

UCH-FC  
DOC-Microb  
5896  
C-1

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN INTRACELULAR Y EXTRACELULAR  
DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA MICROCINA E492 POR  
ENTEROBACTINA Y SUS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

ERWIN ALEJANDRO STRAHSBURGER FIGUEROA

Diciembre, 2004

Director de Tesis: Dra. Rosalba Lagos Monaco

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO

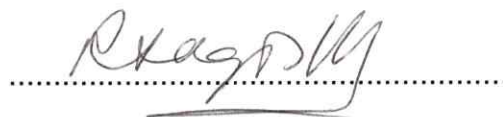
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

ERWIN ALEJANDRO STRAHSBURGER FIGUEROA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 29, de Marzo de 2004.

Director de Tesis:

Dra. Rosalba Lagos Monaco

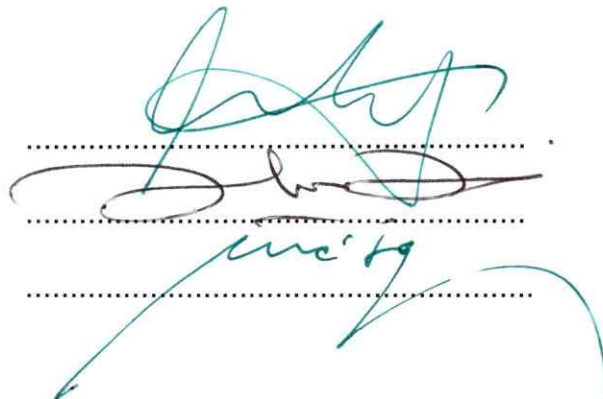


Comisión Evaluadora de la Tesis

Dr. Víctor Cifuentes

Dr. Carlos Jerez

Dr. Claudio Vásquez



Señor, haz de mi trabajo un instrumento de tu paz.

Quiero dedicar este trabajo a mi esposa Pamela y mi hijo Nicolás, quienes son mi apoyo, mi compañía y mi vida entera.

De forma especial también quiero dedicar este esfuerzo a mi familia y a la de mi esposa, quienes han colaborado con mi trabajo de distintas maneras y en especial a mi Tío Eduardo, Abuelo Roberto y Abuelita Virginia, quienes desde el cielo comparten mis penas y alegrías.

Finalmente, también quiero dedicar este trabajo a la Dra. Rosalba Lagos, tutora que desde el comienzo depositó su confianza en mí y a quien por su continuo apoyo fue posible completar cada etapa de este doctorado.

Quiero agradecer a cada integrante del Centro de Equipo Mayor y del laboratorio de Biología Estructural y Molecular, presentes en el periodo en que realice esta tesis, por su ayuda en discusiones y colaboraciones y por formar parte de un ambiente grato y amigable que nos permitió ganar una copa adherida a un momento inolvidable.

De manera especial quiero agradecer a Dios, por su enorme generosidad al darme una bella familia para crecer, una esposa fantástica y un hijo maravilloso para caminar en la vida y la oportunidad de conocer y compartir con tantas personas maravillosas en esta etapa de crecimiento profesional.

# TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>1.1 Bacteriocinas</b> .....	1
<b>1.2 Microcina E492 como modelo de estudio</b> .....	2
<b>1.3 Importación de bacteriocinas</b> .....	6
<b>1.3.1 Receptores de membrana externa de colicinas y microcinas</b> .....	6
<b>1.3.2 Sistemas de translocación para la importación de bacteriocinas en <i>E. coli</i></b> .....	7
<b>1.3.3 Importación de la microcina E492 en <i>Escherichia coli</i></b> .....	9
<b>1.3.4 Inhibición de las colicinas y la microcina E492 por el sideróforo enterobactina</b> .....	10
<b>1.3.5 La importación del sideróforo enterobactina y sus productos de hidrólisis en <i>Escherichia coli</i></b> .....	12
<b>1.3.6 Importación de antibióticos asociados a grupos catecoles</b> .....	16

1.4 La producción de microcina activa está relacionada con el metabolismo del hierro.....	17
1.4.1 Producción de microcina inactiva en fase estacionaria.....	18
1.4.2 Papel de MceD en la producción de microcina activa.....	19
1.4.3 Secreción de enterobactina y producción de microcina inactiva.....	20
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
<b>2. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>27</b>
2.1 Materiales.....	27
2.2 Medios de cultivo.....	31
2.3 Técnicas moleculares.....	32
2.4 Aislamiento y Purificación de microcinas.....	32
2.4.1 Purificación de la forma activa.....	32
2.4.2 Purificación desde mutantes en <i>mceD</i> o en genes del sistema de la enterobactina.....	33
2.4.3 Geles de poli(acrilamida SDS (PAGE-SDS) y marcación fluorescente de las muestras de microcina.....	33
2.5 Ensayos de la actividad bactericida de muestras de microcina.....	34
2.5.1 Ensayo sobre césped bacteriano.....	34
2.5.2 Ensayo de sensibilidad en cultivos líquidos.....	34

	<b>Página</b>
<b>2.5.3</b> Ensayos de sensibilidad en medio pobre en hierro.....	35
<b>2.5.4</b> Actividad sobre esferoplastos.....	35
<b>2.5.4.1</b> Preparación de esferoplastos.....	36
<b>2.5.4.2.</b> Ensayo de sensibilidad de los esferoplastos ante la microcina.....	36
<b>2.6</b> Ensayos de inhibición de la actividad bactericida de la microcina.....	37
<b>2.6.1</b> Ensayos de inhibición sobre césped bacteriano.....	37
<b>2.6.2</b> Ensayos de inhibición en cultivos líquidos.....	37
<b>2.6.3</b> Cinética de la inhibición del péptido de microcina <sub>83-103</sub> sobre la microcina silvestre.....	37
<b>2.6.4</b> Ensayos de inhibición del suero de conejo anti-microcina o del péptido carboxilo terminal sobre la microcina.....	38
<b>2.6.5</b> Ensayos de inhibición de actividad de microcina desde el sobrenadante de cultivos de <i>E. coli</i> .....	38
<b>2.6.6</b> Ensayo de sensibilidad sobre cepas cultivadas en presencia de DHB.....	39
<b>2.7</b> Ensayos de conversión de la forma inactiva a la forma activa de la microcina E492.....	39
<b>2.7.1</b> Activación en agua.....	40
<b>2.7.2</b> Activación en metanol.....	40
<b>2.7.3</b> Ensayo de activación por temperatura sobre el sobrenadante y la microcina de la cepa de <i>E. coli</i> VCS257 p527.....	40

<b>2.8</b> Caracterización de formas activas e inactivas de la microcina mediante dicroísmo circular.....	41
<b>2.9</b> Purificación de la enterobactina y sus productos de hidrólisis.....	41
<b>2.9.1</b> Obtención de la enterobactina y sus productos de hidrólisis por HPLC.....	41
<b>2.9.2</b> Análisis de los antagonistas por TLC.....	42
<b>2.10</b> Determinación de la producción de sideróforos en placas de cromozuror.....	43
<b>2.11</b> Preparación de anticuerpo policlonal anti-microcina.....	43
<b>2.11.1</b> Obtención del suero anti-microcina.....	43
<b>2.11.2</b> Determinación del título IgG anti-microcina del suero de conejo inmunizado.....	44
<b>3. RESULTADOS</b> .....	45
<b>3.1</b> Identificación del sistema importador de la microcina E492 en <i>E. coli</i> .....	45
<b>3.1.1</b> Identificación de los receptores de importación de la microcina E492.....	45
<b>3.1.2</b> Modelo de importación de la microcina E492.....	49
<b>3.2</b> El papel de los receptores FepA, Fiu y Cir en la importación de microcina E492.....	49
<b>3.2.1</b> Contribución de cada receptor en el reconocimiento de la microcina E492.....	49

3.2.2 Efecto de la concentración del hierro extracelular sobre la sensibilidad de <i>E.coli</i> H1443 a la actividad bactericida de la microcina E492.....	55
3.2.3 Sensibilidad a la microcina E492 en cepas dobles mutantes de <i>E. coli</i> para los receptores FepA, Fiu y Cir bajo condiciones restrictivas de hierro.....	59
3.3 Estudio de la participación del extremo carboxilo terminal de la microcina E492 en el reconocimiento por sus receptores de la membrana externa FepA, Fiu y Cir.....	61
3.3.1 El péptido sintético correspondiente a la porción carboxilo terminal de la microcina E492 no compete con la importación de microcina silvestre.....	62
3.4 Actividad bactericida de la microcina E492 sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	64
3.5 Estudio de la actividad antagonista de los productos de hidrólisis de la enterobactina y de su precursor el ácido 2,3- dihidroxibenzoico.....	68
3.5.1 El ácido 2,3-dihidroxibenzoico es un antagonista débil de la microcina E492 cuando se utiliza <i>E. coli</i> AN260 ( <i>fepC</i> ) como cepa indicadora.....	68
3.5.2 El ácido 2,3-dihidroxibenzoico estimula la actividad bactericida de la microcina E492.....	73



3.5.3 El DHB aumenta la sensibilidad a la microcina E492 en la cepa silvestre <i>E. coli</i> BL21.....	75
3.5.4 Los productos de hidrólisis de la enterobactina son antagonistas de la actividad bactericida de la microcina E492.....	79
3.5.5 Competencia entre antagonistas y la microcina E492.....	84
3.6 Relación de la producción de microcina E492 con el metabolismo de la enterobactina.....	86
3.6.1 Caracterización de la cepa mutante <i>E. coli</i> VCS257 p527 ( <i>mceD::tn5</i> ).....	86
3.6.2 La proteína MceD y la enzima Fes no complementan sus actividades enzimáticas en <i>E. coli</i> .....	90
3.6.3 La actividad de MceD es dispensable en cepas de <i>E. coli</i> no productoras o no importadoras de enterobactina.....	93
3.6.4 La falta de los genes <i>entDF</i> en <i>E. coli</i> produce microcina inactiva.....	94
3.6.5 La microcina activa es capaz de producir la activación de la microcina inactiva producida en la <i>E. coli</i> H1885 ( <i>entDF</i> ).....	97
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
4.1 Modelo de la importación de la microcina E492 en <i>Escherichia coli</i> .....	103
4.2 Diferencias en el transporte de la microcina E492 entre los receptores FepA, Fiu y Cir.....	105

<b>4.3 Mecanismo de reconocimiento de la microcina E492 por sus receptores de membrana externa.....</b>	<b>106</b>
<b>4.4 El paso de la microcina a través del receptor de membrana externa....</b>	<b>108</b>
<b>4.5 Posibles ventajas fisiológicas de la microcina E492 al poseer tres receptores de importación.....</b>	<b>109</b>
<b>4.6 Antagonistas de la actividad bactericida de la microcina E492.....</b>	<b>111</b>
<b>4.6.1 Mecanismo de inhibición de la microcina E492.....</b>	<b>111</b>
<b>4.6.2 Importancia biológica de la actividad antagonista de la enterobactina y el trímero lineal y dímero de DBS sobre la actividad bactericida de la microcina E492.....</b>	<b>114</b>
<b>4.7 Efecto del metabolismo de la enterobactina sobre la producción de microcina E492 activa.....</b>	<b>115</b>
<b>4.8 Relación entre los sistemas de la enterobactina y la microcina E492.....</b>	<b>116</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>119</b>
<b>6. REFERENCIAS.....</b>	<b>120</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1.</b> Etapas en la producción y acción de la microcina E492.....	4
<b>FIGURA 2.</b> Esquema de importación de la enterobactina férrica y sus productos de hidrólisis.....	14
<b>FIGURA 3.</b> Esquema de la síntesis de enterobactina.....	22
<b>FIGURA 4.</b> Los receptores de membrana externa FepA, Fiu y Cir están implicados en la translocación de la microcina E492 al periplasma.....	48
<b>FIGURA 5.</b> Contribución de los receptores FepA, Fiu y Cir al reconocimiento de la microcina E492.....	52
<b>FIGURA 6.</b> Sensibilidad a la microcina E492 de la cepa de <i>E. coli</i> H1443 en condiciones restrictivas de hierro.....	57
<b>FIGURA 7.</b> Sensibilidad a la microcina E492 de la cepa de <i>E. coli</i> H1443 sin tratar y como esferoplasto en condiciones restrictivas de hierro.....	58
<b>FIGURA 8.</b> Ensayo cinético del efecto bactericida de la microcina E492 en presencia y ausencia del péptido sintético de la región carboxilo terminal.....	63
<b>FIGURA 9.</b> Efecto del ácido 2,3-dihidroxibenzoico sobre la actividad de la microcina E492.....	69
<b>FIGURA 10</b> Análisis cromatográfico mediante HPLC y TLC de un extracto orgánico del sobrenadante de la cepa mutante de <i>E. coli</i> H1941( <i>fur</i> ).....	80

<b>FIGURA 11.</b> Ensayos de sobrevivencia en presencia de distintas concentraciones de antagonistas.....	82
<b>FIGURA 12.</b> Efecto de la concentración de microcina E492 sobre la actividad antagonista.....	85
<b>FIGURA 13.</b> Actividad de la microcina E492 en presencia de una mezcla de antagonistas.....	87
<b>FIGURA 14.</b> Expresión de la proteína microcina E492 en distintas cepas de <i>E. coli</i> .....	95
<b>FIGURA 15.</b> Activación de la <i>Mcc-entDF</i> en metanol.....	100
<b>FIGURA 16.</b> Estructura secundaria de la microcina E492 inactiva purificada desde la cepa de <i>E. coli</i> H1885 ( <i>entDF</i> ).....	101
<b>FIGURA 17.</b> Modelo de importación de la microcina E492 en <i>E. coli</i> .....	104

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Cepas bacterianas utilizadas .....	28
<b>Tabla 2.</b> Plasmidios utilizados .....	29
<b>Tabla 3.</b> Actividad bactericida de la microcina E492 sobre cepas de <i>E. coli</i> silvestre y mutantes triple, dobles y únicas en los receptores FepA, Fiu y Cir.....	46
<b>Tabla 4.</b> Mutantes <i>E. coli</i> DK214 ( <i>fepB</i> ) y <i>E. coli</i> AN260 ( <i>fepC</i> ) son sensibles a la microcina E492.....	50
<b>Tabla 5.</b> Concentración de microcina E492 necesaria para obtener un 50% de muerte celular sobre cepas de <i>E. coli</i> silvestre y mutantes en los receptores FepA, Fiu y Cir.....	53
<b>Tabla 6.</b> Sensibilidad a la microcina E492 de cepas mutantes que expresan solo FepA, Fiu o Cir en presencia y carencia de hierro.....	60
<b>Tabla 7.</b> Actividad de la microcina E492 pre-incubada con un anticuerpo policlonal anti-microcina E492.....	65
<b>Tabla 8.</b> Sensibilidad de esferoplastos de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> a la microcina E492.....	67
<b>Tabla 9.</b> Efecto del DHB sobre la sensibilidad a la microcina 492.....	72
<b>Tabla 10.</b> Efecto del ácido 2,3-dihidroxibenzoico y del ácido benzoico sobre la actividad de la microcina E492 en la célula silvestre de <i>E. coli</i> BL21.....	74

<b>Tabla 11.</b> Efecto del DHB sobre la sensibilidad de la cepa de <i>E. coli</i> BL21 a la microcina E492.....	78
<b>Tabla 12.</b> Protección bactericida de la microcina E492 de la enterobactina sobre mutantes de <i>E. coli</i> únicas y dobles para los receptores FepA, Fiu y Cir.....	83
<b>Tabla 13.</b> Actividad antibiótica de las cepas de <i>E. coli</i> VCS257 p434 y VCS257 p527.....	89
<b>Tabla 14.</b> Actividad bactericida de la microcina E492 en distintas cepas hospederas de <i>E. coli</i> .....	91
<b>Tabla 15.</b> Efecto de sobrenadantes de distintas cepas mutantes de <i>E. coli</i> , sobre la actividad de la microcina E492.....	96
<b>Tabla 16.</b> Activación de la microcina inactiva <i>Mcc-entDF</i> por la microcina activa en solución acuosa.....	98
<b>Tabla 17.</b> Comparación de secuencias consenso que contienen serina modificable fosfopanteinilación .....	117

## Lista de Abreviaturas

A	absorbancia
AB	ácido benzoico
Amp	ampicilina
APS	persulfato de amonio
UA	unidades arbitrarias
BCIP	5-bromo-4-indolil fosfato
pb	pares de bases
BSA	albúmina de suero de bovino
CA <sub>50%</sub>	concentración antibiótica que elimina el 50% de la población sensible
Cm	cloranfenicol
DBS	2,3-Dihidroxibenzoilserina
DBS <sub>2</sub>	dímero de DBS
DBS <sub>3</sub>	trímero de DBS
DHB	2,3-Dihidroxibenzoico
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
DTPA	ácido dietilenotriaminopentaacético
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
HDTMA	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
Kan	kanamicina
<i>mce</i>	marco de lectura abierto del sistema de la microcina E492
MccE492	microcina E492
Mcc <sup>a</sup>	microcina E492 activa
MES	ácido 2-N(morfolino)etano sulfónico
MOPS	ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico
M <sub>r</sub>	movilidad relativa
mV	milivoltios
np	nanopura
pa	pro análisis
P-pant	fosfo pantetoina.

PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
SDS	dodecilsulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino
Tet	tetraciclina
TLC	Cromatografía en capa fina
UFC	unidades formadoras de colonias
UV	ultravioleta



## RESUMEN

*Klebsiella pneumoniae* RYC492 produce la microcina E492, un péptido con actividad bactericida que forma canales iónicos en la membrana interna de cepas de *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y algunas cepas de *Vibrio*. Su mecanismo de acción involucra un reconocimiento a nivel de la membrana externa, translocación hacia el espacio periplasmático y una interacción con el sistema TonB para insertarse en la membrana interna y formar un canal. Las bacteriocinas son importadas por receptores específicos de membrana externa necesarios para la captura de nutrientes como el hierro o la vitamina B<sub>12</sub>. Varios sistemas de receptores de membrana externa están asociados al sistema TonB, compuesto por las proteínas ExbB, ExbD y TonB, que se localizan en la membrana citoplasmática y se extienden hacia el periplasma. Mutantes en *exbB* o *tonB* son resistentes a la acción bactericida de la microcina E492. Hasta ahora no había sido posible encontrar mutantes en receptores de membrana externa que sean resistentes a la microcina E492. Esto sugería que podría existir más de un receptor para la microcina E492. Para estudiar esta posibilidad, se buscó receptores que estuvieran asociados al sistema TonB/ExbBD. Se estudió la sensibilidad de mutantes únicas, dobles y triples para los receptores FepA, Fiu y Cir, que participan en la importación del sideróforo enterobactina y sus precursores. Los resultados de este trabajo demuestran que una cepa mutante simultáneamente en estos tres receptores

es resistente a la microcina E492. Otros componentes de la importación de enterobactina como la proteína periplasmática FepB o el sistema importador de membrana interna FepCDG, no son necesarios para la importación de microcina, puesto que cepas de *E. coli* mutantes en *fepB* o *fepC* son sensibles a esta bacteriocina. Por otra parte se observó que en la medida que se estimulaba la expresión de los receptores FepA, Fiu y Cir, la sensibilidad por la microcina aumentaba sugiriendo que la densidad de estos receptores en la membrana externa es una limitante para el grado de la potencia bactericida de la microcina E492. Se observó además que el receptor FepA es el transportador más eficiente; Fiu contribuye en forma moderada y Cir, participa cuando la concentración de microcina es mayor a 5  $\mu$ M. La actividad de la microcina E492 no fue inhibida por un péptido sintético correspondiente a sus últimos 20 aminoácidos ni por anticuerpos dirigidos contra esta región de la microcina E492, lo cual sugiere que el reconocimiento es complejo y no involucra solamente una región de la proteína. Se estudió la capacidad de la enterobactina, sus productos de hidrólisis y el precursor DHB para actuar como antagonistas de la microcina E492. Los ensayos de inhibición indican que los principales antagonistas son el trímero lineal, la enterobactina y el dímero, siendo el monómero y el DHB antagonistas parciales cuando su concentración es muy alta. Además, ensayos de competencia entre los antagonistas y la microcina, utilizando como cepas indicadoras a mutantes que expresan algunos de los receptores FepA, Fiu y Cir, sugieren un mecanismo de inhibición de tipo

maduración, esta forma es susceptible de ser activada. Se discutieron algunas hipótesis que pueden explicar este resultado, relacionando la maduración de la microcina E492 con la síntesis de moléculas relacionadas a la enterobactina.

competitivo. La proteína MceD codificada en el sistema de la microcina estaría relacionada con el metabolismo de la enterobactina, pues posee un 30% de identidad con la enzima Fes de *E. coli*, una enterobactina esterasa que hidroliza la enterobactina para liberar el hierro a nivel intracelular. Es probable que en el citoplasma exista alguna asociación no covalente entre los productos de hidrólisis de un derivado de la enterobactina y la microcina E492, lo cual podría dificultar su liberación al espacio extracelular. La proteína MceD podría romper o modificar estas asociaciones permitiendo la secreción de la microcina E492. Estas suposiciones se basan en el que a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa mutante *mceD::Tn5* la microcina purificada no es detectada en geles de poliacrilamida. Al expresar esta mutante *mceD* en cepas que no sintetizan ni importan enterobactina se observa en geles de poliacrilamida una banda de microcina E492 igual que la banda de la microcina silvestre, lo cual sugiere que MceD es dispensable en ausencia de enterobactina o sus productos de hidrólisis. Por otro lado, si se expresa microcina silvestre en una cepa de *E. coli* H1885 (*entDF*) defectuosa en la síntesis de enterobactina, se produce microcina inactiva. Se analizó la estructura de esta forma inactiva por dicroísmo circular y se encontró que poseía mayor porcentaje de estructura  $\alpha$ -hélice a diferencia de la microcina activa que presenta un mayor contenido de estructura  $\beta$ . Este comportamiento es similar al observado en mutantes en la maduración de la microcina, que también producen una forma inactiva con mayor contenido en  $\alpha$ -hélice. Al igual que la microcina purificada a partir de una mutante en la

maduración, esta forma es susceptible de ser activada. Se discutieron algunas hipótesis que pueden explicar este resultado, relacionando la maduración de la microcina E492 con la síntesis de moléculas relacionadas a la enterobactina.

## ABSTRACT

*Klebsiella pneumoniae* RYC492 produces microcin E492, a peptide with bactericidal activity that forms ion channels in the inner membrane of strains of *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* and some strains of *Vibrio*. Its mechanism of action involves a recognition in the outer membrane, translocation towards the periplasmic space and an interaction with the TonB system to be inserted in the cytoplasmic membrane to form a channel. The bacteriocins are imported by specific outer membrane receptors necessary for the uptake of nutrients such as iron or vitamin B<sub>12</sub>. Several systems of outer membrane receptors are associated to the TonB system, which is composed by proteins ExbB, ExbD and TonB, located in the cytoplasmic membrane and extend towards the periplasm. Single mutants in *exbB* or *tonB* are resistant to bactericidal action of the microcin E492. Until now, no mutants in outer membrane receptors resistant to microcin E492 had been found. This suggests that more than one receptor to microcin E492 could exist. To study this possibility, several receptors associated to the TonB/ExbBD system were tested. Single, double and triple mutants for FepA, Fiu and Cir receptors, that participate in the uptake of siderophore enterobactin and its hydrolytic products, were tested as putative receptors for microcin E492. The results demonstrate that a triple mutant strain in these three receptors is resistant to microcin E492. Other components related with the uptake of enterobactin, such as periplasmic

protein FepB or the inner membrane FepCDG, are not necessary for the uptake of microcin E492, because mutant *E. coli* strains *fepB* or *fepC* are sensitive to this bacteriocin. On the other hand, an increase in the density of these receptors in the outer membrane was related to higher sensitivities to microcin E492, suggesting that the expression of these receptors is limiting in the bactericidal action. FepA was found to be the most efficient receptors for microcin E492, while Fiu contributed in a moderate form and Cir participated when the microcin concentration were higher than 5  $\mu$ M. The activity of microcin E492 was not inhibited by a synthetic peptide corresponding to the last 20 amino acids of the carboxyl-terminal of this bacteriocin, nor by antibodies directed against this region of microcin E492. This result suggests that recognition of E492 is a complex process and it does not involve a single region of the microcin. The ability of enterobactin, its hydrolysis products and the precursor DHB to act likes antagonists of microcin E492 activity was studied. The inhibition tests indicated that the main antagonists were the linear trimer and enterobactin followed by the dimer, being the monomer and DHB weaker inhibitors. Competition tests between enterobactin and microcin E492, using as indicator strain to mutants that express one or two of receptors FepA, Fiu and Cir, suggest a competitive inhibition mechanism. MceD protein, encoded by the microcin system has a 30% of identity with Fes enzyme of *E. coli*, an enterobactin esterase that breakdown enterobactin to release iron in the intracellular space. It is probable that some noncovalent association between hydrolytics products of an

enterobactin derivative and the microcin E492 exists, which would make difficult the release of microcin E492. These assumptions are based on the phenotype of *mceD::Tn5* mutant in which purified microcin cannot be detected in gels of poliacrilamida. When the *mceD::Tn5* mutant is expressed in a strain that do not synthesize or import enterobactin, a protein band is observed in poliacrilamida gels, with identical mobility to microcin purified from the wild strain. This result suggests that in the absence of enterobactin or its hydrolytics products, MceD is dispensable. On the other hand, when the microcin E492 system (pJEM15) is expressed in *E. coli* H1885 (*entDF*), a strain defective in the enterobactin synthesis, an inactive microcin is produced. Circular dichroism analysis of microcin-*entDF* shows secondary structure with a higher content of  $\alpha$ -helix than the wild type active microcin, that in turn presents a higher content of  $\beta$ -sheet structure. This behavior is similar to that observed in mutants in the maturation genes of microcin E492. In this case, the inactive form has a greater content in  $\alpha$ -helix, while active microcin purified from the wild type strain is rich in  $\beta$ -sheet structure. The inactive form produced by the *E. coli* H1885 (*entDF*) pJEM15, strain can be converted to the active form in the same manner than inactive microcin produced by mutants in maturation genes. Hypotheses that explain the relationship of microcin maturation and synthesis of molecules related to enterobactin are discussed.



## INTRODUCCION

### 1.1 Bacteriocinas.

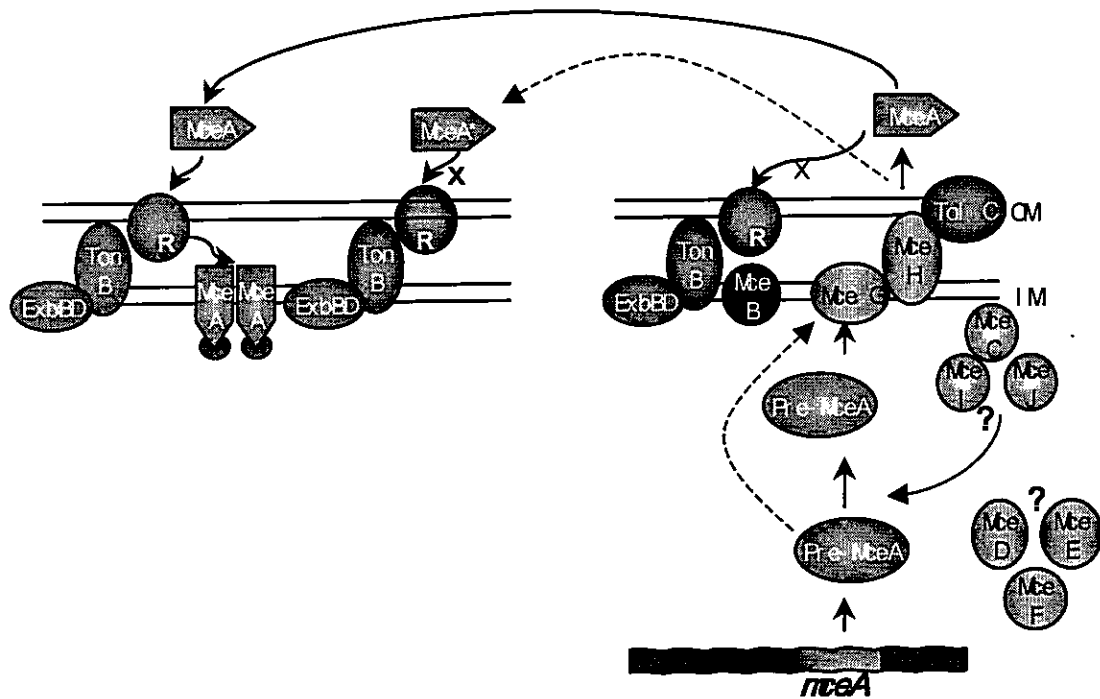
En un ecosistema donde distintas poblaciones de microorganismos buscan espacio y nutrientes suficientes para crecer y multiplicarse, las bacterias han desarrollado péptidos o proteínas bactericidas denominados bacteriocinas para favorecer su sobrevivencia sobre las cepas competidoras sensibles. Estas bacteriocinas presentan una gran diversidad respecto a su síntesis, estabilidad, mecanismo de acción bactericida e inmunidad y se han encontrado en arqueas, bacterias Gram positivas y Gram negativas (Riley y Wertz, 2002; Alonso y col., 2000). Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas han sido clasificadas en dos grandes grupos de acuerdo a su tamaño: las colicinas y las microcinas. Las colicinas son proteínas de 25-70 kDa codificadas en plásmidos, que en su mayoría son producidas por aislados de *Escherichia coli* y su expresión está regulada por el sistema SOS (Lazdunski, 1988; Pugsley, 1984). Esto involucra la síntesis y acumulación de la colicina en el citoplasma y su liberación requiere de una lipoproteína que aumenta la permeabilidad de la membrana interna causando la secreción de la colicina y la lisis de la cepa productora (Lazdunski, 1988; Lazdunski y col., 1998; Riley, 1993). Por otro lado, las microcinas son de menor tamaño molecular (<10 kDa), se encuentran en distintos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y su producción está regulada por su fase de crecimiento y sistemas propios de maduración y exportación, conservando la viabilidad de la cepa productora (Baquero y

Moreno, 1984; Kolter y Moreno 1992, Braun y col., 2002). Además, las microcinas son resistentes a algunas proteasas, condiciones extremas de pH y temperatura y debido a su carácter hidrofóbico son solubles en metanol (de Lorenzo, 1984; Baquero y Moreno, 1984). El modo de acción bactericida de las colicinas y microcinas es muy variado, aunque puede dividirse en bacteriocinas enzimáticas y bacteriocinas formadoras de poros. En el primer grupo están las que poseen actividad enzimática endodesoxiribonucleasa (colicinas E2, E7, E8 y E9) (Lau y col., 1992), actividad endoribonucleasas (colicinas D, E3, E5 y E6) (Masaki y col., 1992; Senior y Holland, 1971; Masaki y Ogawa, 2002), actividad inhibidora de la síntesis de proteínas (colicinas D, cloacina DF13 y microcina C7)(García-Bustos y col., 1984), inhibidora de la DNA girasa (microcina B17)(Herrero y Moreno, 1986) e inhibidora de la RNA polimerasa (microcina J25)(Delgado y col., 2001). El grupo de las bacteriocinas formadoras de poros incluye a las colicinas B, A, E1, IA, Ib, 5, 10, V, y microcina E492, las cuales actúan en la membrana citoplasmática disipando el potencial electroquímico que le otorga energía a la célula (Braun y col., 2002; Kolter y Moreno 1992; Lazdunski y col., 1998).

