen mínimo de buffer fosfato de potasio 20 mM (pH 6,4), $MgSO_4$ 5 mM, DNAsas 0,5 mM y PMSF 5 mM. Todos los pasos fueron llevados a cabo en frío (baño de hielo o cámara fría). La suspensión fue lisada usando una prensa French a 1100 psi. Éste paso se repitió tres veces. Los restos celulares fueron separados por centrifugación ($8.000 \times g$, 4°C, 10 min). El sobrenadante obtenido se centrifugó 1 hora a $76.000 \times g$ a 4°C. El pellet fue solubilizado en buffer fosfato de potasio 20 mM (pH 6,4) en presencia de detergente n-dodecil- β -maltósido (DDM) 1 % durante 4 horas con un agitador magnético a bajas revoluciones. El solubilizado fue nuevamente centrifugado 1 hora a $76.000 \times g$ a 4°C. El precipitado fue descartado y el sobrenadante se sembró en una columna de intercambio iónico DEAE-Sepharose (Sigma-Aldrich). La proteína se eluyó con un gradiente desde 100 hasta 500 mM de KCl en buffer fosfato 20 mM - DDM 0,05 % (pH 6,4). Se colectaron fracciones de 2 ml y aquellas con una relación de absorbancia A_{412}/A_{646} mayores a 0,6 se juntaron y se concentraron en un Amicón con un punto de corte de 50 kDa hasta aproximadamente 2 ml. Luego se realizó una diálisis en un litro de buffer fosfato de potasio 20 mM - DDM 0,05 % (pH 6,4) durante toda la noche. Finalmente, se realizó una cromatografía de exclusión molecular (Figura 2.1) como paso adicional de purificación. Se usó una columna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare Life Sciences). La cromatografía se realizó en buffer fosfato de potasio 20 mM - DDM 0,05 % (pH 6,4). Las fracciones centrales del pico único se juntaron y se concentraron nuevamente con un amicón de 50 kDa. Se fraccionó y se guardaron las fracciones a -70 °C.

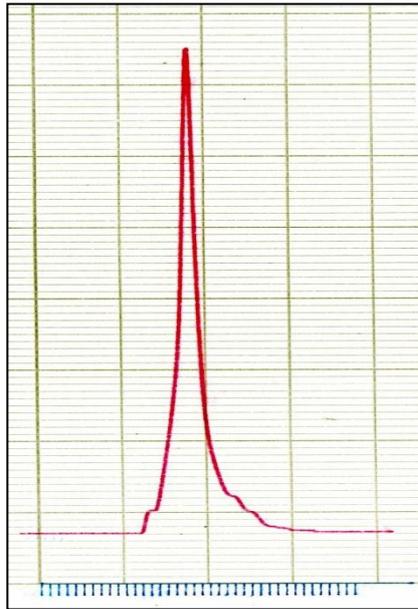


Figura 2.1. Purificación de citocromo *bdI*. Cromatograma de FPLC correspondiente a la cromatografía de exclusión molecular

ii) Propiedades espectrales. Cuantificación del citocromo *bdI*

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Kita y colaboradores (1984 a). Los espectros del citocromo oxidado (manera en que se lo purifica) y reducido completamente con ditionito de sodio fueron tomados a temperatura ambiente mediante un barrido entre los 400 y 700 nm. La diferencia de la absorción del espectro reducido menos la absorción del espectro oxidado exhibe una absorbancia típica y característica. Para calcular la concentración del citocromo *bdI* se usó el coeficiente de $10,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el par de longitudes de onda 628 y 607 nm a partir de la mencionada diferencia de absorción (Borisov *et al.*, 1999).

$$\text{Absorbancia} = \text{Abs } 628\text{nm (red - ox)} - \text{Abs } 605 \text{ nm (red - ox)}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia}}{\epsilon} \times \text{dilución}$$

iii) Purificación del citocromo *bo₃*

El citocromo *bo₃* se purificó a partir de la cepa de *E. coli* (pET-*bdI*). El cultivo celular se procesó de la misma manera descrita en la sección 2.j.i hasta el momento de la cromatografía. Como en éste caso la proteína tiene una etiqueta 6XHis-Tag C-terminal en

la subunidad II, se llevó a cabo una cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), usando una columna con una resina de Ni^{+2} (HisTrap™ HP- GE Healthcare Life Sciences). La columna se equilibró con buffer fosfato de potasio 50 mM, DDM 0,05 %, imidazol 25 mM (pH 8,3) y se realizó un gradiente desde 25 hasta 300 mM de imidazol. El citocromo b_{o_3} eluyó entre 100-130 mM. Las fracciones se juntaron y se concentraron en un Amicón con un punto de corte de 100 KDa hasta aproximadamente 2 ml. Luego se realizó una diálisis en un litro de buffer fosfato de potasio 50 mM - DDM 0,05 % - 1 mM EDTA (pH 8,3) durante toda la noche. Se fraccionó y se guardaron las fracciones a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

iv) Propiedades espectrales. Cuantificación del citocromo b_{o_3}

Los espectros del citocromo oxidado y reducido completamente con ditionito de sodio fueron tomados a temperatura ambiente mediante un barrido entre los 350 y 700 nm. La concentración del citocromo b_{o_3} se calculó a partir de la banda de absorción de Soret de la enzima oxidada usando el coeficiente $\epsilon_{407\text{nm}} = 183\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Forte *et al.*, 2016).

I) Detección de la actividad peroxidasa del citocromo b_{dI} en geles de SDS-PAGE

Para detectar la actividad de la peroxidasa asociada a los grupos hemo se usó una modificación del protocolo de Thomas y colaboradores (1976). Se preparó un gel de poliacrilamida sin SDS y se dejó toda la noche a 1 mA/gel para remover el exceso del persulfato de amonio. El SDS se introdujo en el gel durante la pre-electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara fría en oscuridad y con una intensidad de corriente constante de 10 mA/gel. Las muestras se prepararon con Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM y glicerol 20 % concentración final. Inmediatamente antes de la electroforesis (10-15 minutos) se agregó el SDS con una relación final de 3 mg de SDS/mg de proteína a temperatura ambiente. Se obvió la presencia de agentes reductores como el β -mercaptoetanol. En el momento de llevar a cabo la tinción se preparó una solución al 0,05 % concentración final de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4. El gel se sumergió en la solución durante una hora en oscuridad con una leve agitación. Transcurrido el tiempo se agregó H_2O_2 a una concentración final de 0,015 %. El revelado se llevó a cabo mediante la detección cromogénica de la actividad HPR asociada al citocromo debido a que el DAB en presencia del H_2O_2 precipita dando un producto insoluble de color marrón. La tinción es visible a los tres minutos e incrementa dentro de los 30 minutos. Para remover cualquier precipitado de DAB y aclarar el fondo del gel y aumentar la intensidad de teñido se lavó el gel con isopropanol:acetato de sodio 250 mM pH 5 (3:7) (Thomas *et al.*, 1976).

m) Detección del citocromo bo_3 por Western blot

Las proteínas de la fracción conteniendo el citocromo bo_3 fueron separadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa mediante un dispositivo de electrotransferencia semi-seco (Bio-Rad TransBlot SD). El bloqueo de la membrana se realizó durante 16 horas a temperatura ambiente en 40 ml de buffer de bloqueo (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,9 %, albúmina sérica bovina 3%). La membrana fue incubada con agitación suave durante 1 hora en 6 ml de una dilución del anticuerpo primario de ratón (anti-His-Tag, dilución 1:6000 en buffer de bloqueo), y posteriormente se lavó tres veces con 30 ml de buffer de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,9 %, Tween-20 0.005%) durante 5 minutos. Luego se incubó en 6 ml de una dilución de anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con HRP (dilución 1:10000 en buffer de bloqueo) y se lavó tres veces con 30 ml de buffer de lavado durante 5 min. El revelado se llevó a cabo mediante la detección cromogénica de la actividad de la HPR luego del agregado de DAB dando un producto insoluble color marrón.

n) Actividad ubiquinol oxidasa de los citocromos purificados

La actividad ubiquinol oxidasa se obtuvo midiendo la tasa de consumo de oxígeno en un oxígrafo equipado con un electrodo tipo Clark (OROBOROS Oxygraph-2k). El consumo de oxígeno disuelto se midió en buffer fosfato de potasio 20 mM - DDM 0,05 % (pH 6,4). El péptido fue preincubado con 0,5 μ g citocromo por 10 minutos. La mezcla de reacción también contenía DDT 4 mM (Promega) como un reductor constante de la coenzima Q_1 (Sigma-Aldrich) que fue la encargada de iniciar la reacción luego de la incubación con el péptido.

o) Reducción de la coenzima Q_1 a ubiquinol-1 (QH_2)

La quinona reducida, QH_2 , se preparó a partir de la ubiquinona comercial Q_1 por reducción con borohidruro de sodio (Bennett *et al.*, 1996). La coenzima Q_1 se disolvió en 200 μ l de etanol para lograr una concentración 10 mM y fue transferida a un tubo de vidrio con tapa. Se agregaron 100 μ l de HCl 1,2 N y seguidamente se adicionaron unos granos (aproximadamente 5 mg) de $NaBH_4$ hasta obtener una solución incolora, completamente reducida. Durante el proceso se forman burbujas en el medio de reacción debido a la formación de H_2 . En el momento en que éstas ceden se procede a la extracción de QH_2 mediante el agregado de 400 μ l ciclohexano. Se agitó la mezcla en un vortex y se dejó en reposo unos minutos hasta que se observó una separación de fases. Una vez

separadas, la fase orgánica (fase en donde difunde el ubiquinol) se transfirió rápidamente a otro tubo de vidrio seco y con tapa con el sumo cuidado para no tomar la fase acuosa. La extracción de QH₂ con ciclohexano se repitió dos veces. Todos los pasos fueron llevados a cabo en una campana de seguridad y se disponía de una atmósfera de N₂ para evitar la oxidación de la muestra. Un vez obtenida la QH₂ en ciclohexano, el solvente se evaporó y finalmente se resuspendió en 200 µl de etanol anhidro y se guardó la solución a -20 °C hasta el momento de su uso siempre al resguardo de la luz. Debido a la inestabilidad de la misma, la solución de QH₂ se preparó en el día y unos momentos antes de realizar el ensayo. La concentración de QH₂ se midió espectrofotométricamente usando el $\epsilon_{290\text{ nm}}$ de 4 mM⁻¹ cm⁻¹.

p) Producción de ERO en los citocromos purificados

Para evaluar la producción de especies reactivas también se usó la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA, Molecular Probes-Invitrogen) desacetilada como se indica en el apartado 2.i. Los citocromos purificados (0,5 µg) se incubaron con DCFH 3 (µM) y MccJ25, MccJ25 Y9F o MccJ25-GA (20 µM) en buffer fosfato de potasio 20 mM – DDM 0,05 % (pH 7,4). Se llevó a cabo un control con metanol. La reacción se inició mediante el agregado de ubiquinol-1 (350 µM) y se llevó a cabo a 37 °C con agitación. El ensayo se realizó en presencia y en ausencia de superóxido dismutasa (SOD) 10 UE concentración final. Las reacciones fueron seguidas durante 30 minutos en un espectrofluorómetro para microplaca usando un filtro de emisión con un punto de corte de 515 nm.

q) Reducción de los citocromos purificados por MccJ25

En cubetas de cuarzo se colocaron 50 µg de citocromo en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4 - DDM 0,05 % con el agregado de KCN 6 mM de modo de producir un bloqueo del flujo de los electrones al oxígeno. Como control positivo de la reducción del citocromo se agregó al medio de reacción ditionito de sodio. Adicionalmente se realizó un control con DTT 4 mM y coenzima Q₁ 50 µM. Se evaluó la capacidad de la MccJ25 de ceder electrones al citocromo colocando una concentración elevada del péptido (400 µM). La reacción se siguió durante 15 minutos. Los espectros del citocromo oxidado y reducido por los diferentes reactivos fueron tomados a temperatura ambiente.

r) Análisis estadístico

Los gráficos y el análisis estadístico correspondiente de todos los datos de este trabajo se realizaron usando el programa GraphPad Prism 6.

4. Resultados y discusión

Anteriormente, se había observado un efecto inhibitorio sobre la actividad de algunas enzimas de la cadena respiratoria de *E. coli*, involucrando un aumento de la producción de superóxido. En condiciones de anaerobiosis la MccJ25 perdía la actividad antibiótica en cepas que poseían una ARNP resistente, indicando la necesaria presencia del oxígeno para observar el efecto sobre la membrana celular (Bellomio *et al.*, 2007). Por otro lado, también se había reportado que la MccJ25 inhibía la actividad enzimática del complejo III (citocromo *c* reductasa) en la cadena respiratoria de la mitocondria (Niklison Chirou *et al.*, 2004; Niklison-Chirou *et al.*, 2010). Con base en estos antecedentes y debido a que el blanco de acción de la MccJ25 en la membrana celular de *E. coli* no se conoce, se decidió evaluar el efecto de las oxidasas terminales para la acción de MccJ25 sobre la cadena respiratoria.

a) Obtención de MccJ25 y variantes

i) Obtención de MccJ25 y de MccJ25 Y9F

Para obtener microcina J25 y la mutante MccJ25 Y9F se empleó la cepa productora *E. coli* AB259 transformada con los plásmidos pTUC200 y pTopoY9F- pTUC203-6 respectivamente. Del sobrenadante se purificaron las microcinas maduras como se describe en la sección Materiales y Métodos. Se observaron los picos característicos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Figuras 3.1 A y B) y por espectrometría de masas (MS) se confirmó la identidad de los mismos. Es importante recalcar que cuando se purificó la variante Y9F no se encontró contaminación con MccJ25 nativa. Los espectros de MS/MS mostraron iones con m/z de 687 correspondiente al anillo de la molécula de MccJ25 (Gly1-Glu8), confirmando la integridad del mismo, lo cual es importante para el transporte del antibiótico dentro de la célula a través de su interacción con la proteína de membrana interna SbmA (de Cristóbal *et al.*, 2006).

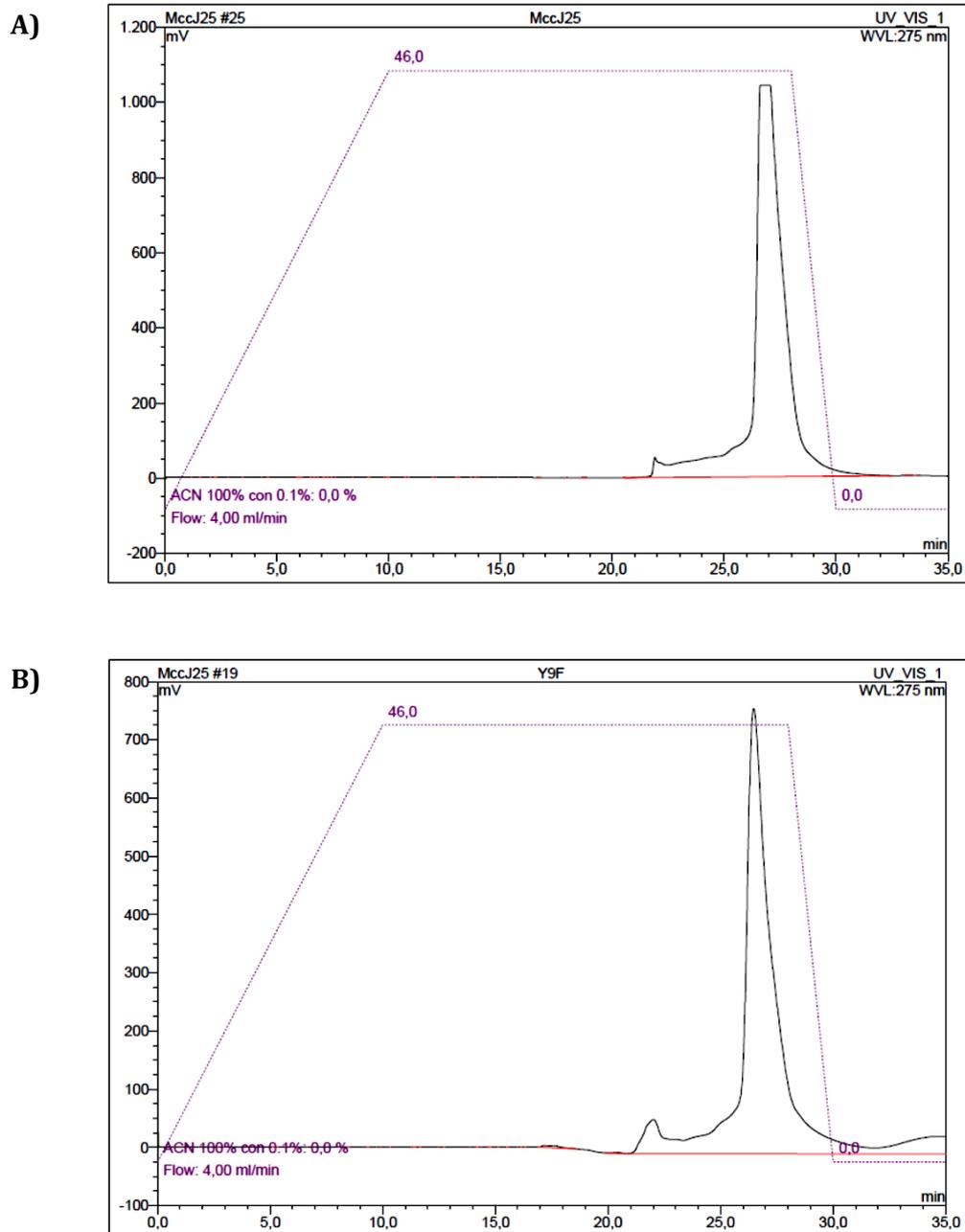


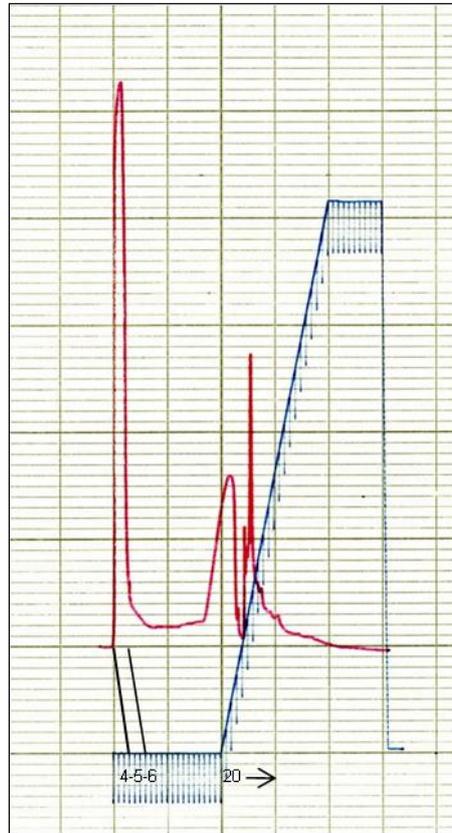
Figura 3.1. Cromatograma de RP-HPLC semipreparativa utilizada para la purificación de los péptidos eluidos previamente de una columna preparativa de fase reversa C8. Perfil de elución del péptido nativo MccJ25 (A) y de la variante Y9F (B).

ii) Obtención de la variante MccJ25-GA

Otra variante de MccJ25 que se empleó en esta tesis consiste en un derivado amidado en el extremo C-terminal de la molécula de MccJ25, denominada MccJ25-GA. El derivado obtenido es incapaz de actuar sobre la ARNP. La modificación se obtuvo por tratamiento con glicil metil ester previa activación del péptido con EDAC. Fue purificado de acuerdo al protocolo descrito detalladamente en la sección Materiales y Métodos. Se llevó a cabo por una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna de alta resolución,

Protein-Pak™ DEAE 8HR (Waters AP-1) (Figura 3.2.A). El análisis del péptido por espectrometría de masa reportó la señal masa/carga (m/z) esperada de 2178,30 Da (Figura 3.2.B) (Vincent *et al.*, 2005).

