

UCH - FC
DOC - Microbiología
G. 2 16
C-1

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

“LA AGREGACIÓN ESPONTÁNEA DE LA MUTANTE Q8H DE LA MICROCINA E492 ANULA LA ACTIVIDAD BACTERICIDA Y AUMENTA EL EFECTO CITOTÓXICO EN CÉLULAS TUMORALES”

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

VERÓNICA ALEJANDRA GARCÍA MENA

Directora de Tesis:

Dra. Rosalba Lagos Mónaco



Agosto, 2008.

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

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

VERÓNICA ALEJANDRA GARCÍA MENA

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 27 de Agosto de 2008.

Director de Tesis:

Dra. Rosalba Lagos Mónaco

Rosalba Lagos

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Eugenio Spencer

Dr. Víctor Cifuentes

Dr. Oscar León

[Handwritten signatures and a circular stamp]

The stamp is circular and contains the text: "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE".

Biografía



Nací en Santiago el 19 de Diciembre de 1977, en un ambiente de alegría, con aroma a pan de Pascua y casi junto con la llegada del verano, quizás eso explica lo feliz que me hace el sol, el calor y esa época del año. Soy la hermana mayor de un total de 3 hermanos, con los cuales completamos una familia muy unida, apatotada y revoltosa.

Desde muy pequeña coleccionada tubos de vidrio y frasquitos de remedio para jugar a mezclar sus contenido, pero solo terminado mis estudios en el Colegio Excelsior escuché hablar de la carrera de Bioquímica y sin pensarlo dos veces postulé a esa carrera en la Pontificia Universidad Católica de Chile, donde estudié gracias a una Beca Padre Hurtado.

Junto con mi ingreso a la Universidad, llegó a mi vida la persona más importante del mundo, mi hija Vanessa, cuya existencia me empujó a entregar lo mejor de mí en cada uno de mis proyectos.

Realicé mi Tesis en el Laboratorio de Bioquímica, de la PUC diseñando cepas atenuadas de *Salmonella* y su uso como vacunas orales vivas. El ambiente del laboratorio fue muy motivante y contribuyó en la decisión de ingresar a un programa de Doctorado.

El año 2003 ingrese al programa de Doctorado de Ciencias con mención en Microbiología de la Universidad de Chile, donde viví grandes momentos personales y académicos. Realicé una pasantía de un año y medio en Galveston, una pequeña isla al sur de Houston, donde el invierno dura tan solo 3 semanas. Fue una gran experiencia que viví junto a mi hija y reforzó mi interés por dedicarme a la investigación.

Terminaré mis estudios en pocos días feliz de las experiencias que viví en cada lugar y con ganas de seguir el camino de la Ciencia.

A mi hija



Agradecimientos

Deseo agradecer a la Dra. Rosalba Lagos mi directora de tesis, por aceptarme en su laboratorio, por la confianza depositada en mí, su apoyo y sus consejos.

Al Dr. Octavio Monasterio por las discusiones científicas, por su capacidad formadora. El Dr. Claudio Soto por aceptarme en su Laboratorio en UTMB y por enseñarme un punto de vista diferente de la ciencia.

A MESESP, CONICYT y la UTMB por financiar mi proyecto de tesis y las beca de mantención y pasantías.

A mis compañeros del laboratorio: César, Mario Tello, Gaby, Luis, Sergio, Alexis, Felipe, por su compañía, por las buenas conversaciones y buena onda. En especial a la Jechu, Coté, Roselyn, el Leo por su amistad, por escuchar mis pataletas, soportarme en los malos días y por estar siempre presente. Al Negro porque sin su compañía, cariño y paciencia hubiese sido muy difícil.

También quiero agradecer a mis amigos de Galveston: Andrea, Rodrigo Díaz, Rodrigo Morales, Lisbell, Maca, Patty, Marcelo, Denisse, Abi, Aki, Cristian y Diego por su amistad, por tantos momentos compartidos, tantas tardes de calor y sobre todo por la compañía, la ayuda y el cariño que le entregaron a Vanessa, siempre están en mi corazón.

A mis amigos: Ale, Brett y Claudia gracias mis niños, los quiero muchísimo!, sin uds nunca habría podido vivir en Galveston. A Patin, Elsiña, Sole, Johanna, Alvaro, Bredford, Pato, Andrés Toro, Claudio Navarro, Anita por tantos años de amistad, la confianza, por cuidarme, por tantos buenos momentos, por ser mis amigos!!.