## **1.2 Microcina E492 como modelo de estudio.**

El presente trabajo de Tesis tuvo como modelo de estudio la microcina E492, un péptido hidrofóbico de 7.886 Da, con un pl de 3.8, resistente a tripsina, condiciones de pH ácido y temperaturas sobre 90°C (de Lorenzo, 1984; Lagos y col., 1999). Ésta bacteriocina es producida por *Klebsiella pneumoniae*

RYC492 y ejerce su acción tóxica sobre cepas de *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y algunas cepas de *Vibrio* (de Lorenzo, 1984; de Lorenzo y col., 1984; de Lorenzo y Pugsley, 1985; Patzer y col., 2003). Su mecanismo bactericida involucra un proceso de importación hacia el periplasma y la despolarización de la membrana interna (de Lorenzo y Pugsley, 1985) debido a la formación de canales iónicos, lo cual se determinó mediante experimentos en bicapas fosfolipídicas (Lagos y col., 1993). Estudios genéticos determinaron que la producción de microcina E492 activa requiere de varios genes localizados en un fragmento de 13 kb del cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492 el cual fue clonado en el vector pHC79 y utilizado para transformar la cepa de *E. coli* VCS257 (Wilkens y col., 1997). La cepa denominada *E. coli* VCS257pJAM434 produce microcina E492 con la mismas propiedades bioquímicas y bactericidas que la microcina E492 silvestre de *K. pneumoniae* RYC492 (Wilkens y col., 1997) (Fig. 1). La determinación de la secuencia de este fragmento de 13 Kb y su posterior análisis revelaron la presencia de 10 marcos de lectura abiertos: *mceA* para la microcina E492, *mceB* para la proteína de inmunidad, *mceC* homóloga a una glicosil transferasa de *Salmonella enterica* (76% de identidad), *mceD* homóloga a la enteroquelina esterasa (*fes*) de *S. enterica* (53% identidad), *mceE* sin homólogo conocido, *mceF* homólogo a una peptidasa, *mceG* homólogo a un exportador ABC CvaB (84 % identidad), *mceH* homólogo a CvaA una proteína accesoria al exportador ABC (86% identidad), *mceI* comparte un dominio homólogo a una aciltransferasa y *mceJ* sin homólogo conocido (Fig. 1) (Lagos y col., 2001). La



**Figura 1. Etapas en la producción y acción de la microcina E492.** ME, membrana externa; MI, membrana interna. La microcina E492 (MceA) es sintetizada como un precursor (pre-MceA) que sufre un proceso de maduración (MceC, I, J), procesamiento y exportación (MceG, H, TolC). La microcina no puede ejercer su acción sobre la cepa productora debido al efecto protector de la proteína de inmunidad MceB. La microcina madura interactúa con el receptor y es translocada a través de la membrana externa hacia el periplasma y se inserta en citoplasmática en la célula sensible. Cuando falta algún miembro del proceso de maduración de la microcina, se secreta una microcina inactiva (mceA\*) que no es importada por el receptor de membrana externa. R, receptor de membrana externa. Se desconoce la función de las proteínas MceD, E, F.

determinación de la masa de la microcina E492 activa fue de 7.886 Da, revelando la ausencia de modificaciones post-traduccionales ya que se correspondía con la masa de la secuencia primaria de la microcina E492. Estudios de las microcinas producidas por mutantes en los genes de maduración *mceC* y *mceI/J* muestran que su inactividad es debido a diferencias en su estructura secundaria, conservándose el valor de su masa, pero siendo incapaz de ser importada por los receptores de membrana externa de la cepa sensible (Fig. 1). Probablemente estos genes participen directa o indirectamente en el plegamiento correcto de la microcina E492 (Baeza, 2003). La importación de la microcina E492 en *E. coli* es dependiente del sistema transductor de energía TonB/ExbBD e inhibida por el sideróforo enterobactina. Sin embargo, aun se desconoce su receptor de membrana externa y si el mecanismo de inhibición por enterobactina involucra una competencia entre el sideróforo y la microcina por un receptor común. Por otro lado, como se describe en esta Tesis, la microcina E492 y la enterobactina no sólo se relacionan en el ámbito de la importación. La expresión del sistema de la microcina E492 (pJAM434) en una cepa no productora de enterobactina produce microcina inactiva, sugiriendo que en la cepa productora de microcina el sistema de la enterobactina también podría estar relacionado con la producción de microcina activa. Este trabajo se centró en estudiar la relación que existe entre la producción e importación del sideróforo enterobactina y sus productos de hidrólisis con la producción de microcina E492 activa y su reconocimiento por la célula blanco.

### **1.3 Importación de bacteriocinas.**

#### **1.3.1 Receptores de membrana externa de colicinas y microcinas.**

Las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa que es útil en la protección de la acción tóxica de algunas moléculas del medio ambiente. Esta membrana, asociada por su cara externa a polisacáridos, permite el paso de moléculas menores a 700 Da a través de proteínas denominadas porinas que forman poros para el transporte pasivo de iones, aminoácidos, azúcares y otras moléculas de volumen reducido (Nikaido y Vaara, 1985). Compuestos de mayor tamaño o volumen como sideróforos o vitamina B<sub>12</sub>, son transportados mediante receptores específicos de membrana externa en un proceso dependiente de energía. Las colicinas y microcinas (tamaño mayor a 700 Da) no pueden utilizar las porinas ingresando a la célula blanco a través de sistemas de captura de nutrientes (Lazdunski y col., 1998; Patzer y col., 2003). Los sistemas de transporte activo de nutrientes están constituidos por un receptor de membrana externa, un sistema transductor de energía y un sistema de importación de membrana interna tipo ABC asociado a una proteína periplasmática transportadora del ligando. Las colicinas y microcinas deben ser reconocidas por estos receptores de sideróforos o nutrientes. Por ejemplo, la proteína de membrana externa FhuA reconoce el sideróforo ferricromo y la colicina M, microcinas J25 y 24, los bacteriófagos T1, T5,  $\Phi$ 80 y UC-1 (Killmann y col., 1995; Braun y col., 2002; Cao y Klebba, 2002), el receptor de membrana externa FepA transporta al sideróforo enterobactina e importa a las colicinas B y D, el receptor Cir reconoce sideróforos del tipo catecol y se une a las colicinas

Ia, Ib y V (Davies y Reeves, 1975; Pugsley 1985); el receptor BtuB transporta vitamina B<sub>12</sub> y la colicina E1 y finalmente la porina OmpF transporta moléculas hidrofílicas y reconoce a la colicina N. Además los receptores BtuB u OmpF pueden transportar colicina A y los receptores FepA, Cir, Iron y Fiu también importadores de sideróforos del tipo catecol pueden reconocer las colicinas G, H y microcinas M y H47 (Trujillo y col., 2001; Patzer y col., 2003).

### **1.3.2 Sistemas de translocación para la importación de bacteriocinas en *E. coli*.**

La translocación del sideróforo o bacteriocina hacia el espacio periplasmático requiere del reconocimiento por un receptor en la membrana externa, sobre el cual se induce un cambio conformacional inducido por energía proveniente de la membrana citoplasmática que abre el canal permitiendo el transporte del ligando hacia el periplasma (Liu y col., 1994; Jiang y col., 1997). Los sistemas encargados de traspasar la energía electroquímica desde la membrana interna hacia los receptores son el sistema Tol y el sistema TonB. El primer sistema está localizado en sitios donde la membrana interna y externa están en contacto (Benedetti y col., 1991) y se compone de cuatro proteínas TolQ, TolR, TolA y TolB. Su función está relacionada con la integridad y preservación de la membrana celular y aquellas colicinas que requieren de este sistema de translocación se denominan colicinas del grupo A. Por otro lado, el sistema transductor de energía TonB está compuesto por las proteínas TonB, ExbB y ExbD con una estequiometría de 1:7:2 (Higgs y col., 2002a). ExbB

tiene tres regiones de transmembrana y el extremo C-terminal hacia el periplasma (Kampfenkel y Braun, 1993), mientras que ExbD tiene una región de transmembrana y el resto de su estructura en el periplasma (Kampfenkel y Braun, 1992). TonB por su parte, está en contacto con ambas proteínas a través de interacciones de tipo hidrofóbicas, mientras que su región periplasmática se une en forma transitoria con regiones de proteínas de membrana externa, denominadas cajas TonB (Larsen y col., 1997; Higgs y col., 2002b). Por comparaciones estructurales con el sistema motor flagelar MotAB, se ha deducido que probablemente el complejo ExbBD es un canal de protones que transforma esta energía electroquímica en energía mecánica que finalmente energiza a TonB (Zhai y col., 2003). TonB traspasa esta energía al entrar en contacto con proteínas de la membrana externa favoreciendo el cambio conformacional del canal con la consiguiente liberación del ligando hacia el periplasma en contra de un gradiente de concentración de hasta 1000 veces (Larsen y col., 1997). Las bacteriocinas que dependen de este sistema de transducción pertenecen al grupo B, como las colicinas B, D, Ia, Ib, M, V, 5, 10, los fagos T1 y 80 y las microcinas H47, 24, G, H y E492. Sin embargo, el sistema TonB/ExbBD parece ser dispensable para la microcina E492 en el proceso de translocación (Baeza, 2003). La cepa de *E. coli tonB* que carece de su porción periplasmática permanece sensible a la actividad bactericida de la microcina E492 (Baeza, 2003), sugiriendo un papel de TonB más relacionado con el proceso de inserción de la microcina en la membrana citoplasmática que



con el paso de la microcina a través de la membrana externa. La generación de una cepa resistente o tolerante a bacteriocinas involucra una mutación a nivel del receptor en la membrana externa o en su sistema transductor de energía. La primera afecta la captación del nutriente que es importado por ese receptor, en tanto que la segunda afecta a todos los receptores dependientes de ese sistema transductor de energía, disminuyendo notoriamente la captación de nutrientes, su velocidad de crecimiento y su capacidad de sobrevivir en un ambiente competitivo. De ese modo la cepa productora de colicina o microcina, asegura el desplazamiento de la especie sensible y la de sus probables mutantes espontáneas, confiriéndoles una ventaja adaptativa a las bacteriocinas que utilizan estos sistemas de importación.

### **1.3.3. Importación de la microcina E492 en *E. coli*.**

La importación de la microcina E492 en *E. coli* depende de un receptor de membrana externa asociado al sistema transductor de energía TonB/ExbBD (Pugsley y col., 1986), dado que cepas mutantes generadas por transposición del transposón Tn5 en los genes *tonB* y *exbB* presentan un fenotipo resistente a la actividad bactericida de la microcina E492 (Pugsley y col., 1986). También se ha establecido que el proceso de inserción de la microcina en la membrana interna depende del sistema TonB (Lagos y col., 2001), ya que al permeabilizar con EDTA y lisozima la membrana externa de la cepa de *E. coli* mutante *tonB*, se mantiene su resistencia a la actividad bactericida de la microcina E492 (Lagos y col., 2001). Respecto del posible receptor para la microcina E492

cepas mutantes en algunos de los receptores TonB-dependiente como FepA, Cir, FhuA, o BtuB son sensibles a la actividad bactericida de la microcina E492, descartándolos como posibles receptores. Para determinar la existencia de un receptor TonB dependiente Pugsley y col. (1986) analizaron una colección de mutantes de *E. coli* por transposición con Tn5 y encontraron solamente una cepa tolerante a la microcina E492, sospechosa de haber mutado en el posible receptor de la microcina. Este putativo gen denominado *semA* (del Inglés, sensitive to e microcin) fue mapeado y la cepa mutante de *E. coli semA* fue caracterizada. Sin embargo, esta cepa no mostraba cambios en la composición de proteínas de membrana externa ni tampoco en su tasa de crecimiento en un medio mínimo carente de hierro (Pugsley y col., 1986). De este modo, SemA fue descartada como receptor para la microcina E492 y se concluyó que a través de las aproximaciones genéticas tradicionales no era posible identificar el receptor de la microcina E492. Este antecedente hizo plantear la posibilidad de la existencia de más de un receptor para la microcina E492, puesto que la probabilidad de producir una cepa doble o triple mutante por los experimentos de mutagénesis convencionales es prácticamente nula.

#### **1.3.4 Inhibición de colicinas y microcina E492 por el sideróforo enterobactina.**

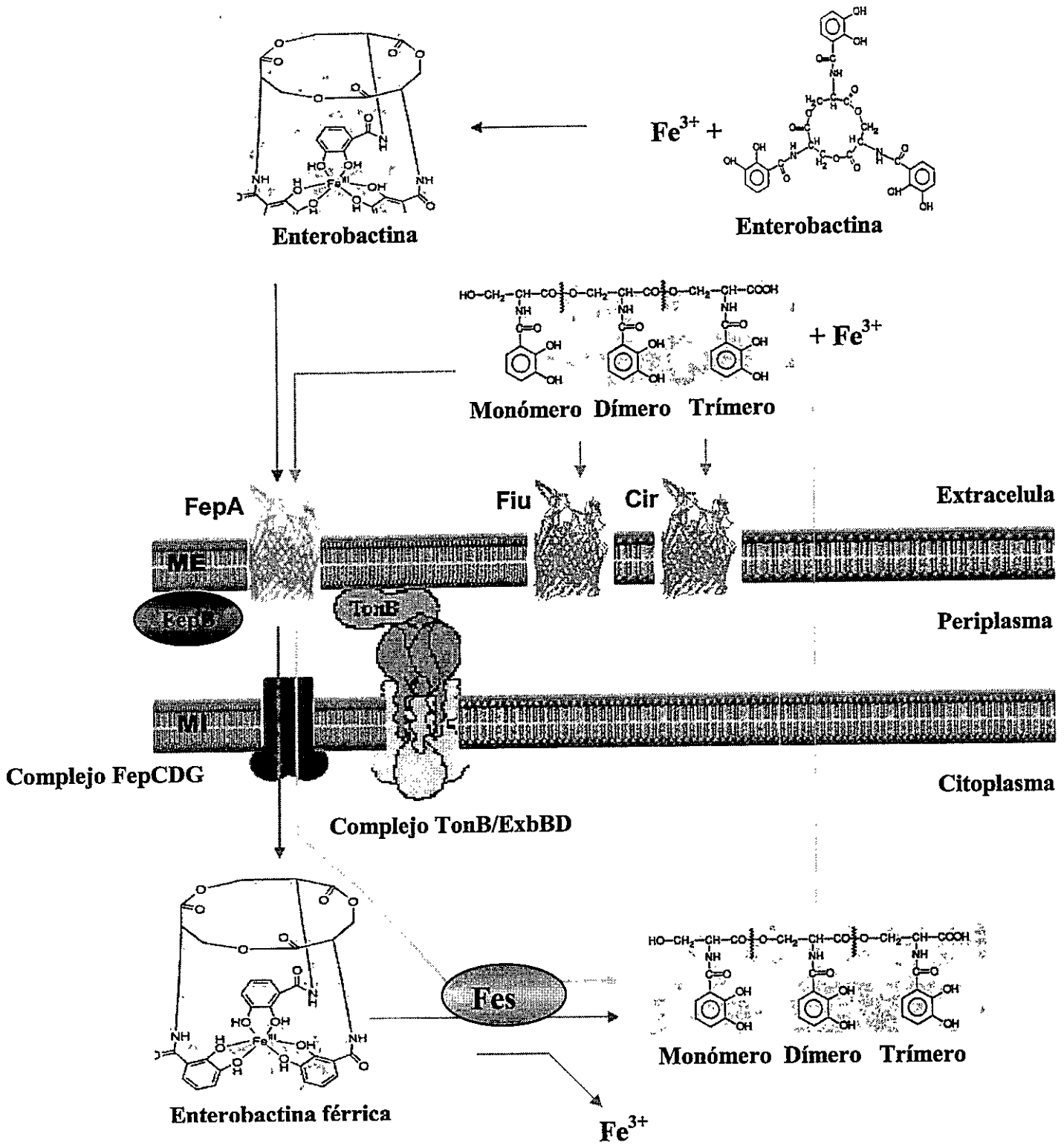
Otra forma de identificar posibles receptores de una bacteriocina es a través de la competencia con el ligando natural del receptor. Por ejemplo, la enterobactina y sus productos de hidrólisis asociados a hierro poseen una

actividad antagonista sobre la actividad bactericida de las colicinas B y D debido a que son importadas por el mismo receptor (Guterman, 1973; Pugsley y Reeves, 1976a, 1976b). Estudios de competencia entre las colicinas B o D marcadas con  $I^{125}$  y la enterobactina férrica describen esta inhibición de tipo competitiva por la unión al receptor FepA (Payne y col., 1997). El efecto antagonista de la enterobactina férrica es mayor al efecto producido por la enterobactina libre de hierro debido a la mayor afinidad de la enterobactina férrica por FepA. De lo contrario la célula importaría en forma activa un sideróforo sin hierro generándose un desperdicio de energía e ineficiencia en el transporte de hierro. Sin embargo, un caso contrario es el efecto de la enterobactina sobre la actividad bactericida de la microcina E492. Solamente la enterobactina libre de hierro tiene actividad antagonista sobre la actividad bactericida de la microcina E492 (Orellana y Lagos, 1996). La enterobactina férrica no afecta la actividad de la microcina E492 y se desconoce si los productos de hidrólisis de enterobactina tienen algún efecto. Esto sugiere que FepA no sería el receptor de la microcina E492 y que el efecto antagonista de la enterobactina no sería del tipo competitivo. Otra explicación a este fenómeno es la existencia de más de un receptor para la microcina E492 lo cual anularía el efecto antagonista de la enterobactina férrica, ya que la unión de este sideróforo al receptor FepA no impediría que la microcina E492 utilice otros receptores para ingresar a la célula blanco. Dado que la enterobactina y sus productos de hidrólisis son importados por los receptores FepA, Fiu y Cir, se propone que al menos dos de éstas proteínas de membrana externa podrían ser candidatos a

receptor de la microcina E492, relacionando la importación de la microcina E492 con la importación de hierro a través del sistema de importación de la enterobactina. La existencia de bacteriocinas con más de un receptor ha sido descrito también para la microcina H47 y colicinas G y H, que reconocen en *E. coli* a FepA, Fiu y Cir como receptores (Trujillo y col., 2001; Patzer y col., 2003).

### **1.3.5 La importación del sideróforo enterobactina y sus productos de hidrólisis en *E. coli*.**

El hierro es un factor importante para el crecimiento de *E. coli*, requiriéndose una concentración mínima de 0,05 a 0,1  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, en un ambiente natural como el lumen intestinal la concentración de hierro férrico es muy baja debido a su equilibrio con el hidróxido férrico ( $K_d = 10^{-12} \mu\text{M}$ ), la transferrina ( $K_d = 10^{-18} \mu\text{M}$ ) y la lactoferrina ( $K_d < 10^{-18} \mu\text{M}$ ). Para la captación de hierro *E. coli* posee moléculas denominadas sideróforos (del griego, sidero "hierro", foros "portador"), las cuales pueden ser del tipo catecol como la enterobactina, del tipo hidroxamato como la aerobactina y moléculas más pequeñas como el citrato que transporta hierro en forma de citrato férrico (Heidinger y col., 1983; Braun, 1985; Neillands, 1993, 1995). Entre estos sideróforos la enterobactina, un trímero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoilserina (DBS), es quien coordina el  $\text{Fe}^{3+}$  con la más alta afinidad ( $K_d = 10^{-52} \text{M}$ ) (Harris y col., 1979). Esta molécula es reconocida e importada hacia el periplasma por la proteína de membrana externa FepA (Fig. 2) (Wayne y col., 1976; Pugsley y



**Figura 2. Esquema de importación de la enterobactina férrica y sus productos de hidrólisis.** La enterobactina libre se asocia al hierro y es reconocido por la proteína de membrana externa FepA, permitiendo su paso hacia el citoplasma en un proceso dependiente de la transducción de energía a través del complejo TonB-ExbB-ExbD. Luego, en el periplasma es transportada por la proteína FepB hacia el complejo proteico de membrana interna FepCDG, estimulando en FepC la hidrólisis de ATP y el paso del ligando hacia el citoplasma. Finalmente la enzima Ferro-enterobactina esterasa (Fes) rompe los enlaces ester del anillo central de la enterobactina, liberando al hierro y produciendo trímeros lineales, dímeros y monómeros de 2,3-Dihidroxibenzoilserina. Estas moléculas son liberadas al medio extracelular e importan hierro a través de los receptores Fiu y Cir y las proteínas FepBCDG. Símbolos: ME, membrana externa; MI, membrana interna.

Reeves, 1977). Este receptor posee una estructura tipo barril de hebras beta (Buchanan y col., 1999) y su función se ha descrito como un canal gatillado por ligando (Rutz y col., 1992; Jiang y col., 1997). En ausencia de enterobactina su región amino terminal actúa como un "corcho" impidiendo el paso de cualquier molécula a través del canal (Liu y col., 1993; Scott y col., 2001). Uno de los rizos extracelulares de este receptor reconoce en forma específica a la enterobactina férrica, lo que estimula la apertura del canal permitiendo el paso del ligando hacia el periplasma (Rutz y col., 1992; Newton y col., 1997) en un proceso dependiente del sistema TonB (Liu y col., 1994; Jiang y col., 1997; Higgs y col., 2002a, 2002b). Una vez en el periplasma, la proteína periplasmática FepB se une a la enterobactina férrica para transportarla hacia el sistema importador de membrana interna FepCDG (Fig. 2) (Pierce y Earhart, 1986; Ozenberger y col., 1987; Sprencel y col., 2000). Este complejo proteico es un transportador del tipo ABC y utiliza la hidrólisis del ATP para abrir el canal y transportar la enterobactina férrica hacia el citoplasma (Wyckoff y col., 1999). Finalmente, la enzima citoplasmática Fes (Ferro enterobactina esterasa) rompe los enlaces ésteres del anillo central del trímero cíclico de DBS formándose en primer lugar un trímero lineal, luego un dímero y finalmente un monómero de DBS (Fig. 2) (O'Brien y col., 1971; Langman y col., 1972). Esta degradación parcial de la enterobactina disminuye su alta afinidad por el hierro permitiendo la liberación al interior de la célula. Se cree que otras proteínas citoplasmáticas reducen  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  para ser utilizado como un cofactor por varias enzimas de *E. coli* (Braun y Hantke, 1991). Los productos de hidrólisis de la enterobactina

generados en el citoplasma (monómeros, dímeros, trímeros lineales) son excretados al medio extracelular para ser reutilizados en el transporte de hierro hacia el interior de la célula a través de las proteínas de membrana externa FepA, Fiu, Cir y el mismo sistema translocador TonB y FepBCDG (Fig. 2). En el citoplasma la enzima Fes hidroliza estas moléculas a dímeros o monómeros, los cuales son utilizados nuevamente en la importación de hierro (Fig. 2). Sin embargo, la importación de estos productos de hidrólisis no es igual en cada receptor. El monómero (DBS) es transportado principalmente por FepA, Fiu y en menor grado por Cir (Hantke, 1990); el dímero (DBS<sub>2</sub>) es importado principalmente por FepA y en menor grado por Fiu, descartándose la participación de Cir, en tanto que el trímero lineal (DBS<sub>3</sub>) es capturado solamente por FepA (Hancock y col., 1977). Si la microcina es importada por el sistema de la enterobactina, es probable que cada producto de hidrólisis posea diferentes grados de inhibición sobre la actividad bactericida de la microcina E492.

### **1.3.6 Importación de antibióticos asociados a grupos catecoles.**

El sistema de importación de enterobactina también captura antibióticos asociados a grupos catecoles. Mutantes únicas en el sistema TonB y dobles mutantes *fiu cir* son resistentes a antibióticos semisintéticos del tipo  $\beta$ -lactámicos o cefalosporinas asociados a un grupo catecol, mientras que mutantes únicas en *fiu* o *cir* y otros receptores importadores de sideróforos



permanecen sensibles al efecto de éstos antibióticos (Nikaido y Rosenberg, 1990; Diarra y col., 1996; Curtis y col., 1988; Tatsumi y col., 1995; Diarra y col., 1996). Estos antecedentes indican que los receptores Fiu y Cir pueden reconocer una variedad de moléculas que presentan en su estructura un grupo catecol. En cambio el receptor FepA transporta la enterobactina y moléculas sintéticas análogas a la enterobactina, como el análogo TRENCAM (sustitución de una amina terciaria por el anillo lactona macrocíclico de la enterobactina), ya que conserva los nitrógenos del anillo central de la enterobactina y no presenta modificaciones en los catecoles (Thulasiraman y col., 1998; Heidinger y col., 1983). Esto sugiere que el receptor FepA posee un reconocimiento específico de su ligando, mientras que Fiu y Cir aceptan una mayor variabilidad en sus ligandos. En ese sentido es probable que al menos los receptores Fiu y Cir puedan reconocer a la microcina E492.

#### **1.4 La producción de microcina activa está relacionada con el metabolismo del hierro.**

Puesto que la actividad bactericida de la microcina es dependiente de la presencia de la enterobactina, cabe preguntarse si la producción de microcina activa esta relacionada también con el metabolismo de la enterobactina o el metabolismo del hierro. La producción de microcina E492 en un cultivo de *K. pneumoniae* RYC492 es mayor cuando el crecimiento de la cepa es en medio mínimo en presencia de citrato, una molécula transportadora de hierro (Harle y col., 1995). La microcina se sintetiza en forma activa durante la fase

exponencial de crecimiento y en forma inactiva en la fase estacionaria (Orellana y Lagos, 1996; Corsini y col., 2002). Estos cambios, como se describe a continuación, están relacionados con los niveles del hierro presentes en el medio de cultivo y con la expresión de algunos de los determinantes genéticos necesarios para la producción de microcina activa.

#### **1.4.1 Producción de microcina inactiva en fase estacionaria.**

La microcina E492 activa producida durante la fase exponencial de crecimiento puede ser inactivada con enterobactina (Orellana y Lagos, 1996), en tanto que la microcina producida en fase estacionaria es inactiva debido a la carencia de expresión de los genes *mceIJ* (Corsini y col., 2002). La expresión de enterobactina está controlada por la proteína represora Fur, en tanto la regulación de los genes del sistema de la microcina E492 parecen ser Fur independientes. Esta proteína se asocia al hierro y posteriormente reconoce secuencias en el DNA denominadas cajas Fur (Griggs y Konisky, 1989; Baichoo y Helmann, 2002). Esta unión proteína-DNA reprime la transcripción de una gran variedad de genes, algunos de los cuales están relacionados directamente con la importación de hierro (Escolar y col., 1999) como los genes de la síntesis, exportación e importación de la enterobactina y sus productos de hidrólisis (Crosa 1997; Crosa y Walsh 2002) o bien, pueden ser genes de virulencia (Litwin y Calderwood, 1993) o quimiotaxis (Karjalainen y col., 1991). Cuando la concentración de hierro citoplasmático disminuye Fur se disocia del hierro liberándose del DNA. De esta manera la célula comienza a sintetizar

enterobactina y a capturar hierro aumentando así la concentración del hierro citoplasmático. Cuando la concentración de hierro es alta la proteína Fur vuelve a asociarse el metal, inhibiendo la expresión de los genes con cajas Fur (Escolar y col., 1999). De esta manera la célula evita las altas concentraciones de hierro a nivel citoplasmático lo que podría llegar a ser tóxico para la célula. La cepa mutante *fur* expresa constitutiva e independientemente de la concentración de hierro intracelular, la proteínas necesarias para la síntesis, exportación e importación de enterobactina (Ernst y col., 1978; Hantke, 1981). Por ello es ventajoso purificar a la enterobactina y sus productos de hidrólisis a partir del sobrenadante de esta cepa mutante en *fur*.