A)



B)

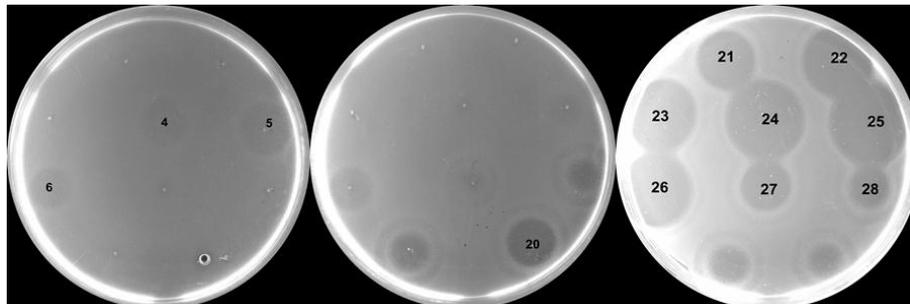


Figura 3.2. Purificación de MccJ25-GA. (A) Perfil de elución de la cromatografía de intercambio aniónico. **(B)** Ensayo de actividad antimicrobiana de las fracciones colectadas. Se colectaron las fracciones 4-6 y 20-28 correspondiente a MccJ25-GA y a MccJ25, respectivamente.

b) Efectos *in vivo* de MccJ25

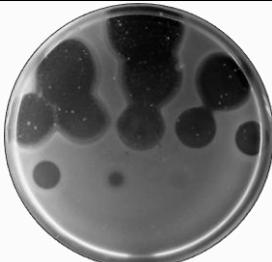
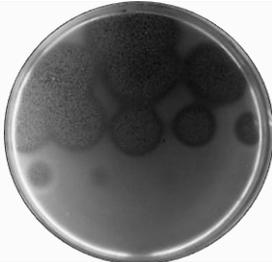
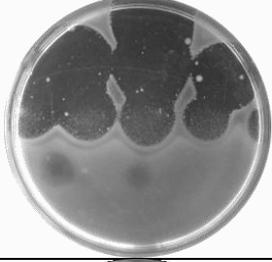
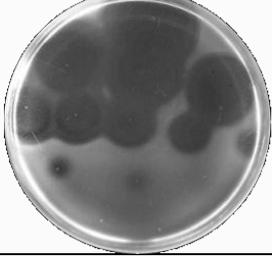
i) Sensibilidad a MccJ25 de *E. coli* C43 y mutantes en las oxidasas terminales

En una primera instancia se determinó la CIM de MccJ25 en cepas de *E. coli* C43. La cepa C43 (DE3) es un derivado de la cepa BL21 (DE3) que está optimizado para la sobreproducción de proteínas de membrana (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004). Esta cepa crece bien en medios de cultivos definidos sin comprometer el rendimiento de la proteína recombinante (Lin *et al.*, 2011).

Las cepas estudiadas son cepas mutantes en el gen involucrado en la síntesis de uno de los citocromos -C43 Δbdl ; C43 Δbo_3 - o en la síntesis de dos de los citocromos -C43 $\Delta bdl\Delta bdII$; C43 $\Delta bo_3\Delta bdII$ -. En una primera instancia, a todas las cepas se les evaluó su comportamiento frente al fagoT5 (Bonhivers *et al.*, 1996) y a la MccB17 (Braun *et al.*, 1973, 1980) para corroborar la presencia de los transportadores activos de membrana externa e interna FhuA y SbmA, respectivamente. La cepa C43 $\Delta bdl\Delta bdII$ resultó ser mutante en FhuA ya que no fue sensible al fagoT5, por lo que esta cepa no fue usada para ensayos *in vivo* como tal. Esta cepa tuvo que ser transformada previamente con un plásmido conteniendo el gen *fhuA* de *E. coli* antes de realizar las determinaciones correspondientes (ver más adelante).

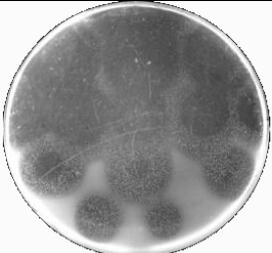
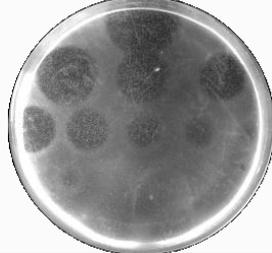
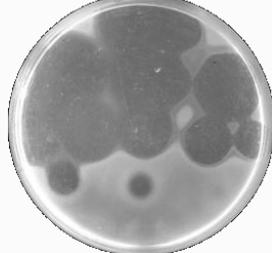
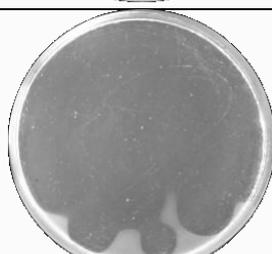
Cuando se evaluó el efecto de la MccJ25 en cada una de las cepas de *E. coli* en estudio, no se observó una diferencia significativa de las CIMs entre las diferentes cepas (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Concentraciones inhibitorias mínimas de MccJ25 frente a distintas cepas mutantes en los citocromos de *E. coli* C43.

Cepas	Citocromos presentes	CIM (μM)	
Parental	<i>bo₃</i> <i>bdI</i> <i>bdII</i>		0,24 (claros)
Δbo_3	<i>bdI</i> <i>bdII</i>		0,24 (turbios)
ΔbdI	<i>bo_3</i> <i>bdII</i>		0,48 (claros)
$\Delta bo_3 \Delta bdII$	<i>bdI</i>		0,48 (claros)

Previamente se había reportado que la acción de la MccJ25 sobre la respiración celular en cepas de *E. coli* se logra cuando hay una mayor concentración intracelular del péptido (Bellomio *et al.*, 2007). Dado que este efecto se observa cuando se hiperexpresa FhuA, las cepas en estudio se transformaron con el plásmido pGC01. Una vez realizado este paso se evaluó nuevamente la sensibilidad frente a MccJ25 (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Concentraciones inhibitorias mínimas de MccJ25 frente a distintas cepas mutantes en los citocromos de *E. coli* C43 transformadas con el plásmido pGC01.

Cepas	Citocromos presentes	CIM (μM)	
C43 (pGC01)	<i>bo</i> ₃ <i>bdI</i> <i>bdII</i>		0,0076 (claros y turbios)
Δ <i>bo</i> ₃ (pGC01)	<i>bdI</i> <i>bdII</i>		0,48 (turbios)
Δ <i>bdI</i> (pGC01)	<i>bo</i> ₃ <i>bdII</i>		0,48 (claros)
Δ <i>bo</i> ₃ Δ <i>bdII</i> (pGC01)	<i>bdI</i>		0,03 (claros y turbios)
Δ <i>bdIΔ<i>bdII</i> (pGC01)</i>	<i>bo</i> ₃		0,015 (claros)

El resultado obtenido fue una hipersensibilidad a MccJ25. En la cepa parental la CIM disminuyó en dos órdenes de magnitud, pasando a ser del orden nanomolar (240 nM a 8 nM). También se puede observar la presencia de dos tipos de halos de inhibición, claros en las zonas en las que se depositaron las diluciones más concentradas y turbios a medida que aumenta la dilución del péptido. En las cepas mutantes en los citocromos *bdI* y *bo*₃ a pesar que sobreexpresan FhuA no se produjo ningún cambio de la sensibilidad frente al

péptido. Es notable que cuando citocromo *bo*₃ estuvo presente los halos de inhibición fueron claros y no se observaron las microcolonias que se observan a bajas concentraciones del péptido. Cuando se suma la ausencia del citocromo *bdII* se puede observar un aumento en la sensibilidad. En las cepas dobles mutantes $\Delta bo_3\Delta bdII$ y $\Delta bdI\Delta bdII$ las CIM fueron 0,03 y 0,015 μ M respectivamente.

Estos resultados indican la importancia que tienen *in vivo* la presencia de los citocromos *bdI* y fundamentalmente el citocromo *bo*₃ para que el péptido ejerza su efecto inhibitorio. Además, el citocromo *bdII* tendría un efecto protector o induciría eventualmente una posible respuesta de defensa de naturaleza desconocida frente a MccJ25 ya que su presencia en las cepas de *E. coli* estudiadas produce un aumento de la CIM de un orden de magnitud.

ii) La MccJ25 disminuye la viabilidad celular de las cepas de *E. coli* C43 (pGC01)

Cuando se evaluó la sensibilidad de las cepas mutantes en los citocromos de *E. coli* que sobreexpresan FhuA en cultivos líquidos los resultados mostraron una correlación con los obtenidos en el ensayo de sensibilidad a la MccJ25 realizado en medio sólido. Se observó que luego del tratamiento con MccJ25 durante 30 minutos la cepa parental *E. coli* C43 (pGC01) disminuyó 3,14 unidades log. Las cepas mutantes Δbo_3 y ΔbdI transformadas con pGC01 fueron las menos afectadas, Figura 3.3. Los porcentajes de disminución de UFC/ml fueron del 90 y 50 % respectivamente. Este resultado indica la gran importancia de la presencia de ambos citocromos para observar el efecto inhibitorio de la MccJ25. Evidentemente el mecanismo de acción de MccJ25 involucra a estas proteínas y la ausencia de cualquiera de las dos tiene como consecuencia una menor muerte celular inducida por MccJ25

En las cepas que además son mutantes en el citocromo *bdII*, *E. coli* C43 $\Delta bo_3\Delta bdII$ (pGC01) y $\Delta bdI\Delta bdII$ (pGC01) el efecto antimicrobiano del péptido es similar al observado en la cepa parental. En ellas la presencia de solo uno de los otros dos citocromos de *E. coli* (*bdI* o *bo*₃) produce un gran efecto inhibitorio. Las observaciones del efecto de la MccJ25 en estas cepas indicarían que el citocromo *bdII* tiene o induce un efecto protector frente a la acción del péptido de naturaleza desconocida que debe ser investigada.

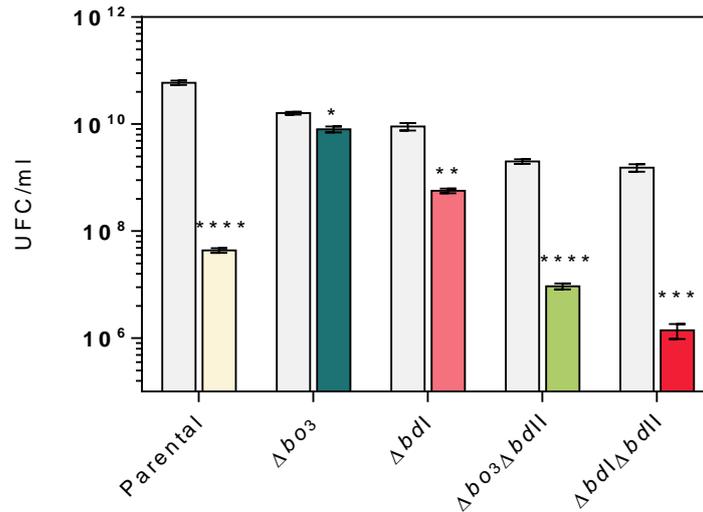


Figura 3.3. Viabilidad celular. Las células de las diferentes cepas de *E. coli* (pGC01) fueron crecidas hasta una DO_{600nm} de 0,8. En ese momento cada cultivo se dividió en dos. Cada cepa se representa con un color diferente y corresponde al tratamiento con MccJ25 20 μ M. Las barras grises representan los controles de cada cepa sin péptido.

iii) El consumo de oxígeno fue inhibido por MccJ25

Previamente se describió que el efecto de la MccJ25 sobre la membrana celular de *E. coli* y de *Salmonella* Newport involucra la inhibición del consumo de oxígeno (Bellomio *et al.*, 2007; Rintoul *et al.*, 2001). Por lo tanto, se decidió estudiar *in vivo* el efecto de la MccJ25 mediante la determinación de la tasa de consumo de oxígeno en las todas las cepas mutantes en los citocromos. En efecto, en *E. coli* solo se observa una reducción en el consumo de oxígeno cuando se sobreexpresa el transportador de membrana externa, FhuA. Como era de esperar, cuando se evaluó el consumo de oxígeno sin sobreexpresar FhuA no se observó una inhibición significativa del consumo de oxígeno (resultados no mostrados). Por lo tanto, se muestran los resultados cuando el ensayo se llevó a cabo con las cepas de *E. coli* C43 transformadas con el plásmido pGC01.

En la Figura 3.4 se muestran las tasas de consumo de O_2 y los porcentajes de inhibición con respecto al control sin tratar. La MccJ25 fue capaz de inhibir la respiración celular en todas las cepas estudiadas. Cuando se analizaron los porcentajes de inhibición se vio que el péptido fue capaz de inhibir la respiración un 25 % en la cepa parental. En las cepas mutantes ΔbdI y $\Delta bdI\Delta bdII$ la inhibición fue de 22 y 20 %, respectivamente.

La cepa mutante Δbo_3 fue la menos afectada. La inhibición observada fue un 6 %. Al igual de lo que ocurrió cuando se estudió la viabilidad celular, se observó que la inhibición del consumo de oxígeno es mayor ante la ausencia del citocromo *bdII* aumentando al 12 %. Coincidiendo con el hecho de que la cepa doble mutante fue más inhibida que su

respectiva simple mutante. En estas cepas la poca inhibición del consumo de oxígeno se podría deber a que la cadena respiratoria es menos inhibida o a que el oxígeno se podría estar consumiendo a expensas de ser reducido de manera parcial produciendo ERO.

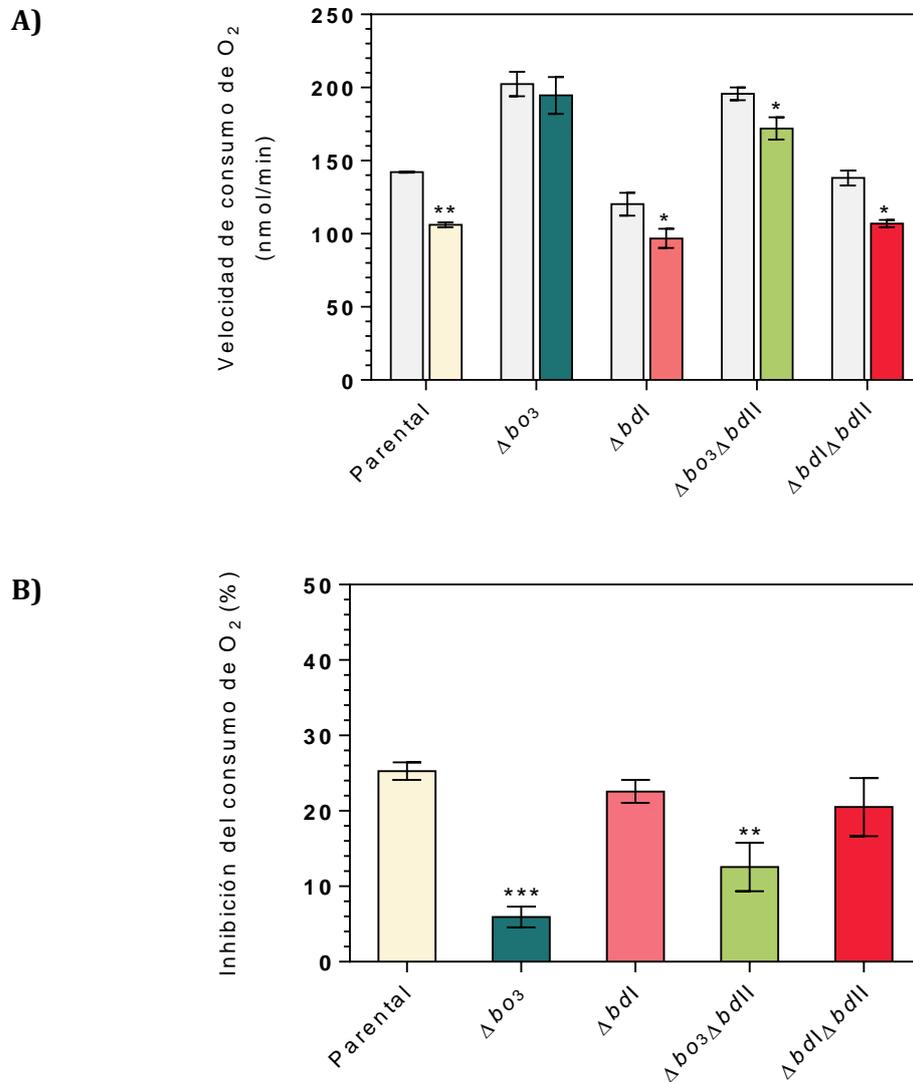


Figura 3.4. Efecto de la MccJ25 50 μM en la respiración de células de *E. coli* C43 (pGC01). (A) La velocidad de consumo de O₂ por unidad de DO_{600nm} se determinó a 37 °C. Las células fueron pre-incubadas con la MccJ25 por 30 minutos. Cada cepa se representa con un color diferente y corresponde al tratamiento con MccJ25 20 μM. Las barras grises representan los controles de cada cepa sin péptido. (B) Valores referidos a la velocidad obtenida en ausencia de MccJ25 (control).

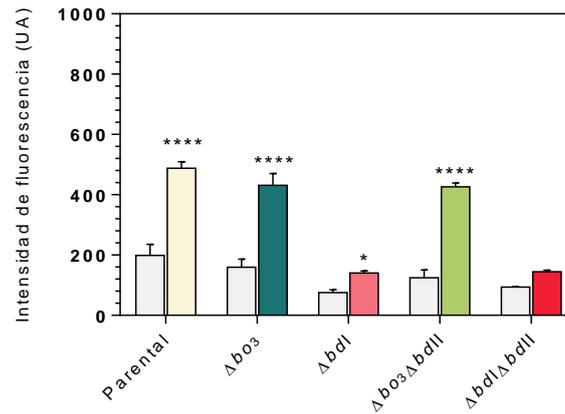
c) Efectos *in vitro* de la MccJ25

i) MccJ25 causa una sobreproducción de ERO en membranas de *E. coli*

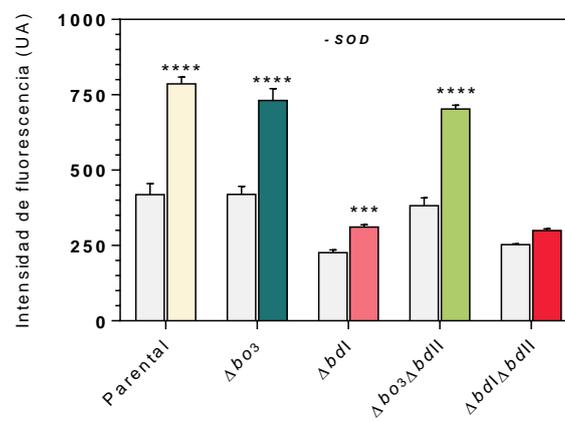
Fue reportado previamente que la producción de ERO estaría involucrada en la inhibición de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria. El agregado de la enzima superóxido dismutasa en la mezcla de reacción revirtió la inhibición de estas enzimas. Teniendo en cuenta que SOD actúa degradando los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), se concluyó que eran los responsables de esta inhibición. Además, se observó que MccJ25 aumentaba la expresión del gen *katG* el cual actúa como un reportero de la actividad OxyR que sensa los niveles intracelulares de H_2O_2 . Por otro lado, también se vio que en condiciones anaeróbicas la MccJ25 pierde su actividad antimicrobiana (Bellomio *et al.*, 2007).

Por lo tanto, se decidió medir la producción de ERO en membranas celulares purificadas a partir de las diferentes cepas mutantes en presencia de MccJ25 usando la sonda DCFH. Ésta sonda es capaz de sensar peróxido de hidrógeno, superóxido y radical hidroxilo (Bonini *et al.*, 2006; Culakova *et al.*, 2013; Hevia *et al.*, 2014; Ruiz-Leal y George, 2004). Para confirmar que la especie reactiva del oxígeno interviniente era el ión superóxido el ensayo se llevó a cabo en presencia y en ausencia de 10 UE de SOD. Se consideró que la oxidación de la sonda debida a los iones superóxido correspondió a la diferencia de la intensidad de fluorescencia obtenida sin el agregado de SOD y en presencia de la misma, Figura 3.5 (B) y (C), respectivamente. Los electrones ingresaron a la cadena respiratoria a nivel de la succinato deshidrogenasa. Una vez comenzado el transporte llegan al oxígeno por medio de las quinonas y las oxidasas terminales.