Mis compañeros de doctorado: Jota, Iván, Aniela, Felipe y Jae Yen por el apoyo, por entendernos, acompañarnos en el sufrimiento, por las discusiones, las críticas, por los viajecitos, por las comidas, por su amistad.

A la Jana, el José, el Flaco por su amistad y al resto del cuarto A porque cuando estamos juntos retrocedemos 15 años.

Quisiera agradecer especialmente a mi familia: mi mamá, mi papá, al Mario, el Seba y la Cony (la última integrante de la tribu) porque me han apoyado en todo, porque creen en mí, porque me ayudan cada día, porque me quieren. A mi abuela porque cada vez que colapsaba ella me tranquilizaba, me abrazaba, me quería, por todos sus consejos, por tener siempre las palabras, aunque fueran en un pequeño papel, siempre estas en mi corazón.

Por último a mi hija Vanessa, simplemente por existir, te amo!.



Tabla de contenido



Biografía	i
Agradecimientos	iii
Tabla de contenido	iv
Lista de Tablas	vii
Lista de Figuras	viii
Abreviaturas.....	xi
Resumen	xii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
1.1. Actividad bactericida de la MccE492.....	2
1.2. Determinantes genéticos del sistema productor de MccE492.....	3
1.3. Actividad bactericida	8
1.3.1. Receptor de membrana externa.....	8
1.3.2. TonB.....	9
1.3.3. Formación de poros.	11
1.3.4. Formación de fibras amiloides.	12
1.4. Actividad antitumoral de la MccE492.	13
Objetivo general.....	15
2. Materiales y Métodos.....	17
2.1 Reactivos químicos.....	17
2.2. Cepas bacterianas y plásmidos.	18
2.3. Líneas celulares y cultivos primarios.....	21
2.4. Animales.	21
2.5. Medios de cultivo.	21
2.6. Técnicas moleculares.	22
2.7. Aislamiento y purificación de MccE492.....	24
2.7.1. Purificación de microcina mediante cromatografía en fase reversa.	24
2.7.2. Aislamiento y purificación de MccE492 en "batch".....	24
2.7.3. Cuantificación de la MccE492.....	25
2.8. Geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS).....	25
2.9. Western blot.....	26
2.10. Electroquimioluminiscencia (ECL).....	26
2.11. Ensayo de la actividad bactericida de las muestras de MccE492.	27
2.11.1. Ensayo de la viabilidad en cultivos líquidos.	27
2.11.2. Ensayo de la actividad bactericida sobre césped bacteriano.	27
2.12. Mutagénesis in vitro del gen <i>mceA</i>	28
2.13. Preparación de esferoplastos.....	28

2.14. Ensayos de sensibilidad a MccE492 sobre esferoplastos.....	29
2.15. Ensayo de inmunidad a la MccE492.....	29
2.16. Formación de canales iónicos <i>in vitro</i>	30
2.17. Ensayo de agregación de la MccE492 <i>in vitro</i>	31
2.17.1. Preparación de las muestras de MccE492.....	31
2.17.2. Detección de la formación de agregados amiloides.....	31
2.17.2.1. Espectro de absorción de rojo Congo (RC).....	31
2.17.2.2. Detección de fibras amiloides por emisión de tioflavina T.....	32
2.18. Cultivo celular y ensayos de citotoxicidad de la MccE492.....	33
2.18.1. Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i>	33
2.18.2. Ensayos de proliferación celular.....	33
2.18.3. Determinación de la muerte celular.....	33
2.19. Ensayos de citotoxicidad de MccE492 en tumores <i>in vivo</i>	34
2.19.1. Generación de tumores subcutáneos en ratones C57/BL/6.....	34
2.19.2. Generación de tumores subcutáneos en ratones "nude".....	34
2.19.3. Inyección intratumoral de MccE492.....	35
2.19.4. Administración oral de MccE492.....	35
2.19.5. Medición del tamaño y peso del tumor.....	36
2.19.6. Determinación de parámetros de toxicidad.....	36
2.20. Ensayo preliminares de biodisponibilidad.....	36
2.20.1. Obtención de [³⁵ S] microcina E492.....	36
2.20.2. Ensayo de biodisponibilidad y biodistribución de la MccE492 en ratones C57/BL/6.....	37
2.21. MALDI-TOF MS de muestras de MccE492.....	38
3. Resultados.....	39
3.1. Obtención de mutantes puntuales de la MccE492.....	39
3.2. Caracterización de las mutantes PL-G18S y PL-G18D.....	44
3.3. Caracterización de la mutante de la MccE492 Q8H.....	46
3.3.1. Purificación de MccE492 Q8H a partir del sobrenadante de la bacteria productora.....	46
3.3.2. Resistencia a proteasas y temperatura.....	46
3.4. Construcción de los plasmidios T7pBA y T7pBA Q8H.....	49
3.4.1. Expresión de MccE492 bajo el promotor inducible T7.....	49
3.5. Determinación de la actividad bactericida de la MccE492 Q8H sobre bacterias sensibles.....	52
3.6. Determinación de la actividad bactericida de la MccE492 Q8H sobre esferoplastos.....	52
3.7. Co-producción de MccE492 silvestre y Q8H.....	55
3.8. Co-incubación de MccE492 silvestre y Q8H.....	55
3.9. Formación de canales iónicos por la MccE492 Q8H.....	57
3.10. Cinética de agregación de la MccE492.....	61
3.10.1. Unión de rojo Congo a la MccE492.....	61
3.10.2. Unión de tioflavina T.....	61
3.10.3. Ensayo de "seeding".....	64