#### **1.4.2 Papel de MceD en la producción de microcina activa.**

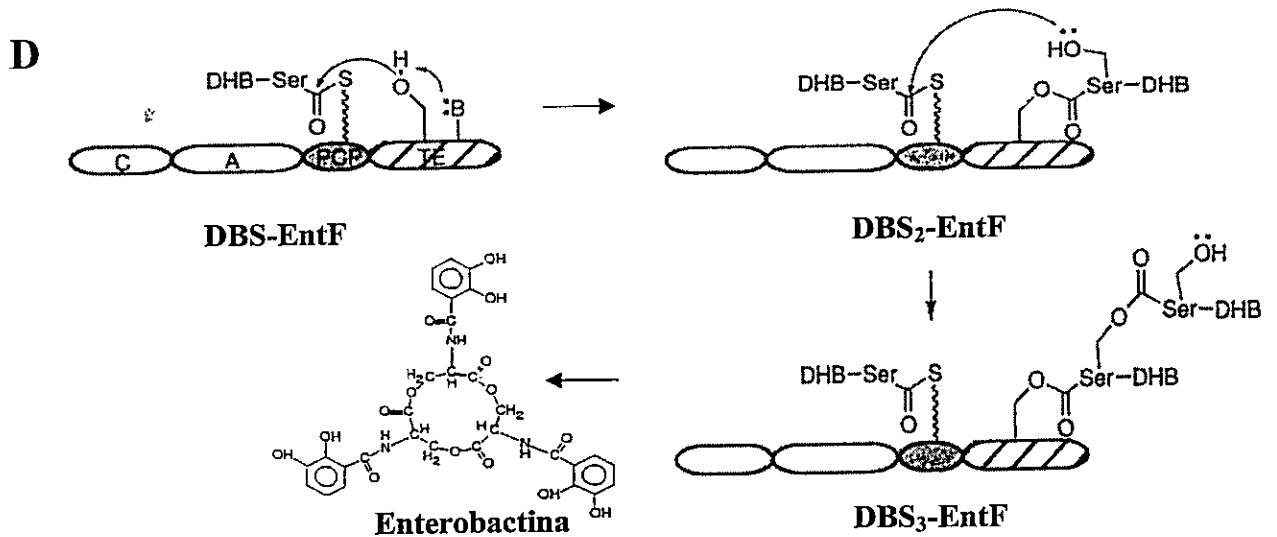
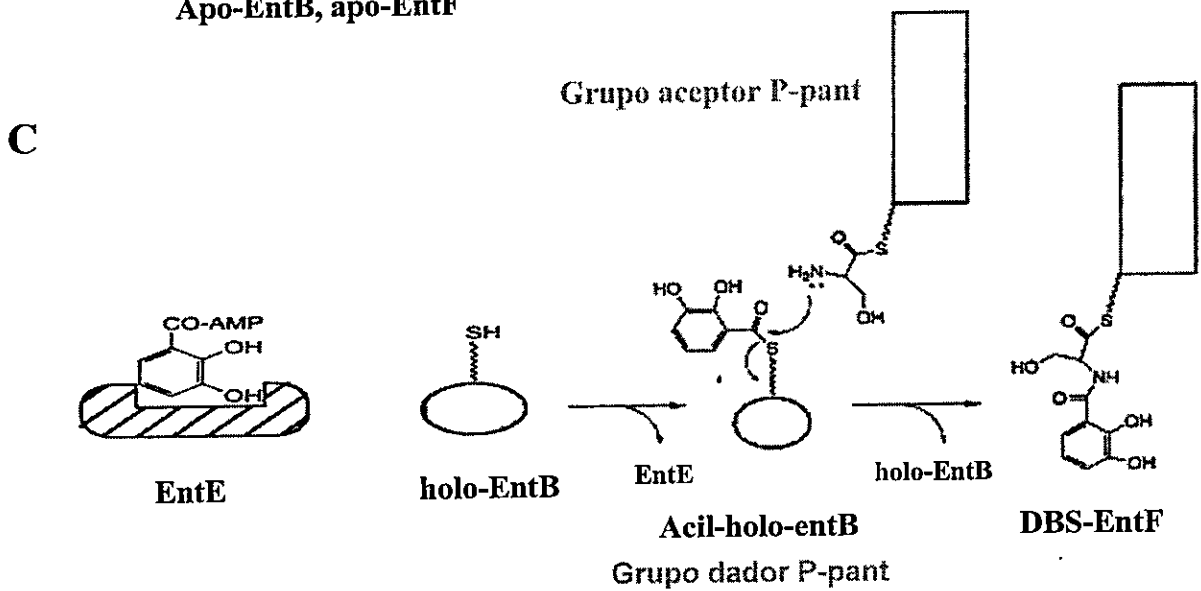
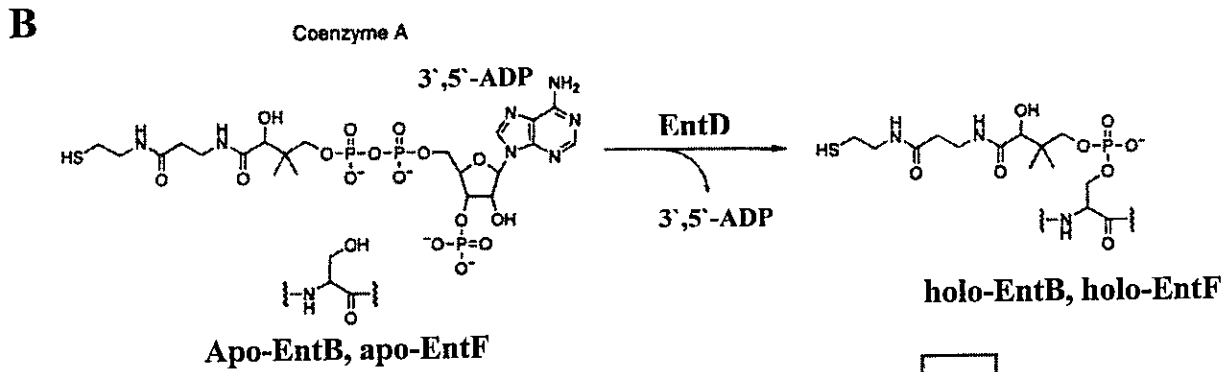
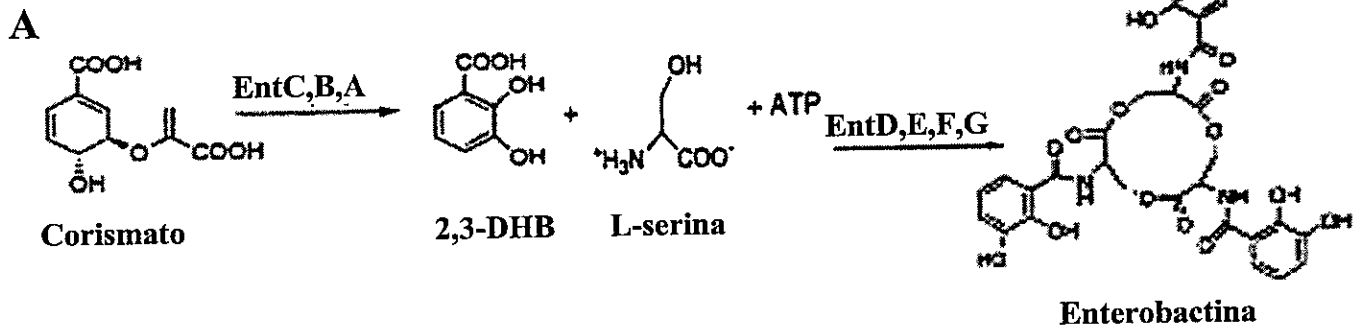
Una de las proteínas del sistema de microcina que podría vincular el metabolismo de la enterobactina con la producción de microcina activa es MceD. Esta proteína tiene un 30% de identidad con la enzima Fes de *E. coli*, la que hidroliza a la enterobactina a monómeros, dímeros y trímeros lineales de DBS. Una posible explicación al papel que juega este producto génico podría ser que exista en el citoplasma alguna asociación no covalente entre los productos de hidrólisis de la enterobactina y la microcina, la cual al igual que éstos productos es hidrofóbica y esto podría interrumpir su exportación a través del sistema MceGH-TolC (Castillo, 2003). Entonces MceD y su putativa actividad esterasa, podría reconocer estas asociaciones y romper los enlaces ésteres del sideróforo reduciendo la afinidad por la microcina o el tamaño del

ligando asociado, permitiendo la secreción de la microcina E492. En forma alternativa, también se puede especular que la asociación con alguno de los productos de hidrólisis de la enterobactina le confieren mayor estabilidad a la microcina E492. Un punto de vista distinto respecto de la participación de MceD en la producción de microcina activa se basa en la observación de Hantke y col. (2003). Estos autores aislaron del sobrenadante de *Salmonella enterica* un sideróforo denominado salmoquelina, un trímero de DBS asociado a azúcares confiriéndole una gran solubilidad en solvente acuoso. La producción de este sideróforo depende de los genes *iroBCD*, puesto que desde el sobrenadante de las respectivas mutantes no ha sido posible purificar salmoquelina (Hantke y col., 2003). Si consideramos que existe un 53% de identidad entre IroD y MceD y un 76% de identidad entre IroB y MceC, entonces MceC y MceD podrían estar relacionados con la síntesis de algún sideróforo similar a la salmoquelina. La única evidencia obtenida en nuestro laboratorio que se informa en esta Tesis y que vincula la producción de microcina E492 y la síntesis de enterobactina es que la cepa mutante de *E. coli* H1885 (*entDF*) la cual no sintetiza enterobactina, al transformarse con el plasmidio que porta el sistema de la microcina produce microcina inactiva. Para entender en qué forma se puede ver inhibida la actividad de la microcina, brevemente se describirá la síntesis y exportación de enterobactina.

#### **1.4.3 Secreción de enterobactina y producción de microcina inactiva.**

La enterobactina es sintetizada por bacterias Gram negativas como

*Escherichia*, *Salmonella* y *Klebsiella* y su síntesis puede dividirse en dos etapas. Primero se sintetiza el ácido 2,3-dihidroxi benzoico (DHB) a partir de corismato, en tres reacciones independientes catalizadas por las proteínas EntC, EntB/G y EntA (Crosa, 1989) (Fig. 3A). La enterobactina se sintetiza a partir de 3 moléculas de DHB y 3 serinas en una reacción de ciclación realizada por el complejo multienzimático de membrana citoplasmática EntEFB, el cual sintetiza y excreta simultáneamente la enterobactina (Fig. 3A) (Hantash y Earhart, 2000; Crosa y Walsh 2002). Este complejo multienzimático solamente utiliza el DHB y las serinas como sustrato. Por eso el DBS, DBS<sub>2</sub> y DBS<sub>3</sub> lineal son considerados productos de hidrólisis y no precursores de enterobactina (O'Brien y col., 1971). El mecanismo de síntesis de enterobactina es similar a la síntesis no-ribosomal de proteínas (Kleinkauf y Döhren, 1996), en el cual el sitio activo de la enzima es activado con el grupo fosfopantetoina (P-pant) (Fig. 3B) (Weinreb y col., 1998). EntD es la enzima que agrega este grupo P-pant a una serina que está ubicada en el sitio activo de las proteínas EntF y EntB (Fig. 3B) (Weinreb y col., 1998; Gehring y col., 1997). La holo-EntB se une al catecol y la holo-EntF se une a la serina (Fig. 3C). Luego el catecol de la holo-EntB es donado a la holo-EntF-serina, formándose la EntF-serina-catecol (DBS-EntF) y holo-EntB (Fig. 3C). Finalmente, EntF traspasa este grupo DBS al sitio de su extremo amino-terminal denominado de elongación, dejando libre el sitio activo para la formación de otra molécula de DHB-serina (Fig. 3D). Esta nueva molécula de DBS también es traspasada hacia el domino de elongación, formando un DBS<sub>2</sub>-EntF (Fig. 3D)(Gehring y col., 1998). El ciclo se repite una



**Figura 3. Esquema de la síntesis de enterobactina.** (A) En el citoplasma las enzimas EntC,B,A producen el ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB) a partir del corismato. El complejo asociado a membrana EntDEFG, en una reacción dependiente de la hidrólisis de ATP, asocia el DHB y la serina para formar un trímero cíclico de 2,3-dihidroxibensoilserina (DBS), denominado enterobactina. (B) La serina del sitio activo de la apo enzima EntB y EntF es unida al grupo fosfopantetoina (P-pant) a través de la enzima EntD y la coenzima A, formándose las holo-EntB y holo-EntF. (C) Las holo-enzimas se asocian a un catecol y a una serina y posteriormente la holo-EntF-serina acepta el DHB donado por la holo-EntB-DHB, formándose la DBS-EntF y la holo EntB. (D) Este grupo DBS es trasladado al sitio de elongación de EntF (TE), permitiendo la formación de otro grupo DBS en el sitio activo de EntF. Posteriormente este grupo DBS también es trasladado al sitio de elongación de EntF formándose un DBS<sub>2</sub>-EntF. Este procedimiento es repetido una vez más formándose DBS<sub>3</sub>-EntF y finalmente el trímero se cicla y es liberado al medio extracelular como enterobactina. Esquemas obtenidos de Weinreb y col., 1998 y de Gehring y col., 1997.

vez más para formar el trímero lineal y finalmente se postula un cierre de la estructura cíclica para formar y liberar la enterobactina (Fig. 3D) (Crosa y Walsh, 2002). Un posible candidato para el proceso de ciclación es una proteína de membrana de 43 kDa necesaria para la liberación de la enterobactina, pues una mutante denominada P43 sólo produce trímeros lineales, dímeros y monómeros de DBS (Furrer y col., 2002). Una cepa mutante en los genes *entD,F* produce solamente el DHB debido a la falta de la enzima que agrega el grupo P-pant a las enzimas sintetizadoras de enterobactina y la enzima que participa en la formación del DBS, respectivamente. En esta Tesis se estableció que al transformar la cepa de *E. coli* H1885 (*entDF*) con un plasmidio que porta el sistema de la microcina se produce microcina inactiva. Existen varias alternativas para explicar esta observación, entre las cuales están: i) El DHB posee una actividad antagonista sobre la microcina E492; ii) La producción de enterobactina es necesaria para la función de las proteínas del sistema de la microcina y la carencia de las actividades EntDF genera una microcina inactiva similar a las producidas en las mutantes de los genes de maduración de la microcina E492. Para dirimir entre estas posibles alternativas se propone estudiar al DHB como posible antagonista de la microcina E492 y caracterizar la microcina inactiva producida en la mutante de *E. coli* H1885 (*entDF*).



## HIPÓTESIS

Considerando el hecho que la enterobactina es antagonista de la microcina E492 y que es importada por los receptores FepA, Fiu y Cir nuestra hipótesis es que la microcina E492 también puede ser importada por estos tres receptores. En este sentido el grado de sensibilidad de la cepa blanco por la microcina E492 dependerá de los niveles de hierro en el medio ambiente. A menor concentración de hierro mayor expresión de los receptores FepA, Fiu y Cir y por consiguiente, mayor sensibilidad por la microcina E492. Por otro lado, debido a que el monómero, dímero y trímero lineal de DBS también son importados por estos tres receptores, éstas moléculas serán antagonistas de la actividad de la microcina E492 al igual que la enterobactina.

## **OBJETIVOS**

De lo antes expuesto surgen varias interrogantes con respecto a los receptores de la microcina y su relación con el metabolismo de enterobactina. Para estudiar estos aspectos y la relación que existe con la actividad de la microcina E492 se propone el siguiente objetivo general y los siguientes objetivos específicos.

### **Objetivo general**

Identificar los receptores de la microcina y establecer la actividad antagonista de sus ligandos naturales sobre la actividad bactericida de la microcina E492.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar a los receptores de la microcina E492.
2. Determinar si el ácido 2,3-dihidroxibenzoico y los productos de hidrólisis de la enterobactina son antagonistas de la microcina E492.
3. Estudiar la actividad de la microcina E492 y el posible papel de MceD cuando el sistema de la microcina es expresado en una cepa no productora de enterobactina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales.

Las cepas de bacterianas y plasmidios usados en este trabajo están señalados en las Tablas 1 y 2 respectivamente. La cepa de *E. coli* tipo silvestre (H1443) y sus mutantes únicas, dobles y triples para los receptores FepA, Fiu y Cir, además de la cepa de *E. coli* AN260 *fepC* y *E. coli* H1885 (*entDF*) fueron donadas gentilmente por el Dr. Klaus Hantke, Universität of Tübingen, Tübingen, Alemania. La cepa de *E. coli* tipo silvestre AB1515 y la cepa de *E. coli fepB* fueron donadas gentilmente por el Dr. Charles Earhart, de la University of Texas, Texas, USA.

De Gibco, BRL (Grand Island, NY, USA) se obtuvieron las enzimas de restricción, Taq DNA polimerasa, desoxinucleótidos, marcador DNA  $\lambda$  HindIII, CIAP, kit CONCERT™ Rapid PCR Purification System.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) se obtuvo fluorescamina, bis-acrilamida, SDS, azida de sodio, fosfato di-ácido de potasio, azul brillante de Coomassie, estándar de bajo peso molecular para péptidos, glucosa, Tween 20, tricina, ácido tri-fluoroacético, ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB), hexadecyl-trimethylammonium bromide (HTDA).

De BioRad Laboratories Inc., Hercules (Ca, USA) se obtuvo acrilamida, persulfato de amonio, TEMED.

De Merck, (Darmstadt Alemania) se obtuvo azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, carbonato ácido de sodio, cloruro de calcio, acetónitrilo, placas de celulosa, benceno, sulfato de hierro II, ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), ácido benzoico, amoníaco, ácido fórmico, nitrito de sodio, molibdato de sodio, colorante cromoazuror.

**Tabla 1. Cepa des bacterianas utilizadas en este trabajo**

Cepa des	Genotipo	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado clínico	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
AB1515	<i>F tonA23 purE42 proC14 leu-6 trpE38 thi-1</i>	Langman (1972)
DK214	Como AB1515 pero <i>fepB</i>	Pierce y col. (1983)
AN273	<i>proC leu trp fesB411</i>	Langman (1972)
AN260	<i>proA2 lacY galK2 trp401 aroB351 argE3 rpsL xyl pheA tyrA4 kat mtl supE44 fepC.</i>	Langman (1972)
H1443	<i>araD (lac) aroB rpsL relA flbB deoC pstF rbsR</i>	Hantke (1990)
H873	Como H1443, pero <i>fepA::Tn10</i>	Hantke (1990)
H1594	Como H1443, pero <i>fiu::MudX</i>	Hantke (1990)
H800	Como H1443, pero <i>cir::MudX</i>	Hantke (1990)
H1877	Como H1443, pero <i>fiu::MudXfepA::Tn10</i>	Hantke (1990)
H1875	Como H1443, pero <i>cir::MudXfepA::Tn10</i>	Hantke (1990)
H1728	Como H1443, pero <i>fiu::MudXcir</i>	Hantke (1990)
H1876	Como H1728, pero <i>fepA::Tn10</i>	Hantke (1990)
H1885	<i>araD 139D(argF lac) U169 rpsL150 realA1 flibB5301 deoC1 ptsF25 rbsR ΔentDF.</i>	Hantke, Tubingen
H1941	<i>araD 139D(argF lac) U169 rpsL150 realA1 flibB5301 deoC1 ptsF25 rbsR fur</i>	Hantke (1981)
BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT, r<sub>B</sub> m<sub>B</sub></i>	Novagen
VCS257	<i>DP50, sup F[supE44, supF58, hsd53(r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>), dapD8, lacY1, glnV44 Δ (gal-uvrB)47, tyrT58, gyrA29, tonA53Δ(thyA57)]</i>	Stratagene
X8605	<i>F<sup>-</sup>, trpR Δ(lac)U169, strpA Δ(tonBlacP)</i>	Guarente y Beckwith (1978)

**Tabla 2. Plasmidios utilizados en este trabajo**

Plasmidios	Características relevantes	Referencia
pHC79	Cosmidio de propósito general. Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Hohn y Collins (1980)
pJAM434	Plásmido que tiene los genes para la producción de microcina activa. Construido en el cosmidio pHC79 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> . Amp <sup>r</sup>	Wilkens y col. (1997)
pJAM229	Plásmido derivado de pJAM434. Posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido respecto a pJAM434. Produce microcina activa. Amp <sup>r</sup>	Wilkens y col. (1997)
pJEM15	Derivado de pJAM229. Posee doble copia del gen <i>mceF</i> . Amp <sup>r</sup>	Wilkens y col. (1997)
p527	pJAM434 <i>mceD</i> ::Tn5. Amp <sup>r</sup> Kn <sup>r</sup>	Lagos y col. (2001)

De Winkler Limitada (Santiago, Chile) se obtuvo cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio hexahidratado, tricloruro de hierro III, dimetilformamida, Tris, glicina, glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, formamida,  $\beta$ -mercaptoetanol, citrato de sodio, marcador de proteína preteñido, agarosa, acetato de amonio 7.5 M pH 7.5, glicerol, sacarosa, TEMED, acrilamida, bis-acrilamida, fenol-cloroformo básico, marcador DNA  $\lambda$ HindIII, marcador DNA escala 1kb, marcador DNA escala 100 bp, fenol saturado básico, dodecilsulfato de sodio, DL-ditiotreitol, EDTA sal disódica 2-hidrato.

De TCL (Santiago, Chile) se obtuvo reactivos grado técnico: ácido acético, etanol, metanol, acetona, ácido clorhídrico.

De Fluka Chemie AG Messerschmittstr (Suiza) se obtuvo cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio.

De DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, USA) se obtuvo triptona, extracto de levadura, casamioácidos.

De J. T. Baker Edo de México (México) se obtuvo hidróxido de sodio.

De Polaroid (Santiago Chile) se obtuvo película instantánea 667.

De Waters (USA) se obtuvo cartuchos Sep-Pak C18.

De US Biologicals Swampscott (MA USA) se obtuvo arabinosa.

De Laboratorio Benguerel, Ltda. (Santiago, Chile) se obtuvo tetraciclina.

De Laboratorio Bestpharma S.A. se obtuvo kanamicina, estreptomicina, cloramfenicol.

De Lyka Lab. Limited se obtuvo ampicilina.

De Boehringer Mannheim Corp. (Indianapolis, USA) se obtuvo Tritón X-100.

## 2.2. Medios de cultivo.

*Caldo Luria.* Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, NaOH 3,5 mM final. Se usó para el crecimiento de todos los clones de *E. coli*.

*Medio SOB.* Bactotripton 20 g/l, extracto de levadura 5,0 g/l, NaCl 0,5 g/l KCl 2,5 mM. Se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 5N (~0,2 ml/l).

*Medio SOC.* Al medio SOB estéril se agregó 20 ml de una solución estéril de glucosa 1 M. Esta solución se preparó disolviendo 18 g de glucosa para un volumen total de 100 ml de solución y fue esterilizado por filtro de 0,2 µm.

*Medio mínimo (M9).* Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 6 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 1 g/l. Se suplementó con CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1 mg/ml, .casaminoácidos 1 mg/ml, como fuente de carbono glucosa 0,2% p/v.

*Placas de agar LB.* Se prepararon las placas utilizando el medio caldo Luria y 1,5 % - 1,0 % de agar.

*Placas con células indicadoras.* Sobre placas de agar LB se depositó 3 a 5 ml de agar LB al 0,7% en el cual se incluyó 300 µl de un cultivo bacteriano crecido toda la noche.

Las células bacterianas se crecieron en placas o en medio líquido suplementado con antibióticos, cuya concentración final fue la siguiente: estreptomicina (10 µg/ml; todas las cepas usadas, excepto *E. coli* VCS257 pJEM15), ampicilina (100 µg/ml; *E. coli cir, fiu, fepA cir, fiu cir, fiu fepA*; VCS257 pJEM15), tetraciclina (10 µg/ml; *E. coli fepA; fiu fepA; fepA cir*) y kanamicina (50 µg/ml; mutante VCS257p527 *mceD::Tn5*).

### **2.3 Técnicas moleculares.**

Todas las operaciones no detalladas (aislamiento de ADN, preparación de células electrocompetentes, transformación, electroporación) se realizaron utilizando métodos estandarizados (Sambrook y col., 1989; Ausubel y col., 1992).

### **2.4 Aislamiento y purificación de microcinas.**

#### **2.4.1 Purificación de la forma activa.**

La forma activa de la microcina E492 se extrajo desde el sobrenadante de la cepa de *E. coli* VCS257 pJEM15 crecida en medio mínimo M9 (Miller, 1972) suplementado con citrato de sodio y glucosa 0,2 % p/v (Orellana y Lagos, 1996). El sobrenadante de 1 litro de cultivo en fase exponencial ( $A_{600}$  0.7) se filtró a través de una columna Sep-Pack C18 (Waters). La columna se lavó con 5 ml de metanol 60% y la microcina se eluyó con 3 ml de metanol 95% (de Lorenzo, 1984). La microcina obtenida en metanol es estable y mantiene su



actividad por meses. La concentración de microcina se determinó midiendo su Absorbancia a 260 y 280 nm aplicando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/ml} = 1000 \times [(A_{280} \times 1.55) - (A_{260} \times 0.76)]$$

#### **2.4.2 Purificación desde mutantes en *mceD* o en genes del sistema de la enterobactina.**

La microcina se aisló desde el sobrenadante de las cepas de *E. coli* VCS257 p527 y mutantes de *E. coli* H1443 (*aroB*) o AN260 (*fepC*) transformadas con los plasmidios pJAM434, pJEM15 o p527 según la metodología descrita en el punto 2.4.1.

#### **2.4.3 Geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS) y marcación fluorescente de las muestras de microcina.**

Alícuotas de 300  $\mu\text{l}$  de extracto metanólico de muestra de microcina se evaporaron a 35°C al vacío (Labconco Centrivap Console) hasta un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ . Se adicionó 8  $\mu\text{l}$  de solución de fluorescamina en DMSO (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), 4  $\mu\text{l}$  de borato de sodio 0.4 M, pH 9.0, y 4  $\mu\text{l}$  de amortiguador de carga 4x. La mezcla se calentó a 100°C por 3 min y resolvió en PAGE-SDS (16%) bajo las condiciones descritas por Schagger y von Jagow (1987).

## **2.5 Ensayos de la actividad bactericida de muestras de microcina.**

### **2.5.1 Ensayo sobre césped bacteriano.**

La actividad bactericida de la microcina purificada fue detectada, depositando alícuotas de la muestra sobre un césped de una cepa bacteriana indicadora *E. coli* BL21(DE3) u otra, según se indique. Las placas se incubaron a 37°C por toda la noche. La actividad de la microcina se visualizó por la presencia de halos de inhibición de crecimiento. La cuantificación de la actividad antibiótica de la microcina se realizó determinando la máxima dilución de la muestra donde es posible observar sobre el césped un halo de inhibición de crecimiento bacteriano (dilución mínima inhibitoria, Mayr-Harting y col., 1972). Para diluir las muestras se utilizó agua o metanol al 95%.

### **2.5.2 Ensayo de sensibilidad en cultivos líquidos.**

Las cepas de *E. coli* silvestre o mutantes señaladas en la Tabla 1 se crecieron toda la noche en medio Luria Bertani (LB) para luego ser utilizadas como inóculo a un medio mínimo M9 suplementado con glucosa y citrato de sodio 0.2 % (p/v), 0.001 % (p/v) de cloruro de tiamina y sus respectivos antibióticos. El crecimiento en medio mínimo fue a 37°C con agitación hasta alcanzar un  $DO_{600} \sim 0.6$  (aprox.  $5 \times 10^8$  cél./ml). Cada vez que se ensayó la actividad de la microcina en cultivos celulares, el metanol se evaporó y la muestra se resuspendió en el mismo volumen de agua o buffer correspondiente, o bien, se ajustó la concentración de microcina a un volumen final de 100  $\mu$ l con un máximo porcentaje de metanol de 10%. Alícuotas de 100

$\mu\text{l}$  de la muestra de microcina se mezclaron con 100  $\mu\text{l}$  de un cultivo de la respectiva cepa de *E. coli* ( $A_{600} = 0.6$ ) y se incubó por 15 min a 37°C. Diluciones seriadas de esta mezcla se sembraron sobre agar-LB y después de incubar las placas a 37°C durante 18 h, se determinó el número de células sobrevivientes mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (ufc). El porcentaje de células sobrevivientes a la actividad antibiótica de la microcina se estimó con respecto al control sin tratamiento con microcina. El porcentaje de células muertas se estimó sustrayendo del total de células iniciales, el número de células que no sobrevivieron al ensayo.

### **2.5.3 Ensayos de sensibilidad en medio pobre en hierro.**

En los ensayos de sensibilidad en cultivos líquidos o sobre un césped bacteriano, se utilizaron cepas crecidas en medio mínimo suplementado con concentraciones entre 5-25  $\mu\text{M}$  de ácido dietilen-triaminopentaacético (DTPA), un quelante de hierro. A partir de estas cepas crecidas hasta fase exponencial, se utilizaron 100  $\mu\text{l}$  de células para los ensayos de sensibilidad en cultivo líquido, 300  $\mu\text{l}$  para formar un césped sensible sobre placas LB, o 20 ml para formar esferoplastos, utilizando la metodología descrita en los puntos 2.5.1, 2.5.2 y 2.5.4.2, respectivamente.

### **2.5.4 Actividad sobre esferoplastos.**

#### **2.5.4.1 Preparación de esferoplastos.**

Los esferoplastos se prepararon básicamente de acuerdo a lo descrito por Weiss (1976). La cepa de interés se creció en 100 ml de medio M9 suplementado con glicerol al 0.5% p/v hasta una  $A_{600}$  0.5. Las células se colectaron por centrifugación, se lavaron 2 veces con 20 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 y se resuspendieron en 20 ml de 100 mM Tris-HCl, 20% p/v de sacarosa, pH 8.0. Mientras se aplicaba agitación constante, se adicionó 1 ml de solución de lisozima (6 mg/ml) y se incubó la mezcla por 15 min a 37°C. Luego, se adicionó lentamente 2 ml de una solución de 0.1 M EDTA pH 8.0 y se incubó por otros 15 min. En forma rutinaria la cantidad de esferoplastos se determinó por la disminución del título celular después de diluciones en agua (solución hipotónica).

#### **2.5.4.2. Ensayo de sensibilidad de los esferoplastos ante la microcina.**

Se mezclaron alícuotas de 100  $\mu$ l de esferoplastos con 100  $\mu$ l de concentraciones crecientes de una muestra de microcina y se incubaron por 15 min a 37°C. Se realizaron diluciones seriadas en buffer 100 mM Tris-HCl, 20% p/v de sacarosa, pH 8.0 y 10  $\mu$ l (por triplicado) de cada dilución se sembraron sobre placas agar-LB. Luego de 18 h de incubación a 37°C, el título celular se determinó mediante el conteo de las UFC. El porcentaje de muerte de los esferoplastos se estimó sustrayendo del total el número de esferoplastos muertos después de incubar con microcina.

## **2.6 Ensayos de inhibición de la actividad bactericida de la microcina.**

### **2.6.1 Ensayos de inhibición sobre césped bacteriano.**

La microcina purificada se diluyó en agua o utilizando una solución que contiene el antagonista respectivo. Alícuotas de 3-5  $\mu$ l de cada dilución se agregaron al césped bacteriano y se determinó el título tal como se indica en el punto 2.5.1.

### **2.6.2 Ensayos de inhibición en cultivos líquidos**

Los ensayos de inhibición se realizaron mezclando distintos antagonistas (enterobactina y sus productos de hidrólisis) con la microcina en un volumen total de 100  $\mu$ l. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 15 min y luego se agregaron 100  $\mu$ l de la cepa indicadora para incubarse nuevamente a 37°C durante 15 min. Posteriormente se determinó el porcentaje de células sobrevivientes y se sustrajo en número de células muertas como se indicó anteriormente en el punto 2.5.2.

### **2.6.3 Cinética de la inhibición del péptido de microcina<sub>83-103</sub> sobre la microcina silvestre.**

Se resuspendieron en un volumen total de 250  $\mu$ l, 32  $\mu$ g/ml de microcina y 200  $\mu$ g/ml del péptido de microcina<sub>83-103</sub> y se mezclaron con 250  $\mu$ l de un cultivo de la cepa de *E. coli* H1443 (*aroB*) crecida hasta fase exponencial en

medio mínimo M9 DTPA 12,5  $\mu$ M. Esta mezcla se incubó en un Termoblock ajustado previamente a 37°C y alícuotas de 10  $\mu$ l fueron colectadas a distintos tiempos para determinar el porcentaje de células sobrevivientes y calcular el número de células muertas. El ensayo control consistió en repetir el procedimiento en ausencia del péptido.

#### **2.6.4 Ensayos de inhibición del suero de conejo anti-microcina o del péptido carboxilo terminal sobre la microcina.**

En un volumen de 100  $\mu$ l se mezcló la microcina con el suero de un conejo anti-microcina o el péptido carboxilo terminal para luego ser incubados por 15 min a 37°C. Luego se determinó su actividad antibiótica sobre un césped o cultivo bacteriano siguiendo los procedimientos mencionados en los puntos 2.5.1 y 2.5.2. Alternativamente se repitió el procedimiento cambiando la microcina por el sobrenadante del cultivo de la cepa de *E. coli* VCS257 pJEM15.

#### **2.6.5 Ensayos de inhibición de actividad de microcina desde el sobrenadante de cultivos de *E. coli*.**

Desde una preparación de microcina con un título de 1/1024 se tomaron 10  $\mu$ l y se mezclaron con 90  $\mu$ l del sobrenadante de un cultivo de fase exponencial de las cepas de *E. coli* H1885 (*entDF*), H1941 (*fur*) o BL21 crecidas en medio mínimo M9. Esta mezcla se incubó por 15 min a 37°C, se agregó a

100 µl del cultivo de la cepa de *E. coli* BL21 e incubó por 15 min a 37° C para finalmente determinar el número de células sobrevivientes.

### **2.6.7 Ensayo de sensibilidad sobre cepa des cultivadas en presencia de DHB.**

La cepa de *E. coli* BL21 se cultivó en medio LB y posteriormente se dividió para ser inoculada en un medio LB sin o con 10 mM de DHB. Luego de 15 o 90 min de cultivo a 37°C, las células se centrifugaron a 8000 x g y resuspendieron en medio LB conservando el volumen original. Este lavado se repitió para eliminar el DHB del cultivo e inmediatamente se determinó su sensibilidad contra la microcina E492 siguiendo el procedimiento 2.5.2. El medio LB + DHB 10 mM se ajustó a pH 7,0 con NaOH 10 N y se esterilizó utilizando un filtro estéril acrodisc 0.2 µm.