A)



B)



C)

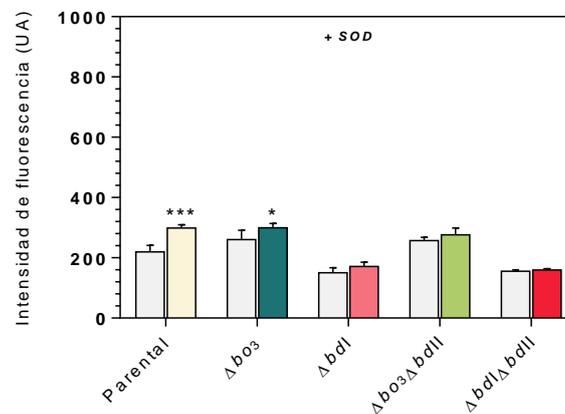


Figura 3.5. (A) Producción de ión superóxido y ERO por membranas celulares en presencia (C) y ausencia (B) de SOD 10 UE. Debido a que el ensayo fue llevado a cabo con membranas celulares se procedió a desacetilar la sonda DCFH-DA (λ_{exc} 490 nm - λ_{em} 520 nm) tal como se explica en la sección de Materiales y Métodos. Cada cepa se representa con un color diferente y corresponde al tratamiento con MccJ25 20 μ M. Las barras grises representan los controles de cada cepa sin péptido.

En la Figura 3.5 (A) se observa que MccJ25 aumentó dos veces la producción de superóxido en la membrana de la cepa parental en comparación al control sin péptido. La misma situación se encontró en las cepas mutantes en el citocromo bo_3 , tanto en la simple

como en la doble mutante $\Delta bo_3\Delta bdII$. Sin embargo, en las dos cepas mutantes en el citocromo *bdI* la producción de ERO fue considerablemente menor en presencia del péptido. Estos resultados aunque fueron obtenidos *in vitro* concuerdan con los obtenidos *in vivo* en lo que respecta a la determinación del consumo de oxígeno. Las cepas en la que menos se manifestó la inhibición del consumo de oxígeno fueron las que mostraron mayor producción de ERO cuando se estudió el efecto de la MccJ25 sobre la cadena respiratoria funcional en membranas purificadas. Los resultados hasta aquí obtenidos permiten inferir la importancia de las oxidasas terminales en el mecanismo de acción de la MccJ25 en la membrana celular.

ii) Determinación de la actividad de la enzima NDH

(1) La MccJ25 no inhibe la actividad NADH deshidrogenasa

Está reportado que MccJ25 inhibe aproximadamente un 5 % las actividades de las enzimas NADH y lactato deshidrogenasa en membranas de *E. coli*. Sin embargo, cuando el ensayo se realizó en ausencia de KCN se observó una inhibición de 21 y 44 %, respectivamente. Mientras que la actividad succinato deshidrogenasa no fue afectada por la presencia del péptido (Bellomio *et al.*, 2007). Las sales de tetrazolio (MTT) son ampliamente utilizadas como aceptores de electrones artificiales en los ensayos de enzimas que catalizan reacciones de oxido-reducción. El ensayo se basa en la reducción del MTT para formar el formazán, el cual absorbe a 570 nm permitiendo el monitoreo continuo del curso de la reacción enzimática (Massa y Farías, 1982). Al determinar las actividades deshidrogenasas por el método explicado en la sección 2.h.ii se agrega cianuro rutinariamente. De esta manera se impide que los electrones lleguen hasta el oxígeno y los mismos se desvían al aceptor artificial de electrones, el MTT. Basándonos en estos antecedentes, decidimos estudiar el efecto de la MccJ25 directamente sobre la actividad enzimática de la NDH deshidrogenasa en membranas purificadas a partir de las diferentes cepas mutantes de *E. coli* C43.

Cuando se determinó la actividad NADH deshidrogenasa en las membranas de las cepas en estudio, también se observó una inhibición de dicha actividad de aproximadamente el 5 % en la cepa parental cuando la membrana fue preincubada con MccJ25 tal como estaba reportado previamente (Figura 3.6). En el resto de las membranas obtenidas de las cepas mutantes en los citocromos se vio una inhibición menor de la enzima, aunque no se observaron diferencias significativas.

Como en presencia de KCN se bloquea el flujo de electrones hacia las oxidasas terminales los electrones fluyen desde el sustrato reducido, el NADH, hasta el aceptor

alternativo, el MTT, pasando por las enzimas NADH deshidrogenasas. Estos resultados permiten concluir que la MccJ25 es incapaz de ejercer una inhibición directa de la actividad NADH deshidrogenasa.

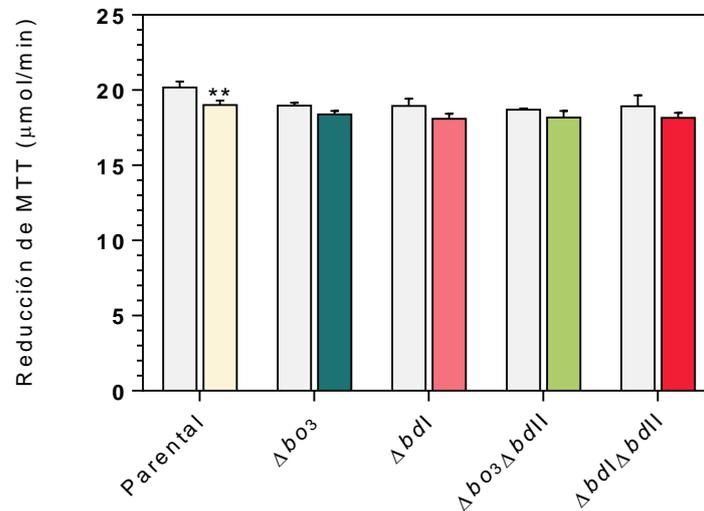


Figura 3.6. Efecto de la MccJ25 en la enzima NADH deshidrogenasa en membranas de *E. coli*. La reacción fue realizada a 37 °C en presencia de 6 mM de KCN y fue seguida por la reducción del MTT a 570 nm. La MccJ25 (20 µM) fue pre-incubada con el extracto de membrana (10 µg de proteína /ml) por 10 minutos. El control de cada cepa se representa en color gris mientras que las barras de colores representan el efecto de la MccJ25.

(2) La MccJ25 inhibe la actividad NADH oxidasa

Anteriormente fue descrito un efecto inhibitorio de la actividad NADH y lactato oxidasa por parte de la MccJ25 (Bellomio *et al.*, 2007), dejando en evidencia la necesidad de un flujo de electrones a través de la cadena respiratoria. Para confirmar si realmente la llegada de los mismos al aceptor final, el oxígeno, pasando por las oxidasas terminales es importante se evaluó la actividad NADH oxidasa en presencia de MccJ25. Para ello, se sigue espectrofotométricamente el consumo de NADH sin el agregado de KCN. Tal como se aprecia en la Figura 3.7 cuando se evaluó la actividad NADH oxidasa en presencia de MccJ25, se observó una inhibición de la actividad enzimática. Con respecto a los porcentajes de inhibición en las membranas obtenidas de la cepa parental y de ambas cepas mutantes en el citocromo *bdI* la inhibición fue de aproximadamente un 15 %. La menor inhibición fue observada en la membrana que no tiene el citocromo *bo3*. En la membrana en la que solo el citocromo *bdI* ($\Delta bo_3\Delta bdII$) se encuentra presente la inhibición fue de un 23 % (Tabla 3.3).

Este ensayo se realiza en ausencia de KCN, los electrones fluyen desde el sustrato reducido, el NADH, hasta el oxígeno. Con estos resultados podemos inferir que la llegada de los electrones hasta las oxidasas terminales es de gran importancia para observar el efecto inhibitorio por parte de la MccJ25 en la actividad NADH oxidasa. Esta inhibición podría ser debida a un efecto a nivel de las oxidasas terminales. La inhibición de estas enzimas generaría la acumulación de quinonas reducidas lo que en última instancia provocaría la inhibición de la actividad NADH oxidasa.

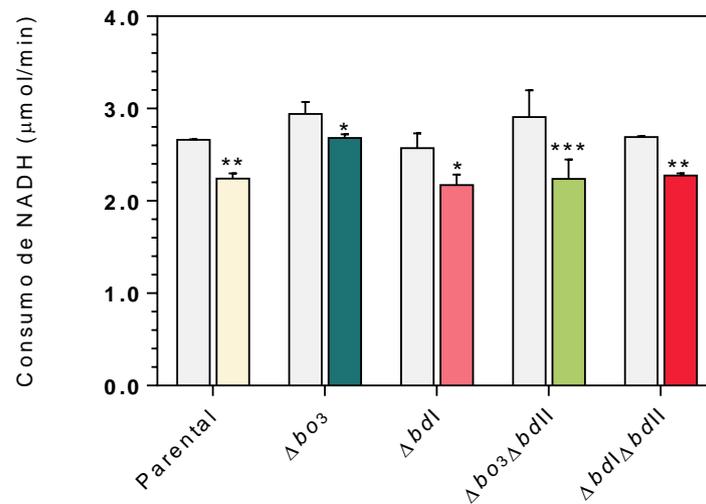


Figura 3.7. Efecto de la MccJ25 en la actividad NADH oxidasa en membranas de *E. coli*. La reacción fue realizada a 37 °C y fue seguida midiendo la absorbancia a 340 nm de NADH luego de preincubar las fracciones de membranas (10 µg/ml de proteína) 15 minutos con o sin MccJ25 (20 µM). El control de cada cepa se representa en color gris mientras que las barras de colores representan el efecto de la MccJ25 en las diferentes cepas.

Tabla 3.3. Porcentaje de inhibición de la actividad NADH oxidasa.

Cepas de <i>E. coli</i>	% de inhibición
C43	15,71 ± 2,11
Δbo ₃	7,92 ± 1,91
ΔbdI	15,62 ± 4,42
Δbo ₃ ΔbdII	23,07 ± 7,23
ΔbdI ΔbdII	15,52 ± 0,89

Con los resultados hasta aquí obtenidos, podemos decir que para observar el efecto de la MccJ25 sobre la cadena respiratoria es necesario que las células tengan aumentada la entrada del péptido, lo cual se logra sobreexpresando FhuA. Se pudo ver una inhibición

del consumo de oxígeno en las cepas mutantes en los citocromos *bd* mientras que en las cepas mutantes en el citocromo *bo₃* el consumo de oxígeno se vio menos afectado debido a que el mismo estaría siendo reducido parcialmente formando ERO. En ensayos realizados con membranas purificadas de las diferentes mutantes en presencia del péptido no se pudo ver una inhibición de la actividad NADH deshidrogenasa sin embargo un efecto inhibitorio fue observado cuando se estudió la actividad NADH oxidasa. Es decir cuando los electrones pudieron llegar hasta el aceptor final, el oxígeno. La inhibición de la actividad NADH oxidasa fue mayor en las membranas de la cepa $\Delta bo_3\Delta bdII$, en la cual solo el citocromo *bdI* se encuentra presente. Como esta inhibición fue observada usando membranas aisladas por lo tanto no puede ser atribuible a un efecto de MccJ25 sobre la ARNP, ni sobre otra proteína o blanco de acción citoplasmático.

Con base en los resultados obtenidos se procedió a purificar el citocromo *bdI* y *bo₃* para evaluar el efecto de la MccJ25 directamente sobre estas oxididasas terminales.

d) Purificación de las oxididasas terminales

i) Purificación, propiedades espectrales y cuantificación del citocromo *bdI*

El citocromo *bdI* se purificó siguiendo el protocolo detallado en la sección Materiales y Métodos. La oxidasa terminal se purificó de la cepa de *E. coli* C43 transformada por un plásmido que tiene clonado el operón completo e hiperexpresa la proteína cuando es inducida mediante el agregado de IPTG. Una vez que se obtuvo la fracción de membrana celular se produjo la extracción de la enzima mediante una solubilización con el detergente DDM al 1 %. La proteína solubilizada fue sembrada en una columna de intercambio aniónico y se eluyó con un gradiente de KCl. Las fracciones colectadas fueron concentradas y dializadas contra un buffer con una concentración menor de DDM (0,05%) y se guardaron a -70 °C en presencia de glicerol al 10 % hasta el momento de su uso.

Se determinó la concentración de citocromo *bdI* por el método de Kita y colaboradores (1984 a). El espectro de la forma oxidada muestra unos picos de absorción característicos a 412, 530 y 645 nm, con un pico menor a 604 nm; mientras que la forma totalmente reducida por ditionito de sodio muestra unos picos a 430, 530, 560 y 629 nm, con un pico ancho a 595 (Kita *et al.*, 1984^a; Miller y Gennis, 1983). En la Figura 3.8 se muestra el espectro de absorbancia del citocromo *bdI* purificado y tomado a temperatura ambiente.

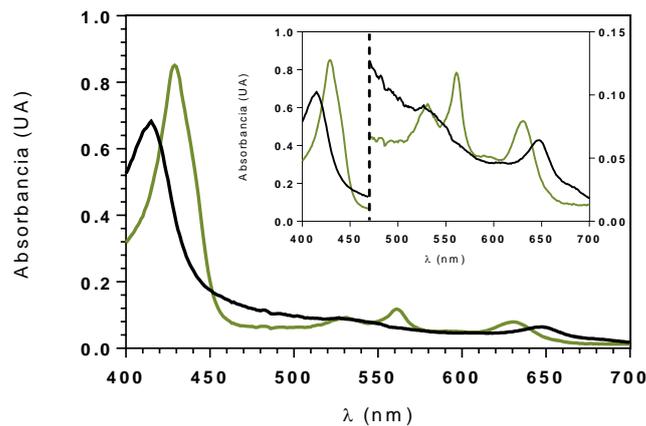


Figura 3.8. Espectro de absorbancia del citocromo *bdI*. Los espectros fueron obtenidos en buffer fosfato de potasio 20 mM – DDM 0,05 % (pH 7,4). En negro se muestra el espectro oxidado que es la manera en la que se lo obtiene. El espectro totalmente reducido con ditionito de sodio de la proteína se representa en verde.

La resta del espectro reducido menos el espectro oxidado exhibe tres máximos de absorción típicos y característicos del citocromo b_{558} a 430, 530 y 560 nm y uno del citocromo d a 628 nm. Este último también tiene una señal que está superpuesta con la del hemo b_{558} en los 430 nm. Asimismo puede observarse una señal negativa adicional, causada por la forma oxigenada ferrosa del hemo d a aproximadamente 655 nm. Por otro lado, se distingue una banda ancha a 595 nm debido al componente hemo b_{595} . A 440 nm puede observarse un hombro también debido a este grupo hemo (Hoeser *et al.*, 2014). Estudios previos determinaron varios coeficientes de extinción molar para el citocromo *bdI* purificado para diferentes pares de longitudes de ondas (Kita *et al.*, 1984^a; Miller y Gennis, 1983). En la Figura 3.9 se muestra la diferencia entre ambos espectros del citocromo *bdI* purificado. Para calcular la concentración del citocromo *bdI* se usó el coeficiente de $10,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el par de longitudes de onda 607 y 628 nm a partir de la diferencia de absorción del espectro reducido con ditionito de sodio menos la absorción del espectro oxidado (Borisov *et al.*, 1999).

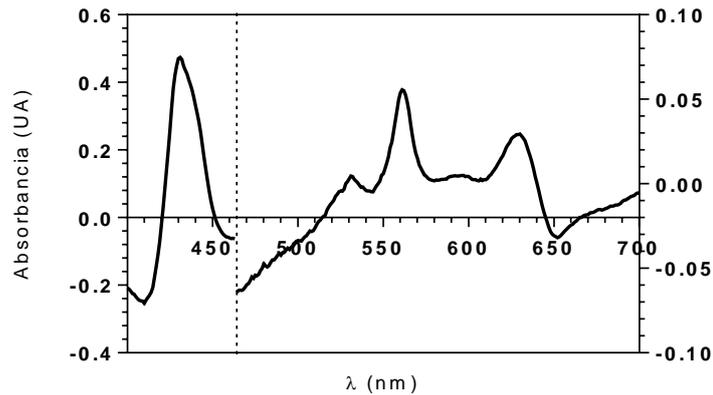


Figura 3.9. Espectro de diferencia entre la absorbancia de la forma reducida menos la forma oxidada del citocromo *bdI*.

ii) Revelado del citocromo *bdI* por actividad peroxidasa

Borisov y colaboradores en el año 2013 reportaron que el citocromo *bdI* tenía actividad catalasa y que ésta se desvanece al reducirse, no compite con la actividad de oxígeno-reductasa y se inhibe por cianuro. La actividad que posiblemente estaría asociada con el grupo hemo b_{595} , también se observó en células de *E. coli* deficientes en catalasa tras la sobreexpresión del citocromo *bd*, lo que sugiere un papel protector contra el estrés oxidativo *in vivo* (Borisov *et al.*, 2013). Recientemente, Al-Attar y colaboradores (2016), utilizando el citocromo *bdI* de *E. coli* con gran pureza y altamente activo, no pudieron detectar la actividad catalasa reportada previamente. Sin embargo, demostraron que además de su actividad oxidasa, el citocromo *bdI* es una auténtica quinol peroxidasa que reduce el peróxido de hidrógeno a agua. El citocromo *bdI* sería la primera quinol peroxidasa unida a la membrana detectada en *E. coli*. Esto proporcionaría una base bioquímica para su papel en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y podría explicar los hallazgos frecuentes reportados en la literatura que indican una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno y disminución de virulencia en mutantes que carecen de esta oxidasa terminal (Al-Attar *et al.*, 2016).

En este trabajo se propuso detectar dicha actividad del citocromo *bdI* usando una adaptación del protocolo de Thomas y colaboradores (1976) donde se describe el uso de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina - H_2O_2 como colorantes para la actividad peroxidasa del citocromo *P-450* en geles de SDS-PAGE. Las bandas precipitadas de color azul sobre los geles de poliacrilamida son estables y permiten detectar niveles muy bajos de actividad peroxidasa asociada con los grupos hemo. En el presente ensayo se optó por trabajar con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) ya que se encontraron reportes bibliográficos que respaldan

su uso (Angermüller y Fahimi, 1981; Clare *et al.*, 1984; Togo *et al.*, 2000). En la Figura 3.10 puede observarse la banda de 100 kDa correspondiente al citocromo *bdI* (flecha en calle 2). En la calle 6 se sembró la enzima HPR (44 kDa) como control positivo.

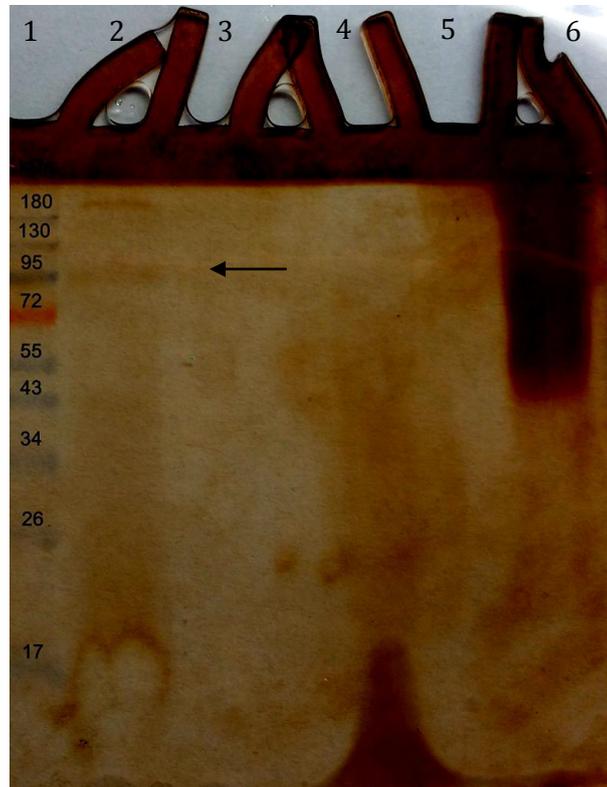


Figura 3.10. Gel de SDS-PAGE revelando la actividad peroxidasa del citocromo *bdI*. En la primera calle se observa un marcador de masa molecular. En la segunda calle se sembró el citocromo *bdI* purificado, mientras que la enzima HPR usada como control positivo se sembró en la última calle.

iii) Purificación, propiedades espectrales y cuantificación del citocromo *bo₃*

El citocromo *bo₃* se purificó a partir de una cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pET-*bo₃*. El cultivo celular se procesó de la misma manera descrita en la sección Materiales y Métodos hasta el momento de la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), usando una columna con una resina de Ni⁺² (HisTrap™ HP- GE Healthcare Life Sciences). La proteína se eluyó con un gradiente desde 25 hasta 300 mM de imidazol. Las fracciones se concentraron, dializaron contra un buffer con una concentración menor de DDM (0,05 %) y se guardaron a -70 °C en presencia de glicerol al 10 % hasta el momento de su uso. El espectro de la forma oxidada posee máximos de absorción a 410, 527 y 565 nm. En la forma totalmente reducida con ditionito de sodio cambian a 427, 531, y 560 nm con un incremento de sus intensidades de absorción (Kita *et*

al., 1984b). El espectro del citocromo bo_3 purificado y tomado a temperatura ambiente se muestra en la Figura 3.11.