3.11. Actividad bactericida de la MccE492 sobre mutantes en TonB.....	66
3.11.1. Ensayo de viabilidad de las cepas de <i>E.coli</i> X8605 TonB S16L y X8605 TonB Δ43-239.....	66
3.11.2. Ensayo de viabilidad en esferoplastos de las cepas mutantes en TonB.	66
3.12. Ensayo de inmunidad de células mutantes en TonB.	68
3.13. Efecto citotóxico de la MccE492 Q8H sobre distintas líneas tumorales.	71
3.14. Desarrollo de un nuevo procedimiento de purificación de la MccE492 para su uso <i>in vivo</i> sobre tumores.	76
3.15. Procedimiento de agregación a altas concentraciones de MccE492. ...	79
3.16. Efecto citotóxico de las fibras de MccE492 administrada intratumoralmente en un modelo de melanoma murino.	82
3.17. Efecto citotóxico de la administración oral de fibras MccE492 en modelo de melanoma murino	82
3.18. Citotoxicidad de las fibras de MccE492 en células tumorales HT29 y HCT116 de carcinoma de colon humano.....	87
3.19. Efecto citotóxico de la administración intratumoral de fibras MccE492 en modelo de carcinoma de colon humano.	88
3.20. Efecto citotóxico de la administración oral de fibras MccE492 en modelo de carcinoma de colon humano HT29.	91
3.21. Toxicidad de las fibras de MccE492 administradas crónicamente.	93
3.22. Estudios farmacocinéticos.....	97
4. Discusión	100
4.1. Mutaciones en el péptido líder de la MccE492.....	101
4.2. Codón de inicio de la traducción de la MccE492.....	101
4.3. MccE492 Q8H.....	102
4.4. Efecto de TonB en la actividad bactericida.	105
4.5. Fibras amiloides.	106
4.6. Citotoxicidad.....	107
4.7. Efecto antitumoral de la MccE492.....	109
5. Conclusiones	111
6. Referencias.....	112



Lista de Tablas

Tabla 1: Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este estudio.....	19
Tabla 2: Plásmidos utilizados en este estudio.	20
Tabla 3: Partidores utilizados en este estudio.....	23
Tabla 4: Actividad bactericida después de co-incubar <i>in vitro</i> muestras purificadas de MccE492 silvestre y Q8H.	58
Tabla 5: Distribución de la masa de los tumores de carcinoma de colon HT29 tratados intratumoralmente con 5 mg/Kg de MccE492.	92
Tabla 6: Distribución de la masa de los tumores carcinoma de colon HT29 tratados oralmente con 50 mg/Kg de McE492.....	95
Tabla 7: Masa corporal y masa de los órganos de los animales tratados con MccE492.....	96
Tabla 8: Parámetro farmacocinéticos de [³⁵ S]MccE492 luego de inyectarla vía intravenosa en ratones C57/BL/6.	99