### **2.7 Ensayos de conversión de la forma inactiva a la forma activa de la microcina E492.**

Los ensayos de conversión consistieron básicamente en incubar la forma activa de la microcina con un exceso molar de la forma inactiva. La mezcla se sometió a una desnaturación suave, después de lo cual se determinó la actividad microcina resultante. Se utilizaron dos métodos en la activación, los que se diferenciaron básicamente en el solvente utilizado.

### **2.7.1 Activación en agua.**

Alícuotas de 100  $\mu$ l de una mezcla de forma inactiva y activa de la microcina 9:1 (v/v) en metanol 95% se evaporaron a 35°C al vacío (Labconco Centrivap Console) hasta un volumen final de 10  $\mu$ l. Se adicionó 90  $\mu$ l de agua np y se incubó por 10 min a 37°C. La actividad de la muestra se determinó mediante ensayo en cultivo líquido como se describe en el punto 2.5.2.

### **2.7.2 Activación en metanol.**

La mezcla de ambas formas de la microcina (9 inactiva : 1 activa v/v) se evaporó hasta un volumen final de 10  $\mu$ l, se adicionó 10  $\mu$ l de agua np estéril y se incubó por 10 min a 37°C. Se adicionó 80  $\mu$ l de metanol y la actividad se determinó mediante el ensayo sobre césped sensible. En cada ensayo de activación los controles correspondientes a la forma activa e inactiva de la microcina por separado se trataron de la misma forma que la mezcla de activación.

### **2.7.3 Ensayo de activación por temperatura sobre el sobrenadante y la microcina de la cepa de *E. coli* VCS257 p527.**

Una alícuota del cultivo de la cepa de *E. coli* VCS257p527 o VCS257p434 se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min. El sobrenadante se colectó y calentó a baño maría por 10 min. Luego se determinó el título del sobrenadante diluyéndolo en agua np estéril y agregando 5  $\mu$ l de cada dilución



sobre un césped de *E. coli* BL21. Alternativamente también se calentó el cultivo a baño maría, posteriormente se centrifugó y determinó el título del sobrenadante sobre un césped de BL21. Para repetir este ensayo utilizando la microcina purificada, 100  $\mu$ l de microcina se concentraron hasta un volumen de aproximadamente 10  $\mu$ l. Se agregaron 90  $\mu$ l de agua y se incubó a baño maría siguiendo el procedimiento antes descrito.

## **2.8 Caracterización de las formas activas e inactivas de la microcina mediante dicroísmo circular.**

Los espectros de soluciones que contenían las muestras de microcina en metanol se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-810 a 25°C, utilizando una celda de 0.1 cm de paso de luz. Se acumularon los espectros de 10 corridas a intervalos de 1 nm en un rango de longitud de onda entre 190-260 nm. Se restó el espectro de metanol obtenido bajo condiciones idénticas.

## **2.9 Purificación de la enterobactina y sus productos de hidrólisis.**

### **2.9.1 Obtención de la enterobactina y sus productos de hidrólisis por HPLC.**

La purificación de la enterobactina y sus productos de hidrólisis se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Winkelmann y col.(1994). En resumen, el sobrenadante de 100 ml de cultivo de la cepa de *E. coli* H1941 (*fur*) crecida en medio mínimo M9 DTPA 12,5  $\mu$ M hasta fase estacionaria, se acidificó con

HCl concentrado hasta un pH 2. Se agregaron 20 ml de acetato de etilo para extraer la enterobactina y sus productos de hidrólisis. Esta fracción se denominó extracto crudo de enterobactina. Posteriormente se evaporó el acetato de etilo calentado la muestra a 60°C en un termoblock bajo campana, para luego resuspenderla en ~ 300 µl de metanol. Una alícuota de 50 µl se aplicó a una columna C-18 (Merck) conectada a un HPLC (Beckman) para separar por fase reversa a la enterobactina y sus productos de hidrólisis. Se utilizó un gradiente de acetonitrilo 10%-40% asociado a una concentración constante de ácido trifluoroacético (TFA) 10%, con un flujo de 1ml/min y midiendo la absorbancia del eluido a 245 nm. Las fracciones colectadas que corresponden a los máximos picos observados en el cromatograma (ver resultados) se evaporaron hasta casi sequedad y se resuspendieron en 300 µl de metanol, guardándose a -20°C hasta su utilización.

### **2.9.2 Análisis de los antagonistas por TLC.**

Para determinar la pureza e identidad de las fracciones colectadas por la cromatografía en fase reversa, se utilizó la cromatografía en capa fina bidimensional en placas de celulosa con matriz de aluminio. El solvente utilizado en la primera dimensión contiene benceno: ácido acético: agua (125:72:3). Después de secar la placa de celulosa, se realizó la segunda dimensión girando la placa en 90° y utilizando formiato de amonio 5% p/v en ácido fórmico 0.5% p/v (O'Brien y col., 1970). La enterobactina y sus productos

de hidrólisis se visualizaron rociando la placa con una solución de  $\text{FeCl}_3$  0.1% y sus valores de migración se compararon con los descritos en la literatura (O'Brien y col., 1969, 1970).

## **2.10 Determinación de la producción de sideróforos en placas de cromoazuror.**

Las placas de cromoazuror se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Schwyn y Neilands (1987). Brevemente, se preparó un agar mínimo estéril concentrado 2x y una solución estéril que contiene: cromoazuror 605  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\text{Fe-III}$  0.1 mM, HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide) 728  $\mu\text{g/ml}$ . Ambas soluciones se mezclaron para formar placas de cromoazuror. Luego sobre la placa se pican las colonias de las distintas cepas de *E. coli* utilizadas en el ensayo y se incubaron por 18 h a 37°C. La formación de un halo naranja indicó la secreción de sideroforos.

## **2.11 Preparación de anticuerpo policlonal anti-microcina.**

### **2.11.1 Obtención del suero anti-microcina.**

Para preparar el anticuerpo policlonal se empleó como antígeno un péptido sintético de 20 aminoácidos que corresponde al extremo C-terminal de la microcina, cuya secuencia es CSWNGSGSGYNSATSSSGSG. El péptido sintético se acopló a Blue Carrier (Hemocianina, BioSonda S.A.) con glutaraldehído. Se inocularon a dos conejos en forma subcutánea e

intraepidérmica con 1 ml del antígeno (500  $\mu$ g en PBS y coadyuvante de Freund completo). A las dos y a las cuatro semanas, se volvieron a inocular con 500  $\mu$ g del antígeno, pero utilizando coadyuvante de Freund incompleto. Luego de analizar el anticuerpo extrayendo una pequeña muestra, fue necesario aplicar un refuerzo con el antígeno (800  $\mu$ g del antígeno utilizando coadyuvante de Freund incompleto). La sangría final se realizó a los 72 días después de que los conejos recibieron la primera inmunización. Tanto el suero pre-inmune como los sueros inmunes se evaluaron por ELISA.

#### **2.11.2 Determinación del título IgG anti-microcina del suero de conejo inmunizado.**

Se activó la placa incubando 50  $\mu$ l de un extracto de microcina purificada (320  $\mu$ g/ml) durante toda la noche a 4°C. Luego se bloqueó con BSA al 1% azida de sodio al 0,02% en PBS durante 1 h. Después de eliminar la solución de bloqueo, se agregó el anticuerpo en diluciones seriadas con BSA-azida en PBS y se incubó por 2 h. Se lavó 3 veces con PBS-Tween-20 al 0,1% para luego incubar por 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Se volvió a lavar con PBS-Tween-20 al 0,1%, para agregar enseguida el sustrato PNPP (1  $\mu$ g/ml en tampón bicarbonato de sodio 0,05 N, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,6) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con NaOH 3 N y se leyó la absorbancia a 405 nm.

## RESULTADOS

### 3.1 Identificación del sistema importador de la microcina E492 en *E. coli*

#### 3.1.1 Identificación de los receptores de importación de la microcina E492.

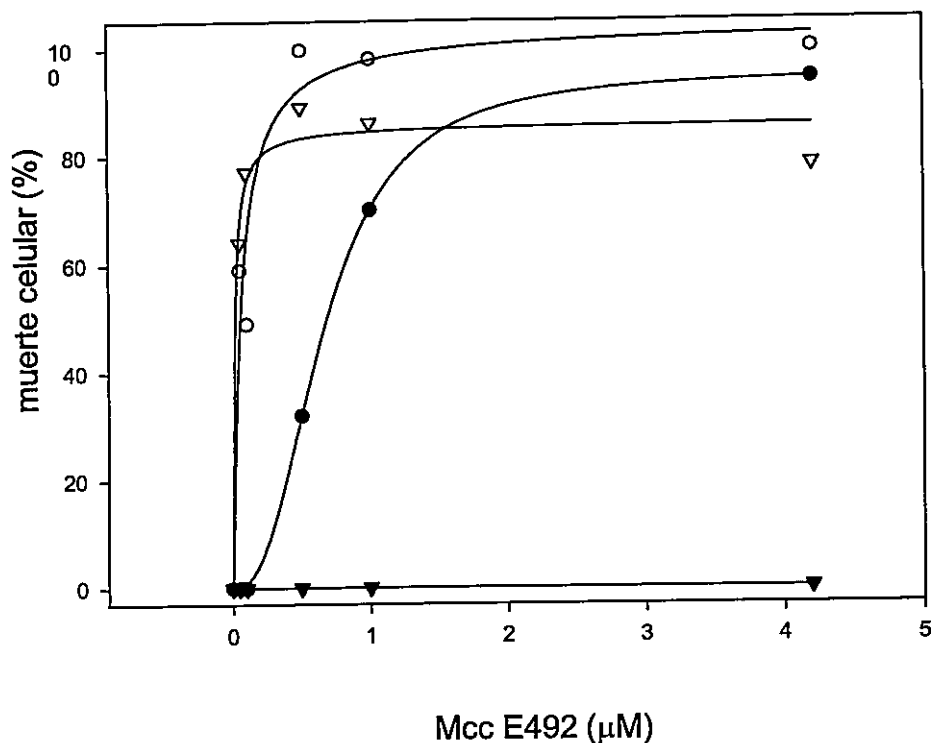
La estrategia genética utilizada habitualmente para identificar el receptor de un antibiótico consiste en buscar una cepa resistente al antibiótico y que presente una mutación en alguna proteína de membrana externa. Esta proteína generalmente corresponde al receptor de membrana externa y la resistencia es debido a que no puede reconocer al antibiótico impidiendo su importación y por ende, su acción bactericida a nivel de la membrana interna o del citoplasma. Para realizar estudios genéticos dirigidos a identificar el o los receptores de la microcina E492, se escogieron como posibles candidatos cepas mutantes triples, dobles y únicas para las proteínas de membrana externa *FepA*, *Fiu* y *Cir*. Estas cepas mutantes son isogénicas con la cepa parental de *E. coli* H1443 que expresa estos tres receptores, de manera que las diferencias observadas entre ellas pueden ser atribuidas exclusivamente a la ausencia de estos receptores. El ensayo genético más simple consistió en agregar una gota de microcina purificada sobre el césped de cada de estas cepas mutantes triples, dobles y únicas para los genes *fepA*, *fiu* y *cir*. En la tabla 3 se observa que la cepa triple mutante de *E. coli* H1876 es resistente a la microcina E492, en tanto que la presencia de al menos uno de estos tres receptores de membrana externa le confiere sensibilidad a la actividad bactericida de la microcina E492.

**Tabla 3. Actividad bactericida de la microcina E492 sobre cepas de *E. coli* silvestre y mutantes triples, dobles y únicas en los receptores FepA, Fiu y Cir.**

Cepa	Genotipo	Actividad bactericida
		Mcc E492
H1443	wt	+
H873	<i>fepA</i> <sup>-</sup>	+
H1594	<i>fiu</i> <sup>-</sup>	+
H800	<i>cir</i> <sup>-</sup>	+
H1728	<i>fiu</i> <sup>-</sup> <i>cir</i> <sup>-</sup>	+
H1875	<i>fepA</i> <sup>-</sup> <i>cir</i> <sup>-</sup>	+
H1877	<i>fepA</i> <sup>-</sup> <i>fiu</i> <sup>-</sup>	+
H1876	<i>fepA</i> <sup>-</sup> <i>fiu</i> <sup>-</sup> <i>cir</i> <sup>-</sup>	-

La actividad bactericida se determinó mediante la formación de halos de inhibición de crecimiento del césped de cada una de estas cepas usadas como indicadoras, al agregar 5 µl de una solución de microcina purificada (título 1/8, concentración 216 µg/ml). El símbolo (+) indica inhibición de crecimiento, el signo (-) señala crecimiento bacteriano en presencia de la microcina E492.

Estos resultados sugieren fuertemente que estas tres proteínas corresponden a los receptores de membrana externa de la microcina E492. Además, sugieren que la importación de microcina no requiere de una previa asociación entre dos o tres de estos receptores para reconocer y transportar su ligando. Por lo tanto, *E. coli* tendría tres alternativas independientes para la importación de microcina E492. El efecto bactericida de la microcina requiere además de estos tres receptores de membrana externa, de la inserción de la microcina en la membrana citoplasmática, la cual es dependiente del sistema transductor de energía TonB. Para determinar que la resistencia de la cepa triple mutante es debido exclusivamente a la ausencia de los receptores de la microcina E492 y no a una falla en el proceso de inserción de la microcina en la membrana citoplasmática, se eliminó la barrera de la membrana externa mediante la formación de esferoplastos de la cepa triple mutante de *E. coli* H1876 y se realizaron ensayos de sensibilidad. La Figura 4 muestra que los esferoplastos de la triple mutante de *E. coli* H1876 son sensibles a concentraciones crecientes de la microcina E492, no así las células no permeabilizadas. Este experimento indica que el sistema TonB es funcional y la resistencia observada en la cepa triple mutante de *E. coli* H1876 es debido exclusivamente a la ausencia de los receptores FepA, Fiu y Cir. Se observa además que a bajas concentraciones de microcina las células permeabilizadas tanto de la cepa silvestre de *E. coli* H1443 como de la cepa triple mutante de *E. coli* H1876 son más sensibles a la acción de ésta bacteriocina que las cepa silvestre de *E. coli* H1443 no tratada.



**Figura 4. Los receptores de membrana externa FepA, Fiu y Cir están implicados en la translocación de la microcina E492 al periplasma. Las cepas de *E. coli* H1443 (wt) y H1876 (*fepA*<sup>-</sup> *fiu*<sup>-</sup> *cir*<sup>-</sup>) se crecieron en medio mínimo M9 hasta una densidad celular de  $5 \times 10^8$  cel/ml. Una alícuota de estas cepas se utilizó en un ensayo de sensibilidad ante la microcina (símbolos llenos), el resto fue tratada para formar esferoplastos (símbolos vacíos) e inmediatamente usadas en los ensayos de sensibilidad. *E. coli* H1443 (wt) sin tratamiento (●) y esferoplastos (○). *E. coli* H1876 (*fepA*<sup>-</sup> *fiu*<sup>-</sup> *cir*<sup>-</sup>) sin tratamiento**

(▼) y esferoplastos (▽).



### **3.1.2 Modelo de importación de la microcina E492.**

Se quiso establecer si otros componentes del sistema importador de la enterobactina, como la proteína periplasmática FepB o el sistema importador FepCDG, también son necesarios para el transporte de la microcina hacia la membrana citoplasmática. Para ello se realizaron ensayos de sensibilidad a la microcina E492 utilizando la cepa silvestre de *E. coli* AB1515 y cepas mutantes de *E. coli* *fepB* y *fepC*. Los resultados de la Tabla 4 muestran que ambas cepas mutantes son sensibles a la microcina E492 al igual que la cepa silvestre, sugiriendo que la microcina E492 utiliza del sistema de importación de enterobactina, solamente a los receptores de membrana externa y el sistema transductor de energía TonBExbBD, para alcanzar su sitio blanco.

## **3.2 El papel de los receptores FepA, Fiu y Cir en la importación de microcina E492.**

### **3.2.1 Contribución de cada receptor en el reconocimiento de la microcina E492.**

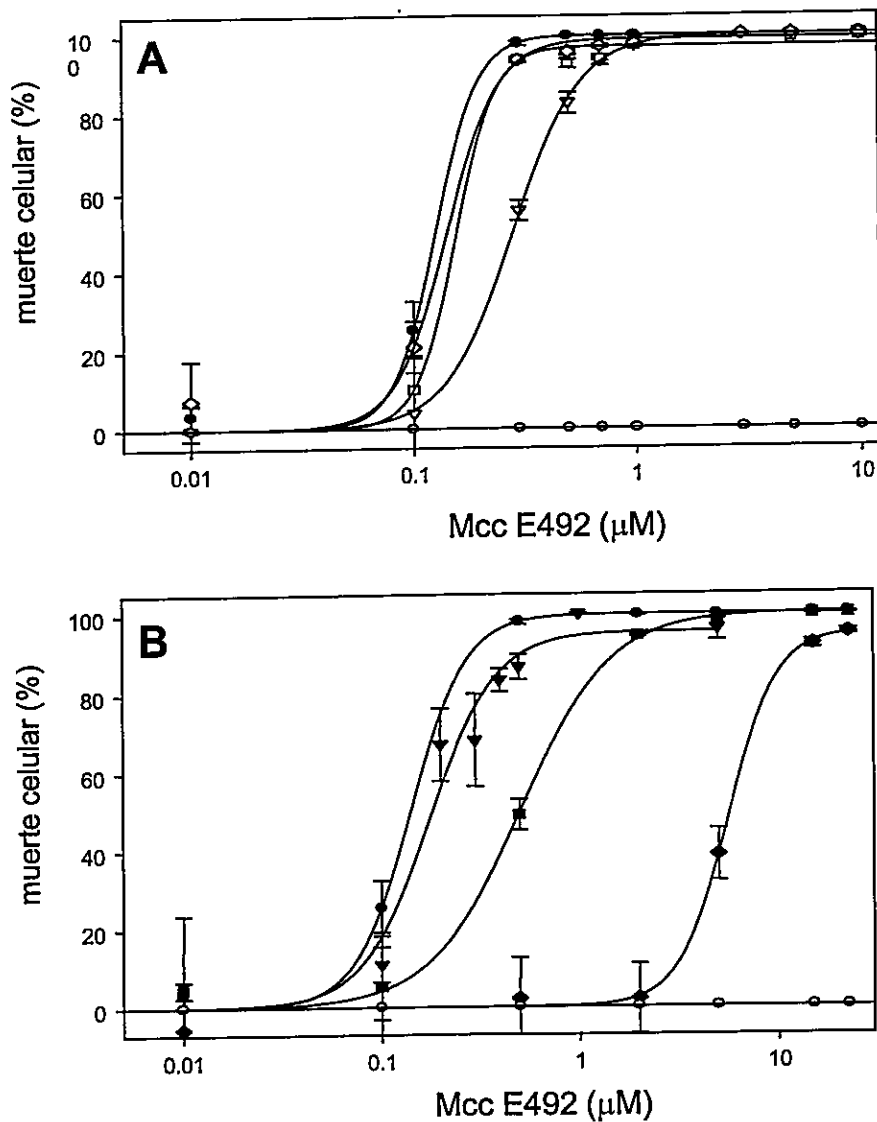
Para determinar en una cepa sensible de *E. coli* el nivel de participación de los receptores FepA, Fiu y Cir en la importación de la microcina E492 y un posible efecto cooperativo entre ellos, se realizaron ensayos de sobrevida a la cepa silvestre de *E. coli* H1443 y a sus mutantes en los receptores FepA, Fiu y Cir utilizando concentraciones crecientes de microcina E492. Se estableció como punto de comparación el valor  $CB_{50\%}$ , es decir, aquella concentración de microcina que por su actividad bactericida es capaz de matar el 50 % de la

**Tabla 4. Mutantes *E. coli* DK214 (*fepB*<sup>-</sup>) y AN260 (*fepC*<sup>-</sup>) son sensibles a la microcina E492.**

<b>Cepa indicadora</b>	<b>Título de la mceE492</b>
<i>E. coli</i> AB1515 (wt)	1/256
<i>E. coli</i> DK214 ( <i>fepB</i> )	1/256
<i>E. coli</i> AN260 ( <i>fepC</i> )	1/128

A partir de diluciones seriadas en base 2 de la microcina E492, se agregaron 5  $\mu$ l de cada dilución sobre el césped de cada cepa. El título se define como la máxima dilución de microcina capaz de generar en el césped un halo de inhibición de crecimiento. El césped se formó utilizando alícuotas del cultivo respectivo crecido hasta su fase exponencial en medio LB.

población celular. En la Figura 5 se puede observar que a concentraciones de microcina E492 superiores a 10  $\mu\text{M}$ , todas las mutantes, a excepción de la triple mutante, alcanzan sobre el 95% de muerte celular, sugiriendo una importación eficiente de la microcina E492 por cualquiera de estos tres receptores a estas concentraciones de microcina. Sin embargo, si la concentración de microcina es inferior a 10  $\mu\text{M}$ , la sobrevivencia de esta población es diferente según cual o cuales de estos tres receptores se expresa en la membrana externa (Fig. 5). Los valores de  $\text{CB}_{50\%}$  obtenido sobre mutantes únicas para FepA, Fiu o Cir oscilan entre 0,14  $\mu\text{M}$  a 0,28  $\mu\text{M}$ , siendo valores similares al obtenido sobre la cepa silvestre de *E. coli* H1443 ( $\text{CB}_{50\%}$  0,12  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 5). La razón por la cual se conserva la sensibilidad por la microcina, como se demostrará más adelante, es debido a que en las cepas mutantes siempre se expresa al menos uno de los dos receptores que transportan más eficientemente a la microcina E492. La cepa mutante única que muestra una mayor disminución en la sensibilidad por la microcina E492 es en la mutante de *E. coli* H873 (*fepA*<sup>-</sup>), seguida por la cepa mutante de *E. coli* H1594 (*fiu*<sup>-</sup>) que presenta una disminución moderada en la sensibilidad por la microcina E492, en tanto que la cepa mutante de *E. coli* H800 (*cir*<sup>-</sup>) que expresa FepA y Fiu simultáneamente presentan una sensibilidad similar a la cepa parental *E. coli* H1443 (Fig. 5A, Tabla 5). Estos resultados sugieren que la microcina E492 se transporta principalmente a través de FepA, luego por Fiu y finalmente por Cir. Los ensayos de sensibilidad realizados a



**Figura 5. Contribución de los receptores FepA, Fiu y Cir al reconocimiento de la microcina E492.** Las cepas silvestre, triple mutante, mutantes únicas (A) y dobles mutantes (B) para los receptores FepA, Fiu y Cir, se crecieron en medio mínimo M9 hasta una densidad celular de  $5 \times 10^8$  cel/ml. Una alícuota de este cultivo se utilizó en ensayos de sensibilidad con concentraciones crecientes de microcina E492. El 100% de las células sobrevivientes corresponde al ensayo realizado en paralelo en ausencia de microcina E492 y el porcentaje de muerte celular se sustrae del número de células sobrevivientes al ensayo. Símbolos de las cepas de *E. coli*; H1443 wt (●), H800 *cir*<sup>-</sup> (◇), H1594 *fiu*<sup>-</sup> (□), H873 *fepA*<sup>-</sup> (▽), H1875 *fepA*<sup>-</sup> *cir*<sup>-</sup> (■), H1728 *fiu*<sup>-</sup> *cir*<sup>-</sup> (▼), H1877 *fepA*<sup>-</sup> *fiu*<sup>-</sup> (◆), H1876 *fepA*<sup>-</sup> *fiu*<sup>-</sup> *cir*<sup>-</sup> (○).

**Tabla 5. Concentración de microcina E492 necesaria para obtener un 50% de muerte celular sobre cepas de *E. coli* silvestre y mutantes en los receptores FepA, Fiu y Cir.**

Cepas	Genotipo relevante	CB <sub>50%</sub> (μM)
H1443	<i>fepA</i> <sup>+</sup> <i>fiu</i> <sup>+</sup> <i>cir</i> <sup>+</sup>	0,12
H800	<i>cir</i> <sup>-</sup>	0,14
H1594	<i>fiu</i> <sup>-</sup>	0,15
H873	<i>fepA</i> <sup>-</sup>	0,28
H1728	<i>fiu</i> <sup>-</sup> <i>cir</i> <sup>-</sup>	0,17
H1875	<i>fepA</i> <sup>-</sup> <i>cir</i> <sup>-</sup>	0,50
H1877	<i>fepA</i> <sup>-</sup> <i>fiu</i> <sup>-</sup>	5.5
H1876	<i>fepA</i> <sup>-</sup> <i>fiu</i> <sup>-</sup> <i>cir</i> <sup>-</sup>	R

Estos valores se calcularon a partir del ajuste de la curva de la Figura 5, utilizando el algoritmo de la ecuación de Hill. El símbolo (R) indica resistencia a la actividad bactericida de la microcina E492.

cepas dobles mutantes para estos receptores exponen mejor estas diferencias. La cepa doble mutante de *E. coli* H1877 (*fepA<sup>-</sup> fiu<sup>-</sup>*) que expresa solamente el receptor Cir, genera el valor  $CB_{50\%}$  más alto (5,5  $\mu$ M) (Fig. 5B, Tabla 5), indicando que a bajas concentraciones de microcina este receptor probablemente no participa del proceso de importación, o bien, que su contribución no es muy significativa. Por su parte la cepa doble mutante de *E. coli* H1875 (*fepA<sup>-</sup> cir<sup>-</sup>*) que expresa solamente el receptor Fiu, contribuye significativamente a la importación de la microcina E492 con un valor  $CB_{50\%}$  de 0,50  $\mu$ M (Fig. 5B, Tabla 5). La sensibilidad de la cepa doble mutante de *E. coli* H1728 (*fiu<sup>-</sup> cir<sup>-</sup>*) que expresa el receptor FepA, es muy similar a la sensibilidad de la cepa silvestre, lo cual sugiere nuevamente que éste es el receptor principal para la microcina E492 (Fig. 5B, Tabla 5). En los resultados anteriores también se observa que el aumento en el transporte a través de FepA se incrementa en forma aditiva al co-expresarse los receptores Fiu y Cir, y del mismo modo lo hace el transporte a través de Fiu al co-expresarse Cir, reafirmando la actividad independiente de estos tres receptores. Por lo tanto, el grado de sensibilidad de la cepa silvestre de *E. coli* H1443 (*fepA<sup>+</sup> fiu<sup>+</sup> cir<sup>+</sup>*) a la microcina E492, simplemente corresponde a la sumatoria que le otorga cada receptor por el transporte de la microcina E492. Las causas por las cuales cada receptor le confiere a la célula distinta sensibilidad por la microcina E492, pueden ser varias. Una posibilidad es que los receptores posean afinidades similares por la microcina pero diferentes velocidades de transporte a través del

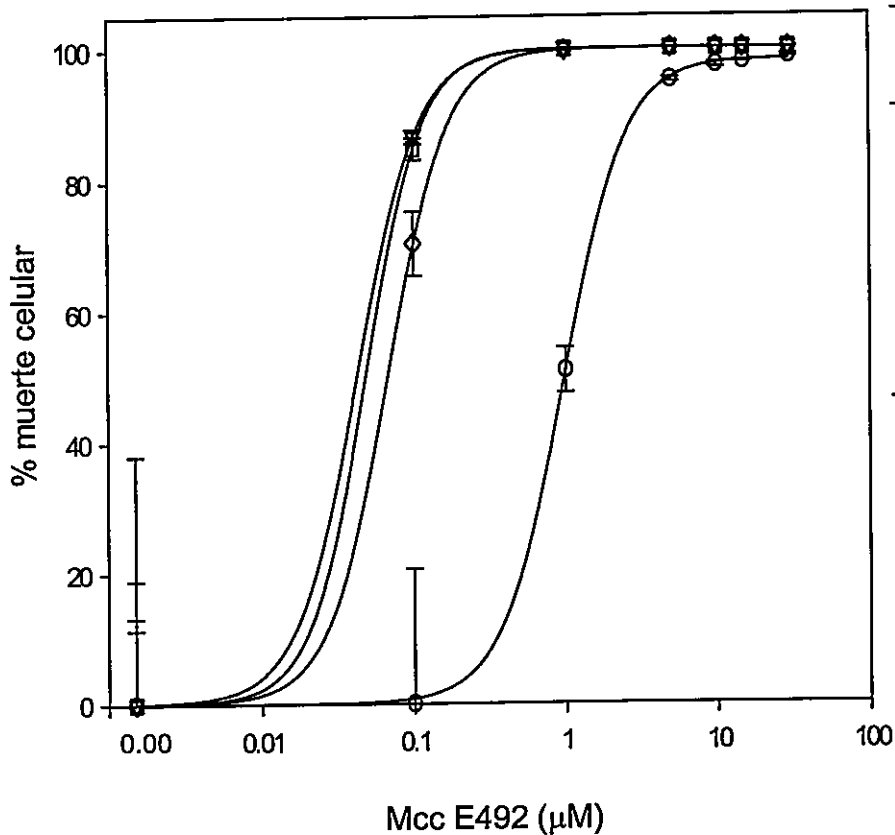
canal, o viceversa, distintas afinidades por la microcina, pero un transporte eficiente hacia el periplasma. Otra posibilidad es que cada receptor presente diferencias respecto de su densidad en la membrana externa, lo cual podría afectar directamente la sensibilidad por la microcina E492. Respecto de este último punto, en *E. coli* los niveles de FepA y Cir en la membrana externa son equivalentes, sin embargo, el receptor Fiu presenta una menor densidad a altas concentraciones de hierro, pero equivalentes a Cir en condiciones de crecimiento pobres en hierro (Curtis y col., 1988). Para determinar si variaciones en la densidad de estos tres receptores de membrana externa afectan la sensibilidad ante la microcina E492, se realizaron experimentos bajo condiciones que estimulan la máxima expresión de estos receptores y se midieron los cambios en la sensibilidad. Los resultados de estos experimentos se detallan a continuación.