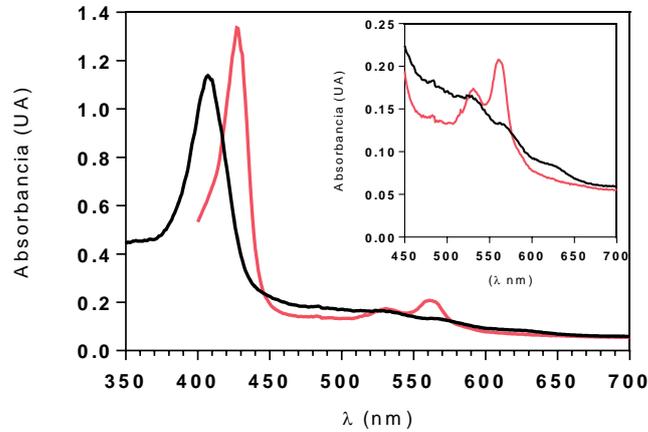


Figura 3.11. Espectro absoluto del citocromo bo_3 . Los espectros fueron obtenidos en buffer fosfato de potasio 20 mM – DDM 0,05 % (pH 7,4). En negro se muestra el espectro oxidado que es la manera en la que se lo obtiene. El espectro totalmente reducido con ditionito de sodio de la proteína se representa en rojo.

La diferencia de absorción del espectro reducido menos la absorción del espectro oxidado exhibe un máximo típico y característico del citocromo b a 560 nm, Figura 3.12. La diferencia entre los espectros muestra las mismas características reportadas en la bibliografía (Bolgiano *et al.*, 1991; Kita *et al.*, 1984b).

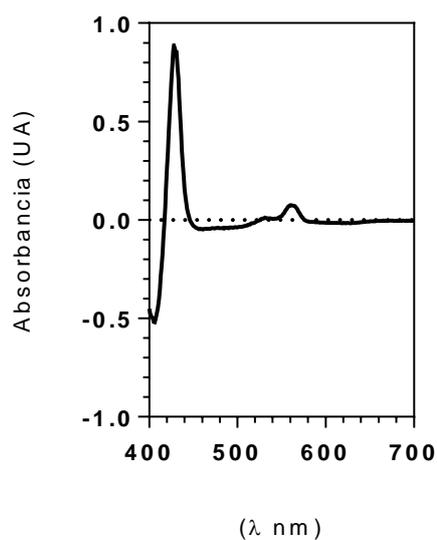


Figura 3.12. Espectro de diferencia entre la absorbancia de la forma reducida menos la forma oxidada del citocromo bo_3 .

iv) Western blot del citocromo bo_3

Debido a que el citocromo bo_3 tiene una etiqueta 6XHis-Tag C-terminal en la subunidad II de 33 kDa, se realizó un Western blot utilizando anticuerpos anti-His-Tag para su revelado (protocolo detallado en la sección Materiales y Métodos). De esta manera se puso de manifiesto la presencia de la proteína en la fracción purificada.

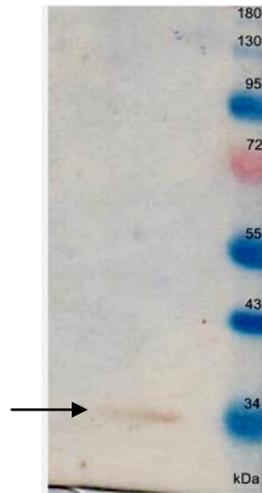


Figura 3.13. Electroforesis SDS-PAGE revelada por Western blot. Se observa a la izquierda la subunidad II del citocromo bo_3 (flecha). En la parte derecha, el marcador de masa molecular.

e) Actividad ubiquinol oxidasa de los citocromos purificados

Con los citocromo bdI y bo_3 purificados se determinó, *in vitro*, el efecto de la MccJ25 sobre la actividad ubiquinol oxidasa. El estudio de inhibición y los parámetros cinéticos se determinaron con ubiquinol-1 como sustrato de las enzimas. Las muestras se preincubaron con MccJ25 (0,5 μ g de proteína) durante 15 minutos antes del inicio de la reacción mediante el agregado de sustrato de la enzima. El medio de reacción también contenía DTT en exceso, el cual actúa como agente reductor de la coenzima Q_1 . Los electrones fluyen desde el DTT hasta la quinona-1, la cual al reducirse y formar ubiquinol-1 cede los electrones al citocromo quien finalmente los pasa al oxígeno. En todos los casos, el agregado de KCN inhibió totalmente la actividad oxidasa.

i) La MccJ25 inhibe al citocromo bdI de manera no competitiva

En la Figura 3.14 se puede observar el gráfico de Michaelis-Menten correspondiente a la actividad ubiquinol oxidasa de citocromo bdI . Las velocidades de consumo de oxígeno se determinaron empleando diferentes concentraciones del sustrato soluble, QH_2 , que se mantiene reducido durante el curso de la reacción con DTT. En verde se representan las

determinaciones realizadas en presencia de MccJ25 (50 μM). Es evidente el efecto inhibitorio sobre la actividad ubiquinol oxidasa ejercido por el péptido.

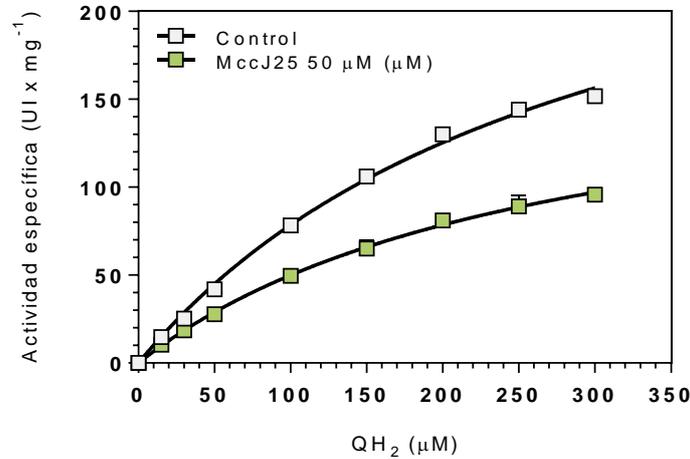


Figura 3.14. Curva de actividad específica en función de la concentración de sustrato para el citocromo *bdI*. La reacción fue seguida en un oxígrafo equipado con un electrodo de tipo Clark (OROBOROS Oxygraph-2k).

Existen métodos gráficos fiables que facilitan el cálculo preciso de K_m y V_{max} . Los cálculos se hacen en base a transformaciones matemáticas de la ecuación de Michaelis-Menten; una de las expresiones más utilizadas es la representación de Lineweaver-Burk. En esta forma de cálculo se representa $1/V_0$ frente a $1/[S]$, esto es la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de sustrato (de ahí que también la representación sea conocida como de dobles inversas), así se obtiene una recta cuya intersección con el eje X es $-1/K_m$ y con el eje Y es $1/V_{max}$, siendo la pendiente K_m/V_{max} (Nelson y Cox, 2012), Figura 3.15. Como puede observarse en la tabla 3.4, en este trabajo de tesis se encontró que el citocromo *bdI* tiene un valor de K_m para el ubiquinol-1 de $299,85 \pm 32,08 \mu\text{M}$ para el control y de $248,18 \pm 33,69 \mu\text{M}$ en presencia de MccJ25, no habiendo diferencia significativa entre ambos. Los valores obtenidos se encuentran entre los reportados previamente. En la bibliografía los diferentes valores de K_m para el ubiquinol-1 van desde 16 hasta $230 \mu\text{M}$ (Kita *et al.*, 1984a; Kolonay *et al.*, 1994; Lorence *et al.*, 1984; Miller y Gennis, 1983; Weiss *et al.*, 2009). Esta variación probablemente es el resultado de las diferentes condiciones de ensayos empleadas, tales como la presencia o ausencia de diversos fosfolípidos y/o detergentes. Sin embargo, si se observó una disminución del valor de la V_{max} calculada cuando las determinaciones se llevaron a cabo en presencia de MccJ25 50 μM . Para el control fue de $151,51 \pm 33,23 \text{ UI mg}^{-1}$ y en presencia del péptido de $90,91 \pm 9,89 \text{ UI mg}^{-1}$.

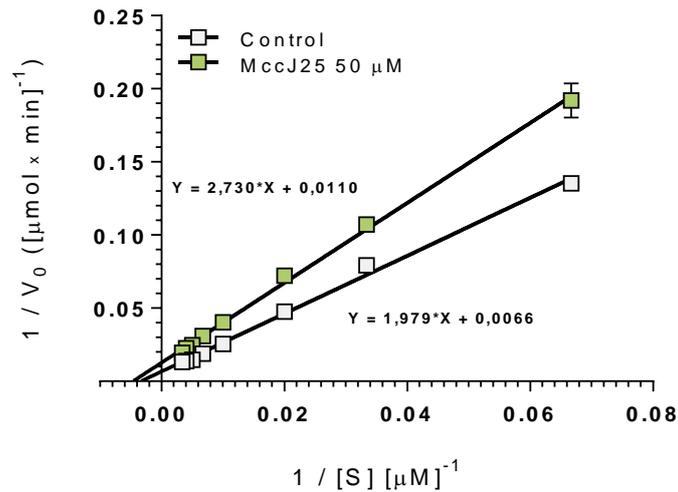


Figura 3.15. Gráfico de Lineweaver-Burk obtenido para la actividad ubiquinol oxidasa del citocromo *bdI*. En cuadrados verdes se representa la influencia de MccJ25 sobre la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato. El control se representa en gris. En ambos casos se muestra la recta de mejor ajuste obtenida.

Tabla 3.4. Valores de K_m y V_{max} obtenidos para el citocromo *bdI*.

Parámetros cinéticos	Control	MccJ25
$V_{m\acute{a}x}$ (UI mg^{-1})	$151,51 \pm 33,23$	$90,91 \pm 9,89$
K_m (μM)	$299,85 \pm 32,08$	$248,18 \pm 33,69$

Las constantes cinéticas obtenidas, valores de K_m que no difieren significativamente en presencia y ausencia del inhibidor y una $V_{m\acute{a}x}$ que disminuye, indican que el péptido inhibe de manera no competitiva al citocromo *bdI*. Un inhibidor no competitivo es aquel que puede combinarse tanto con la enzima libre como con el complejo enzima-sustrato, sin afectar al sitio activo de la enzima. No se afecta la afinidad de la enzima por el sustrato.

ii) La MccJ25 no inhibe la actividad ubiquinol oxidasa de citocromo *bo₃*

La actividad ubiquinol oxidasa del citocromo *bo₃* *in vitro* no cambió significativamente en presencia de MccJ25 en la condiciones ensayadas, Figura 3.16.A. Como era de esperar los valores de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} obtenidos en presencia y en ausencia de MccJ25 tampoco arrojó una diferencia significativa, Figura 3.16.B y Tabla 3.5. Los valores de V_{max} obtenidos fueron de aproximadamente 150 UI mg^{-1} y los de K_m fueron de aproximadamente 300 μM , encontrándose dentro del rango de valores extremadamente diversos reportados en la bibliografía. Los mismos van desde 10 hasta 625 μM (Abramson *et al.*, 2000; Kita *et al.*, 1984b; Sakamoto *et al.*, 1998, 1998; Sato-

Watanabe *et al.*, 1994). Esto puede deberse, al igual que lo que ocurre con la determinación de la actividad ubiquinol oxidasa del citocromo *bdI*, al uso de un sustrato no nativo, QH_2 , para los ensayos, además de las diferentes condiciones experimentales utilizadas (Weiss *et al.*, 2009). En la referencia más citada sobre la purificación y caracterización espectral del citocromo *bo₃* el valor de K_m reportado es de $625 \mu\text{M}$ (Kita *et al.*, 1984b). Sin embargo, cuando los autores estudiaron la presencia de fosfolípidos en el medio de reacción se vio un aumento de la actividad ubiquinol oxidasa acompañado con el cambio del valor de K_m . El nuevo valor de K_m fue de $50 \mu\text{M}$ coincidente con el obtenido luego por otros autores (Sato-Watanabe *et al.*, 1994).

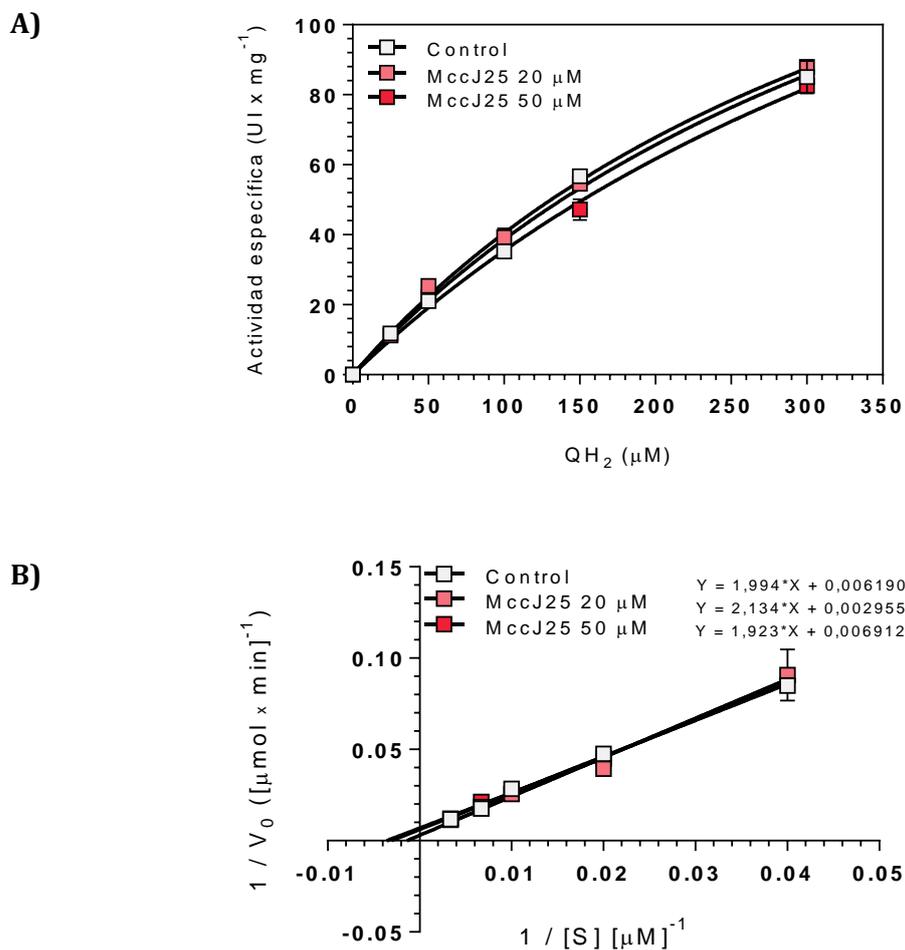


Figura 3.16. Gráfico de Michaelis-Menten para la determinación de la actividad ubiquinol oxidasa del citocromo *bo₃* (A) La reacción fue realizada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y fue seguida midiendo el consumo de oxígeno en un oxígrafo OROBOROS Oxygraph-2k. La MccJ25 fue pre-incubada con el citocromo *bo₃* ($0,5 \mu\text{g}$ de proteína) por 10 minutos y se inició la reacción con el agregado de Q_1 en presencia de DTT 4 mM . (B) Gráfico de Lineweaver-Burk para la actividad ubiquinol oxidasa del citocromo *bo₃*. Para ambos casos en cuadrados de colores se representa la influencia de MccJ25 sobre la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato. El control se representa en gris. Se muestra la recta de mejor ajuste obtenida

Tabla 3.5. Valores de Km y Vmax obtenidos para el citocromo *bo*₃ cuando la concentración de MccJ25 fue de 50 μ M.

Parámetros cinéticos	Control	MccJ25
V _{máx} (UI mg ⁻¹)	161,55 \pm 36,95	144,67 \pm 46,43
Km (μ M)	322,06 \pm 68,95	278,24 \pm 76.9

Por lo tanto se concluyó que el citocromo *bo*₃ no fue inhibido por MccJ25 en las condiciones ensayadas. Evidentemente las diferentes condiciones experimentales afectan en gran medida los parámetros cinéticos obtenidos. En este trabajo las condiciones ensayadas fueron las mismas para ambos citocromos. Se usó como detergente DDM 0,05 % concentraciones tal como está reportado en la bibliografía. No obstante, se plantea como proyección ensayar la presencia de diferentes fosfolípidos o reconstituir los citocromos en liposomas, para que de esta manera la enzima se encuentre en un entorno más fisiológico y así evaluar nuevamente la actividad ubiquinol oxidasa.

iii) La inhibición del citocromo *bdI* es concentración dependiente

Una vez analizados los parámetros cinéticos de la actividad enzimática del citocromo *bdI* se optó por seguir trabajando con una concentración de coenzima Q₁ correspondiente a la mitad del valor de la Km ya que se consideró una concentración óptima para realizar las mediciones de consumo de oxígeno debido a que el mismo era consumido completamente en un tiempo moderado de aproximadamente cinco minutos.

Manteniendo constante la concentración de coenzima Q₁ (150 μ M) se evaluó la inhibición de la actividad ubiquinol oxidasa con diferentes concentraciones de MccJ25. Se vio que la inhibición fue dependiente de la dosis de microcina utilizada (Figura 3.17).