### **3.2.2 Efecto de la concentración del hierro extracelular sobre la sensibilidad de *E. coli* H1443 a la actividad bactericida de la microcina E492.**

La disminución del contenido de hierro del ambiente induce un aumento en la densidad de los receptores de membrana externa FepA, Fiu y Cir (McIntosh y Earhart, 1977; Bagg y Neilands, 1987), lo cual podría conllevar un aumento en la sensibilidad por la microcina E492. Para comprobar esta hipótesis, la cepa silvestre se creció en medio mínimo M9 en ausencia y a concentraciones crecientes del quelante de hierro DTPA. La carencia de hierro

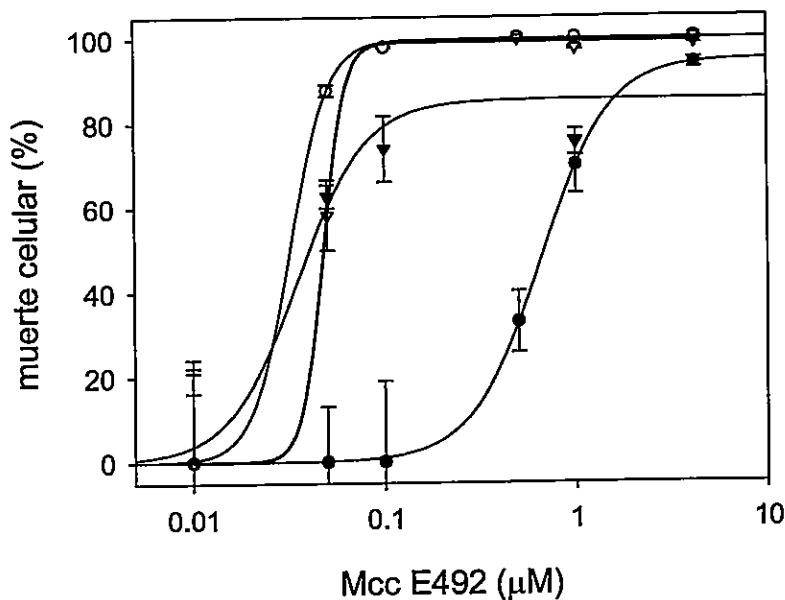
induce la máxima expresión de estos receptores que están bajo el control del represor Fur. En la Figura 6 se observa que la cepa cultivada sin DTPA tiene un  $CB_{50\%}$  de  $0,96 \mu\text{M}$ , en tanto que en las células crecidas con DTPA  $5 \mu\text{M}$  el  $CB_{50\%}$  disminuye hasta  $0,042 \mu\text{M}$ , es decir, se requiere de 23 veces menos microcina para matar el 50% de la población. Un aumento similar en la sensibilidad se observa al cultivar la cepa con mayores concentraciones de DTPA 25 y  $100 \mu\text{M}$ , con valores de  $CB_{50\%}$  de  $0,048$  y  $0,067 \mu\text{M}$  respectivamente. La sensibilidad de la cepa es muy similar en cualquiera de las tres concentraciones de DTPA, sugiriendo que la concentración de DTPA  $5 \mu\text{M}$  es suficiente para quelar el hierro presente en el medio M9 e inducir la densidad de los receptores FepA, Fiu y Cir a un nivel que es capaz de producir la máxima sensibilidad a la microcina E492. En forma alternativa, la máxima sensibilidad por la microcina E492 también podría deberse a un aumento en la densidad de su sistema de translocación TonB. Para analizar esta posibilidad, repetimos el ensayo anterior determinando la sensibilidad de los esferoplastos de cepas crecidas en ausencia y presencia de DTPA, puesto que en este caso el esferoplasto posee una membrana externa permeabilizada y por tanto, la sensibilidad dependerán exclusivamente del sistema TonB y no del transporte a través de sus receptores de membrana externa. La Figura 7 muestra que en presencia o ausencia del DTPA, los esferoplastos poseen una sensibilidad similar entre ellos, con valores de  $CB_{50\%}$  de  $0,035$  y  $0,067 \mu\text{M}$  respectivamente. Además, esta sensibilidad es similar al  $CB_{50\%}$  de  $0,032 \mu\text{M}$  obtenido en la cepa





Condicción (μM DTPA)	CB <sub>50%</sub> (μM)	Incremento (n veces)
0	0,96	1
5	0,042	23
25	0,048	20
100	0,067	14

**Figura 6. Sensibilidad a la microcina E492 de la cepas de *E. coli* H1443 en condiciones restrictivas de hierro.** La cepa de *E. coli* H1443 se creció en medio mínimo M9 hasta una densidad celular de  $5 \times 10^8$  cel/ml, en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del quelante de hierro DTPA y se determinó la sobrevivencia a concentraciones crecientes de microcina E492. La CB<sub>50%</sub> de microcina E492 ante la cepa silvestre en ausencia de DTPA (○) fue de 0,96 μM y en presencia de DTPA 5 μM (▽), 25 μM (□) y 100 μM (◇) fueron de 0,042 μM, 0,048 μM y 0,048 μM respectivamente. El incremento en la sensibilidad se calculó en base a la razón; (CB<sub>50%</sub> obtenido sobre la cepa crecida sin DTPA) / (CB<sub>50%</sub> sobre la cepa crecida en DTPA).



Condición	CB <sub>50%</sub> (μM)
bacteria sin tratar	0,65
esferoplasto	0,035
bacteria + DTPA	0,032
esferoplasto + DTPA	0,048

**Figura 7. Sensibilidad a la microcina E492 de la cepa de *E. coli* H1443 sin tratar y como esferoplasto en condiciones restrictivas de hierro.** Las células se crecieron en medio mínimo M9 hasta una densidad celular de  $5 \times 10^8$  cel/ml, en presencia (símbolos vacíos) o ausencia (símbolos llenos) del quelante de hierro DTPA 25 μM. Una alícuota de estas cepas se utilizó en un ensayo de sensibilidad ante la microcina y el resto se trató para formar esferoplastos e inmediatamente se sometieron al ensayo de sensibilidad. La cepa silvestre de *E. coli* H1443 sin tratar (●) y su esferoplasto (▼) en ausencia de DTPA presentan un CB<sub>50%</sub> para la microcina E492 de 0,65 μM y 0,035 μM respectivamente. En tanto que la cepa silvestre de *E. coli* H1443 sin tratar (○) y su esferoplastos (▽) en presencia de DTPA reflejaron una CB<sub>50%</sub> para la microcina E492 de 0,032 μM y 0,048 μM respectivamente.

crecida en presencia del quelante de hierro DTPA, sugiriendo que en condiciones de máxima expresión de estos receptores, el transporte de la microcina a través de la membrana externa es tan eficiente que su sensibilidad es equivalente a una cepa que permite el libre paso de la microcina desde el medio extracelular hacia el sistema TonB, para su inserción en la membrana interna y formación del canal.

### **3.2.3 Sensibilidad a la microcina E492 en cepas dobles mutantes de *E. coli* para los receptores FepA, Fiu y Cir bajo condiciones restrictivas de hierro.**

El objetivo de los siguientes experimentos fue determinar la contribución de cada receptor a la sensibilidad por la microcina E492 en condiciones de máxima expresión de éstos receptores. Para ello realizamos ensayos de sensibilidad a tres cepas dobles mutante las cuales expresaron solamente el receptor FepA, Fiu o Cir y que han sido cultivadas en condiciones carentes de hierro. En la tabla 6 se observa que la cepa que expresa sólo FepA presenta una sensibilidad similar a la silvestre, mientras que las cepas mutantes que expresa solamente Fiu o Cir, muestran una sensibilidad menor. Los resultados sugieren que pese a la máxima expresión de los receptores Fiu o Cir, estos probablemente poseerían una menor afinidad por la microcina E492, lo cual no les permite alcanzar la misma sensibilidad observada en la cepa silvestre. Por el contrario, el receptor FepA poseería la mayor afinidad por la microcina, reafirmando como la principal proteína importadora de microcina E492.

**Tabla 6. Sensibilidad a la microcina E492 de cepas mutantes que expresan sólo FepA, Fiu o Cir en presencia y carencia de hierro.**

Cepas	Genotipo	Título de la microcina	
		cepa sensible cultivada sin DTPA	con DTPA
H1443	<i>fepA<sup>+</sup> fiu<sup>+</sup> cir<sup>+</sup></i>	1/64	1/128
H1728	<i>fiu<sup>-</sup> cir<sup>-</sup></i>	1/32	1/128
H1875	<i>fepA<sup>-</sup> cir<sup>-</sup></i>	1/32	1/64
H1877	<i>fepA<sup>-</sup> fiu<sup>-</sup></i>	1/16	1/16

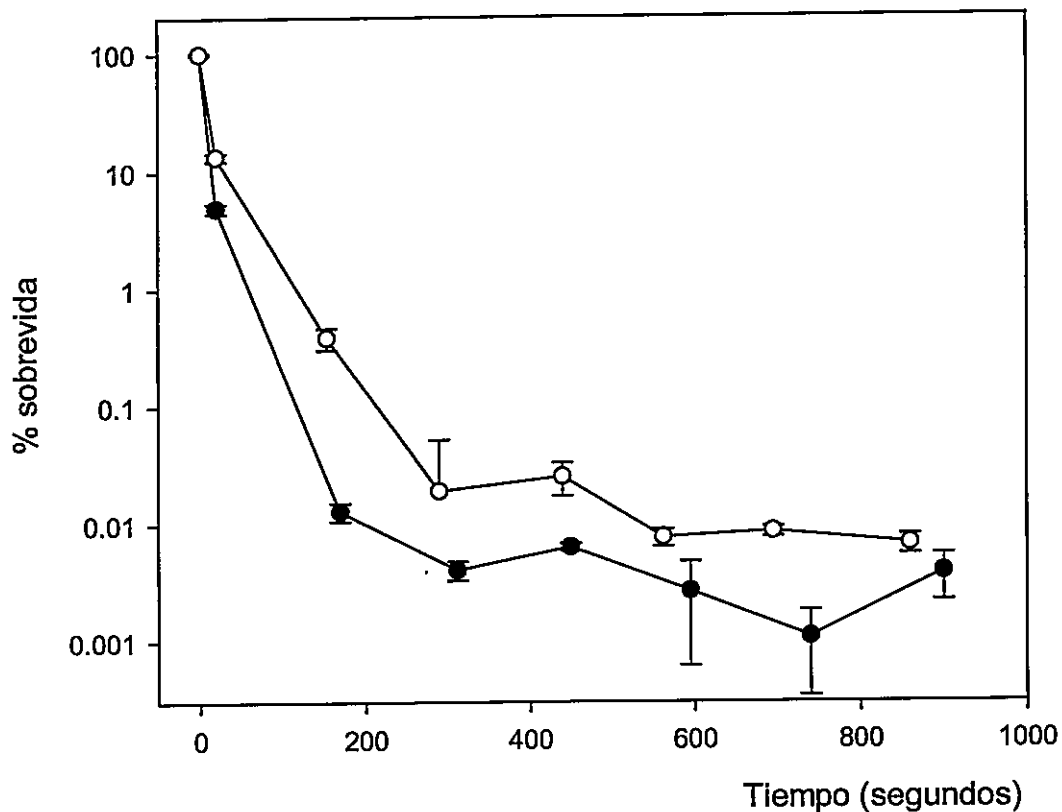
Las cepas de *E. coli* doble mutantes para los receptores FepA, Fiu y Cir se crecieron en medio mínimo M9 en presencia o ausencia de DTPA 12,5  $\mu$ M y se cosecharon durante la fase exponencial de crecimiento. Su densidad óptica se ajustó a DO<sub>600</sub> 0,1 con medio mínimo M9 sin DTPA y una alícuota se utilizó para formar un césped sobre placas LB. Se agregó 5  $\mu$ l de diluciones seriadas de microcina E492 (38  $\mu$ M) sobre cada uno de los céspedes y el título de la microcina E492 se estimó en base a la máxima dilución de microcina capaz de formar un halo de inhibición de crecimiento.

### **3.3 Estudio de la participación del extremo carboxilo terminal de la microcina E492 en el reconocimiento por sus receptores de membrana externa FepA, Fiu y Cir.**

Se postula que en el proceso de reconocimiento de las colicinas por el receptor de FepA o Cir, las colicinas emularían las cargas negativas de la enterobactina férrica para unirse al sitio de unión del receptor y estimular el cambio conformacional que induce la apertura del canal (Cao y Klebba, 2002). El análisis de las secuencias de las microcina E492, H47 y colicinas G y H, muestran una similitud en su extremo carboxilo terminal, razón por la cual, el grupo de Hantke postula que las serinas de esta región serían aquellas cargas negativas reconocidas por los receptores de membrana externa FepA, Fiu y Cir (Braun y col, 2002; Patzer y col, 2003). Para estudiar si éste es el caso, se realizaron ensayos de competencia entre la microcina E492 y anticuerpos policlonales contra el carboxilo terminal de la microcina E492 o entre la microcina y un péptido sintético que posee los últimos 20 aminoácidos de la microcina E492. Esta estrategia ha sido utilizado con éxito en la identificación de la porción del receptor FhuA que reconoce a los fagos T1, T5,  $\Phi$ 80 y la colicina M (Killmann y col., 1995).

### **3.3.1 El péptido sintético correspondiente a la porción carboxilo terminal de la microcina E492 no compete con la importación de microcina silvestre.**

Los experimentos de competencia entre el péptido carboxilo terminal y la microcina E492 se realizaron utilizando una relación microcina:péptido 1:1 (40  $\mu$ M) y no mostraron variación en la actividad bactericida de la microcina E492, medido por titulación en césped sensible (datos no mostrados). Se repitió el experimento cambiando el solvente acuoso por metanol para favorecer la estabilidad y actividad de la microcina E492, pero la actividad bactericida de la microcina no cambió en presencia o ausencia del péptido, incluso cuando la relación microcina:péptido fue de 1:140 (datos no mostrados). Existe la posibilidad que durante el ensayo de competencia entre la microcina y el péptido, éste último pueda ser importado por los receptores FepA, Fiu y Cir, anulándose su acción inhibitoria sobre la actividad de la microcina E492. Para dirimir este punto se realizaron ensayos cinéticos de sensibilidad en presencia y ausencia del péptido de microcina E492. Se observó que la microcina incubada con el péptido de 20 aminoácidos requiere de un tiempo levemente mayor para alcanzar el mismo porcentaje de muerte observado con la microcina (Fig. 8), pero las diferencias no se ven significativas. Para establecer en forma más categórica que no existe participación del extremo carboxilo terminal en el reconocimiento por sus receptores de membrana externa, se usó una estrategia alternativa. Se incubó la microcina E492 con un suero de conejo pre-



**Figura 8. Ensayo cinético del efecto bactericida de la microcina E492 en presencia y ausencia del péptido sintético de la región carboxilo terminal.** Las mezclas de microcina (40  $\mu$ M)(●) y microcina + péptido (1:1, 40  $\mu$ M) (○) se incubaron a 37°C con la cepa sensible de *E. coli* H1443. Alícuotas del ensayo se colectaron en los tiempos indicados para determinar el porcentaje de sobrevivida de las células.

inmunizado con el péptido carboxilo terminal de la microcina E492. Si esta región es importante en el reconocimiento, se esperaba que la unión del anticuerpo a la porción carboxi-terminal de la microcina produjera un impedimento estérico para el reconocimiento de la microcina por sus receptores. Sin embargo, como se aprecia en la tabla 7, la actividad de la microcina purificada no se modificó al mezclarse con distintas diluciones del suero anti-microcina. En forma complementaria, se reemplazó a la microcina purificada por una microcina silvestre presente en el sobrenadante de un cultivo de la cepa sobreproductora de microcina E492 *E. coli* VCS257 pJEM15. Estos sobrenadantes se colectaron cuando el cultivo de esta cepa en medio mínimo M9 alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0,49 y 0,81 respectivamente, con títulos de 1/2 y 1/4. La mezcla de estos sobrenadantes con distintas diluciones de anticuerpo, no afectaron la actividad bactericida del sobrenadante (datos no mostrados). En resumen, estos ensayos de competencia utilizando la porción carboxilo terminal y anticuerpos policlonales contra esta región, sugieren que probablemente existe una interacción microcina-receptor que requiere de una parte importante de la proteína, siendo más compleja que una simple unión del carboxilo terminal de la microcina al receptor.

### **3.4 Actividad bactericida de la microcina E492 sobre *Pseudomonas aeruginosa*.**

La microcina E492, a diferencia de otros antibióticos, al utilizar tres receptores para ingresar a la célula blanco amplía su espectro bactericida entre



**Tabla 7. Actividad de la microcina E492 pre-incubada con un anticuerpo policlonal anti-microcina E492.**

Microcina ( $\mu\text{M}$ )	Muerte celular (%)		
	sin anticuerpo	con anticuerpo (1:50)	con anticuerpo (1:5)
0	0 ( $\pm 12$ )	0 ( $\pm 20$ )	0 ( $\pm 8$ )
0,02	19 ( $\pm 10$ )	82 ( $\pm 9$ )	56 ( $\pm 5$ )
0,04	63 ( $\pm 14$ )	93,5 ( $\pm 0.2$ )	89 ( $\pm 0.69$ )
0,2	97,5 ( $\pm 0.24$ )	99,98 ( $\pm 0.001$ )	99,5 ( $\pm 0.12$ )
0,4	99,75 ( $\pm 0.01$ )	99,99 ( $\pm 0.001$ )	99,87 ( $\pm 0.02$ )
1,2	99,9 ( $\pm 0.001$ )	99,99 ( $\pm 0.0003$ )	99,99 ( $\pm 0.001$ )

Distintas concentraciones de microcina se mezclaron con suero anti-microcina en la cantidad indicada y se incubaron a 37°C por 30 min. Luego se mezclaron con la cepa indicadora de *E. coli* H1443 para el ensayo habitual de sensibilidad.

bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, aunque *P. aeruginosa* posee estos tres receptores y la similitud entre las proteínas FepA de *E. coli* y *P. aeruginosa* es de un 60% (Dean y Poole, 1993), la cepa es resistente a la actividad bactericida de la microcina E492. Una posible explicación a esta resistencia podría estar dada por la reducida expresión de estos receptores FepA, Fiu y Cir, ya que *P. aeruginosa* utiliza otros sistemas de importación de hierro (Poole y McKay, 2003). Alternativamente, existe la posibilidad de que el sistema TonB de *P. aeruginosa* no permita la inserción de la microcina en la membrana interna, evitando su acción bactericida. Se realizaron experimentos de sensibilidad a la *P. aeruginosa* cultivada en medio mínimo o medio pobre en hierro para estimular la expresión de los receptores FepA, Fiu y Cir. Los resultados muestran que el césped de *P. aeruginosa* es resistente a la microcina producida por una colonia productora de microcina activa o a una alícuota de la microcina E492 purificada (datos no mostrados). Sin embargo, esferoplastos de *P. aeruginosa* y *E. coli* (Tabla 8) son sensibles a un shock osmótico y a la actividad bactericida de la microcina E492, sugiriendo que entre ambas especies el sistema TonB conserva la capacidad de insertar la microcina en la membrana interna, y que la resistencia de *P. aeruginosa* a la actividad bactericida de la microcina E492 aparentemente es debido a diferencias en la expresión y/o afinidad de sus receptores FepA, Fiu y Cir por la microcina E492.

**Tabla 8. Sensibilidad de esferoplastos de *Pseudomonas aeruginosa* a la microcina E492.**

Cepa indicadora (esferoplastos)	Condiciones	Muerte celular (%)
<i>E. coli</i>	Agua	99,97 ( $\pm$ 0,02)
<i>E. coli</i>	Sacarosa 20%	0,15 ( $\pm$ 16)
<i>E. coli</i>	Sacarosa 20% + microcina E492	99,99 ( $\pm$ 0,002)
<i>P. aeruginosa</i>	Agua	72,8 ( $\pm$ 7,3)
<i>P. aeruginosa</i>	Sacarosa 20%	0,0 ( $\pm$ 54)
<i>P. aeruginosa</i>	Sacarosa 20% + microcina E492	95,7 ( $\pm$ 5,9)

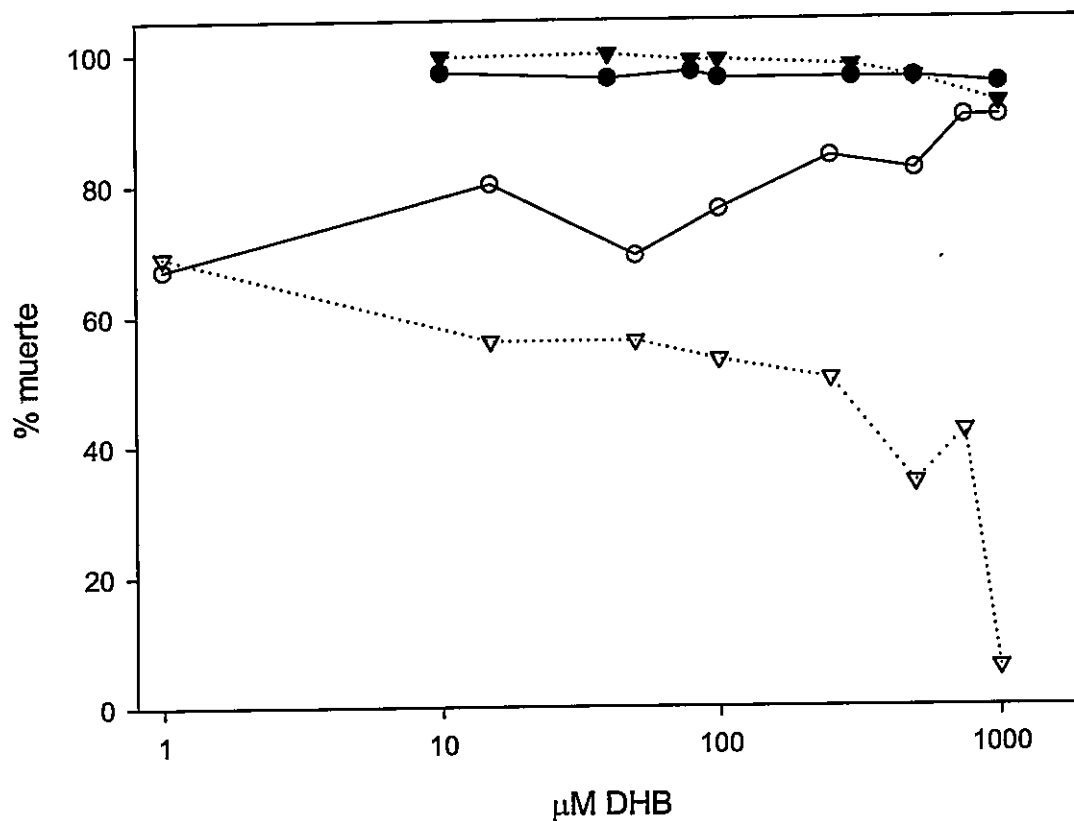
Los esferoplastos se prepararon como se describe en materiales y métodos. El metanol de las muestras se evaporó y reemplazó por el mismo amortiguador de los esferoplastos. La solución hipotónica (agua) se utilizó para estimar el porcentaje de esferoplastos formados y la solución isotónica de sacarosa al 20% + microcina E492 se utilizó para estimar el porcentaje de esferoplastos sensibles a la microcina E492. La concentración de microcina E492 utilizada en todos estos experimentos fue de 32  $\mu$ g/ml.

### **3.5 Estudio de la actividad antagonista de los productos de hidrólisis de la enterobactina y de su precursor el ácido 2,3-dihidroxi benzoico.**

El ligando natural de FepA es la enterobactina y de Fiu y Cir los productos de hidrólisis de la enterobactina. Además, FepA, Fiu y Cir pueden importar el ácido 2,3-dihidroxi benzoico (DHB), un precursor en la síntesis de enterobactina. Debido a que los receptores FepA, Fiu y Cir también importan a la microcina E492, nuestro segundo objetivo fue determinar si los productos de hidrólisis de la enterobactina y el ácido 2,3-dihidroxi benzoico son antagonistas de la actividad bactericida de la microcina E492.

#### **3.5.1 El ácido 2,3-dihidroxi benzoico es un antagonista débil de la microcina E492 cuando se utiliza la cepa indicadora de *E. coli* AN260 (*fepC*).**

Para determinar el posible efecto antagonista del DHB sobre la microcina E492, se realizó un ensayo de actividad bactericida en el cual se pre-incubó el DHB con la microcina y posteriormente se agregó a la cepa sensible de *E. coli* H1443 (*aroB*) para determinar su sobrevivencia. Se escogió esta cepa como cepa indicadora, ya que no produce enterobactina, a fin de evitar el efecto antagonista de la enterobactina silvestre durante el ensayo de actividad. En la Figura 9 se observó que sobre la cepa de *E. coli* H1443 (*aroB*) la actividad de la microcina no disminuyó en presencia de DHB en un rango entre 1 y 1000  $\mu\text{M}$  cuando se utilizaron concentraciones de microcina de 35,2  $\mu\text{M}$ . Sin embargo,



**Figura 9. Efecto del ácido 2,3-dihidroxibenzoico sobre la actividad de la microcina E492.** Dos distintas concentraciones de microcina E492 de 21,6  $\mu\text{g/ml}$  (símbolos vacíos) y 35,2  $\mu\text{g/ml}$  (símbolos llenos) se preincubaron con distintas concentraciones de DHB y luego con la cepa de *E. coli* H1443 (*aroB*) (○) o la cepa mutante de *E. coli* AN260(*fepC*) (▼) para determinar el porcentaje de muerte.

existía la posibilidad de que el DHB fuera importado durante la incubación con la cepa sensible enmascarándose el posible efecto antagonista. Para dilucidar esta incógnita se repitió el ensayo utilizando la cepa de *E. coli* AN260 (*fepC*), la cual no importa DHB ni enterobactina y sus productos de hidrólisis. Esta cepa posee una mutación en el gen *fepC*, impidiendo la importación de estos sideróforos desde el periplasma hacia el citoplasma, pero no afecta la importación de la microcina E492. El ensayo de sensibilidad utilizando esta cepa de *E. coli* AN260 (*fepC*), mostró que a altas concentraciones de DHB hay una ligera pérdida de la actividad bactericida de la microcina E492 (Fig. 9). Para observar mejor este efecto antagonista, se repitió el ensayo disminuyendo la concentración de la microcina E492. En estas condiciones se observó que sobre una concentración de DHB 1 mM la actividad bactericida de la microcina E492 fue inhibida significativamente (Fig. 9). Por el contrario, bajo estas mismas condiciones la cepa de *E. coli* H1443 (*aroB*) importadora de DHB, presentó un ligero aumento en la actividad bactericida de la microcina a medida que aumentaba la concentración del DHB (Fig. 9). En resumen, estos resultados nos indican que sólo hay efecto antagonista del DHB sobre la microcina, cuando la cepa sensible no importa el DHB y cuando se utiliza una concentración de microcina que no elimine más del 90% de la población. Solo así es posible visualizar la débil actividad antagonista del DHB, el cual probablemente no tiene ningún efecto inhibitorio al nivel biológico. Una posible explicación de esta débil actividad antagonista, es que el DHB es incapaz de competir contra la microcina por el receptor FepA. Para abordar esta hipótesis,

se estudió la posible competencia entre el DHB y la microcina por los receptores FepA, Fiu o Cir, realizando experimentos sobre céspedes de cepas dobles mutantes que expresan solamente uno de estos tres receptores en su membrana externa. En la Tabla 9 se observó que solamente aquellas mutantes que expresan en su membrana externa Fiu o Cir fueron protegidas por el DHB a una concentración 10 mM, aunque dicha protección no alcanzó el 100%, debido posiblemente a que estas cepas importan el DHB. Por el contrario, la cepa mutante que sólo expresa FepA no es protegida por el DHB, sino más bien, se estimula su sensibilidad a la actividad bactericida de la microcina E492. En base a estos antecedentes, podemos suponer que la mutante de *E. coli* AN260 (*fepC*) a bajas concentraciones de microcina es protegida ligeramente por las concentraciones de DHB 1 y 500  $\mu$ M, alcanzándose una protección significativa con DHB 1 mM (Fig. 9) debido posiblemente a que en éstas altas concentraciones, el DHB podría estar uniéndose al receptor FepA compitiendo con la importación de la microcina E492. En conclusión, podemos suponer que el receptor FepA posee mayor afinidad por la microcina que por el DHB, explicando la débil actividad antagonista sobre la microcina E492, lo cual sumado a la importación del DHB por *E. coli* silvestre reduce aún más la pobre actividad inhibidora del DHB.

**Tabla 9. Efecto del DHB sobre la sensibilidad a la microcina E492.**

Título			
Cepa de <i>E. coli</i>	Genotipo relevante	Microcina E492	Microcina E492 + DHB
BL21	wt	1/32	1/256
H1941	<i>fur</i>	1/128	1/256
AN260	<i>fepC</i>	1/64	1/16
H1885	<i>entDF</i>	1/64	1/128
H1443	<i>aroB</i>	1/64	1/64
H1728	<i>aroB fiu cir</i>	1/8	1/64
H1875	<i>aroB fepA cir</i>	1/64	1/16
H1877	<i>aroB fepA fiu</i>	1/16	1/8

Las células crecidas en medio LB hasta la fase exponencial se ajustaron a una DO<sub>600</sub> de 0,1 y una alícuota se utilizó para formar un césped indicador. Se realizaron diluciones seriadas de la microcina E492 (369 µg/ml) en ausencia o presencia de 10 mM de DHB y 5 µl de cada dilución se agregaron al césped de cada cepa para determinar el título de la actividad bactericida de la microcina E492.



### 3.5.2 El ácido 2,3-dihydroxibenzoico estimula la actividad bactericida de la microcina E492.

Pese al débil efecto antagonista del DHB en la cepa de *E. coli* AN260 (*fepC*), resulta curioso observar como en la medida que aumenta la concentración del DHB se observa una mayor actividad bactericida de la microcina sobre la cepa de *E. coli* H1443 (*aroB*) (Fig. 9). Este efecto también se observa en la cepa doble mutante que sólo expresa FepA, pero no en las dobles mutantes que sólo expresan Fiu o Cir (Tabla 9), sugiriéndonos una actividad dual para el DHB. Sobre los receptores Fiu y Cir el DBH puede actuar como antagonista, pero sobre el receptor FepA, de algún modo estimula la sensibilidad por la microcina E492. Al utilizar la cepa silvestre de *E. coli* BL21 o cepas mutantes de *E. coli* H1885 (*entDF*) y H1895 (*fur*) como cepas indicadoras, también se observó el efecto estimulador del DHB sobre la actividad bactericida de la microcina E492 (Tabla 9). Este efecto estimulador observado sobre la cepa de *E. coli* BL21 es dependiente de la concentración de DHB, observándose un aumento en el título de la microcina en 16 veces al diluir la microcina en DHB 1 y 10 mM, una activación de 4 veces con DHB 100  $\mu$ M y una activación de dos veces con DHB 10  $\mu$ M (Tabla 10). Estos resultados sugieren dos posibilidades; 1) el ácido 2,3-dihydroxibenzoico aumenta la sensibilidad de la cepa blanco por la microcina E492; 2) hay un aumento en la actividad de la microcina E492 sobre la cepa sensible. La primera alternativa se basa en que el DHB estimula la producción de enterobactina, y por ende,

**Tabla 10. Efecto del ácido 2,3 dihidroxibenzoico y del ácido benzoico sobre la actividad de la microcina E492 en las células silvestre de *E. coli* BL21.**

[DHB] / [AB] (mM)	Título de la microcina		
	DHB	DHB pH7,1	AB
0	1/4	1/4	1/4
0.001	1/4	1/4	1/4
0.01	1/8	1/8	1/8
0.1	1/16	1/8	1/8
1	1/64	1/16	1/8
10	1/64	1/32	1/8

Se prepararon soluciones del ácido 2,3 dihidroxibenzoico (DHB) y del ácido benzoico (AB) en un rango entre 1  $\mu$ M - 10 mM en buffer fosfato 100 mM pH 7,2. Cada una de estas soluciones se utilizaron en las diluciones seriadas de la microcina E492 y 5  $\mu$ l de cada dilución se agregaron a un césped sensible de *E. coli* BL21. Para el ensayo control, la microcina se diluyó en buffer fosfato libre de DHB o AB. En la tabla se muestra el título de la microcina al diluirse en cada una de las concentraciones del respectivo ácido. Alternativamente, el DHB se resuspendió en agua y su pH se ajustó a pH 7,1 con una solución de NaOH 10 N. La concentración de microcina E492 fue de 369  $\mu$ g/ml.

también la síntesis de los receptores FepA, Fiu y Cir, induciendo en la cepa indicadora un aumento en la sensibilidad por la microcina E492. La segunda alternativa es que la propiedad ácida del DHB podría aumentar la estabilidad de la microcina E492, o bien, una posible asociación del DHB con la microcina podría aumentar su afinidad por los receptores o su transporte hacia el periplasma. Para esclarecer el efecto del DHB sobre la actividad de la microcina E492, se realizaron los experimentos que se detallan a continuación.

### **3.5.3 El DHB aumenta la sensibilidad a la microcina E492 en la cepa silvestre de *E. coli* BL21.**

Con el fin de entender el efecto estimulador del DHB sobre la actividad bactericida de la microcina E492 a una cepa que expresa en forma natural el metabolismo de la enterobactina, se utilizó como cepa indicadora la cepa silvestre de *E. coli* BL21. Debido a que la microcina E492 es más estable al incubarse en una solución ácida pH 3 (Wilkens, 1996; Baeza 2003) y el pKa del DHB es de 2,41 (Frederick y col 2001), se estudió el posible efecto ácido del DHB sobre la actividad de la microcina. Para ello se realizaron experimentos de sensibilidad a la mezcla microcina-DHB, cambiando el buffer fosfato 100 mM pH 7,1 por agua. El pH de las distintas concentraciones de DHB se ajustaron a pH 7,1 con NaOH 10 N, eliminando el efecto ácido sobre la activación de la microcina E492. Como se observa en la Tabla 10, a pH neutro la cepa indicadora muestra una mayor sensibilidad a la actividad bactericida de la

microcina E492 y en forma dependiente de la concentración del DHB. Existe la posibilidad de que el efecto del DHB no sea específico, sino más bien, sus propiedades ácidas sean las responsables del aumento en el título de la microcina E492. Para verificar esta alternativa, se utilizó como control el ácido benzoico, el cual tiene un pK de 4,1 y presenta una estructura similar al DHB ya que solamente carece de los grupos hidroxilo asociados al anillo del benceno. Este compuesto no tiene ningún papel biológico en la síntesis de enterobactina, ni tampoco transporta hierro al interior de la célula (Greenwood y Luke, 1981). En la Tabla 10 se observa que el ácido benzoico no tiene efecto sobre la actividad de la microcina E492, solamente se observa un leve aumento en el título, probablemente por su carácter ácido. Por lo tanto, una molécula sin actividad biológica no estimula el aumento en la actividad bactericida de la microcina E492, apoyando la hipótesis de que la actividad biológica del DHB es la causante del aumento en la actividad de la microcina E492. Esta observación también puede corroborarse en la Tabla 9 en donde solamente en aquellas cepas que importan DHB como *E. coli* BL21 (wt), H1885 (*entDF*) y H1894 (*fur*) se observó un aumento del título de la microcina E492. Además señala que la síntesis de enterobactina parece no ser necesaria para que el DHB induzca un aumento sobre la actividad bactericida de la microcina E492, dado que en la cepa productora constitutiva de enterobactina *E. coli* H1894 (*fur*) y en la cepa no productora de enterobactina *E. coli* H1885 (*entDF*), el DHB produce los mismos efectos. Para demostrar que este aumento es debido a la mayor sensibilidad de la cepa de *E. coli* BL21 por la microcina E492, esta cepa se cultivó en LB hasta

la fase exponencial y posteriormente se separó en dos cultivos, uno con DHB 10 mM y otro sin DHB. Para evitar el efecto ácido del DHB, el medio LB-DHB se ajustó a pH 7,0 con NaOH 10 N y se esterilizó por filtración antes de agregar las células. Los cultivos de *E. coli* BL21 se crecieron en LB sin DHB y con DHB 10 mM por 12 min o 90 min, se centrifugaron y lavaron con LB-sin DHB, para evitar la presencia del DHB durante el ensayo de sensibilidad contra la microcina E492. En la Tabla 11 se observa que la cepa crecida en ausencia de DHB por 12 min presentó un porcentaje de muerte celular del 83% de la población ante la actividad bactericida de la microcina E492. Sin embargo, a los 90 min de crecimiento la población ya no es sensible al efecto bactericida de la microcina E492. Este resultado simplemente nos muestra que a los 12 min hay un efecto bactericida sobre aproximadamente  $3 \times 10^5$  cel/ml, el cual se distingue sobre una población total de  $4 \times 10^5$  cel/ml, pero a los 90 min la población ha aumentado 10 veces ( $2,6 \times 10^6$  cel/ml), de manera que el número de células muertas ya no representa un número muy significativo respecto del total de la población. Por otra parte, el efecto bactericida de la microcina E492 sobre la población de *E. coli* BL21 crecidas en presencia de DHB fue sobre el 97% de la población a los 12 min, y sobre el 99,9% de la población a los 90 min. Este aumento notorio en la actividad de la microcina es producto del efecto del DHB sobre la cepa, ya que el DHB presente en el cultivo fue lavado antes de agregar la microcina, evitando la incubación de la microcina con el DHB. En resumen, una población mayor a  $10^6$  cel/ml, en la cual se agrega una cantidad de microcina que da una baja actividad bactericida (94%

**Tabla 11. Efecto del DHB sobre la sensibilidad a la microcina E492 de la cepa de *E. coli* BL21.**

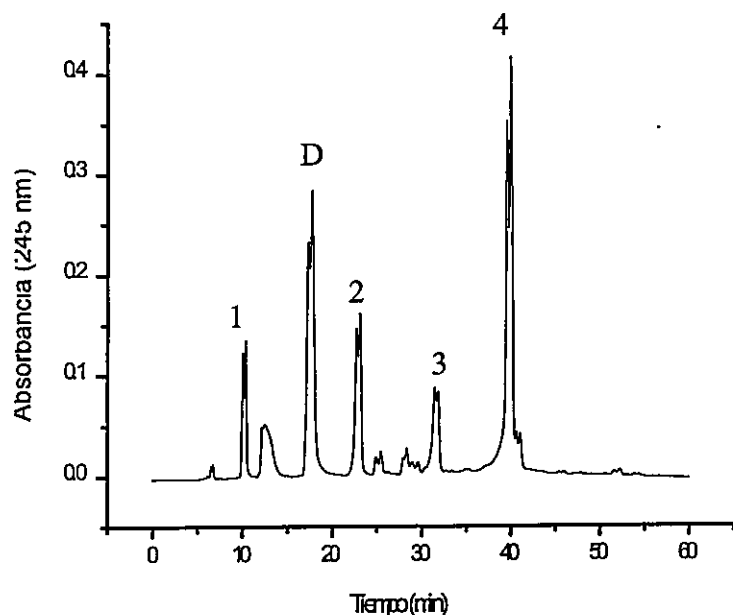
Condición	Sin microcina E492		Con microcina E492	
	[10 <sup>6</sup> cel/ml]	[% muerte]	[10 <sup>6</sup> cel/ml]	[% muerte]
<b>- DHB</b>				
12 min	0,43 (± 0.07)	0 % (± 17 %)	0,073 (± 0,04)	83 % (± 10 %)
90 min	2,6 (± 0.2)	0 % (± 8 %)	2,47 (± 0.5)	6 % (± 19 %)
<b>+ DHB</b>				
12 min	0,40 (± 0,1)	0 % (± 27 %)	0,014 (± 0,003)	97 % (± 0,6 %)
90 min	2,43 (± 0,2)	0 % (± 9 %)	0,001 (± 0,0002)	99,9 % (± 0,01%)

La cepa de *E. coli* BL21 se creció en medio LB hasta la fase exponencial y posteriormente se dividió en dos porciones. A uno de ellas se le adicionó 10 mM de DHB y se incubó 12 o 90 min a 37°C. Las células de ambos cultivos se lavaron y resuspendieron con medio LB e inmediatamente se determinó su sensibilidad a la microcina E492. Entre paréntesis se indica la desviación estándar del experimento realizado por triplicado.

de sobrevida) se ve dramáticamente aumentada cuando las células sensibles se tratan con DHB (0,01% de sobrevida). El medio LB contiene aproximadamente  $10^{-6}$  M de Fe disponible para la célula, lo cual hace probable que el sistema de la enterobactina presente una expresión basal con un bajo número de receptores FepA, Fiu y Cir. El cultivo con DHB probablemente induciría la expresión del sistema de la enterobactina, aumentando el número de estos tres receptores de membrana externa, lo que llevaría a un incremento en la sensibilidad por la microcina E492.

#### **3.5.4 Los productos de hidrólisis de la enterobactina son antagonistas de la actividad bactericida de la microcina E492.**

Otros ligandos naturales de los receptores FepA, Fiu y Cir son los productos de hidrólisis de la enterobactina. Para estudiar su posible papel antagonista fue necesario purificarlos siguiendo la metodología propuesta por Winkelmann y col. (1994), la cual se describe en la sección Materiales y Métodos. Las fracciones obtenidas por HPLC de fase reversa y analizadas por cromatografía en capa fina permitieron obtener de forma pura los monómeros, dímeros y trímeros lineales del 2,3-dihidroxibenzoilserina, además de la propia enterobactina (Fig. 10). Con el objeto de evitar la presencia de sideróforos producidos por la cepa sensible y su importación durante el ensayo, los experimentos se realizaron utilizando la cepa indicadora de *E. coli* AN260 (*fepC*). Para comparar la actividad antagonista entre estas distintas moléculas, se determinó la concentración inhibidora ( $CI_{50\%}$ ) de antagonista capaz de inhibir

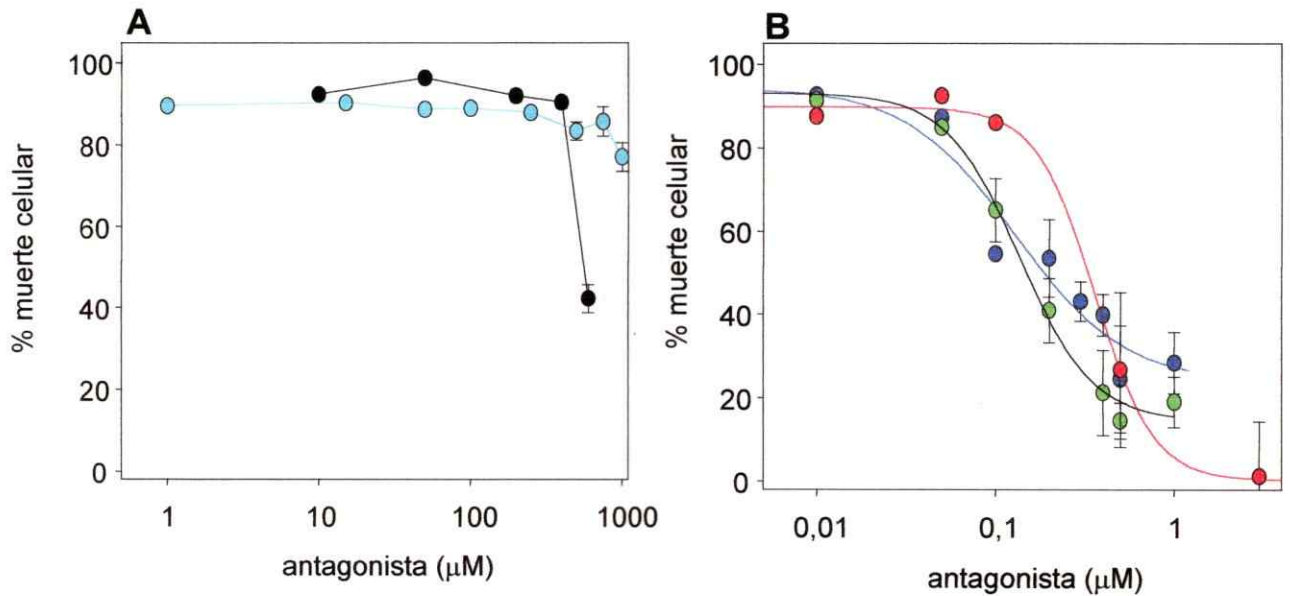


Moléculas	Literatura (rf)	Experimento (rf)
DBS	0,76	0,76 (Pico 1)
DBS <sub>2</sub>	0,66	0,68 (Pico 2)
DBS <sub>3</sub>	0,55	0,56 (Pico 3)
Enterobactina	0,2	0,22 (Pico4)

**Figura 10. Análisis cromatográfico mediante HPLC y TLC de un extracto orgánico del sobrenadante de la cepa mutante de *E. coli* H1941 (*fur*).** 100 ml del sobrenadante de un cultivo de *E. coli* H1941 (*fur*) crecido hasta la fase estacionaria se sometió a una extracción con acetato de etilo. Este extracto se evaporó, se resuspendió en 50  $\mu$ l de acetonitrilo 10% y cromatografió en una columna C-18 (Merck) usando una gradiente de acetonitrilo 10-50 % durante una hora con un flujo de 1 ml/min. Las fracciones eluidas corresponden al: ácido 2,3 dihidroxibenzoico (D), monómero DBS (1), dímero DBS<sub>2</sub> (2), trímero lineal DBS<sub>3</sub> (3) y enterobactina (4). A cada fracción se le determinó mediante TLC su movilidad electroforética utilizando placas de celulosa de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Los valores de migración en la tabla inserta se compararon con los observados en la literatura (O'Brien y col., 1969, 1970).



el 50% de la actividad bactericida de la microcina E492. En estos ensayos de inhibición de la actividad bactericida de la microcina E492 se observó que el monómero posee un leve efecto antagonista cuando su concentración es superior a 0,5 mM (Fig. 11A), en tanto que el trímero, la enterobactina y el dímero son buenos antagonistas de la actividad de la microcina E492 (Fig. 11 B) con valores de  $CI_{50\%}$  de 0,13  $\mu$ M, 0,14  $\mu$ M y 0,36  $\mu$ M respectivamente. Si consideramos que el principal receptor de la microcina es FepA, en menor medida Fiu y con una pequeña participación de Cir, es posible suponer que la baja actividad antagonista del DBS y DHB estaría dada por la baja afinidad de ambos compuestos por el receptor FepA. Es probable que en el rango de concentraciones en que el DBS y DHB poseen actividad antagonista sobre la microcina E492, habitualmente no se encuentre en el ambiente disminuyendo su papel biológico como antagonista de la microcina E492. Por otro lado, es posible que la actividad antagonista del trímero lineal se deba a que ésta molécula podría estar compitiendo con la microcina por los receptores FepA y Fiu, mientras que la enterobactina y el dímero probablemente también compiten por ambos receptores pero con menor afinidad. Para corroborar esta hipótesis se realizaron ensayos de inhibición de la enterobactina sobre la microcina, utilizando como cepas sensibles mutantes únicas y dobles para los receptores FepA, Fiu o Cir. En la Tabla 12 se observa que la enterobactina protege 16 veces a una cepa que expresa FepA, Fiu y Cir. Sin embargo, si la cepa expresa solamente Fiu y Cir, su protección decae a dos veces, es decir, prácticamente



**Figura 11. Ensayos de sobrevida en presencia de distintas concentraciones de antagonistas.** Las moléculas **A)** DHB, DBS **B)** DBS<sub>2</sub>, DBS<sub>3</sub> y enterobactina se pre-incubaron con la microcina E492 (9,1  $\mu\text{g/ml}$ ) por 15 min a 37°C y luego se incubaron con la cepa sensible de *E. coli* AN260 (*fepC*) por otros 15 min a 37°C. Los símbolos son; **A)** DHB (●), DBS (●); **B)** DBS<sub>2</sub> (●), DBS<sub>3</sub> (●) y enterobactina (●).

**Tabla 12. Protección a la actividad bactericida de la microcina E492 de la enterobactina sobre mutantes de *E. coli* únicas y dobles para los receptores FepA, Fiu y Cir.**

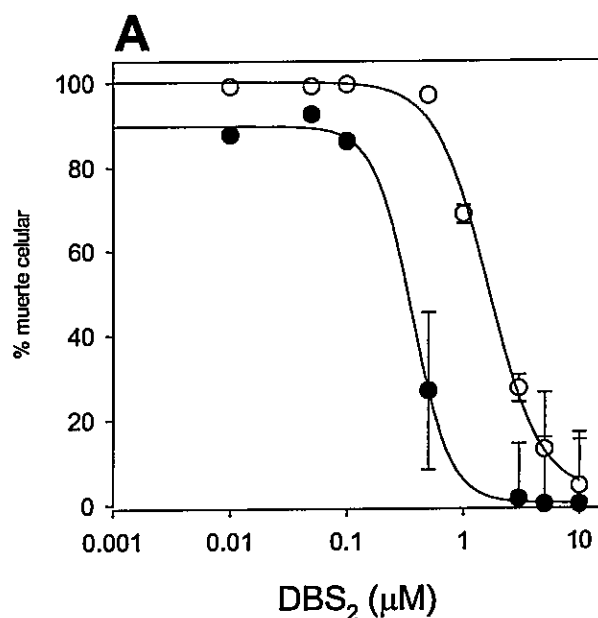
Cepas de <i>E. coli</i>	Genotipo relevante	Título Mcc E492	Título Mcc E492 + enterobactina	Protección (nº veces)
H1443	<i>fepA<sup>+</sup> fiu<sup>+</sup> cir<sup>+</sup></i>	1/16	s/d	16
H873	<i>fepA<sup>-</sup></i>	1/32	1/16	2
H1594	<i>fiu<sup>-</sup></i>	1/8	sin actividad	> 8
H800	<i>cir<sup>-</sup></i>	1/16	1/2	8
H1877	<i>fepA<sup>-</sup> fiu<sup>-</sup></i>	1/2	s/d	2
H1875	<i>fepA<sup>-</sup> cir<sup>-</sup></i>	1/32	1/8	4
H1728	<i>fiu<sup>-</sup> cir<sup>-</sup></i>	1/8	s/d	8

La microcina E492 (84 µM) se diluyó en agua o en agua más enterobactina (102 µM) y 5 µl de cada dilución se agregó sobre el césped de cada mutante. El índice de protección indica el número de veces en que disminuyó el título de la microcina en presencia de la enterobactina. s/d, sin diluir.

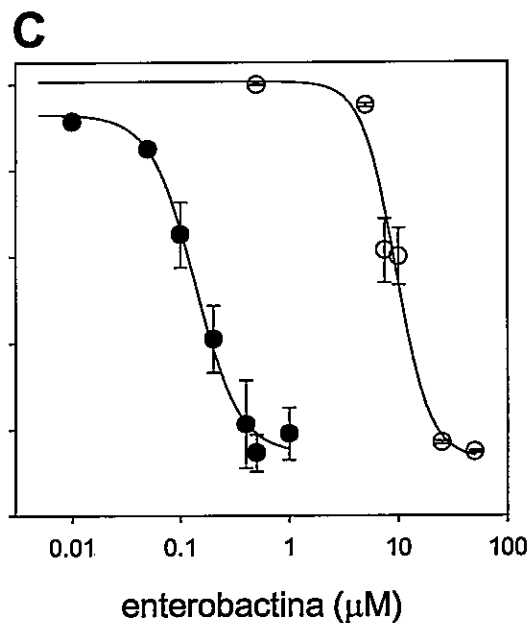
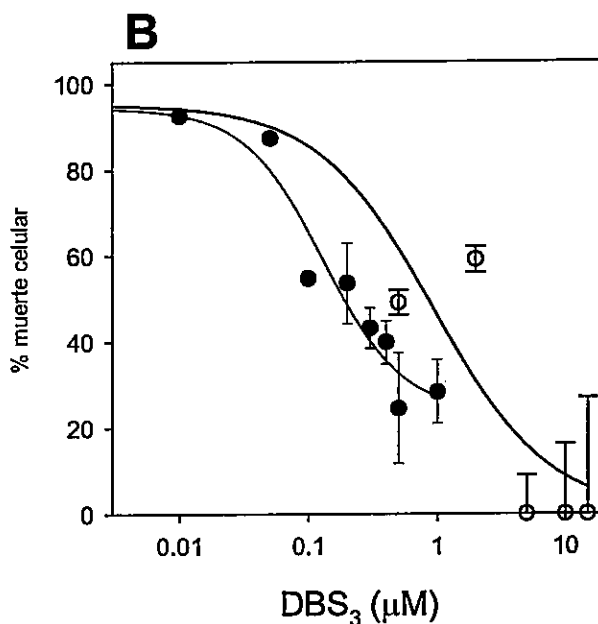
se ha perdido su efecto protector debido a su baja afinidad por estos receptores. El mismo resultados se observa cuando la cepa expresa solamente los receptores Fiu o Cir, aunque entre estas cepas la enterobactina protege más a la cepa que expresa el receptor Fiu (4 veces) debido a la mayor afinidad del sideróforo por Fiu que por Cir. Por otro lado, si la cepa expresa en su membrana externa solamente FepA, los niveles de protección son mayores a 8 veces, sugiriendo que la enterobactina ejerce sobre la microcina E492 una inhibición del tipo competitiva principalmente por la unión al receptor FepA y en menor medida por su unión a los receptores Fiu y Cir.

### **3.5.5 Competencia entre antagonistas y la microcina E492.**

Para determinar si el mecanismo de inhibición de la enterobactina y sus productos de hidrólisis sobre la actividad bactericida de la microcina E492 es por competencia con los receptores, se realizaron experimentos de competencia utilizando concentraciones crecientes del antagonista y una concentración fija de la microcina E492 (26,4  $\mu\text{g/ml}$ ). Este ensayo se repitió utilizando una concentración de microcina E492 más diluida (9,1  $\mu\text{g/ml}$ ), para observar si existen cambios en la curva de inhibición. Si la forma de la curva se mantiene, cambiando solamente el valor de  $CI_{50\%}$ , entonces el tipo de inhibición es de tipo competitiva, en tanto que un cambio en el máximo efecto de protección da cuenta de una inhibición del tipo no competitiva. La Figura 12 muestra que para el  $DBS_2$ ,  $DBS_3$  y la enterobactina, hay un cambio en los



Antagonista	CI <sub>50%</sub> (µM)	
	Mcc E492 (9,1 µg/ml)	MccE492 (26,4 µg/ml)
DBS <sub>2</sub>	0,36	1,6
DBS <sub>3</sub>	0,13	0,93
Enterobactina	0,14	9,5



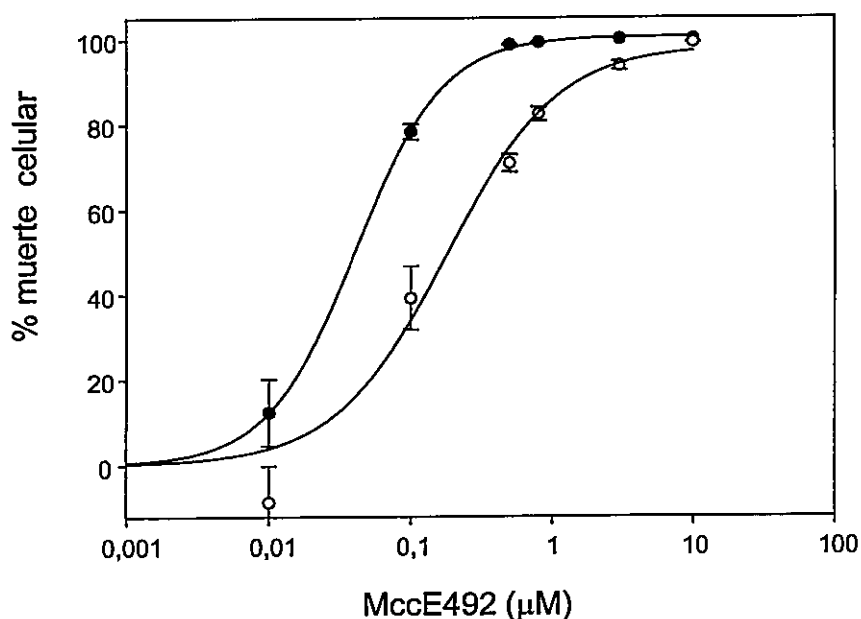
**Figura 12. Efecto de la concentración de microcina E492 sobre la actividad antagonista.** Microcina E492 9,1 µg/ml (símbolos llenos) y microcina E492 26,4 µg/ml (símbolos vacíos) se mezclaron con concentraciones crecientes de cada antagonista y se midió la actividad bactericida sobre la cepa de *E. coli* AN260 (*fepC*). Antagonista DBS<sub>2</sub> (A), DBS<sub>3</sub> (B) y enterobactina (C).

valores de  $CI_{50\%}$ , conservándose la forma de la curva. El  $CI_{50\%}$  del  $DBS_2$  disminuyó 4 veces ( $CI_{50\%}$  1,6  $\mu M$ ), la enterobactina 67 veces ( $CI_{50\%}$  9,5  $\mu M$ ) y el  $DBS_3$  6 veces (Figura 12), indicando una inhibición de tipo competitiva. En estas condiciones, el efecto antagonista del trímero y del dímero de DBS disminuyen en menor proporción posiblemente debido a la mayor afinidad del trímero y dímero por FepA, Fiu y Cir, lo cual otorgaría una mayor protección en comparación con la enterobactina. Finalmente, se quiso evaluar el efecto conjunto de estos antagonistas sobre la actividad de la microcina E492, utilizando un extracto crudo de enterobactina y sus productos de hidrólisis y aumentando la concentración de la microcina. En la Figura 13 se observa nuevamente una inhibición de tipo competitiva sobre la actividad de la microcina E492, ya que disminuye solamente el valor de  $CB_{50\%}$  desde 0,04  $\mu M$  a 0,17  $\mu M$ , respectivamente. Se observa que en presencia de los antagonistas, es necesario una mayor cantidad de microcina para reproducir su efecto bactericida.

### **3.6 Relación de la producción de microcina E492 con el metabolismo de la enterobactina.**

#### **3.6.1 Caracterización de la cepa mutante de *E. coli* VCS257p527 (*mceD* ::Tn5)**

La cepa mutante productora p527 posee una inserción del transposón Tn5 en el



Condición	CA <sub>50%</sub> (µM)
Mcc E492	0,04
Mcc E492 + Mezcla de antagonistas	0,17

**Figura 13. Actividad de la microcina E492 en presencia de una mezcla de antagonistas.** Un extracto que contenía una mezcla de la enterobactina y sus productos de hidrólisis (12 µM) se utilizó como antagonista sobre concentraciones crecientes de microcina E492. Cada mezcla se incubó con la cepa sensible de *E. coli* H1443 (*aroB*) durante 15 min a 37°C y luego se determinó el porcentaje de sobrevivencia respecto de células no tratadas con microcina para sustraer el porcentaje de células muertas. Microcina E492 (●), microcina E492 más antagonistas (○).

nucleótido 3156 dentro del gen *mceD* (2600-3841, GenBank número de acceso AF063590), el cual es similar a la proteína IroB de *Salmonella enterica* y Fes de *E. coli*. Dado que los genes *iroB* y *fes* están relacionados con el metabolismo de sideróforos del tipo catecol, se estudió la mutante *mceD*::Tn5 para inferir el posible papel de MceD en la producción de microcina activa y la posible relación entre el metabolismo de la microcina E492 y el de la enterobactina. La colonia de la cepa silvestre productora de microcina de *E. coli* VCS257 pJAM434 y de la cepa mutante de *E. coli* VCS257 p527, producen halos de inhibición de crecimiento al crecer sobre el césped de la cepa indicadora de *E. coli* BL21. Al cultivar estas cepas productoras de microcina en un medio líquido, el sobrenadante de la cepa de *E. coli* VCS257 pJAM434 presenta una actividad bactericida mientras que la cepa de *E. coli* VCS257 p527 no presenta actividad bactericida a menos que su sobrenadante se incube a baño maría por 10 min (Tabla 13). La purificación de la microcina a partir de un litro del sobrenadante del cultivo de la cepa de *E. coli* VCS257 pJAM434 presenta una actividad bactericida de 32 UA (Tabla 13), en tanto que la microcina purificada a partir del cultivo de la cepa de *E. coli* VCS257 p527 no tiene actividad, ni tampoco luego de su calentamiento a baño maría, sugiriendo que el calentamiento del sobrenadante debe haber inducido algún tipo de activación en el cultivo, el cual parece ser independiente de la propia microcina E492. Curiosamente, el calentamiento del cultivo total o solamente del sobrenadante de la cepa de *E. coli* VCS257 p527 producen la misma activación en la actividad bactericida, sugiriendo que ésta activación se relaciona con algo



**Tabla 13. Actividad antibiótica de las cepas de *E. coli* VCS257 p434 y VCS257 p527**

Cepas	Condiciones	Actividad bactericida (UA) sobre <i>E. coli</i> BL21	Actividad antibiótica (UA) sobre <i>E. coli tonB</i>
<i>E. coli</i> VCS257 pJAM434	colonia	con actividad	sin actividad
	sobrenadante	1	sin actividad
	sobrenadante + T°	1	sin actividad
	cultivo + T°	1	sin actividad
	microcina purificada	32	sin actividad
	microcina purificada + T°	32	sin actividad
<i>E. coli</i> VCS257 p527	colonia	con actividad	sin actividad
	Sobrenadante	sin actividad	sin actividad
	Sobrenadante + T°	1	sin actividad
	cultivo + T°	1	sin actividad
	microcina purificada	sin actividad	sin actividad
	microcina purificada + T°		

La actividad bactericida de colonias, cultivos líquidos, sus sobrenadantes y de la microcina purificada se determinó como se describió en Materiales y Métodos. Se utilizaron céspedes de *E. coli* BL21 y X8605 (*tonB*). Alternativamente, el cultivo o el sobrenadante se calentaron a baño maría durante 10 min, antes de determinar su título sobre el césped. La microcina purificada soluble en metanol 95% se evaporó sin llegar a sequedad y se resuspendió en el mismo volumen de agua, previo a su tratamiento con temperatura. Las unidades arbitrarias (UA) se estimaron en base al título de la actividad bactericida.

presente en el sobrenadante y no en la célula. Por otro lado, tanto las colonias como el precipitado de un cultivo líquido de la cepa de *E. coli* VCS257 p527 presentan un aspecto mucoide, sugiriendo una mayor lisis celular en comparación con la cepa silvestre de *E. coli* VCS257 pJAM434. La producción de microcina en ausencia de MceD parece ser nociva para la célula, sugiriendo que MceD podría ser necesaria para favorecer la liberación de la microcina activa. En ausencia de MceD, posiblemente la exportación de microcina queda interrumpida, generándose alguna inestabilidad a nivel de la membrana interna y/o externa, que origina este fenotipo susceptible de lisis.