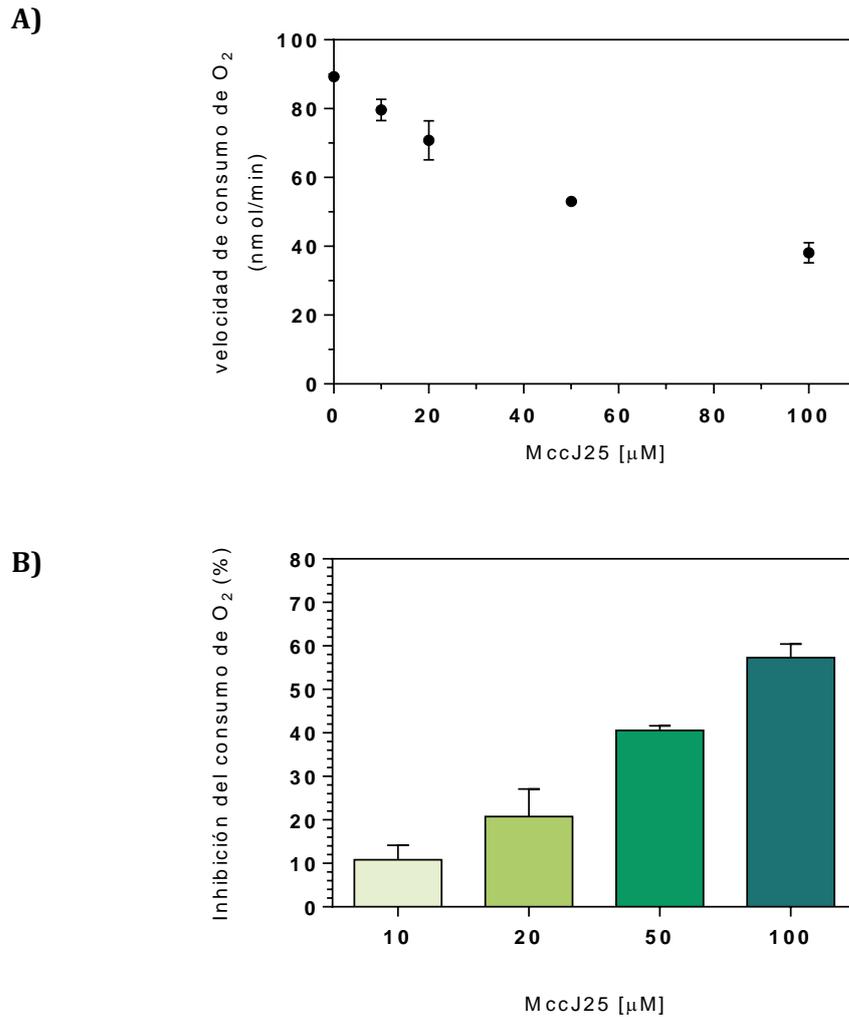


Figura 3.17. (A) Velocidades de consumo de oxígeno del citocromo *bdl*. (B) Porcentaje de inhibición del consumo de O_2 por MccJ25. Los valores de inhibición de las diferentes concentraciones de MccJ25 se encuentran referidos a un control sin péptido.

f) Efecto de los análogos de MccJ25 sobre el citocromo *bdl*

i) Actividad ubiquinol oxidasa

Ante estos resultados obtenidos se procedió a estudiar el efecto de las variantes de microcinas activas a diferentes niveles. La MccJ25 nativa es activa frente a los dos blancos de acción, el blanco citoplasmático, la RNAP, y la cadena respiratoria. La microcina Y9F, es inactiva sobre la cadena respiratoria (Chalón *et al.*, 2009) y finalmente la MccJ25-GA es inactiva sobre la ARNP pero está reportado que tiene efecto inhibitorio a nivel de la respiración (Bellomio *et al.*, 2007). Como en el laboratorio se contaba con esta variedad de microcinas y con el citocromo *bdl* purificado, se evaluó la acción de los péptidos (20 μM) directamente sobre la proteína purificada (0,5 μg). Tanto la MccJ25 como la MccJ25-GA fueron capaces de inhibir el consumo de oxígeno en un 25 %

aproximadamente. Como era de esperar la microcina Y9F no inhibió al citocromo *bdl* en forma significativa mientras que el KCN lo inhibió completamente.

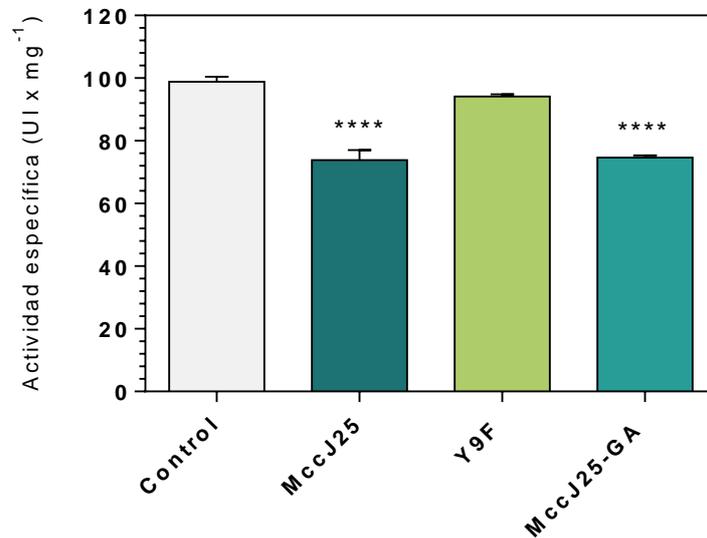


Figura 3.18. Actividad específica de citocromo *bdl* en presencia de MccJ25, Y9F y MccJ25-GA. La actividad ubiquinol oxidasa se determinó midiendo el consumo de oxígeno y se expresa como porcentaje en comparación con el control sin el agregado de péptido (20 μ M). Se llevó a cabo un control con KCN que dio como resultado una actividad nula.

ii) Producción de superóxido

En este trabajo se estudió la capacidad de la MccJ25 de producir ERO. Se vio que la MccJ25 fue capaz de inducir un estallido oxidativo en membranas de *E. coli* donde el citocromo *bdl* se encontraba presente (sección. 3.c.i). Para determinar si la MccJ25 era capaz de inducir la formación de ERO en las proteínas purificadas, se llevó a cabo un ensayo similar al que se usó para su puesta en evidencia usando membranas aisladas de la cepas de interés. Cabe destacar que en este ensayo y en el ensayo llevado a cabo con membranas se hicieron todos los controles correspondientes de modo tal de tener la certeza que las especies reactivas del oxígeno formadas corresponden a un efecto del péptido sobre la proteína. En este caso en particular, el uso del agente reductor DTT no fue posible debido a que impedía la oxidación de la sonda DCFH. Por tal motivo se realizó el protocolo de reducción de la coenzima Q_1 detallado en la sección Materiales y Métodos. Las reacciones fueron iniciadas mediante el agregado de la coenzima Q_1 reducida (QH_2).

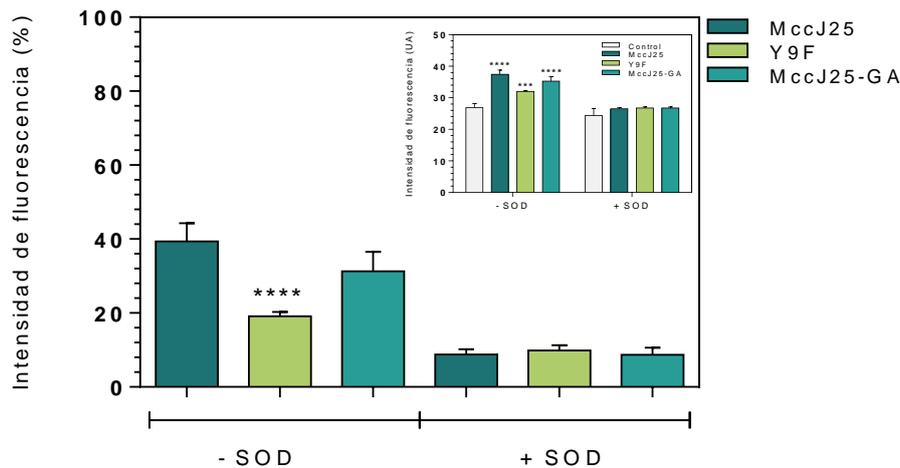


Figura 3.19. Producción de $O_2^{\cdot-}$ por el citocromo *bdl*. El citocromo *bdl* (25 nM) se incubó con 20 μ M de MccJ25, Y9F, MccJ25-GA o metanol (control) y DCFH. Se inició la reacción mediante el agregado de ubiquinol (QH2) 350 μ M. Se muestra los valores referidos al control sin péptido. Inserto: valores absolutos de la intensidad de fluorescencia. (λ_{exc} 490 nm - λ_{em} 520 nm). En el inserto se muestran los valores absolutos de la intensidad de fluorescencia a partir de los cuales se calculó el porcentaje de aumento.

Como puede verse en la Figura 3.19, la MccJ25 incrementó un 39 % las especies reactivas del oxígeno con respecto al control sin péptido, de la misma manera la variante MccJ25-GA produjo un incremento de un 31 %. El menor incremento de ERO fue por parte de la variante Y9F con solo un 18 %. Cuando el mismo ensayo se realizó en presencia de SOD no pudo verse una diferencia significativa con respecto al control. Debido a la especificidad de la enzima SOD por su sustrato, el ión superóxido se puede concluir que el incremento de la intensidad de fluorescencia en presencia de los péptidos es debido casi exclusivamente a este radical. Estos resultados indican que la MccJ25 es capaz de inducir un incremento de la producción de superóxido específicamente sobre el citocromo *bdl* y no sobre el citocromo *bo*₃, Figura 3.20.

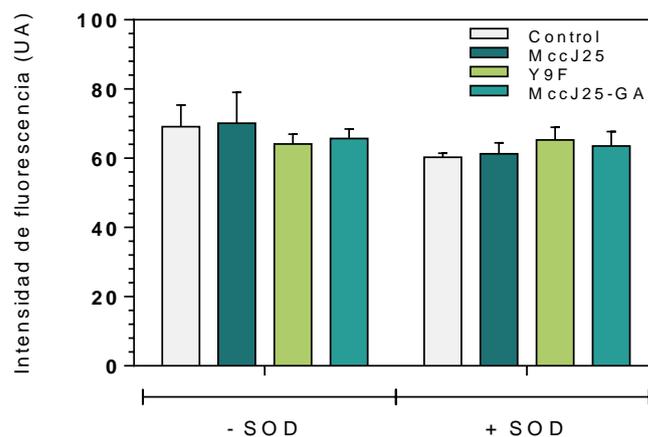


Figura 3.20. Producción de ROS por el citocromo bo_3 . El citocromo bo_3 (25 nM) se incubó con 20 μ M de MccJ25, Y9F, MccJ25-GA o metanol (control) y DCFH. Se inició la reacción mediante el agregado de ubiquinol (QH2) 350 μ M (λ_{exc} 490 nm - λ_{em} 520 nm).

g) Reducción de los citocromos por MccJ25

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos hasta acá, se pudo demostrar que la MccJ25 es capaz de inhibir al citocromo bdl *in vitro* e inducir la formación de aniones superóxido. Sin embargo el mecanismo de acción sobre el mismo todavía debe ser elucidado.

Los radicales tirosilos están implicados en diferentes procesos redox mediados por enzimas incluida la generación de oxígeno a partir del agua y en la reacción de la ribonucleótido reductasa. Por lo tanto, la cadena lateral aromática de los residuos de tirosina redox son catalíticamente importantes (Barry *et al.*, 2012). Vassilliev y colaboradores en el año 2005 sintetizaron varios pentapéptidos. La secuencia de los mismos se eligió de modo tal de reproducir secuencias peptídicas encontradas en enzimas que contienen tirosina redox, como por ejemplo la ribonucleótido reductasa y el fotosistema II. Al analizar diferentes péptidos redox, encontraron que tanto la secuencia de aminoácidos como la longitud de los mismos afectaban la estructura y función de los residuos de tirosina redox activos (Vassiliev *et al.*, 2005). Es interesante notar al observar la Figura 3,21 que la MccJ25 tiene 3 de los 5 aminoácidos de uno de los péptidos estudiados por Vassiliev y colaboradores (péptido R), descrito como péptido redox y derivado, a su vez, de una proteína redox.



Figura 3.21. Secuencias de MccJ25 y el péptido R. Se comparan las secuencias de aminoácidos del pentapéptido con la de MccJ25. El péptido R contiene una tirosina redox activa que forma un radical tirosilo.

Por ensayos de voltametría cíclica se vio que la MccJ25 se oxida de forma irreversible, esta oxidación es debida exclusivamente, en fase homogénea, a la Tyr9. El potencial redox reportado es de aproximadamente 0,95 V, lo que se corresponde con el valor de potencial redox para la tirosina. Por otro lado, mediante EPR se concluyó que la MccJ25 es capaz de producir un radical tirosilo *in vitro*, y se vio además que el residuo que lo genera, la Tyr9, es importante en el mecanismo de acción de MccJ25 sobre la membrana celular mediada por la inhibición del consumo de oxígeno y generación de radicales superóxido (Chalon *et al.*, 2009; Chalón *et al.*, 2011). Se sabe que la MccJ25 no es capaz de generar radicales superóxido de manera directa, sino que necesitaría un componente activo propio de la célula para poder generarlos. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la MccJ25 es un péptido redox capaz de formar un radical tirosilo por medio de la Tyr9 de manera indirecta, se propuso evaluar la capacidad del péptido de ceder electrones a los citocromos y generar un cambio en el espectro de absorción de los mismos.

Se decidió indagar si el péptido posee la capacidad de inducir por sí mismo un cambio en el estado de oxidación de las oxidasas terminales. Para ello, se trataron ambos citocromos con KCN 6 mM de modo tal de producir un bloqueo de la transferencia de electrones hacia el oxígeno y se agregó MccJ25. En la parte izquierda de la Figura 3.22 se representan los espectros del citocromo *bdI*, mientras que en la parte derecha se muestran los correspondientes al citocromo *bo₃*. Antes de llevar a cabo el ensayo se corroboró que el KCN no produzca ningún cambio espectral en la concentración usada y durante el tiempo de reacción (A). Un control adicional fue llevado a cabo con DTT-Q₁ (B). Al tener bloqueado el paso de reducción del O₂ por la presencia de KCN los electrones que llegan desde la quinona reducen a la proteína y producen la reducción de la misma. El tratamiento con MccJ25 (C) fue capaz de inducir un desplazamiento desde los 412 nm hacia longitudes de ondas mayores del máximo de absorción del hemo *b₅₅₈*. La aparición del máximo a 560 nm de este mismo grupo hemo y la desaparición del máximo de 645 nm característicos del espectro de absorbancia del citocromo *bdI* reducido. Similar al cambio observado del citocromo *bdI* de *Azotobacter vinelandii* cuando interacciona con aurachin D (Jünemann *et al.*, 1997). Estos autores sugirieron una proximidad entre el hemo *b₅₅₈* y el sitio de unión del inhibidor, lo que llevaría a la inhibición del dominio de unión a quinona. A diferencia de lo que ocurre con el citocromo *bdI*, sobre el citocromo *bo₃* el tratamiento con el péptido

no produjo ningún cambio espectral. Este resultado es coherente con la falta de inhibición y la no inducción de ERO observada *in vitro* en esta oxidasa terminal.

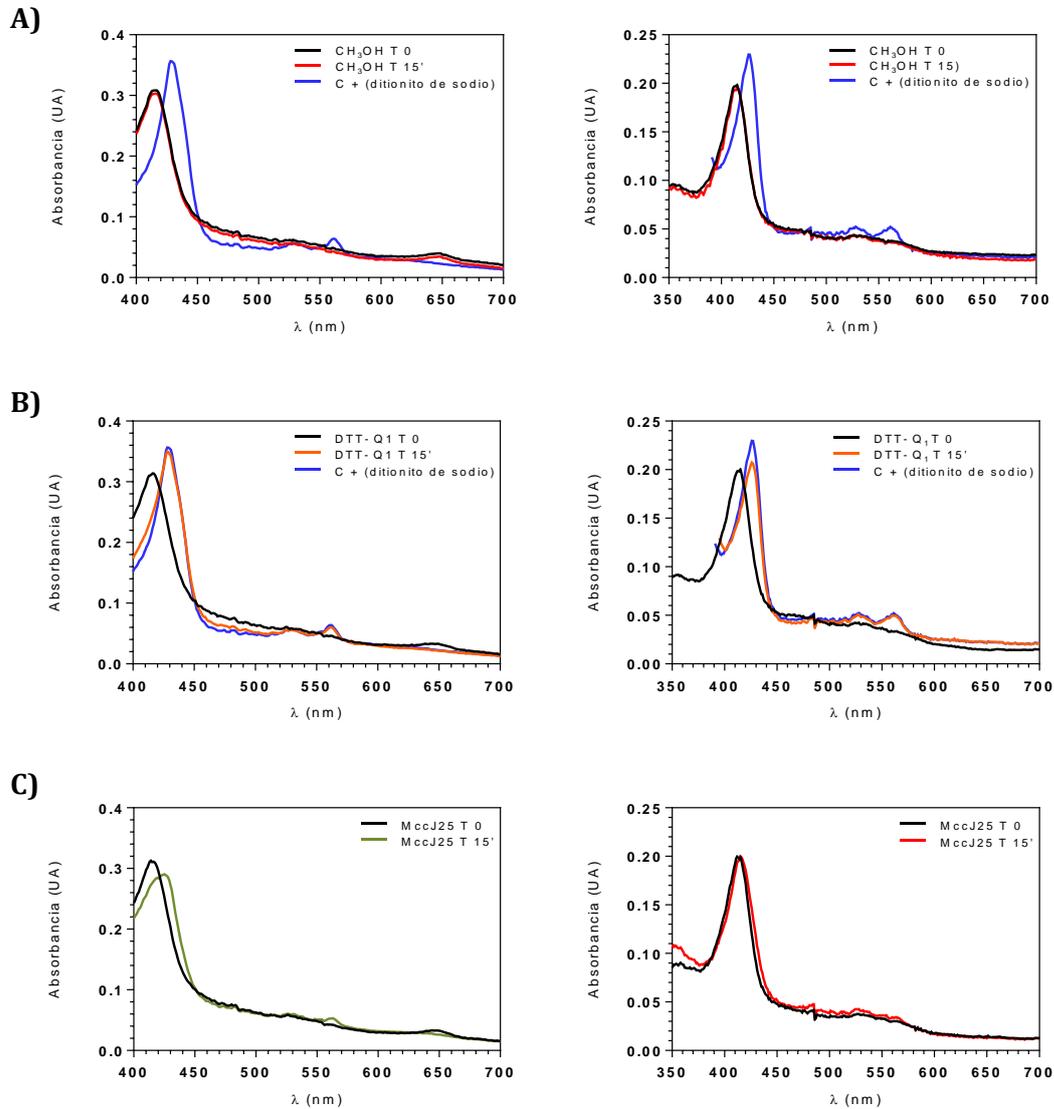


Figura 3.22. Perturbaciones espectrales inducidas por MccJ25.

Finalmente, en la Figura 3.22 se muestra el análisis de la diferencia entre los espectros de la forma reducida con MccJ25 (A) y ditionito de sodio (B) y la forma oxidada del citocromo *bdl* en presencia de KCN. Se inserta nuevamente la Figura 3.9 de apartado d.i de esta sección (C). La diferencia de absorción entre ambos espectros mostró la absorbancia típica y característica del citocromo b_{558} a 430, 530 y 560 nm. Sin embargo, como la reducción por parte de la MccJ25 no fue completa, la intensidad de absorción es menor que el control con ditionito de sodio. El pico de absorción del hemo b_{595} a 595 nm no fue observado en el espectro obtenido luego del tratamiento con MccJ25 mientras que la absorbancia del citocromo *d* a 628 nm no se observa en ninguno de los dos casos. Esto

último puede deberse a la unión del KCN con este grupo hemo no permitiendo su reducción. Debido a que estos ensayos son preliminares, no se puede afirmar en forma concluyente que la MccJ25 afecte específicamente a un determinado grupo hemo pero si se puede concluir que el péptido es capaz de provocar un cambio en el estado de oxidación del citocromo *bdI* provocando una reducción parcial del mismo. Esto llevaría a un mal funcionamiento de la proteína lo cual sería el causante del aumento de ERO. Cabe recordar que la MccJ25 es un péptido redox, el cual es capaz de formar un radical tirosilo. Se plantea la posibilidad de que el péptido al ceder su electrón podría reducir de manera parcial al citocromo llevando a la formación de un radical tirosilo y paralelamente provocaría la reducción del oxígeno.

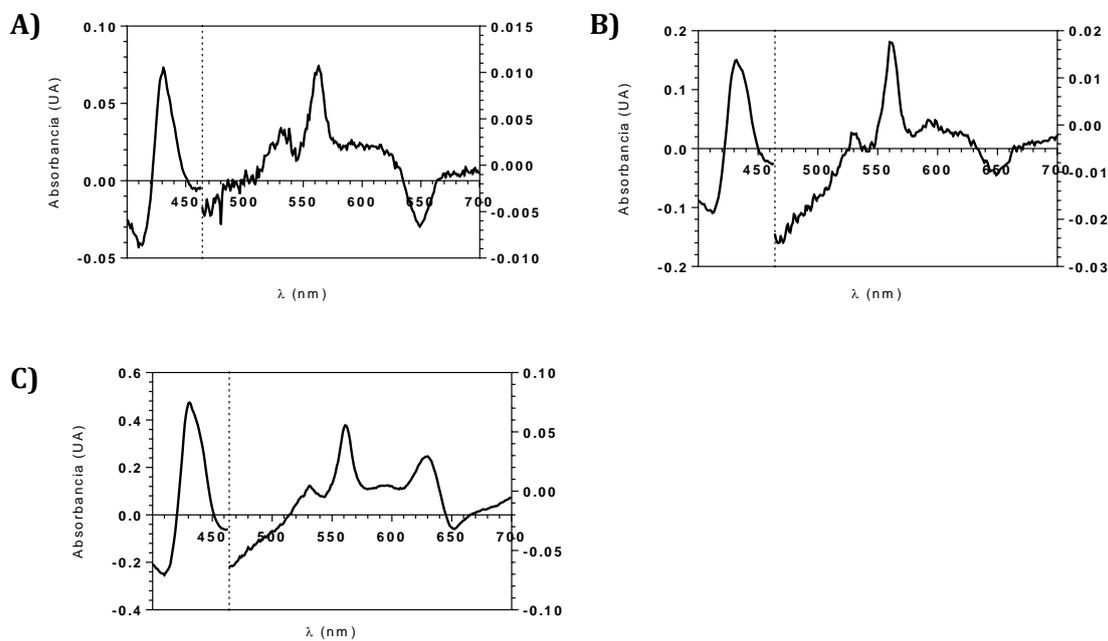


Figura 3.23. Espectros de diferencia entre la absorbancia de la forma reducida menos la forma oxidada. Se muestra el espectro obtenido por el tratamiento con MccJ25 **(A)** y ditionito de sodio **(B)** en presencia de KCN. **(C)** Espectro obtenido por el tratamiento con ditionito de sodio en ausencia de KCN.

5. Discusión general

El efecto de la acción de MccJ25 sobre la cadena respiratoria bacteriana fue descrito por primera vez en *Salmonella*. En la cepa hipersensible *S. Newport* la MccJ25 despolariza la membrana plasmática, inhibe el consumo de oxígeno y algunas enzimas de la cadena respiratoria como las deshidrogenasas de NADH, succinato y lactato (Rintoul *et al.*, 2001). Sin embargo, *S. Typhimurium*, *S. Derby* y algunas cepas de *S. Enteritidis* son resistentes, debido a que el péptido no puede ingresar a la célula (Killmann *et al.*, 2001). Se demostró que se debía a que la proteína transportadora FhuA que poseen dichas cepas es incapaz de transportarlo. *S. Typhimurium*, se volvió sensible a MccJ25 cuando fue transformada con un plásmido de codifica para FhuA de *E. coli*. En esta cepa la MccJ25 además de la inhibición de la ARNP actúa sobre la membrana interna de *Salmonella*, donde se vio una inhibición de la respiración celular pero sin dañar la permeabilidad de la membrana (Vincent *et al.*, 2004). Se propuso que la hipersensibilidad que presentaba esta cepa al antibiótico resulta de un efecto aditivo de estos dos mecanismos de acción (Rintoul *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2004). En *E. coli* en un principio tampoco se pudo ver el efecto de la MccJ25 sobre la respiración celular. Sin embargo, la cepa transformante de *E. coli* PA232 (pGC01) con una ARNP resistente se volvió hipersensible al péptido. Se produjo una inhibición de la respiración celular sin alterar significativamente la permeabilidad celular y el potencial transmembrana (Bellomio *et al.*, 2007). Nuevamente solo se obtuvo un efecto significativo sobre el consumo de oxígeno cuando se hiperexpresó FhuA, es decir aumentando el ingreso del péptido al interior celular. En cuanto a la alteración de la permeabilidad de membrana, el péptido es capaz de inducir pérdida de iones pequeños en liposomas (Rintoul *et al.*, 2000). Sin embargo, no se encontraron evidencias que sugieran que la integridad de liposomas sea afectada en gran medida. Por lo que se concluyó que el péptido no formaría poros en la membrana ni tendría un mecanismo de tipo detergente a pesar de que penetra en la membrana hasta la zona interfásial (Dupuy y Morero, 2011).

Como se esperaba, cuando se estudió el efecto de la MccJ25 en las cepas de *E. coli* C43 y sus mutantes también fue necesaria la hiperexpresión de FhuA para poder observar el efecto del péptido a nivel de la cadena respiratoria. Los resultados arrojaron una inhibición del consumo de oxígeno en todas las cepas ensayadas. Sin embargo, se observó que la inhibición del consumo de oxígeno fue menor en las cepas en la que citocromo *bdI* se encontraba presente. La letalidad de los antibióticos se encuentra asociada a las alteraciones fisiológicas en el estado redox de la célula y la influencia de las condiciones ambientales, como el nivel de aireación y la disponibilidad de aceptores de electrones terminales. Tanto los antibióticos bactericidas como bacteriostáticos son capaces de perturbar la respiración celular. La inhibición de procesos celulares tales como la transcripción del ADN o traducción del ARNm puede reducir la demanda de energía y

secundariamente suprimir las tasas de respiración celular y la producción de ATP llevando a la célula a un estado metabólico que no provoca su muerte. Mientras que la muerte celular ocasionada por los antibióticos bactericidas se asocia a una aceleración de la respiración y a la producción de ERO. Esto termina por causar un daño secundario que afecta a los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Dwyer *et al.*, 2014; Lobritz *et al.*, 2015). En los ensayos llevados a cabo para estudiar la influencia de la MccJ25 sobre el consumo de oxígeno de bacterias vivas la tasa de consumo de oxígeno no se encuentra acelerada, a diferencia de lo reportado por Lobritz y colaboradores (2015). Si se tiene en cuenta lo discutido Lobritz y Dwyer, la MccJ25 al perturbar la transcripción génica y la respiración celular en las cepas de *E. coli* C43 estimularía una alteración del estado redox de la célula con la resultante formación de ERO. En los ensayos de viabilidad celular llevados a cabo en este trabajo fue observada la capacidad del péptido de disminuir marcadamente las UFC/ml en la cepa parental en un periodo corto de incubación de 30 minutos. De la misma manera produjo una disminución de las UFC/ml en las cepas mutantes en dos oxidasas terminales *E. coli* C43 $\Delta bdI\Delta bdII$ y *E. coli* C43 $\Delta bo_3\Delta bdII$. Ambas cepas son capaces de crecer aeróbicamente con solo una de las oxidasas terminales. Se observó como la ausencia del citocromo *bdII* incrementó la muerte celular con respecto a las cepas que solo tienen uno de los citocromos mutados, *E. coli* C43 ΔbdI y *E. coli* C43 Δbo_3 . No se encuentra reportado hasta la fecha una actividad depuradora o una eventual inducción de un sistema de defensa por parte del citocromo *bdII*. Es por esto que se deberían realizar estudios para ensayar el rol de esta proteína. Una aproximación a una posible explicación es el hecho de que las oxidasas terminales pueden tener actividad peroxidasa asociada (Al-Attar *et al.*, 2016; Edwards *et al.*, 2000; Giuffrè *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 1976). Por otro lado, es necesario recalcar que en los ensayos llevados a cabo *in vivo* el péptido puede actuar sobre sus dos blancos de acción descritos, la ARNP y la cadena respiratoria. Debido a esto también se plantea la necesidad de evaluar el efecto de la MccJ25 sobre la cadena respiratoria en cepas que además de ser mutantes en los citocromos sean mutantes en la ARNP. Esto permitiría también dilucidar si existe una correlación entre ambos mecanismos de acción.

Para estudiar el efecto del péptido *in vitro*, se trabajó con la fracción de membranas de las células y se evaluó el efecto del péptido a nivel de la misma. En ensayos *in vitro* pudo verse como en las membranas de las cepas en las que el consumo de oxígeno se inhibió de menor manera, *E. coli* C43 Δbo_3 y *E. coli* C43 $\Delta bo_3\Delta bdII$, la producción de ERO fue mayor. Esto indicaría que el oxígeno consumido se podría estar reduciendo parcialmente produciendo ERO. Cuando un antibiótico actúa sobre su blanco de acción además de interferir en un proceso específico se produce adicionalmente la generación de ERO. Esta

formación de especies tóxicas del oxígeno se considera como un componente adicional de toxicidad y como una consecuencia fisiológica de la interacción de los antibióticos con sus blancos tradicionales (Dwyer *et al.*, 2014). Sin embargo, como en el ensayo de producción de ERO fue llevado a cabo con membranas aisladas puede afirmarse que en el caso de MccJ25 la producción de ERO sería de manera independiente al blanco de acción intracelular, la ARNP. Resulta evidente que ocurre como consecuencia de un efecto sobre componentes de la membrana de *E. coli*. Dupuy y colaboradores (2009) también reportaron que el péptido induce la formación de especies reactivas del oxígeno mediante ensayos con DCFH-DA *in vivo*. Estos fenómenos se observaron independientemente de la inhibición de la actividad de la ARN polimerasa (Dupuy *et al.*, 2009).

En cuanto a la inhibición de las enzimas de la cadena respiratoria en membranas aisladas la MccJ25 no fue capaz de ejercer un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima NDH a menos que exista un flujo de electrones hasta las oxidasas terminales. Es por esto que no se observa una inhibición de la actividad NADH deshidrogenasa pero si de la actividad NADH oxidasa. La inhibición de la actividad NADH oxidasa resultó mayor si la membrana fue obtenida a partir de una cepa que solo expresaba al citocromo *bdI*, es decir en ausencia del citocromo *bdII*. Se recuerda que cuando se determina la actividad NADH deshidrogenasa, los electrones fluyen desde el NADH hasta el aceptor artificial MTT, ya que las oxidasas terminales están inhibidas con KCN. Al contrario, la actividad NADH oxidasa se determina sin el agregado de cianuro y los electrones pueden fluir hasta el oxígeno a través de las oxidasas terminales. Como el péptido inhibe las oxidasas terminales el efecto sobre la NDH podría ser indirecto por la inhibición de una o de varias de las oxidasas terminales. Si existe una inhibición de las oxidasas terminales, se produciría una acumulación de quinonas reducidas, inhibiendo indirectamente la actividad NADH oxidasa. Este resultado permite concluir que la MccJ25 no actúa a nivel de las enzimas NDH sino corriente abajo de las mismas.

La inhibición de la actividad NADH oxidasa es coincidente con lo reportado anteriormente, la MccJ25 inhibe la actividad NADH y D-lactato oxidasa como así también la actividad NADH y D-lactato deshidrogenasas solo cuando los electrones pueden fluir hasta el aceptor final, el oxígeno (en ausencia de cianuro) (Bellomio *et al.*, 2007). En el mismo trabajo citado se demuestra que la presencia de SOD en la mezcla de reacción revierte la inhibición de esta enzima. Además, el agregado de SOD al medio de cultivos empleando la cepa *E. coli* PA232 (pGC01), también protege a las bacterias *in vivo*, impidiendo que disminuya la cantidad de células incapaces de formar colonias que aparecen en presencia de MccJ25. Esto indica que los radicales superóxido serían un determinante sumamente importante para que esta microcina pueda llevar a cabo la actividad antimicrobiana

(Bellomio *et al.*, 2007). La SOD actúa degradando los radicales superóxido, que son muy reactivos y producen daños a distintos niveles dentro de la célula. El radical superóxido no atraviesa la membrana citoplasmática, pero si atraviesa la membrana externa de las enterobacterias. La MccJ25 induce la producción de radicales hacia el espacio periplásmico actuando sobre la membrana plasmática, pero desde dentro de la célula. Los radicales superóxido podrían actuar produciendo daños a proteínas en el periplasma de la bacteria sensible o pueden dismutar y producir peróxido de hidrógeno (Imlay, 2003). El peróxido de hidrógeno puede atravesar la membrana citoplasmática e induciría estrés oxidativo dentro de la célula blanco. En cuanto a la producción de ERO en las membranas de las cepas de *E. coli* C43 y de las mutantes ensayadas, la presencia de SOD en el medio de reacción provocó una disminución de la oxidación de la sonda fluorescente DCFH inducida por la MccJ25. En consecuencia, la intensidad de fluorescencia obtenida fue la misma en las membranas tratadas con el péptido que en los controles sin péptido. Este resultado indica que la ERO que se genera en mayor proporción es el anión superóxido. Este anión principalmente podría estar mediando parte del efecto tóxico que provoca la microcina ya que en condiciones de anaerobiosis se pierde casi totalmente la actividad antimicrobiana (Bellomio *et al.*, 2007).

Los organismos emplean varias maquinarias enzimáticas para la reducción de oxígeno al agua. La mayoría de ellos usan enzimas integradas a la membrana, que son miembros de la superfamilia de las oxidasas hemo-cobre. Las cuales generan un gradiente electroquímico de protones usado para procesos que requieren energía, tales como síntesis de ATP. Las oxidasas del tipo citocromo *bd* forman la otra familia conocida de reductasas de oxígeno que abarcan la membrana de bacterias y arqueas, y no está no relacionadas con las oxidasas hemo-cobre. El citocromo *bdI* posee una elevada afinidad por el oxígeno y por lo tanto juega un papel en la protección contra el estrés oxidativo y la colonización de ambientes pobres en oxígeno por bacterias patógenas (Borisov *et al.*, 2015; Forte *et al.*, 2016; Giuffrè *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015). Dentro de los patógenos en los que se encuentra se puede mencionar a *E. coli*, *S. enterica*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella flexneri* y *Enterococcus faecali*. Al igual que otros agentes infecciosos de los géneros *Brucella*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Listeria* y *Mycobacterium* (Borisov *et al.*, 2011a; Cook *et al.*, 2014). En *Brucella*, causante de la brucelosis en cerdos y bovinos, la replicación y supervivencia en macrófagos depende del citocromo *bdI*. Existen estudios en *Salmonella* y *Mycobacterium tuberculosis* que sugieren fuertemente al citocromo *bdI* como un blanco terapéutico potencial. De hecho, mutantes de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* en el citocromo *bdI* son hipersensibles a bedaquilina, un fármaco usado para el tratamiento de la tuberculosis que se dirige a la ATP sintasa. Además, mutantes del citocromo *bdI* de *M.*

smegmatis son hipersusceptibles a clofazimina, un fármaco usado para el tratamiento de la lepra. (Cook y Poole, 2016; Cook *et al.*, 2014). Varios compuestos inhiben al citocromo *bdI* y se han utilizado para estudiar aspectos estructurales y mecánicos de la cadena respiratoria en las bacterias. Sin embargo, la mayoría de los inhibidores son inespecíficos e inhiben a las otras oxidasas de hemo-cobre también. Esto podría ser problemático debido a que estas oxidasas también están presentes en las mitocondrias. La aurachin D fue el único inhibidor que mostró especificidad para el citocromo *bdI*, aunque sólo a concentraciones bajas (Jünemann *et al.*, 1997; Meunier *et al.*, 1995).

En este trabajo a través de los ensayos de viabilidad celular, consumo de oxígeno y producción de ERO en membranas aisladas se pudo ver como en las diferentes mutantes en los citocromos el efecto de la MccJ25 sobre la cadena respiratoria varía. Las cepas en la que menos se inhibió el consumo de oxígeno en presencia del péptido (*E. coli* C43 ΔbdI y *E. coli* C43 $\Delta bdI\Delta bdII$) fueron las que sus respectivas membranas celulares aisladas produjeron un mayor incremento de ERO. Además, la membrana de la cepa *E. coli* C43 $\Delta bo_3\Delta bdII$ fue la que más resultó inhibida cuando se ensayó la actividad ubiquinol oxidasa.

Anteriormente fue mencionado que el citocromo *bo₃* de *E. coli* está relacionado estructuralmente al complejo IV de la membrana interna de la mitocondria, la citocromo *c* oxidasa, (Abramson *et al.*, 2000). Por otro lado, la MccJ25 es capaz de inhibir al complejo III, la citocromo *c* reductasa de mitocondrias aisladas de corazones de ratas (Niklison Chirou *et al.*, 2004). Con base en esos antecedentes se purificaron las oxidasas terminales de *E. coli*, el citocromo *bdI* y el citocromo *bo₃*. Una vez obtenidos los mismos, luego de caracterizarlos espectralmente y cuantificarlos, se procedió a evaluar directamente el efecto del péptido sobre la actividad ubiquinol oxidasa. Cuando en el medio de reacción se encontraba el citocromo *bdI* con su sustrato, el ubiquinol, como resultado se obtuvo que la reacción fue inhibida en presencia de MccJ25. Sin embargo en igualdad de condiciones no se observó el mismo comportamiento por parte de citocromo *bo₃*. Se pudo demostrar que la inhibición del citocromo *bdI* es de tipo no competitiva y estaría mediada por iones superóxido.

Un compuesto cuya toxicidad es mediada por el aumento de la producción de superóxido es el paraquat. El mismo es capaz de inducir este aumento en el interior de la célula aún cuando la cadena respiratoria es bloqueada por cianuro. Esto se debe a que el paraquat es fácilmente reducido por *E. coli* formando un radical. Luego, este radical reacciona rápidamente con el oxígeno para formar superóxido y no se acumula en condiciones aeróbicas sino que sirve como una fuente continua de superóxido ya que se somete a ciclos continuos de oxidación y reducción. En consecuencia, en una suspensión de células se observa un aumento en el consumo de oxígeno en presencia de paraquat y

cianuro (Hassan and Fridovich, 1979). Al contrario de lo que sucede con el paraquat, en las suspensiones de células de las diferentes cepas de *E. coli* C43 (pGC01) incubadas con MccJ25 el agregado de KCN produjo una inhibición total del consumo de oxígeno. Esto es indicativo de que el péptido no es capaz de generar superóxido de forma directa. Se sabe que el potencial redox de la MccJ25 de aproximadamente 0,95 V corresponde con el valor de potencial redox para la tirosina. Además se vio *in vitro* que la MccJ25 se oxida de forma irreversible y que la Tyr9 es capaz de producir un radical tirosilo. Este residuo es importante en el mecanismo de acción de MccJ25 sobre la membrana celular (Chalón *et al.*, 2009; Chalón *et al.*, 2011). En este trabajo de tesis, se evaluó la capacidad del péptido de ceder electrones a los citocromos produciendo una reducción de los mismos. Esto llevaría a un mal funcionamiento de la enzima provocando que las mismas reduzcan de manera incompleta al oxígeno. Como resultado se obtuvo una perturbación del estado redox de citocromo *bdl* y se observó por la modificación de los espectros de absorbancia de los estados oxidado-reducido. La MccJ25 al ceder los electrones formaría el radical tirosilo observado anteriormente por Chalón y colaboradores (2011).

En lo que a la estructura del péptido se refiere, las diferentes zonas: anillo, lazo y cola tienen una función determinada. Dos de las variantes de MccJ25 existentes y estudiadas en este trabajo son la MccJ25-GA e Y9F. La primera posee modificado el extremo C-terminal haciéndola inactiva a nivel de la ARNP sin embargo, conserva su actividad a nivel de la cadena respiratoria (Bellomio *et al.*, 2003). La variante Y9F tiene sustituida a la Tyr9 por una Phe. Esta no tiene efecto en la cadena respiratoria (Chalón *et al.*, 2009). Un estudio en el cual se sustituyó uno por uno los aminoácidos a lo largo del péptido, cada uno de ellos por los otros 19 aminoácidos posibles determinó que los aminoácidos Gly4, Pro7, Tyr9, Phe10, y Phe19 son importantes en la interacción con la ARNP. Cualquier tipo de sustitución sobre la Tyr9 suprimió la inhibición de la transcripción génica (Pavlova *et al.*, 2008). Otros autores también reportaron ensayos de actividad antimicrobiana de diferentes péptidos derivados del péptido nativo. Soudy y colaboradores (2012) diseñaron péptidos basándose en la hipótesis de que se pueden diseñar péptidos con actividad antibacteriana sobre la base de la secuencia de la MccJ25. En ellos la conformación plegada se adquiere por una combinación de enlaces disulfuro intra-péptido e interacciones electrostáticas o hidrofóbicas. Otra hipótesis planteada fue que la formación del lazo es importante, pero no un requisito para la actividad de MccJ25 y que puede ser posible obtener derivados que son activos sin esta estructura (Hammami *et al.*, 2015; Soudy *et al.*, 2012). Una gran diversidad de péptidos fue obtenida y se encontró que algunos de los péptidos sintéticos conservaron la actividad antimicrobiana contra *S. enterica* y *E. coli* a nivel de la ARNP y la cadena respiratoria. Sin embargo, otros péptidos afectaban solo uno

o ninguno de los blancos de acción. La actividad de los derivados fue similar a la de la MccJ25 nativa pero en ningún caso llegó a superarla indicando que la relación estructura función del péptido es importante para su capacidad inhibitoria.