### **3.6.2 La proteína MceD y la enzima Fes no complementan sus actividades enzimáticas en *E. coli*.**

Dado que la proteína Fes y MceD son similares en su secuencia primaria, se quiso estudiar si existía complementación funcional entre ambas proteínas. Existía la posibilidad que en la cepa mutante de *E. coli* VCS257 p527 la posible actividad esterasa de MceD fuera complementada por la enzima Fes y que esto diera el fenotipo productor de microcina activa observado en la colonia. Para probar esta hipótesis se transformó la cepa mutante de *E. coli* AN273 (*fes*) con los plasmidios pJEM15, pJAM434 y p527 y se encontró que estas tres cepas transformadas son productoras de microcina activa (Tabla 14), indicando por un lado que la enzima Fes no es necesaria para la producción de microcina activa, y por otro descartando la posible complementación funcional de Fes por MceD en la cepa mutante de *E. coli* VCS257 p527. También se

**Tabla 14. Actividad bactericida de la microcina E492 en distintas cepas hospederas de *E. coli*.**

Cepa de <i>E. coli</i>	Plasmidio	Colonia (actividad antibiótica)	Medio Cromoazuror
VCS257	pJEM15	+	Halo Naranja
	pJAM434	+	Halo Naranja
	p527	+	Halo Naranja
AN272 ( <i>fes</i> )	pJEM15	+	Halo Naranja Ancho
	pJAM434	+	Halo Naranja Ancho
	p527	+	Halo Naranja Ancho
H1443 ( <i>aroB</i> )	pJEM15	+	Sin crecimiento
	pJAM434	+	Sin crecimiento
	p527	+	Sin crecimiento
AN260 ( <i>aroB fepC</i> )	pJEM15	+	Sin crecimiento
	pJAM434	+	Sin crecimiento
	p527	+	Sin crecimiento
H1885 ( <i>entDF</i> )	pJEM15	-	Sin crecimiento
	pJAM434	-	Sin crecimiento
	p527	-	Sin crecimiento

Con los plasmidios pJAM434, pJEM15 y p527 se transformaron distintas cepas de *E. coli*. La producción de microcina activa se determinó mediante la formación (+) o ausencia (-) de un halo de inhibición de crecimiento de la cepa indicadora de *E. coli* H1443 y la producción de sideróforos por la formación de un halo naranja alrededor de la colonia crecida en medio cromoazuror.

quiso evaluar una posible complementación funcional de MceD por la actividad esterasa de Fes. La cepa mutante de *E. coli* AN273 (*fes*) no puede hidrolizar la enterobactina férrica impidiendo la disociación del complejo sideróforo-hierro, y por ende el suministro del hierro a nivel intracelular. Esto lleva a la célula a una sobreproducción de enterobactina para aumentar el importe de hierro que finalmente no está disponible, evitando la formación del complejo represor Fe-Fur y por ende, induciendo en forma permanentemente el sistema de síntesis de enterobactina. Para observar la sobreproducción de enterobactina, utilizamos placas de medio mínimo suplementadas con el colorante cromoazuror asociado a hierro. Este colorante presenta un color azul al estar asociado al hierro y naranja al disociarse del metal. Por ello, se aprecia un enorme halo naranja alrededor de la colonia de la cepa de *E. coli* AN273 (*fes*), ya que la sobreproducción de enterobactina secuestra el hierro asociado al colorante, cambiando el color del medio. Una cepa de *E. coli* VCS257 (*fes*<sup>+</sup>) no produce un halo naranja o el diámetro de este es más reducido. La cepa de *E. coli* AN273 (*fes*<sup>-</sup>) transformada con el plasmidio pJEM15 o pJAM434 continua presentando un enorme halo naranja alrededor de la colonia (Tabla 14), pues aparentemente MceD no es capaz de complementar la actividad esterasa de Fes. Este resultado sugiere que la putativa actividad esterasa de MceD sería probablemente sobre sustratos diferentes. El sustrato de Fes es la enterobactina y el sustrato de MceD podría ser la microcina asociada a algún catecol, o bien, otra molécula distinta a la enterobactina, pero necesaria para la liberación de microcina activa. El mismo experimento se llevó a cabo utilizando

cepas de *E. coli* no productoras de enterobactina como *E. coli* H1443, H1885 y AN260 transformadas con los plasmidios pJEM15, pJAM434 y p527. Debido a que estas cepas hospederas no producen sideróforos, no son capaces de secuestrar el hierro asociado al cromoazuror siendo inviables en estas condiciones de cultivo (Tabla 14). Este resultado nos sugiere además, que el sistema de la microcina por sí solo no produce ningún tipo de sideróforo que sea capaz de secuestrar el hierro y permitir el crecimiento de su cepa hospedera no productora de enterobactina.

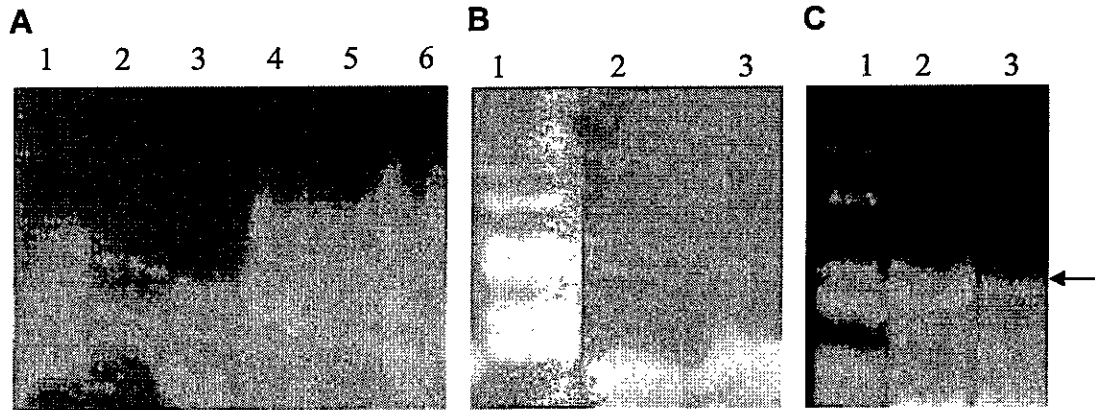
### **3.6.3 Actividad de MceD es dispensable en cepas no productoras o no importadoras de enterobactina.**

Una posible explicación al papel de MceD es que esté relacionado con la modificación de algún factor del tipo catecol asociado a la microcina a nivel intracelular, de tal manera que en ausencia de MceD esta asociación catecol-microcina podría afectar la exportación de la microcina. Esta hipótesis explicaría la ausencia de una banda definida de microcina en un gel de poliacrilamida que resuelve la microcina purificada desde el sobrenadante de la mutante de *E. coli* VCS257 p527. En ausencia del sistema de la enterobactina, por mutaciones en su síntesis o por bloqueo en el proceso de importación, no debería existir un complejo intracelular del tipo sideróforo-microcina, y en este caso no debería afectarse la exportación de la microcina en ausencia de MceD. Para probar esta hipótesis, se determinó la presencia de la banda de microcina E492 en geles de poliacrilamida SDS, a partir de microcina purificada desde la cepa de *E. coli*

VCS257 p527 y cepas de *E. coli* no productoras H1443, H1885 ni importadoras de enterobactina, *E. coli* AN260, transformadas con el plasmidio p527. La Figura 14 muestra que la microcina purificada desde estas hospederas mutantes en el metabolismo de la enterobactina presenta una banda de microcina al igual que las microcinas silvestres expresadas en las mismas cepas hospederas, sugiriendo que la exportación de microcina en ausencia del sistema de la enterobactina, ya no dependen de la actividad de MceD.

#### **3.6.4 La falta de los genes *entDF* en *E. coli* produce microcina inactiva.**

La cepa de *E. coli* H1885 (*entDF*) produce el precursor de la enterobactina denominado DHB, y además, es la única que al transformarse con algún plasmidio productor de microcina activa produce microcina inactiva (Tabla 14). Para entender este fenómeno, se analizó la posibilidad de que la cepa de *E. coli* H1885 (*entDF*) produjera alguna molécula inhibidora de la actividad bactericida de la microcina E492. Se realizaron ensayos de inhibición de la actividad de la microcina E492 utilizando el sobrenadante de la cepa *E. coli* H1885 (*entDF*) y no se observó un efecto inhibitor sobre la actividad bactericida de la microcina E492 (Tabla 15), lo cual descarta la producción de un inhibidor por esta cepa. Como se esperaba, el sobrenadante de la cepa de *E. coli* H1941 (*fur*), la cual expresa constitutivamente la enterobactina y sus productos de hidrólisis, inhibe completamente la actividad bactericida de la microcina E492 (Tabla 15). Otra explicación a la producción de microcina inactiva por la cepa de *E. coli* H1885



**Figura 14. Expresión de la proteína microcina E492 en distintas cepas de *E. coli*.** La microcina E492 se purificó a partir del sobrenadante del cultivo de distintas cepa hospederas de *E. coli* y se resolvió en un gel de poliacrilamida-SDS 16%, como se indica en la Materiales y Métodos. **A**, carril 1 microcina de la cepa de *E. coli* VCS257 p527; carril 2, estándar de peso molecular (2.2, 3.4, 6.2, y 8.16 kDa); carril 3, *E. coli* VCS257 pJEM15; carril 4-6 microcinas purificadas a partir de cepas de *E. coli* H1443 (*aroB*) transformadas con los plasmidios pJEM15, pJAM434 o p527, respectivamente. **B**, carril 1, estándar de peso molecular; carril 2 y 3, microcina de la cepa de *E. coli* AN260 (*fepC*) transformada con pJAM434 o p527. **C**, El carril 1 estándares de peso molecular, carril 2 microcina de la cepa de *E. coli* VCS257 pJEM15 y carril 3 microcina de la cepa de *E. coli* H1885 (*entDF*) pJEM15. La flecha indica la banda de la microcina E492.

**Tabla 15. Efecto de sobrenadantes de distintas cepas mutantes de *E. coli*, sobre la actividad de la microcina E492.**

Ensayo de actividad	Genotipo relevante	% muerte celular
Microcina E492		99,8 ( $\pm 0.01$ %)
Microcina E492 + SN <i>E. coli</i> BL21	wt	95,7 ( $\pm 0.4$ %)
Microcina E492 + SN <i>E. coli</i> H1885	<i>entDF</i>	99,7 ( $\pm 0.03$ %)
Microcina E492 + SN <i>E. coli</i> H1941	<i>fur</i>	0 ( $\pm 31$ %)

El sobrenadante (SN) de un cultivo en la fase estacionaria ( $A_{600}$  1,3) en medio mínimo M9 suplementado con 5  $\mu$ M de DTPA, se filtró y mezcló con microcina E492 (12,0  $\mu$ g/ml) e incubó con la cepa sensible de *E. coli* BL21.



(*entDF*) pJEM15, es que ocurra un fenómeno similar al observado en mutantes en los genes de maduración de la microcina E492, los cuales participan de alguna forma en la conformación correcta de la microcina E492 activa (Baeza, 2003). Una de estas mutantes es la cepa de *E. coli* VCS257 np133 (*mceC::Tn5*) que produce microcina inactiva impidiendo el reconocimiento de la proteína a nivel de los receptores de membrana externa (Corsini y col., 2002). Sin embargo, en este caso, la microcina activa puede convertir esta microcina inactiva en microcina activa, a través de un proceso similar al descrito en los priones. Para determinar si la microcina inactiva producida en la cepa de *E. coli* H1885 (*entDF*) pJEM15 se comporta de manera similar a la microcina producida por la cepa de *E. coli* VCS257 np133, se estudiaron las propiedades de la microcina y su capacidad de convertirse a la forma activa en presencia de microcina silvestre.

### **3.6.5 La microcina activa es capaz de producir la activación de la microcina inactiva producida en la cepa de *E. coli entDF*.**

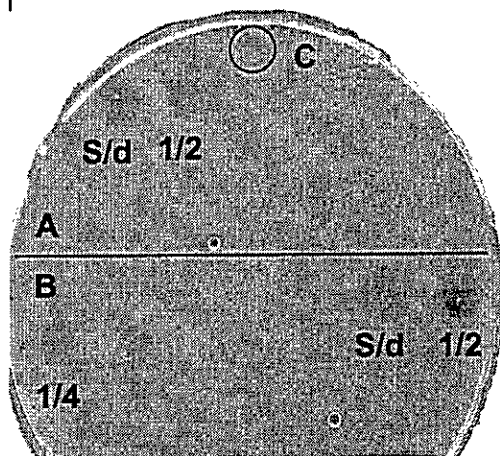
El ensayo de activación se realizó en medio acuoso a partir de una mezcla 1:9 de microcina activa y microcina producida por la cepa de *E. coli* H1885 (*entDF*) incubándose a 37°C por 15 min, tal como se describe en Materiales y Métodos. La activación de la microcina-*entDF* se observa con la disminución de aproximadamente 7,4 veces en el porcentaje de sobrevivencia de la cepa sensible ante la mezcla microcina-*entDF*/microcina-silvestre (1:9) (Tabla 16). Este ensayo de activación también se realizó en presencia del solvente metanol

**Tabla 16. Activación de la microcina inactiva *Mcc-entDF* por la microcina activa en solución acuosa.**

Condiciones	% de sobrevivencia de <i>E. coli</i> BL21				
	1	2	3	4	promedio
No adición	100 (±10)	100 (±3,1)	100 (±29,3)	100 (±35)	100
<i>Mcc-entDF</i> (34,7 µg/ml)	114 (±1)	93 (±13)	103 (±28)	88 (±29)	99,5
<i>Mcc</i> <sup>a</sup> (32,1 µg/ml)	3 (±0,56)	5,6 (±1)	1,3 (±1,2)	0,5 (±0,02)	2,6
<i>Mcc-entDF</i> + <i>Mcc</i> <sup>a</sup> (10 : 1) ( 312,3 µg/ml : 32,1 µg/ml)	0,32 (±0,02)	0,53 (±0,25)	0,37 (±0,032)	0,08 (±0,01)	0,32
Razón de activación	9,4	10,6	3,5	6,25	7,4

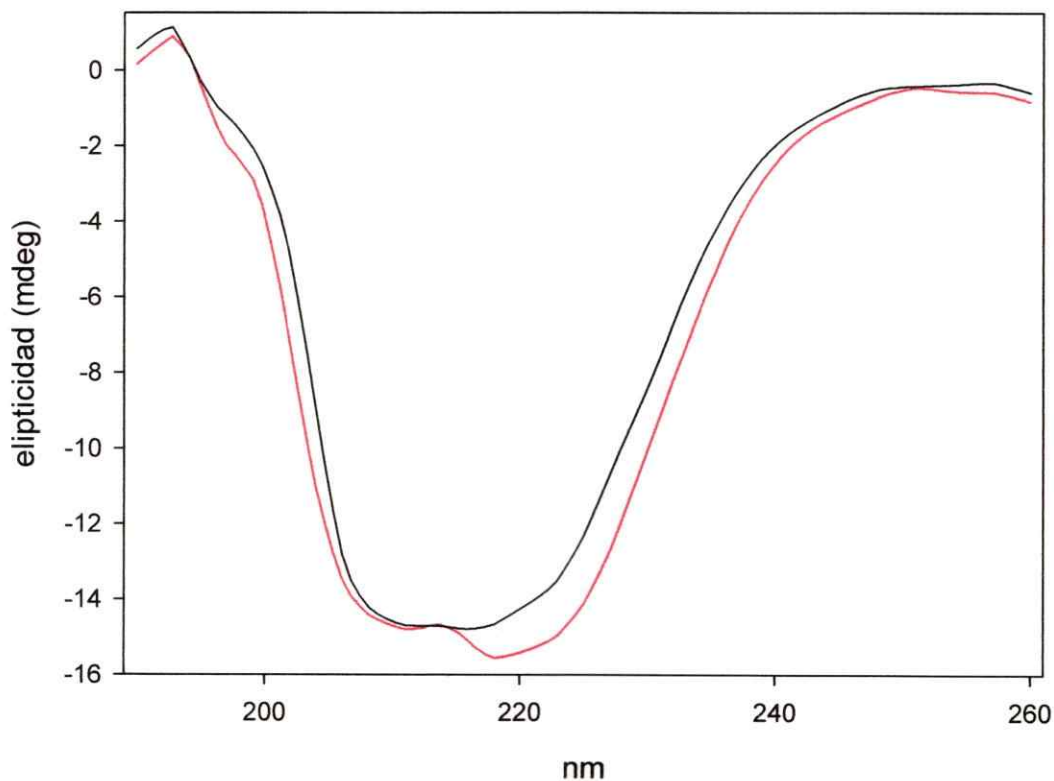
*Mcc-entDF*, microcina inactiva aislada desde el sobrenadante de la mutante de *E. coli* H1885 (*entDF*) transformada con el plasmidio pJEM15. *Mcc*<sup>a</sup>, microcina activa purificada desde una cepa silvestre de *E. coli* VCS257 pJEM15. 1, 2, 3 y 4 son ensayos de activación independientes. Cada determinación se realizó por triplicado. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

utilizando el ensayo de titulación sobre un césped sensible, observándose un aumento de dos veces en el título de la microcina E492 (Fig. 15). La menor razón de activación en este último ensayo puede ser explicada por la menor sensibilidad del método de detección, ya que requiere más del 90% de inhibición del crecimiento del césped para producir un halo de inhibición visible. Para establecer que la activación de la microcina-*entDF* al igual que la microcina purificada a partir de una mutante en *mceC::Tn5*, es producto de un cambio conformacional de la microcina, se determinó el porcentaje de estructura secundaria mediante dicroísmo circular en el UV-lejano. La Figura 16 muestra que el espectro de la microcina producida en la mutante de *E. coli* H1885 (*entDF*) presenta el típico espectro con un mayor contenido de estructura helice- $\alpha$  (mínimos a 208 y 221nm) cuando se le compara con la forma activa que tiene un mayor contenido de hoja- $\beta$  (mínimo a 216 nm). Estructuralmente estas diferencias pueden ser significativas y solamente la determinación de la estructura terciaria de la microcina E492 permitirá determinar en forma más precisa el cambio estructural que inactiva a la microcina E492-*entDF*. Este resultado es consistente con el descrito para la mutante en *mceC*, cuya microcina presenta un menor porcentaje de estructura hoja- $\beta$  y aumento en el contenido de hélice- $\alpha$ . Por lo tanto, la activación de la microcina producida en la mutante de *E. coli* H1885 (*entDF*) al igual que la mutante en *mceC::Tn5*, es debido a una conversión del contenido de hélice- $\alpha$  en hoja- $\beta$  (Baeza, 2003). Estudios preliminares de microscopía electrónica



	Título
A. Mcc (32,1 µg/ml)	1/2
B. Mcc-entDF + Mcc (10:1) (312 µg/ml: 32,1 µg/ml)	1/4
C. Mcc-entDF (312 µg/ml)	sin actividad

**Figura 15. Activación de la Mcc-entDF en metanol.** Alícuotas de 3 µl de diluciones seriadas de las respectivas mezclas se sembraron sobre un césped de células sensibles a la microcina E492. **A)** Título de la microcina silvestre, **B)** Título de mezcla microcina-entDF (Mcc-entDF) y microcina silvestre (Mcc), **C)** Una alícuota de la microcina-entDF. Cada microcina se aisló desde el sobrenadante de la cepa mutante de *E. coli* H1885 (*entDF*) pJEM15 y la cepa silvestre de *E. coli* VCS257 pJEM15. Las concentraciones utilizadas de microcina E492-entDF y microcina E492 fueron de 312 µg/ml y 32,1µg/ml respectivamente. En la mezcla, las concentraciones fueron de 312 µg/ml y 32,1µg/ml para la microcina E492-entDF y microcina silvestre, respectivamente.



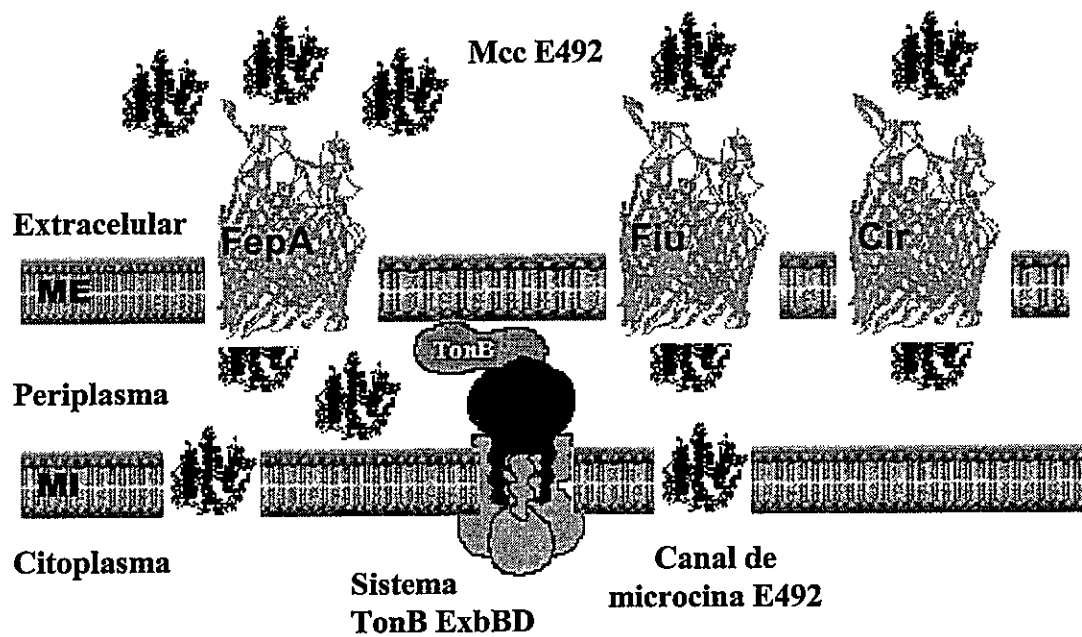
**Figura 16. Estructura secundaria de la microcina E492 inactiva purificada desde la cepa de *E. coli* H1885 (*entDF*). El análisis de la estructura secundaria de las muestras de microcina en metanol 95%, se realizó mediante dicroísmo circular en el UV-lejano como se describe en Materiales y Métodos. Microcina activa producida por la cepa silvestre de *E. coli* VCS257(—), microcina inactiva producida por la cepa mutante de *E. coli* H1885 *entDF* (—).**

revelan que la forma inactiva no forma polímeros de estructura filamentososa, como se ha descrito para la microcina activa (datos no mostrados).

## DISCUSIÓN

### 4.1 Modelo de la importación de la microcina E492 en *Escherichia coli*.

Los resultados presentados junto a los antecedentes del laboratorio permiten identificar a las proteínas de membrana externa FepA, Fiu y Cir y el sistema transductor de energía TonB como los componentes necesarios para el transporte de la microcina E492 desde el medio extracelular hacia la membrana interna. Al igual que otras colicinas, la microcina E492 utiliza una vía de captación de nutrientes para ingresar al interior de la célula blanco, la cual pertenece a la importación de hierro a través del sideróforo enterobactina. Sin embargo, de esta vía de importación solo utiliza las proteínas de membrana externa para translocar a la microcina desde el medio extracelular hacia el espacio periplasmático en un proceso aparentemente independiente del sistema TonB, ya que mutantes truncas en TonB que carecen de su porción periplasmática son sensibles a la microcina E492 (Baeza, 2003). Para la inserción de la microcina en la membrana interna y/o la formación de un canal iónico, la microcina E492 depende del sistema TonB. En este sentido podemos sugerir un modelo de importación para la microcina E492 (Fig. 17) que contempla un reconocimiento de la microcina E492 por los receptores FepA, Fiu y Cir, gatillando la apertura del receptor y el paso de la microcina hacia el periplasma, para posteriormente vía TonB insertarse y despolarizar la membrana citoplasmática, causando la muerte de la célula.



**Figura 17. Modelo de la importación de la microcina E492 en *E. coli*.** En el esquema se muestra el reconocimiento de la microcina E492 por sus receptores de membrana externa (ME) FepA, Fiu y Cir. Luego pasa a través del receptor hacia el periplasma, donde interactúa con la proteína TonB y se inserta en la membrana interna (MI) para formar un canal que despolariza la membrana.



## **4.2 Diferencias en el transporte de la microcina E492 entre los receptores FepA, Fiu y Cir.**

Cada receptor le confiere a la célula distintos grados de sensibilidad por la actividad bactericida de la microcina E492. Los resultados presentados sugieren que estas diferencias se deben a la capacidad de cada receptor para reconocer a la microcina y transportarla hacia el espacio periplasmático y de la densidad de éstos en la membrana externa. Respecto del sistema TonB, al cambiar las concentraciones de hierro del ambiente, la concentración de este sistema transductor de energía no varía mucho en comparación con la densidad de los receptores en la membrana externa, de manera que su contribución a la sensibilidad por la microcina E492 es relativamente constante. Estos resultados se corresponden con el estudio de la densidad de estas proteínas FepA y TonB en presencia y ausencia de DTPA (Higgs y col., 2002). Este estudio mostró que a una concentración de DTPA 10  $\mu$ M no hay cambios en los niveles de sistema TonB, pero si se observó un aumento en la densidad del receptor FepA. Estos antecedentes descartan como etapa limitante en el transporte de la microcina E492, a la inserción de la microcina en la membrana citoplasmática y la formación del canal vía TonB, sino más bien, señala al proceso de translocación de la microcina hacia el periplasma como la etapa limitante. Si bien la translocación de la microcina hacia el periplasma es posible en presencia de la proteína TonB trunca en su porción periplasmática, este evento es más eficiente con la proteína TonB completa (Baeza, 2003). La enterobactina y la colicina B tienen constantes de disociación de 24 nM y 185 nM para el receptor FepA, respectivamente. Si se

postula a la unión de la microcina al receptor como la etapa limitante en la importación y dado que su valor de  $CB_{50\%}$  para el receptor FepA es de 170 nM, es probable que su constante de disociación sea similar al de la colicina B. Si bien el valor  $CB_{50\%}$  involucra la sumatoria de las constantes de disociación, transporte a través de la membrana externa, interacción con TonB y formación del canal, es probable que la constante de disociación sea mayor al de las otras constantes y por ende, similar al de las colicina B. Sin embargo, aunque ambas bacteriocinas pueden tener similares constantes de disociación por el receptor FepA, es muy probable que en éste receptor la microcina y la colicina B sean reconocidas por distintos sitios de unión. A diferencia de la microcina, la colicina B no es importada por los receptores de Fiu y Cir y su sitio de unión dentro del receptor FepA es distinto del sitio de unión de la enterobactina. Por lo tanto, es probable que la microcina sea reconocida por la región que reconoce a la enterobactina y que debiera estar relativamente conservada en los receptores Fiu y Cir.

#### **4.3 Mecanismo de reconocimiento de la microcina E492 por sus receptores de membrana externa.**

Las colicinas G, H y microcinas M y H47 también son importadas por los receptores FepA, Fiu y Cir. Sin embargo, estas microcinas no presentan una identidad significativa con la microcina E492 a excepción de su extremo carboxilo terminal (Patzer y col., 2003), sugiriendo que ésta porción debe ser importante para el reconocimiento de la bacteriocina al nivel de sus receptores. Por otra parte, la microcina 24 que comparte un 43% de identidad con la microcina E492, es importada por el receptor FhuA y no por los receptores FepA, Fui y Cir, y carece

del extremo carboxilo terminal presente en las bacteriocinas importadas por los tres receptores antes mencionados. Otro antecedente que apoya la importancia del extremo carboxilo terminal en el proceso de importación es que en la colicina Ia los residuos ácidos del extremo carboxilo terminal podrían emular a la enterobactina-férrica y así ser reconocida por el receptor Cir (Cao y Klebba, 2002). En base a estos antecedentes, se quiso determinar el papel del extremo carboxilo terminal en la importación. Los ensayos de competencia utilizando el péptido sintético del extremo carboxilo terminal o anticuerpos contra el extremo carboxilo terminal de la microcina, no inhibieron su actividad bactericida. Una explicación a estos resultados es que el extremo carboxilo terminal esta ubicado al interior al de la microcina, de manera que no es reconocido por los anticuerpos y que solo se exponga al momento del reconocimiento por sus receptores. En este caso, se podría suponer que la primera interacción con el receptor es de tipo hidrofóbica, lo cual expone la porción carboxilo terminal para interactuar mediante cargas y en forma más específica con una región interna de FepA, Fiu o Cir, estimulando la apertura del receptor. Así, la presencia del péptido de los últimos 20 aminoácidos de la microcina E492 probablemente no interactuaría muy bien con la porción hidrofóbica del receptor, dificultándose su entrada hacia la porción de reconocimiento más específica, explicando la falta de actividad inhibidora del péptido sintético sobre la actividad bactericida de la microcina E492. Esto además implicaría, que en el reconocimiento del receptor participaría más de una región de la microcina E492. Otra explicación a la incapacidad del péptido para competir por los receptores de membrana externa, es que la unión del péptido a los receptores

induzca un cambio conformacional que implique la importación del péptido. En este sentido, la presencia del péptido solamente retardaría la velocidad de importación de la microcina, pero no afectaría su efecto bactericida. Los resultados que muestran un cambio en la velocidad de importación de la microcina apoyarían esta última hipótesis, aunque no se puede inferir las propiedades del extremo carboxilo terminal de la microcina E492 en la importación de la microcina E492. Nuevas estrategias deben ser diseñadas para abordar esta problemática.

#### **4.4 El paso de la microcina a través del receptor de membrana externa.**

Actualmente se desconoce si el paso de la bacteriocina a través de su receptor de membrana externa involucra un proceso de denaturación en la cual pasaría en forma desplegada (Cao y Klebba, 2002), aunque se manejan distintas hipótesis. Una de ellas es la hipótesis de la “aguja”, la cual contempla el paso de la proteína en forma plegada para formar inmediatamente el canal en la membrana interna. La otra hipótesis denominada “threading” contempla el desplegamiento de la bacteriocina en la superficie celular y posteriormente su paso a través del receptor. Respecto de la microcina E492, el hecho que un esferoplasto es capaz de sufrir su efecto bactericida, sugiere que no se requieren de grandes cambios al pasar por sus receptores para ejercer ésta acción bactericida, favoreciéndose en ese sentido la hipótesis de la aguja. Además, se ha determinado que el diámetro interno del receptor FepA en su estado abierto podría llegar a medir 40 Å (Cao y Klebba, 2002), permitiendo el paso de una proteína pequeña sin grandes cambios en su estructura nativa. Por otro lado, la interacción de TonB con la microcina es absolutamente indispensable, en tanto que la interacción de los receptores con la

microcina es dispensable pues si se permeabiliza la membrana externa, la célula blanco permanece sensible a la actividad bactericida de la microcina E492. La interacción de la proteína TonB se produce aún con la forma inactiva de la microcina, pues células permeabilizadas son sensibles a esta forma inactiva. En este sentido, es probablemente que si la microcina presenta cambios moderados en su estructura, no se vea afectado o su interacción con TonB para la inserción en la membrana citoplasmática, sino más bien se afecta el proceso de reconocimiento por sus receptores.