A pesar de todos los resultados obtenidos hasta ahora con respecto al mecanismo de acción de la MccJ25 sobre la cadena respiratoria aún no se comprenden las bases moleculares que gobiernan. Por ese motivo, el estudio en profundidad para aclarar el mecanismo de acción de la MccJ25 que involucra la inhibición de la respiración celular en *E. coli* y *S. enterica*, podría ayudar a una mejor comprensión de los fenómenos mencionados hasta el momento. La obtención de una cepa de *E. coli*, en la que MccJ25 actúe únicamente por el mecanismo de acción que involucra la liberación de especies reactivas del O₂ ayudará mucho en ese sentido. La gran facilidad para manipular genéticamente a esta bacteria permitirá realizar diferentes experimentos en el futuro. Por ejemplo, la obtención y la caracterización de mutantes resistente a MccJ25 en la RNAP y en los diferentes citocromos; además la caracterización del tipo de interacción ejercido por el péptido con ellos podrían ayudar a develar exactamente el mecanismo de acción del antimicrobiano.

La MccJ25 tiene varias propiedades que le otorgan ciertas ventajas con el resto de los péptidos antimicrobianos desde una perspectiva de uso biotecnológico:

- Es resistente a pH extremos y a altas temperaturas y a la degradación proteolítica.
- Es activo frente a cepas con relevancia clínica.
- Es activo en sangre después de 24 hs de incubación y no tiene actividad hemolítica (López *et al.*, 2007).
- Muestra baja toxicidad en células de mamíferos. Aunque la MccJ25 presenta propiedades pro-apoptóticas en mitocondrias aisladas (Niklison Chirou *et al.*, 2004), la baja citotoxicidad podría deberse a su incapacidad para permear las células humanas (Soudy *et al.*, 2012).

Estas propiedades sugieren que la MccJ25 tiene potenciales aplicaciones no tan solo como conservantes de alimentos sino también como un agente terapéutico y por lo tanto se podría llegar a fomentar aún más la aplicación potencial de la administración sistémica y al tratamiento de infecciones resistentes a los antibióticos conocidos en la actualidad. La estructura en alta resolución de las oxidasas terminales del tipo *bd* ayudará a delinear con precisión el mecanismo de reducción de oxígeno. Se recuerda además que el péptido posee otro blanco de acción intracelular. Un conocimiento profundo de las respuestas fisiológicas inducidas por la MccJ25 es fundamental para poder potenciar al máximo los mecanismos de acción del péptido. Lo cual sería de gran importancia y pondría al péptido como un fuerte candidato antimicrobiano potencial.

La aplicación más prometedora a la fecha sería el uso de la MccJ25 como biopreservante de alimentos. Es importante recalcar que para el uso del péptido con tal fin el inconveniente de la resistencia a la degradación proteolítica fue resuelto. En el laboratorio se cuenta con una variante que puede ser degradada por las enzimas digestivas, la MccJ25-G12Y (Pomares *et al.*, 2009). Esta posee una actividad antimicrobiana análoga al péptido nativo y su aplicación en la industria alimenticia está siendo estudiada actualmente con resultados muy alentadores. Por lo tanto, el péptido podría ser utilizado para combatir *in situ* a los microorganismos contaminantes de alimentos que son los principales causantes de gastroenteritis. Una vez ingerido el alimento el péptido sería degradado por las enzimas digestivas de esta manera no se alteraría la microbiota intestinal natural.

En cuanto a la aplicación como agente terapéutico la MccJ25 o derivados basados en ella podrían tener potenciales aplicaciones clínicas. Por ejemplo, *M. tuberculosis* es un aerobio estricto y para generar la primoinfección requiere un ambiente aeróbico. Se considera que su citocromo *bdl* es un factor de virulencia de esta bacteria (Cook y Poole, 2016).

Por supuesto es necesario llevar a cabo una serie de estudios en profundidad para la aplicación terapéutica del péptido. Estudios dirigidos a dilucidar el papel fisiológico del citocromo *bdl* durante las interacciones bacteria-huésped, así como la información estructural de la enzima, guiarán en el futuro las iniciativas potenciales para el desarrollo de fármacos dirigidos.

Los resultados hasta aquí obtenidos permitirían el desarrollo de inhibidores más potentes basados en el blanco en la membrana, reemplazando diferentes aminoácidos en la molécula de MccJ25 por potenciales aminoácidos redox capaces de formar radicales. Además se podría dirigir específicamente la actividad del péptido al citocromo *bdl* mediante el diseño de moléculas modificadas del antibiótico con actividad antimicrobiana sitio dirigido.

La MccJ25 por su naturaleza y por su capacidad de actuar sobre dos dianas diferentes, una a nivel intracelular y otra a nivel de la cadena respiratoria, es una alternativa prometedora para ser considerada como un nuevo antimicrobiano.

6. Conclusiones

CONCLUSIONES

- En cepas mutantes en los citocromos *bo₃* y *bdl* se observó una disminución del efecto tóxico de la MccJ25. Se concluye por lo tanto que ambos citocromos son esenciales para que el péptido pueda ejercer el efecto a nivel de la cadena respiratoria de *E. coli*.
- El citocromo *bdlI* podría ejercer un efecto protector o beneficioso para la cepa blanco de la MccJ25, posiblemente mediando una detoxificación de las ERO.
- El consumo de oxígeno fue menos afectado *in vivo* en las cepas *E. coli* C43 (pGC01) Δbdl y *E. coli* C43 (pGC01) $\Delta bdl\Delta bdlI$ cuando la MccJ25 se encontraba en el medio de reacción. Las preparaciones de membranas de estas cepas son las que más incrementaron la producción de ERO en presencia de MccJ25
- La MccJ25 es incapaz de inhibir directamente la actividad de la enzima NDH de membranas aisladas de *E. coli*.
- En ensayos *in vitro* la MccJ25 inhibió específicamente la actividad ubiquinol oxidasa del citocromo *bdl*. Por los estudios cinéticos que se llevaron a cabo se concluye que es una inhibición de tipo no competitiva. En preparaciones de membranas aisladas de *E. coli* y sobre el citocromo *bdl* puro cuando los electrones fluyen hasta el oxígeno, la MccJ25 induce un aumento de ERO, principalmente del anión superóxido.
- La MccJ25 no inhibió al citocromo *bo₃* *in vitro* en las condiciones ensayadas.
- La MccJ25-GA fue capaz de ejercer un efecto inhibitorio *in vitro* de la misma manera que el péptido nativo.
- La variante Y9F no tuvo un efecto inhibitorio como la MccJ25 nativa demostrando la importancia de la Tyr9 en la acción del péptido sobre la respiración celular.
- La MccJ25 redujo de manera directa al citocromo *bdl* provocando un cambio en el estado redox de la proteína.
- Por lo tanto, en este trabajo se demuestra la importancia de las oxidasas terminales en el mecanismo de acción de la MccJ25 en la cadena respiratoria.

7. Referencias

- Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S., and Wikström, M. (2000). The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 7, 910–917.
- Adelman, K., Yuzenkova, J., La Porta, A., Zenkin, N., Lee, J., Lis, J.T., Borukhov, S., Wang, M.D., and Severinov, K. (2004). Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic Microcin J25. *Mol. Cell* 14, 753–762.
- Al-Attar, S., Yu, Y., Pinkse, M., Hoeser, J., Friedrich, T., Bald, D., and de Vries, S. (2016). Cytochrome *bd* Displays Significant Quinol Peroxidase Activity. *Sci. Rep.* 6, 27631.
- Albesa, I., Becerra, M.C., Battán, P.C., and Páez, P.L. (2004). Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 605–609.
- Allen, R.J., Brenner, E.P., VanOrsdel, C.E., Hobson, J.J., Hearn, D.J., and Hemm, M.R. (2014). Conservation analysis of the CydX protein yields insights into small protein identification and evolution. *BMC Genomics* 15, 946.
- Angermüller, S., and Fahimi, H.D. (1981). Selective cytochemical localization of peroxidase, cytochrome oxidase and catalase in rat liver with 3,3'-diaminobenzidine. *Histochemistry* 71, 33–44.
- Assrir, N., Pavelkova, A., Dazzoni, R., Ducasse, R., Morellet, N., Guittet, E., Rebuffat, S., Zirah, S., Li, Y., and Lescop, E. (2016). Initial Molecular Recognition Steps of McjA Precursor during Microcin J25 Lasso Peptide Maturation. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.*
- Atlung, T., and Brøndsted, L. (1994). Role of the transcriptional activator AppY in regulation of the *cyx appA* operon of *Escherichia coli* by anaerobiosis, phosphate starvation, and growth phase. *J. Bacteriol.* 176, 5414–5422.
- Barry, B.A., Chen, J., Keough, J., Jenson, D., Offenbacher, A., and Pagba, C. (2012). Proton Coupled Electron Transfer and Redox Active Tyrosines: Structure and Function of the Tyrosyl Radicals in Ribonucleotide Reductase and Photosystem II. *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 543–554.
- Bayro, M.J., Mukhopadhyay, J., Swapna, G.V.T., Huang, J.Y., Ma, L.-C., Sineva, E., Dawson, P.E., Montelione, G.T., and Ebright, R.H. (2003). Structure of antibacterial peptide microcin J25: a 21-residue lariat protoknot. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12382–12383.
- Bellomio, A., Rintoul, M.R., and Morero, R.D. (2003). Chemical modification of microcin J25 with diethylpyrocarbonate and carbodiimide: evidence for essential histidyl and carboxyl residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 458–462.
- Bellomio, A., Vincent, P.A., de Arcuri, B.F., Salomón, R.A., Morero, R.D., and Farías, R.N. (2004). The microcin J25 beta-hairpin region is important for antibiotic uptake but not for RNA polymerase and respiration inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 1454–1458.
- Bellomio, A., Oliveira, R.G., Maggio, B., and Morero, R.D. (2005). Penetration and interactions of the antimicrobial peptide, microcin J25, into uncharged phospholipid monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 285, 118–124.

- Bellomio, A., Vincent, P.A., de Arcuri, B.F., Farías, R.N., and Morero, R.D. (2007). Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *J. Bacteriol.* *189*, 4180–4186.
- Bennett, M.C., Mlady, G.W., Kwon, Y.H., and Rose, G.M. (1996). Chronic in vivo sodium azide infusion induces selective and stable inhibition of cytochrome c oxidase. *J. Neurochem.* *66*, 2606–2611.
- Benov, L., and Fridovich, I. (1999). Why superoxide imposes an aromatic amino acid auxotrophy on *Escherichia coli*. The transketolase connection. *J. Biol. Chem.* *274*, 4202–4206.
- Blond, A., Péduzzi, J., Goulard, C., Chiuchiolo, M.J., Barthélémy, M., Prigent, Y., Salomón, R.A., Farías, R.N., Moreno, F., and Rebuffat, S. (1999). The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem. FEBS* *259*, 747–755.
- Blond, A., Cheminant, M., Destoumieux-Garzón, D., Ségalas-Milazzo, I., Peduzzi, J., Goulard, C., and Rebuffat, S. (2002). Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. *Eur. J. Biochem. FEBS* *269*, 6212–6222.
- Bogachev, A.V., Murtazina, R.A., and Skulachev, V.P. (1996). H⁺/e⁻ stoichiometry for NADH dehydrogenase I and dimethyl sulfoxide reductase in anaerobically grown *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* *178*, 6233–6237.
- Bolignano, B., Salmon, I., Ingledew, W.J., and Poole, R.K. (1991). Redox analysis of the cytochrome o-type quinol oxidase complex of *Escherichia coli* reveals three redox components. *Biochem. J.* *274 (Pt 3)*, 723–730.
- Bonhivers, M., Ghazi, A., Boulanger, P., and Letellier, L. (1996). FhuA, a transporter of the *Escherichia coli* outer membrane, is converted into a channel upon binding of bacteriophage T5. *EMBO J.* *15*, 1850–1856.
- Bonini, M.G., Rota, C., Tomasi, A., and Mason, R.P. (2006). The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? *Free Radic. Biol. Med.* *40*, 968–975.
- Borisov, V.B., and Verkhovskiy, M.I. (2015). Oxygen as Acceptor. *EcoSal Plus* *6*.
- Borisov, V., Arutyunyan, A.M., Osborne, J.P., Gennis, R.B., and Konstantinov, A.A. (1999). Magnetic circular dichroism used to examine the interaction of *Escherichia coli* cytochrome *bd* with ligands. *Biochemistry (Mosc.)* *38*, 740–750.
- Borisov, V.B., Gennis, R.B., Hemp, J., and Verkhovskiy, M.I. (2011a). The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 1398–1413.
- Borisov, V.B., Murali, R., Verkhovskaya, M.L., Bloch, D.A., Han, H., Gennis, R.B., and Verkhovskiy, M.I. (2011b). Aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* is not allowed to work in fully uncoupled mode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17320–17324.
- Borisov, V.B., Forte, E., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2013). Cytochrome *bd* oxidase from *Escherichia coli* displays high catalase activity: an additional defense against oxidative stress. *FEBS Lett.* *587*, 2214–2218.

- Borisov, V.B., Forte, E., Siletsky, S.A., Arese, M., Davletshin, A.I., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2015). Cytochrome *bd* Protects Bacteria against Oxidative and Nitrosative Stress: A Potential Target for Next-Generation Antimicrobial Agents. *Biochem. Biokhimiia* *80*, 565–575.
- Braun, M., Killmann, H., Maier, E., Benz, R., and Braun, V. (2002). Diffusion through channel derivatives of the *Escherichia coli* FhuA transport protein. *Eur. J. Biochem. FEBS* *269*, 4948–4959.
- Braun, V., Schaller, K., and Wolff, H. (1973). A common receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of *Escherichia coli* B. *Biochim. Biophys. Acta* *323*, 87–97.
- Braun, V., Frenz, J., Hantke, K., and Schaller, K. (1980). Penetration of colicin M into cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *142*, 162–168.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H.G., and de Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* *286*, 2361–2364.
- Brøndsted, L., and Atlung, T. (1996). Effect of growth conditions on expression of the acid phosphatase (*cyx-appA*) operon and the *appY* gene, which encodes a transcriptional activator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *178*, 1556–1564.
- Calhoun, M.W., Oden, K.L., Gennis, R.B., de Mattos, M.J., and Neijssel, O.M. (1993). Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J. Bacteriol.* *175*, 3020–3025.
- Carlioz, A., and Touati, D. (1986). Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* *5*, 623–630.
- Carmel, G., Hellstern, D., Henning, D., and Coulton, J.W. (1990). Insertion mutagenesis of the gene encoding the ferrichrome-iron receptor of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *172*, 1861–1869.
- Cathcart, R., Schwiers, E., and Ames, B.N. (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal. Biochem.* *134*, 111–116.
- Chalon, M.C., Bellomio, A., Solbiati, J.O., Morero, R.D., Farias, R.N., and Vincent, P.A. (2009). Tyrosine 9 is the key amino acid in microcin J25 superoxide overproduction. *FEMS Microbiol. Lett.* *300*, 90–96.
- Chalón, M.C., Wilke, N., Pedersen, J., Rufini, S., Morero, R.D., Cortez, L., Chehín, R.N., Farias, R.N., and Vincent, P.A. (2011). Redox-active tyrosine residue in the microcin J25 molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *406*, 366–370.
- Chepuri, V., Lemieux, L., Au, D.C., and Gennis, R.B. (1990). The sequence of the *cyo* operon indicates substantial structural similarities between the cytochrome *o* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the *aa3*-type family of cytochrome *c* oxidases. *J. Biol. Chem.* *265*, 11185–11192.
- Clare, D.A., Duong, M.N., Darr, D., Archibald, F., and Fridovich, I. (1984). Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Anal. Biochem.* *140*, 532–537.

Collins, M.D., and Jones, D. (1981). A note on the separation of natural mixtures of bacterial ubiquinones using reverse-phase partition thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography. *J. Appl. Bacteriol.* *51*, 129–134.

Cook, G.M., and Poole, R.K. (2016). Biochemistry. A bacterial oxidase like no other? *Science* *352*, 518–519.

Cook, G.M., Greening, C., Hards, K., and Berney, M. (2014). Energetics of pathogenic bacteria and opportunities for drug development. *Adv. Microb. Physiol.* *65*, 1–62.

Corbalan, N., Runti, G., Adler, C., Covaceuszach, S., Ford, R.C., Lamba, D., Beis, K., Scocchi, M., and Vincent, P.A. (2013). Functional and structural study of the dimeric inner membrane protein SbmA. *J. Bacteriol.* *195*, 5352–5361.

Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 777–788.

Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 95–105.

de Cristóbal, R.E., Solbiati, J.O., Zenoff, A.M., Vincent, P.A., Salomón, R.A., Yuzenkova, J., Severinov, K., and Farías, R.N. (2006). Microcin J25 uptake: His5 of the MccJ25 lariat ring is involved in interaction with the inner membrane MccJ25 transporter protein SbmA. *J. Bacteriol.* *188*, 3324–3328.

Culakova, H., Dzugasova, V., Gbelska, Y., and Subik, J. (2013). Antibacterial activity of CTBT (7-chlorotetrazolo[5,1-c]benzo[1,2,4]triazine) generating reactive oxygen species. *Microbiol. Res.* *168*, 147–152.

Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., and Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *72*, 317–364, table of contents.

Delgado, M.A., and Salomón, R.A. (2005). Molecular characterization of a DNA fragment carrying the basic replicon of pTUC100, the natural plasmid encoding the peptide antibiotic microcin J25 system. *Plasmid* *53*, 258–262.

Delgado, M.A., Solbiati, J.O., Chiuchiolo, M.J., Farías, R.N., and Salomón, R.A. (1999). *Escherichia coli* outer membrane protein TolC is involved in production of the peptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* *181*, 1968–1970.

Delgado, M.A., Rintoul, M.R., Farías, R.N., and Salomón, R.A. (2001). *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* *183*, 4543–4550.

Delgado, M.A., Vincent, P.A., Farías, R.N., and Salomón, R.A. (2005). YojI of *Escherichia coli* functions as a microcin J25 efflux pump. *J. Bacteriol.* *187*, 3465–3470.

Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J., and Hartman, P.E. (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* *54*, 61–76.

Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2002). Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie* *84*, 511–519.

- Destoumieux-Garzón, D., Duquesne, S., Peduzzi, J., Goulard, C., Desmadril, M., Letellier, L., Rebuffat, S., and Boulanger, P. (2005). The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11-Pro16 beta-hairpin region in the recognition mechanism. *Biochem. J.* *389*, 869–876.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., and Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr. Purif.* *37*, 203–206.
- Dupuy, F., and Morero, R. (2011). Microcin J25 membrane interaction: selectivity toward gel phase. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 1764–1771.
- Dupuy, F.G., Chirou, M.V.N., de Arcuri, B.F., Minahk, C.J., and Morero, R.D. (2009). Proton motive force dissipation precludes interaction of microcin J25 with RNA polymerase, but enhances reactive oxygen species overproduction. *Biochim. Biophys. Acta* *1790*, 1307–1313.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Zirah, S., Goulard, C., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007). Two enzymes catalyze the maturation of a lasso peptide in *Escherichia coli*. *Chem. Biol.* *14*, 793–803.
- Dwyer, D.J., Kohanski, M.A., Hayete, B., and Collins, J.J. (2007). Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* *3*, 91.
- Dwyer, D.J., Belenky, P.A., Yang, J.H., MacDonald, I.C., Martell, J.D., Takahashi, N., Chan, C.T.Y., Lobritz, M.A., Braff, D., Schwarz, E.G., et al. (2014). Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E2100–2109.
- Edwards, S.E., Loder, C.S., Wu, G., Corker, H., Bainbridge, B.W., Hill, S., and Poole, R.K. (2000). Mutation of cytochrome *bd* quinol oxidase results in reduced stationary phase survival, iron deprivation, metal toxicity and oxidative stress in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol. Lett.* *185*, 71–77.
- Endriss, F., Braun, M., Killmann, H., and Braun, V. (2003). Mutant analysis of the *Escherichia coli* FhuA protein reveals sites of FhuA activity. *J. Bacteriol.* *185*, 4683–4692.
- Evans, D.J. (1969). Membrane Adenosine Triphosphatase of *Escherichia coli*: Activation by Calcium Ion and Inhibition by Monovalent Cations¹. *J. Bacteriol.* *100*, 914–922.
- Fedorova, M., Bollineni, R.C., and Hoffmann, R. (2014). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom. Rev.* *33*, 79–97.
- Forte, E., Borisov, V.B., Falabella, M., Colaço, H.G., Tinajero-Trejo, M., Poole, R.K., Vicente, J.B., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2016). The Terminal Oxidase Cytochrome *bd* Promotes Sulfide-resistant Bacterial Respiration and Growth. *Sci. Rep.* *6*, 23788.
- Fournier, E., Nikolaev, A., Nasiri, H.R., Hoese, J., Friedrich, T., Hellwig, P., and Melin, F. (2016). Creation of a gold nanoparticle based electrochemical assay for the detection of inhibitors of bacterial cytochrome *bd* oxidases. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* *111*, 109–114.