#### **4.5 Posibles ventajas fisiológicas de la microcina E492 al poseer tres receptores de importación.**

La microcina E492 ha sido descrita como una bacteriocina capaz de inducir la despolarización de la membrana mediante la formación de un solo poro de microcina E492 (de Lorenzo, 1984), por lo cual se requerirían de bajas cantidades de microcina E492 para ejercer ésta acción bactericida. Basta que la afinidad de su receptor reconozca bajas concentraciones de microcina para que la cepa padezca su efecto mortal. Así, las bajas afinidades que podrían presentar Fiu y Cir por la microcina E492, simplemente indican que a diferencia de FepA, probablemente no detecten pequeñas concentraciones de microcina, las cuales podrían ser nocivas para una cepa que expresa FepA. Sin embargo, solo se requiere de un aumento de entre 3 a 10 veces en la concentración de microcina E492, para que la cepa que expresan solamente Fiu o Cir sea susceptible al efecto bactericida. Si consideramos que el ambiente natural de *Klebsiella pneumoniae* RYC492 es el lumen intestinal, es probable que esta cepa esté

formando biopelículas. En estas condiciones *K. pneumoniae* RYC492 debería generar una concentración efectiva muy alta de microcina E492, favoreciendo la importación de microcina E492 en la cepa sensible por cualquiera de sus tres receptores FepA, Fiu o Cir. Esta población difícilmente podrá generar mutantes espontáneas dobles y triples contra los receptores de la microcina, lo cual favorece la supervivencia de *K. pneumoniae* RYC492 por sobre sus competidoras. Lo más probable es que las cepas resistentes sean mutantes espontáneas en el sistema TonB, sin embargo, estas mutantes serán incapaces de importar hierro y vitamina B<sub>12</sub> en forma eficiente, siendo fácilmente desplazadas por *K. pneumoniae* RYC492. Por otro lado, estos tres receptores explican porqué el espectro de acción bactericida de la microcina, es más amplio que el de las colicinas. Estas últimas generalmente actúan sobre otras cepas de *E. coli* o especies muy relacionadas, sin embargo, el espectro de la microcina E492 involucra a *Citrobacter*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* y algunas especies de *Vibrio*. Estas especies bacterianas deben importar enterobactina o sus productos de hidrólisis y por ende a la microcina E492. En este sentido, otras cepas como *Haemophilus parainfluenzae* y *H. Paraphrophilus* (Williams y col., 1990), *Bordetella bronchiseptica* (Beall y Hoenes, 1997) o *Rhodococcus erythropolis* (Carran y col., 2001), que también pueden importar la enterobactina o el 2,3-dihidroxibenzoato, podría ser sensibles a la actividad bactericida de la microcina E492. Sin embargo, estas cepas no solo deben reconocer y transportar a esta bacteriocina hacia el periplasma, sino además, vía TonB permitir su inserción en la membrana citoplasmática. Establecer “a priori” si una cepa será sensible o no ante la microcina E492 en base a la conservación del sistema TonB

o de los receptores FepA, Fiu o Cir con *E. coli*, es difícil. El grupo de Postle (Larsen y col., 1996) utilizando anticuerpos monoclonales contra la proteína TonB, demostró que dentro de la familia *Enterobacteriaceae* existe una conservación del complejo transductor de energía TonB. Del mismo modo, el grupo de Klebba (Rutz y col., 1991) demostró que los epitopos del receptor FepA son bastantes conservados respecto de otras proteínas de membrana externa y si bien la mayoría puede importar enterobactina férrica, estos anticuerpos también pueden diferenciar proteínas FepA provenientes de distintos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Aparentemente existen regiones del receptor FepA y de la proteína TonB que son bastantes conservadas, pero se desconoce si estas regiones participan de la importación de la microcina E492. De manera que solamente una aproximación experimental permitirá determinar si la cepa importadora de enterobactina férrica será sensible o resistente a la actividad bactericida de la microcina E492, y en el caso de ser resistente, el estudio de la sensibilidad de su respectivo esferoplasto indicará la etapa en que ha sido bloqueado el transporte de la microcina hacia la membrana citoplasmática.

#### **4.6 Antagonistas de la actividad bactericida de la microcina E492.**

##### **4.6.1 Mecanismo de inhibición de la microcina E492**

El trímero lineal de DBS, y la enterobactina son los antagonistas más eficiente de la microcina E492, seguido por el dímero de DBS. Los ensayos genéticos de inhibición de la enterobactina libre sobre la microcina E492 utilizando como cepas indicadoras mutantes que expresan solamente uno de los tres receptores FepA, Fiu y Cir sugieren fuertemente un mecanismo de inhibición de

tipo competitivo. Si la inhibición fuera no competitiva, entonces la enterobactina se uniría a la microcina E492 afectando de igual manera su transporte a través de cada uno sus tres receptores de membrana externa, asumiendo un mecanismo de importación similar en cada receptor. Pero lo observado sugiere una inhibición competitiva, ya que si hay un fuerte efecto antagonista sobre la microcina E492 cuando la cepa indicadora expresa el receptor FepA y prácticamente sin actividad antagonista cuando las cepas indicadoras expresan solamente los receptores Fiu o Cir. Además las formas de la curva de inhibición son similares cuando la concentración de microcina o antagonista es constante, reafirmando la inhibición de tipo competitiva. En este sentido, cualquier ligando que se unan fuertemente al receptor FepA también deberían ser antagonista de la microcina E492, sin embargo, ¿ Por que la enterobactina férrica no es capaz de inhibir la actividad bactericida de la microcina E492? (Orellana y Lagos, 1996). El grupo de Klebba (1997) ha determinado mediante ensayos de unión la inhibición competitiva entre la enterobactina férrica y la colicina B, demostrando que la unión de la colicina B al receptor FepA bloquea el transporte de la enterobactina férrica, debido a que la porción amino terminal de la colicina B se une al receptor FepA, dejándolo en un estado aparentemente abierto, de tal modo que su porción de translocación y su porción carboxilo terminal formadora de poro pasan a través de la membrana externa dirigiendose hacia la membrana interna para ejercer su acción bactericida (Rutz y col, 1992; Payne y col., 1997; Cao y Klebba, 2002). Por el contrario, la unión de la enterobactina férrica al receptor FepA induce un cambio conformacional que permite translocar la enterobactina férrica hacia el periplasma, para posteriormente volver a su estado conformacional anterior (Rutz y col, 1992).



El transporte de la microcina E492, en este sentido, debe ser similar al de la enterobactina, de modo que el transporte de enterobactina férrica no impide que a continuación se importe una molécula de microcina E492 y viceversa. Lamentablemente no se han descrito ensayos de unión de la enterobactina libre de hierro al receptor FepA. Debido a que en el citoplasma se encuentra la enzima Fes, la importación de enterobactina libre de hierro hacia el citoplasma podría considerarse como un gasto innecesario, ya que esta molécula que no ha contribuido a la importación de hierro es sustrato de la actividad esterasa de Fes degradándose a productos de hidrólisis que poseen menor afinidad por el  $Fe^{3+}$  en comparación con la enterobactina. Entonces es muy probable que la posible unión de la enterobactina libre al receptor no gatille la apertura del receptor, generándose una constante unión y desunión de la enterobactina libre al receptor lo cual podría afectar en mayor grado la unión de la microcina al receptor FepA, en comparación a una molécula como la enterobactina férrica, que es importada por FepA. Además se debe considerar que la competencia por la unión al receptor FepA, no impide el transporte de microcina E492 a través de Fiu o Cir. En este sentido, un buen antagonista de la actividad bactericida de la microcina E492, no solo debe competir por la unión a los receptores de membrana externa FepA, Fiu y Cir, sino además, no ser importados o importados débilmente por los receptores FepA, Fiu y Cir. Ensayos que determinen las constante de unión de la microcina E492, DBS<sub>3</sub>, DBS<sub>2</sub> y enterobactina libre de hierro al receptor FepA, Fiu y Cir, a través de métodos fluorescentes como los utilizados en el estudio de la colicina B (Payne y col., 1997), en conjunto con ensayos de inhibición, ayudarían a entender

el mecanismo de inhibición competitiva sobre la actividad bactericida de la microcina E492.

#### **4.6.2 Importancia biológica de la actividad antagonista de la enterobactina y el trímero lineal y dímero de DBS sobre la actividad bactericida de la microcina E492.**

Desde un punto de vista fisiológico, las primeras molécula producidas en condiciones carentes de hierro son el DHB y posteriormente la enterobactina. Por lo tanto, la microcina será activa en los primeros momentos de la producción de enterobactina. Luego en la medida que la enterobactina férrica comienza a ser hidrolizada por la bacteria y empiezan a aparecer los trímeros, dímeros y monómeros de DBS, se incrementa la actividad antagonista del medio sobre la actividad de la microcina E492. Finalmente, toda la enterobactina será transformada en monómeros de DBS, los cuales no afectaran de forma significativa la actividad antagonista de la microcina. Por otro lado, el efecto agonista del DHB sobre la microcina, parece ser debido a su actividad fisiológica como factor de crecimiento (Young y col., 1967). El DHB es precursor de la síntesis de enterobactina, sin embargo, el estímulo sobre la actividad bactericida de la microcina debería estar relacionado con un aumento en la expresión de los receptores. Los operones del sistema de la enterobactina contempla a proteínas que participan de la síntesis de enterobactina y del receptor FepA. Por lo tanto, es muy probable que el DHB estimule en la célula la expresión de las proteínas que sintetizan enterobactina y en consecuencia la expresión del receptor FepA. Este efecto estimulador no ha sido descrito para el DHB sino más bien, para la

enterobactina. La cepa *P. aeruginosa*, no importa enterobactina a menos que la cepa se preincube en presencia de enterobactina, estimulando la expresión de los receptores FepA, Fiu y Cir (Thulasiraman y col., 1998) y por ende la importación de la enterobactina férrica.

#### **4.7 Efecto del metabolismo de la enterobactina sobre la producción de microcina E492 activa.**

La producción de microcina inactiva en la cepa de *E. coli* H1885 (*entDF*) sugiere que otro factor no asociado covalentemente a la microcina, dependiente del metabolismo de la enterobactina sería necesario para el correcto plegamiento de la microcina. Este factor a nivel citoplasmático podría inducir un cambio conformacional para la exportación de la microcina en formar activa y/o estar vinculado al sistema de exportación que es donde se produce finalmente la conformación activa de la microcina E492. EntD o EntF interactuarían directa o indirectamente con el sistema de la microcina para modificar la naturaleza química de este factor, favoreciendo así el correcto plegamiento de la microcina E492. El principal sustrato putativo de la proteína EntD, podría ser la proteína MceC. Como se mencionó anteriormente, MceC es similar a la proteína IroB del sistema de síntesis del sideróforo salmoquelina (Patzner, 2003), la cual se cree actúa como una glicosil-transferasa adicionando el azúcar al grupo catecol. De conservarse esta actividad en MceC, probablemente MceC requiere de un sitio activo asociado a un grupo fosfopantetoina para unir el azúcar y transferirlo a un factor necesario en la síntesis de microcina activa. La proteína EntD podría ser la encargada de agregar este grupo fosfopantetoina a MceC. La secuencia consenso que reconoce

EntD en su proteína blanco involucra una serina muy conservada y aminoácidos contiguos relativamente conservados. El análisis de secuencia de la proteína MceC sugiere que esta proteína también podría contener esta secuencia consenso (Tabla 17), apoyando la hipótesis que la propone como sustrato de la proteína EntD y vincula los sistemas de enterobactina y microcina.

#### **4.8 Relación entre los sistemas de la enterobactina y la microcina E492.**

Bajo condiciones restrictivas de hierro la cepa sensible comienza a expresar todo el sistema de síntesis e importación de la enterobactina y sus productos de hidrólisis. Inicialmente, se estimula la síntesis de los receptores FepA, Fiu y Cir y en el sobrenadante aparecen principalmente monómeros de DBS y una muy reducida cantidad de enterobactina. Sin embargo, debido a que el DBS no es un antagonista de la microcina E492, la célula permanece sensible a la actividad bactericida de la microcina E492. En la medida que el cultivo va creciendo o alcanzando la fase estacionaria, van aumentando gradualmente las concentraciones de enterobactina, trímero lineal y dímero en el medio extracelular, inhibiendo la actividad bactericida de la microcina E492, hasta finalmente proteger a toda la población sensible. Es probable que el sistema de maduración de la microcina que solo es activo en la fase exponencial de crecimiento, ha evolucionado en función del sistema de la enterobactina para producir microcina activa durante la fase exponencial de crecimiento en condiciones carentes de hierro, momento en el que el sistema de la enterobactina es subutilizado, ya que otros sistemas importadores de hierro como el sistema citrato-férrico, son suficientes para nutrir a la célula. Luego, en la fase estacionaria de crecimiento, la

**Tabla 17. Comparación de secuencias consensos que contienen serinas modificadas por la fosfopanteinilación**

Cepa	Proteína	Secuencia consenso
<i>E. coli</i>	FAS ACP	DLGADSL
<i>S. violaceoruber</i>	Gra ACP	ELGYDSL
<i>S. rimosus</i>	Otc ACP	ALGYDSL
<i>B. subtilis</i>	SrfB1 PCP	MIGGHSL
<i>B. brevis</i>	TycA PCP	SLGGDSL
<i>E. coli</i>	EntF PCP	ALGGHSL
<i>E. coli</i>	EntB ArCP	DYGLDSV
<i>K. pneumoniae</i>	MceC (?)	FLYDDSL

Abreviaciones utilizadas en esta tabla: ACP proteína acil-transportadora; PCP, proteína peptidil transportadora ; ArCP, proteína aril-transportadora, FAS, sintetasa de ácidos grasos, Gra, granaticina; Otc, oxitetraciclina; SrfB1, subunidad 1 de la surfactina sintetasa; TycA, subunidad A de la tirocidina sintetasa.

mayor demanda de hierro induce la máxima expresión del sistema de la enterobactina y reprime al sistema de la microcina. En conclusión, la microcina es producida en conjunto con la enterobactina y posiblemente con una molécula similar a la salmoquelina, la cual podría ser necesaria para el correcto plegamiento de la microcina. Un estudio más detallado acerca de la caracterización de este posible cofactor, junto a la determinación del papel del extremo carboxilo terminal en el proceso de importación, ayudarán a comprender como la microcina reconoce a FepA y es transportada hacia el espacio periplasmático, para luego a través de TonB ejercer su acción bactericida.

## CONCLUSIONES

Las proteínas de membrana externa FepA, Fiu y Cir son los receptores de la microcina E492 en *Escherichia coli*.

El grado de sensibilidad de *E. coli* a la microcina E492 está relacionado con la densidad de estos receptores en la membrana externa.

La microcina E492 en *E. coli* solamente requiere de sus receptores de membrana externa y del sistema TonB para ejercer su acción bactericida.

El trímero lineal y dímero de DBS junto a la enterobactina son antagonistas competitivos de la actividad bactericida de la microcina E492.

La producción de microcina inactiva en la cepa hospedera *E. coli* H1885, es debido a la secreción de una forma inactiva de microcina rica en estructura  $\alpha$ -hélice.

MceD evita que el sistema de la enterobactina afecte la liberación de la microcina E492 activa.

## REFERENCIAS

- Alonso, G., G. Vilchez y V. Rodríguez-Lemoine. 2000.** How bacteria protect themselves against channel-forming colicins. *Int. Microbiol.* **3**: 81-88.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl. 1992.** *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed. Greene Publishing Associates, New York, N.Y.
- Baeza, M. 2003.** Mecanismo de inmunidad, de translocación y de conversión tipo príon de la microcina E492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Baichoo N y J.D. Helmann. 2002.** Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol.* **184**: 5826-5832.
- Baquero, F. y F. Moreno. 1984.** The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 117-124.
- Beall B. y T. Hoenes. 1997.** An iron-regulated outer-membrane protein specific to *Bordetella bronchiseptica* and homologous to ferric siderophore receptors. *Microbiology* **143**: 135-145.
- Benedetti H, C. Lazdunski y R. Lloubes. 1991.** Protein import into *Escherichia coli*: colicins A and E1 interact with a component of their translocation system. *EMBO J.* **10**: 1989-1995.
- Braun V. 1985.** The unusual features of the iron transport systems of *Escherichia coli*. *Trends In Biochem. Sci.* **10**: 75-78.



- Braun V. y K. Hantke. 1991.** Genetics of bacterial iron transport. Edn. Winkelmann G. CRC Handbook of Microbial Iron Chelates; CRC Press: pag. 107-137.
- Braun V., S.I. Patzer y K. Hantke. 2002.** Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* **84**: 365-380.
- Buchanan S.K., B.S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm y J. Deisenhofer. 1999.** Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 56-63.
- Cao Z. y P.E. Klebba. 2002.** Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. *Biochimie* **84**: 399-412.
- Carran C.J., M. Jordan, H. Drechsel, D.G. Schmid y G. Winkelmann. 2001.** Heterobactins: A new class of siderophores from *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 containing both hydroxamate and catecholate donor groups. *Biometals* **14**: 119-125.
- Castillo J.A. 2003.** Mecanismo de exportacion y procesamiento de la microcina E492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Corsini, G., M. Baeza, O. Monasterio y R. Lagos. 2002.** The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochimie* **84**: 539-544.
- Crosa J.H. 1989.** Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev.* **53**: 517-530.

- Crosa J.H. 1997.** Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 319-336.
- Crosa J.H. y C.T. Walsh. 2002.** Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 223-249.
- Curtis, N. A. C., R. L. Eisenstadt, S. J. East, R. J. Cornford, L.A. Walker y A. J. White. 1988.** Iron-regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12 and mechanism of action of catechol-substituted cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1879-1886.
- de Lorenzo V. 1984.** Isolation y characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **139**: 72-75.
- de Lorenzo V., J. L. Martínez y C. Asencio. 1984.** Microcin-mediated interactions between *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 391- 400.
- de Lorenzo V. y A. Pugsley. 1985.** Microcin E492, a low-molecular weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 666-669.
- Dean C.R. y K. Poole. 1993.** Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (*pfeA*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**: 317-324.

- Delgado MA, M.R. Rintoul, R.N. Farias y R.A. Salomón. 2001.** *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J Bacteriol.* **183**: 4543-4550.
- Diarra M.S., M.C. Lavoie, M. Jacques, I. Darwish, E.K. Dolence, J.A. Dolence, A. Ghosh, M. Ghosh, M.J. Miller y F. Malouin. 1996.** Species selectivity of new siderophore-drug conjugates that use specific iron uptake for entry into bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2610-2617.
- Ernst J.F., R.L. Bennett y L.I. Rothfield. 1978.** Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **135**: 928-934.
- Escolar L, J. Perez-Martin y V. de Lorenzo. 1999.** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**: 6223-6229.
- Frederick H.T., F. S. Cannon y B. A. Dempsey. 2001.** Calcium and TOC loading: effect of hydroxyl and carboxyl substituents. *Colloids Surfaces* **191**:161-177.
- Furrer J.L., D.N. Sanders, I.G. Hook-Barnard y M.A. McIntosh. 2002.** Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol. Microbiol.* **44**: 1225-1234.
- Garcia-Bustos J.F., N. Pezzi y C. Asensio. 1984.** Microcin 7: purification and properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**:779-785.

- Gehring AM, K.A. Bradley y C.T. Walsh. 1997.** Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry*. 36: 8495-8503.
- Greenwood K.T. y R.K. Luke. 1981.** Regulation of enterochelin synthetase in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta* 660: 371-374.
- Griggs D.W. y J. Konisky. 1989.** Mechanism for iron-regulated transcription of the *Escherichia coli* *cir* gene: metal-dependent binding of Fur protein to the promoters. *J Bacteriol.* 171: 1048-1054.
- Guarente L. y J. Beckwith. 1978.** Mutant RNA polymerase of *Escherichia coli* terminates transcription in strains making defective rho factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:294-297.
- Guerinot M. L. 1994.** Microbiol iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 743-772.
- Guterman S.K. 1973.** Colicin B: mode of action and inhibition by enterochelin. *J. Bacteriol.* 114: 1217-1224.
- Hancock RE, K. Hantke y V. Braun. 1977.** Iron transport in *Escherichia coli* K-12. 2,3-Dihydroxybenzoate-promoted iron uptake. *Arch. Microbiol.* 114:231-239.
- Hantash F.M. y C.F. Earhart 2000.** Membrane association of the *Escherichia coli* enterobactin synthase proteins EntB/G, EntE, and EntF. *J Bacteriol.* 182: 1768-1773.

- Hantke K. 1981.** Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol. Gen. Genet.* **182**: 288-292.
- Hantke K. 1990.** Dihydroxybenzoylserine- a siderophore for *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 5-8.
- Harle C., I. Kim, A. Angerer y V. Braun. 1995.** Signal transfer through three compartments: transcription initiation of the *Escherichia coli* ferric citrate transport system from the cell surface. *EMBO. J.* **14**: 1430-1438.
- Harris, W.R., C. J. Carrano, S. R. Cooper, S. R. Sofen, A.E. Avdeef, J.V. McArdle y K.N. Raymond. 1979.** Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 19. Stability constants and electrochemical behavior of ferric enterobactin and model complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 6097-6104.
- Heidinger S., V. Braun, V.L. Pecoraro y K.N. Raymond. 1983.** Iron supply to *Escherichia coli* by synthetic analogs of enterochelin. *J. Bacteriol.* **153**: 109-115.
- Herrero M. y F. Moreno. 1986.** Microcin B17 blocks DNA replication and induces the SOS system in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 393-402.
- Higgs P.I., T.E. Letain, K.K. Merriam, N.S. Burke, H. Park, C. Kang y K. Postle. 2002b.** TonB interacts with nonreceptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **184**: 1640-1648.
- Hohn, B. y J. Collins. 1980.** A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* **11**: 291-298.

- Jiang X., M.A. Payne, Z. Cao, S.B. Foster, J.B. Feix, S.M. Newton y P.E. Klebba. 1997.** Ligand-specific opening of a gated-porin channel in the outer membrane of living bacteria. *Science* **276**:1261-1264.
- Kampfenkel K. y V. Braun. 1993.** Topology of the ExbB protein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**: 6050-6057.
- Karjalainen T.K., D.G. Evans, D.J. Jr Evans, D.Y. Graham y C.H. Lee. 1991.** Iron represses the expression of CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* **11**: 317-323.
- Killmann H., G. Videnov, G. Jung, H. Schwarz y V. Braun. 1995.** Identification of receptor binding sites by competitive peptide mapping: phages T1, T5, and phi 80 and colicin M bind to the gating loop of FhuA. *J. Bacteriol.* **177**: 694-698.
- Kolter R. y F. Moreno. 1992.** Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 141 - 163.
- Kleinkauf H y H. Von Dohren. 1996.** A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem.* **236**: 335-351.
- Lagos R., M. Wilkens, C. Vergara, X. Cecchi y O. Monasterio. 1993.** Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**: 145-148.
- Lagos R., J. E. Villanueva y O. Monasterio. 1999.** Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.* **181**: 212-217.

- Lagos R., M. Baeza, G. Corsini, C. Hetz, E. Strahsburger, J. A. Castillo, C. Vergara y O. Monasterio. 2001.** Structure, organization, and characterization of the cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**: 229-243.
- Langman L, I.G. Young, G.E. Frost, H. Rosenberg y F. Gibson. 1972.** Enterochelin system of iron transport in *Escherichia coli*: mutations affecting ferric-enterochelin esterase. *J. Bacteriol.* **112**: 1142-1149.
- Larsen R.A., D. Foster-Hartnett, M.A. McIntosh y K. Postle. 1997.** Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for in vivo physical interactions. *J. Bacteriol.* **179**: 3213-3221.
- Lau P.C.K., M. Parsons y T. Uchimura. 1992.** Molecular evolution of E colicin plasmid with emphasis on the endonuclease types. In *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics*, pp. 353-378. NATO ASI series H65. Edited by R. James, C. Lazdunski y F. Pattus. Berlin: Springer-Verlag.
- Lazdunski C.J. 1988.** Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. *Biochimie* **70**: 1291-1296.
- Lazdunski, J., E. Bouveret, A. Rigal, L. Journet, R. Lloubès y H. Bénédicti. 1998.** Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **180**: 4993-5002.
- Litwin C.M. y S.B. Calderwood. 1993.** Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 137-149.

- Liu J., J.M. Rutz, J.B. Feix y P. E. Klebba. 1993.** Permeability properties of a large gated channel within the ferric enterobactin receptor, FepA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 10653-10657.
- Liu J., J.M. Rutz, P.E. Klebba y J.B. Feix. 1994.** A site-directed spin-labeling study of ligand-induced conformational change in the ferric enterobactin receptor, FepA. Biochemistry **33**: 13274-13283.
- Masaki H., S. Yajima, A. Akutsu-Koide, T. Ohta y T. Uozumi. 1992.** In *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics*, pp. 379-395. NATO ASI series H65. Edited by R. James, C. Lazdunski y F. Pattus. Berlin: Springer-Verlag.
- Masaki H y T. Ogawa. 2002.** The modes of action of colicins E5 and D, and related cytotoxic tRNases. Biochimie. **84**: 433-438.
- Mayr-Harting, A., A. Hedges y C. Berkeley. 1972.** Methods for studying bacteriocins. Meth. Microbiol. **7A**, 315-422.
- McIntosh M.A. y C.F. Earhart. 1977.** Coordinate regulation by iron of the synthesis of phenolate compounds and three outer membrane proteins in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **131**:331-339.
- Miller J. H. 1972.** *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Neilands J.B. 1993.** Siderophores. Arch. Biochem. Biophys. **302**: 1-3.
- Neilands J.B. 1995.** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. J Biol. Chem. **270**: 26723-26726.



- Newton S.M., J.S. Allen, Z. Cao, Z. Qi, X. Jiang, C. Sprencel, J.D. Igo, S.B. Foster, M.A. Payne, y P.E. Klebba. 1997.** Double mutagenesis of a positive charge cluster in the ligand-binding site of the ferric enterobactin receptor, FepA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94:** 4560-4565.
- Nikaido H. y M. Vaara. 1985.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49:** 1-32.
- Nikaido H. y E.Y. Rosenberg. 1990.** Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with beta-lactam antibiotics containing catechol and analogous groups. *J. Bacteriol.* **172:** 1361-1367.
- O'Brien I.G., G.B. Cox y F. Gibson. 1969.** 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine: chemical synthesis and comparison with the natural product. *Biochim. Biophys. Acta* **177:** 321-8.
- O'Brien I.G., G.B. Cox y F. Gibson. 1970.** Biologically active compounds containing 2,3-dihydroxybenzoic acid and serine formed by *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **201:** 453-60.
- O'Brien I.G., G.B. Cox y F. Gibson. 1971.** Enterochelin hydrolysis and iron metabolism in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **237:** 537-49.
- Orellana C. y R. Lagos. 1996.** The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumonia* is regulated by a microcin antagonist. *FEMS Microbiol. Lett.* **136:** 297-303.

- Ozenberger B.A., M.S. Nahlik y M.A. McIntosh. 1987.** Genetic organization of multiple *fep* genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 3638-3646.
- Patzer S.I., M.R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno y K. Hantke. 2003.** The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron. *Microbiology* **149**: 2557-2570.
- Payne M.A., J.D. Igo, Z. Cao, S.B. Foster, S.M. Newton y P.E. Klebba. 1997.** Biphasic binding kinetics between FepA and its ligands. *J. Biol. Chem.* **272**: 21950-21955.
- Pierce J.R. y C.F. Earhart 1986.** *Escherichia coli* K-12 envelope proteins specifically required for ferrienterobactin uptake. *J. Bacteriol.* **166**: 930-936.
- Poole K. y G.A. McKay. 2003.** Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front. Biosci.* **8**: d661-86.
- Pugsley A. y P. Reeves. 1976a.** Iron uptake in colicin B-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **127**: 218 – 228.
- Pugsley A.P. y P. Reeves. 1976b.** Characterization of group B colicin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12: colicin resistance and the role of enterochelin. *J. Bacteriol.* **127**: 218-228.
- Pugsley A.P. y P. Reeves. 1977.** The role of colicin receptors in the uptake of ferrienterochelin by *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**: 903-911.

- Pugsley A.P. 1984.** The ins and outs of colicins. Part I: Production, and translocation across membranes. *Microbiol. Sci.* **1**: 168-175.
- Pugsley A.P. 1985.** *Escherichia coli* K12 strains for use in the identification and characterization of colicins. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 369-76.
- Pugsley A., F. Moreno y V. de Lorenzo. 1986.** Microcin-E492-insensitive mutants of *E. coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3253 - 3259.
- Riley A. M. 1993.** Molecular mechanism of colicin evolution. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 1380-1395.
- Riley M. A. y J. E. Wertz. 2002.** Bacteriocins: Evolutions, Ecology and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 117-137.
- Rutz J.M., J. Liu, J.A. Lyons, J. Goranson, S.K. Armstrong, M.A. McIntosh, J.B. Feix y P.E. Klebba. 1992.** Formation of a gated channel by a ligand-specific transport protein in the bacterial outer membrane. *Science* **258**: 471-475.
- Sambrook J., E. Fritch y T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning. A laboratory manual . 2nd edn. Cold Spring Harbor, N. Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schagger H. y G. von Jagow. 1987.** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368 - 379.
- Schwyn B. y J.B. Neilands. 1987.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.

- Scott D.C., Z. Cao, Z. Qi, M. Bauler, J.D. Igo, S.M. Newton y P.E. Klebba. 2001.** Exchangeability of N termini in the ligand-gated porins of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**: 13025-33.
- Sprencel C., Z. Cao, Z. Qi, D.C. Scott, M.A. Montague, N. Ivanoff, J. Xu, K.M. Raymond, S.M. Newton y P.E. Klebba. 2000.** Binding of ferric enterobactin by the *Escherichia coli* periplasmic protein FepB. *J. Bacteriol.* **182**: 5359-5364.
- Tatsumi Y., T. Maejima y S. Mitsuhashi. 1995.** Mechanism of tonB-dependent transport of KP-736, a 1,5-dihydroxy-4-pyridone-substituted cephalosporin, into *Escherichia coli* K-12 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 613-639.
- Trujillo M., E. Rodriguez y M. Laviña. 2001.** ATP synthase is necessary for microcin H47 antibiotic action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 3128-3131.
- Thulasiraman P., S.M. Newton, J. Xu, K.N. Raymond, C. Mai, A. Hall, M.A. Montague y P.E. Klebba. 1998.** Selectivity of ferric enterobactin binding and cooperativity of transport in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **180**: 6689-6696.
- Wayne R., K. Frick y J.B. Neilands. 1976.** Siderophore protection against colicins M, B, V, and Ia in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **126**: 7-12.

- Weinreb P.H., L.E. Quadri, C.T. Walsh y P. Zuber. 1998.** Stoichiometry and specificity of in vitro phosphopantetheinylation and aminoacylation of the valine-activating module of surfactin synthetase. *Biochemistry*. **37**: 1575-1584.
- Weiss R.L. 1976.** Protoplast formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **128**: 668-670.
- Wilkens M. 1996.** Caracterización bioquímica y genética de la microcina E492 producida por *Klebsiella pneumoniae*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Wilkens M., J. E. Villanueva, J. Cofré, J. Chnaiderman y R. Lagos. 1997.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4789 - 4794.
- Williams P., D.J. Morton, K.J. Towner, P. Stevenson y E. Griffiths. 1990.** Utilization of enterobactin and other exogenous iron sources by *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae* and *H. paraphrophilus*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2343-2350.
- Winkelmann G., A. Cansier, W. Beck y G. Jung. 1994.** HPLC separation of enterobactin and lineal 2,3-dihydroxybenzoylserine derivatives: a study on mutants of *Escherichia coli* defective in regulation (*fur*), esterase (*fes*) and transport (*fepA*). *Biometals* **7**: 149-154.

**Wyckoff E.E., A.M. Valle, S.L. Smith. y S.M. Payne. 1999.** A multifunctional ATP-binding cassette transporter system from *Vibrio cholerae* transports vibriobactin and enterobactin. *J. Bacteriol.* **181**: 7588-7596.

**Zhai Y.F., W. Heijne y M.H. Jr. Saier. 2003.** Molecular modeling of the bacterial outer membrane receptor energizer, ExbBD/TonB, based on homology with the flagellar motor, MotAB. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**: 201-210.