- Frericks, H.L., Zhou, D.H., Yap, L.L., Gennis, R.B., and Rienstra, C.M. (2006). Magic-angle spinning solid-state NMR of a 144 kDa membrane protein complex: *E. coli* cytochrome *bo*₃ oxidase. *J. Biomol. NMR* 36, 55–71.
- Gennis, R.B., and Stewart, V. (1996). In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (Washington, DC.: F.C. Neidhardt, ed.).
- Giuffrè, A., Borisov, V.B., Arese, M., Sarti, P., and Forte, E. (2014). Cytochrome *bd* oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1178–1187.
- Gort, A.S., Ferber, D.M., and Imlay, J.A. (1999). The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 32, 179–191.
- Goswami, M., Mangoli, S.H., and Jawali, N. (2006). Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 949–954.
- Halliwell, B., and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231–255.
- Hammami, R., Bédard, F., Gomaa, A., Subirade, M., Biron, E., and Fliss, I. (2015). Lasso-inspired peptides with distinct antibacterial mechanisms. *Amino Acids* 47, 417–428.
- Hasper, H.E., Kramer, N.E., Smith, J.L., Hillman, J.D., Zachariah, C., Kuipers, O.P., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science* 313, 1636–1637.
- Hassan, H.M., and Fridovich, I. (1979). Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *J. Biol. Chem.* 254, 10846–10852.
- Håvarstein, L.S., Holo, H., and Nes, I.F. (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. Read. Engl.* 140 (Pt 9), 2383–2389.
- Hevia, D., Mayo, J.C., Tan, D.-X., Rodriguez-Garcia, A., and Sainz, R.M. (2014). Melatonin enhances photo-oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by an antioxidant reaction that renders N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK). *PLoS One* 9, e109257.
- Hoeser, J., Hong, S., Gehmann, G., Gennis, R.B., and Friedrich, T. (2014). Subunit CydX of *Escherichia coli* cytochrome *bd* ubiquinol oxidase is essential for assembly and stability of the di-heme active site. *FEBS Lett.* 588, 1537–1541.
- Imlay, J.A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395–418.
- Imlay, J.A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755–776.
- Imlay, J.A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 443–454.
- Ingledeu, W.J., and Poole, R.K. (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48, 222–271.

- Jesse, H.E., Nye, T.L., McLean, S., Green, J., Mann, B.E., and Poole, R.K. (2013). Cytochrome *bd*-I in *Escherichia coli* is less sensitive than cytochromes *bd*-II or *bo*'' to inhibition by the carbon monoxide-releasing molecule, CORM-3: N-acetylcysteine reduces CO-RM uptake and inhibition of respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 1693–1703.
- Jünemann, S., Wrigglesworth, J.M., and Rich, P.R. (1997). Effects of decyl-aurachin D and reversed electron transfer in cytochrome *bd*. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 9323–9331.
- Jung, I.L., and Kim, I.G. (2003). Transcription of *ahpC*, *katG*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 915–922.
- Killmann, H., Braun, M., Herrmann, C., and Braun, V. (2001). FhuA barrel-cork hybrids are active transporters and receptors. *J. Bacteriol.* 183, 3476–3487.
- Kita, K., Konishi, K., and Anraku, Y. (1984a). Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. II. Purification and properties of cytochrome b558-d complex from cells grown with limited oxygen and evidence of branched electron-carrying systems. *J. Biol. Chem.* 259, 3375–3381.
- Kita, K., Konishi, K., and Anraku, Y. (1984b). Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. I. Purification and properties of cytochrome b562-o complex from cells in the early exponential phase of aerobic growth. *J. Biol. Chem.* 259, 3368–3374.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., and Collins, J.J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130, 797–810.
- Kolonay, J.F., Moshiri, F., Gennis, R.B., Kaysser, T.M., and Maier, R.J. (1994). Purification and characterization of the cytochrome *bd* complex from *Azotobacter vinelandii*: comparison to the complex from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176, 4177–4181.
- Korshunov, S., and Imlay, J.A. (2006). Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 6326–6334.
- Krasnoselskaya, I., Arutjunjan, A.M., Smirnova, I., Gennis, R., and Konstantinov, A.A. (1993). Cyanide-reactive sites in cytochrome *bd* complex from *E. coli*. *FEBS Lett.* 327, 279–283.
- Laviña, M., Pugsley, A.P., and Moreno, F. (1986). Identification, mapping, cloning and characterization of a gene (*sbmA*) required for microcin B17 action on *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1685–1693.
- Laviña, M., Gaggero, C., and Moreno, F. (1990). Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 6585–6588.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S.C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227–231.
- Lin, M.T., Sperling, L.J., Frericks Schmidt, H.L., Tang, M., Samoilova, R.I., Kumasaka, T., Iwasaki, T., Dikanov, S.A., Rienstra, C.M., and Gennis, R.B. (2011). A rapid and robust method for selective isotope labeling of proteins. *Methods San Diego Calif* 55, 370–378.

- Liu, Q., Lin, Z., Zhang, Y., Li, Y., Wang, Z., and Chen, T. (2014). Improved poly(3-hydroxybutyrate) production in *Escherichia coli* by inactivation of cytochrome *bd*-II oxidase or/and NDH-II dehydrogenase in low efficient respiratory chains. *J. Biotechnol.* *192, Part A*, 170–176.
- Lobritz, M.A., Belenky, P., Porter, C.B.M., Gutierrez, A., Yang, J.H., Schwarz, E.G., Dwyer, D.J., Khalil, A.S., and Collins, J.J. (2015). Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 8173–8180.
- Lopez, F.E., Vincent, P.A., Zenoff, A.M., Salomón, R.A., and Farías, R.N. (2007). Efficacy of microcin J25 in biomatrices and in a mouse model of *Salmonella* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* *59*, 676–680.
- Lorence, R.M., Miller, M.J., Borochoy, A., Faiman-Weinberg, R., and Gennis, R.B. (1984). Effects of pH and detergent on the kinetic and electrochemical properties of the purified cytochrome d terminal oxidase complex of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* *790*, 148–153.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.
- Lu, P., Heineke, M.H., Koul, A., Andries, K., Cook, G.M., Lill, H., van Spanning, R., and Bald, D. (2015). The cytochrome *bd*-type quinol oxidase is important for survival of *Mycobacterium smegmatis* under peroxide and antibiotic-induced stress. *Sci. Rep.* *5*, 10333.
- Massa, E.M., and Farías, R.N. (1982). Effect of phospholipids, triton X-100 and biological membranes on redox systems involving tetrazolium salt reduction. its implications for the assay of enzymatic activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *104*, 1623–1629.
- Massé, E., and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 4620–4625.
- Mattiuzzo, M., Bandiera, A., Gennaro, R., Benincasa, M., Pacor, S., Antcheva, N., and Scocchi, M. (2007). Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Mol. Microbiol.* *66*, 151–163.
- Messner, K.R., and Imlay, J.A. (1999). The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *274*, 10119–10128.
- Messner, K.R., and Imlay, J.A. (2002). Mechanism of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation by Fumarate Reductase, Succinate Dehydrogenase, and Aspartate Oxidase. *J. Biol. Chem.* *277*, 42563–42571.
- Meunier, B., Madgwick, S.A., Reil, E., Oettmeier, W., and Rich, P.R. (1995). New inhibitors of the quinol oxidation sites of bacterial cytochromes *bo* and *bd*. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 1076–1083.
- Miller, M.J., and Gennis, R.B. (1983). The purification and characterization of the cytochrome d terminal oxidase complex of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *J. Biol. Chem.* *258*, 9159–9165.

Minghetti, K.C., and Gennis, R.B. (1988). The two terminal oxidases of the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* each yield water and not peroxide as a final product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 243–248.

Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Knight, J., Levy, R.M., and Ebright, R.H. (2004). Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. *Mol. Cell* 14, 739–751.

Muñoz-Rojas, J. (2004). Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano (Asociación Mexicana de Microbiología, capítulo 3).

Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2012). *Lehninger Principles of Biochemistry* (New York: Worth Publ Inc).

Newton, G., and Gennis, R.B. (1991). In vivo assembly of the cytochrome d terminal oxidase complex of *Escherichia coli* from genes encoding the two subunits expressed on separate plasmids. *Biochim. Biophys. Acta* 1089, 8–12.

Niklison Chirou, M.V., Minahk, C.J., and Morero, R.D. (2004). Antimitochondrial activity displayed by the antimicrobial peptide microcin J25. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 882–886.

Niklison-Chirou, M.V., Dupuy, F., Pena, L.B., Gallego, S.M., Barreiro-Arcos, M.L., Avila, C., Torres-Bugeau, C., Arcuri, B.E., Bellomio, A., Minahk, C., et al. (2010). Microcin J25 triggers cytochrome c release through irreversible damage of mitochondrial proteins and lipids. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 273–281.

Okado-Matsumoto, A., and Fridovich, I. (2000). The role of alpha,beta -dicarbonyl compounds in the toxicity of short chain sugars. *J. Biol. Chem.* 275, 34853–34857.

Osborne, J.P., and Gennis, R.B. (1999). Sequence analysis of cytochrome *bd* oxidase suggests a revised topology for subunit I. *Biochim. Biophys. Acta* 1410, 32–50.

Pavlova, O., Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Ebright, R.H., and Severinov, K. (2008). Systematic structure-activity analysis of microcin J25. *J. Biol. Chem.* 283, 25589–25595.

Pittman, M.S., Robinson, H.C., and Poole, R.K. (2005). A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm. *J. Biol. Chem.* 280, 32254–32261.

Pomares, M.F., Salomón, R.A., Pavlova, O., Severinov, K., Farías, R., and Vincent, P.A. (2009). Potential applicability of chymotrypsin-susceptible microcin J25 derivatives to food preservation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5734–5738.

Pons, A.M., Lanneluc, I., Cottenceau, G., and Sable, S. (2002). New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie* 84, 531–537.

Portrait, V., Gendron-Gaillard, S., Cottenceau, G., and Pons, A.M. (1999). Inhibition of pathogenic *Salmonella* enteritidis growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Can. J. Microbiol.* 45, 988–994.

Puustinen, A., Finel, M., Virkki, M., and Wikström, M. (1989). Cytochrome o (*bo*) is a proton pump in *Paracoccus denitrificans* and *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 249, 163–167.

- Quiroga, M. (2014). Estudio de la aplicación de MccJ25(G12Y) en la conservación de alimentos (UNT: Tesina de grado).
- Requena, J.R., Chao, C.C., Levine, R.L., and Stadtman, E.R. (2001). Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 69–74.
- Riley, M.A., and Gordon, D.M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* *7*, 129–133.
- Riley, M.A., and Chavan, M.A. (2007). *Bacteriocins: Ecology and Evolution* (Springer).
- Rintoul, M.R., de Arcuri, B.F., and Morero, R.D. (2000). Effects of the antibiotic peptide microcin J25 on liposomes: role of acyl chain length and negatively charged phospholipid. *Biochim. Biophys. Acta* *1509*, 65–72.
- Rintoul, M.R., de Arcuri, B.F., Salomón, R.A., Farías, R.N., and Morero, R.D. (2001). The antibacterial action of microcin J25: evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella* newport. *FEMS Microbiol. Lett.* *204*, 265–270.
- Rintoul, M.R., Morero, R.D., and Dupuy, F.G. (2015). The antimicrobial peptide microcin J25 stabilizes the gel phase of bacterial model membranes. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *129*, 183–190.
- Rodríguez-Montelongo, L., Farías, R.N., and Massa, E.M. (1995). Sites of electron transfer to membrane-bound copper and hydroperoxide-induced damage in the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* *323*, 19–26.
- Rogers, L.A. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* *16*, 321–325.
- Rosengren, K.J., Clark, R.J., Daly, N.L., Göransson, U., Jones, A., and Craik, D.J. (2003). Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 12464–12474.
- Ruiz-Leal, M., and George, S. (2004). An in vitro procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PHAH and pesticide toxicity. *Mar. Environ. Res.* *58*, 631–635.
- Sable, S., Pons, A.-M., Gendron-Gaillard, S., and Cottenceau, G. (2000). Antibacterial Activity Evaluation of Microcin J25 against Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 4595–4597.
- Safarian, S., Rajendran, C., Müller, H., Preu, J., Langer, J.D., Ovchinnikov, S., Hirose, T., Kusumoto, T., Sakamoto, J., and Michel, H. (2016). Structure of a *bd* oxidase indicates similar mechanisms for membrane-integrated oxygen reductases. *Science* *352*, 583–586.
- Sakamoto, K., Miyoshi, H., Ohshima, M., Kuwabara, K., Kano, K., Akagi, T., Mogi, T., and Iwamura, H. (1998). Role of the isoprenyl tail of ubiquinone in reaction with respiratory enzymes: studies with bovine heart mitochondrial complex I and *Escherichia coli* *bo*-type ubiquinol oxidase. *Biochemistry (Mosc.)* *37*, 15106–15113.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., et al. (1998). Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int. J. Food Microbiol.* *44*, 93–106.

- Salomón, R.A., and Farías, R.N. (1992). Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *174*, 7428–7435.
- Salomón, R.A., and Farías, R.N. (1995). The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *J. Bacteriol.* *177*, 3323–3325.
- Sanjay, M.K., Srideshikan, S.M., Vanishree, V.L., Usha, M.S., Raj, A.P., Gaddad, S.M., and Shivannavar, C.T. (2011). Copper, Zinc-Superoxide Dismutase from Clinically Isolated *Escherichia coli*: Cloning, Analysis of sodC and Its Possible Role in Pathogenicity. *Indian J. Microbiol.* *51*, 326–331.
- Sato-Watanabe, M., Mogi, T., Ogura, T., Kitagawa, T., Miyoshi, H., Iwamura, H., and Anraku, Y. (1994). Identification of a novel quinone-binding site in the cytochrome *bd* complex from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *269*, 28908–28912.
- Seaver, L.C., and Imlay, J.A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *183*, 7173–7181.
- Seaver, L.C., and Imlay, J.A. (2004). Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J. Biol. Chem.* *279*, 48742–48750.
- Søballe, B., and Poole, R.K. (1999). Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiol. Read. Engl.* *145 (Pt 8)*, 1817–1830.
- Solbiati, J.O., Ciaccio, M., Farías, R.N., and Salomón, R.A. (1996). Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J. Bacteriol.* *178*, 3661–3663.
- Solbiati, J.O., Ciaccio, M., Farías, R.N., González-Pastor, J.E., Moreno, F., and Salomón, R.A. (1999). Sequence Analysis of the Four Plasmid Genes Required To Produce the Circular Peptide Antibiotic Microcin J25. *J. Bacteriol.* *181*, 2659–2662.
- Soudy, R., Wang, L., and Kaur, K. (2012). Synthetic peptides derived from the sequence of a lasso peptide microcin J25 show antibacterial activity. *Bioorg. Med. Chem.* *20*, 1794–1800.
- Sturr, M.G., Krulwich, T.A., and Hicks, D.B. (1996). Purification of a cytochrome *bd* terminal oxidase encoded by the *Escherichia coli* app locus from a delta cyo delta cyd strain complemented by genes from *Bacillus firmus* OF4. *J. Bacteriol.* *178*, 1742–1749.
- Tardat, B., and Touati, D. (1991). Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli*::Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic respiration control). *Mol. Microbiol.* *5*, 455–465.
- Thomas, P.E., Ryan, D., and Levin, W. (1976). An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* *75*, 168–176.
- Togo, S.H., Maebuchi, M., Yokota, S., Bun-Ya, M., Kawahara, A., and Kamiryo, T. (2000). Immunological detection of alkaline-diaminobenzidine-negative peroxisomes of the nematode *Caenorhabditis elegans* purification and unique pH optima of peroxisomal catalase. *Eur. J. Biochem.* *267*, 1307–1312.

- Uندن, G., and Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 217–234.
- Vassiliev, I.R., Offenbacher, A.R., and Barry, B.A. (2005). Redox-active tyrosine residues in pentapeptides. *J. Phys. Chem. B* 109, 23077–23085.
- Villegas, J.M., Volentini, S.I., Rintoul, M.R., and Rapisarda, V.A. (2011). Amphipathic C-terminal region of *Escherichia coli* NADH dehydrogenase-2 mediates membrane localization. *Arch. Biochem. Biophys.* 505, 155–159.
- Vincent, P.A., Delgado, M.A., Farías, R.N., and Salomón, R.A. (2004). Inhibition of *Salmonella* enterica serovars by microcin J25. *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 103–107.
- Vincent, P.A., Bellomio, A., de Arcuri, B.F., Farías, R.N., and Morero, R.D. (2005). MccJ25 C-terminal is involved in RNA-polymerase inhibition but not in respiration inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 549–551.
- Weiss, S.A., Bushby, R.J., Evans, S.D., Henderson, P.J.F., and Jeuken, L.J.C. (2009). Characterization of cytochrome *bo*₃ activity in a native-like surface-tethered membrane. *Biochem. J.* 417, 555–560.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., and Sahl, H.G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* 276, 1772–1779.
- Wikström, M., and Verkhovsky, M.I. (2007). Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1200–1214.
- Wilkens, M., Villanueva, J.E., Cofré, J., Chnaiderman, J., and Lagos, R. (1997). Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 179, 4789–4794.
- Wilson, K.-A., Kalkum, M., Ottesen, J., Yuzenkova, J., Chait, B.T., Landick, R., Muir, T., Severinov, K., and Darst, S.A. (2003). Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12475–12483.
- Yamashita, M., Shepherd, M., Booth, W.I., Xie, H., Postis, V., Nyathi, Y., Tzokov, S.B., Poole, R.K., Baldwin, S.A., and Bullough, P.A. (2014). Structure and function of the bacterial heterodimeric ABC transporter CydDC: stimulation of ATPase activity by thiol and heme compounds. *J. Biol. Chem.* 289, 23177–23188.
- Yan, K.-P., Li, Y., Zirah, S., Goulard, C., Knappe, T.A., Marahiel, M.A., and Rebuffat, S. (2012). Dissecting the maturation steps of the lasso peptide microcin J25 in vitro. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* 13, 1046–1052.
- Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C.T., and Fang, J.-Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Food Microbiol.* 5, 241.
- Yang, Ke (2007). Current understanding on cytochrome *bd* quinol oxidase of *Escherichia coli* a mutagenesis, kinetics and spectroscopy study (Doctoral thesis).

Yap, L.L., Samoilova, R.I., Gennis, R.B., and Dikanov, S.A. (2007). Characterization of mutants that change the hydrogen bonding of the semiquinone radical at the QH site of the cytochrome *bo*₃ from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *282*, 8777–8785.

Yap, L.L., Lin, M.T., Ouyang, H., Samoilova, R.I., Dikanov, S.A., and Gennis, R.B. (2010). The quinone-binding sites of the cytochrome *bo*₃ ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* *1797*, 1924–1932.

Yorgey, P., Lee, J., Kördel, J., Vivas, E., Warner, P., Jebaratnam, D., and Kolter, R. (1994). Posttranslational modifications in microcin B17 define an additional class of DNA gyrase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 4519–4523.

Yuzenkova, J., Delgado, M., Nechaev, S., Savalia, D., Epshtein, V., Artsimovitch, I., Mooney, R.A., Landick, R., Farias, R.N., Salomon, R., et al. (2002). Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin j25. *J. Biol. Chem.* *277*, 50867–50875.