Lista de Figuras

Figura 1: Modelo de la acción y producción de la MccE492.....	5
Figura 2: Actividad de la microcina E492 sobre células tumorales.....	14
Figura 3: Búsqueda de mutantes en la actividad bactericida de la MccE492..	40
Figura 4: Analisis por inmunoblot de las mutantes carentes de actividad bactericida.	41
Figura 5: Análisis de las secuencias de las mutantes en la MccE492.....	43
Figura 6: Análisis del sobrenadante de cultivos productores de MccE492.....	45
Figura 7: Oligomerización de la MccE492 Q8H.....	47
Figura 8: Resistencia de la MccE492 Q8H a altas temperaturas y sonicación.	48
Figura 9: Esquema para construcciones <i>T7mceBA</i> y <i>T7mceBAQ8H</i>	50
Figura 10: Expresión de MccE492 desde las construcciones <i>T7pBA</i> y <i>T7pBA Q8H</i>	51
Figura 11: Ensayo de la actividad bactericida de la MccE492 Q8H sobre <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	53
Figura 12: Ensayo de la actividad bactericida de la MccE492 Q8H sobre esferoplastos de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	54
Figura 13: Purificación de MccE492 silvestre y Q8H co-expresadas en la misma célula.	56
Figura 14: Registro de un canal formado por la MccE492 Q8H.....	59
Figura 15: Curva corriente-voltaje del canal de la MccE492 Q8H.	60
Figura 16: Ensayo de unión de rojo Congo a fibras amiloides.....	62
Figura 17: Agregación de MccE492 silvestre y Q8H en el tiempo.....	63
Figura 18: Ensayo de "seeding" usando como semilla fibras de MccE492 silvestre y Q8H.	65

Figura 19: Ensayo de viabilidad de bacterias mutantes en TonB.	67
Figura 20: Ensayo de viabilidad de esferoplastos de bacterias mutantes en TonB.	69
Figura 21: Ensayo de inmunidad sobre esferoplasto de cepas X8605 TonB Δ 43-239 y X8605 TonB S16L.....	70
Figura 22: Actividad citotóxica de las fibras de MccE492 en distintos tipos celulares.	72
Figura 23: Viabilidad de células de melanoma murino B16 tratadas con fibras de MccE492 silvestre o Q8H.	74
Figura 24: Efecto de distintas concentraciones de fibras de MccE492 silvestre y Q8H en células de melanoma murino B16.	75
Figura 25: Porcentaje de viabilidad de las células de carcinoma de colon humano HT16 tratadas con fibras de MccE492 o MccE492 Q8H.	77
Figura 26: Efecto de distintas concentraciones de fibras de MccE492 silvestre y Q8H en células de carcinoma de colon HT29.	78
Figura 27: Purificación en "batch" de la MccE492.	80
Figura 28: Agregación de MccE492 concentrada detectada por unión a tioflavina T.	81
Figura 29: Efecto del tratamiento de MccE492 administrada intratumoralmente en tumores de melanoma murino.	83
Figura 30: Efecto de la administración oral de MccE492 50 mg/Kg sobre el volumen de los tumores de melanoma murino en ratones C57/BL/6.	85
Figura 31: Efecto de la administración oral de MccE492 100 mg/Kg en el volumen de los tumores de melanoma murino en ratones C57/B6/L.	86
Figura 32: Efecto citotóxico <i>in vitro</i> de la MccE492 en células de carcinoma de colon humano.	89
Figura 33: Efecto antitumoral de las fibras de microcina administradas intratumoralmente en el modelo de cáncer de colon humano HT29.....	90
Figura 34: Efecto antitumoral de las fibras de MccE492 administradas oralmente en el modelo de carcinoma de colon humano HT29.....	94

Figura 35: Curvas concentración [³⁵S]microcina en los tejidos (respecto al suero) en el tiempo.98

Figura 36: Modelo del comportamiento de la microcina Q8H. 104

Abreviaturas

ABC	ATP-Binding Cassette
ACN	Acetonitrilo
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
bp	Pares de bases
Cm	Cloranfenicol
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
DHBS	2,3-Dihidroxibenzoilserina
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dpm	desintegraciones por minuto
DO	Densidad óptica
FBS	Suero fetal bovino
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranósido
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
LB	Caldo Luria
LDH	lactato deshidrogenasa
MccE492	Microcina E492
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxymetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium
NBT	azul de tetrazolium
nm	Nanómetro
ONPG	o-nitrofenil- β -galactósido
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMS	Fenazina metosulfato
rpm	Revoluciones por minuto
RC	Rojo Congo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamino
Tet	Tetraciclina
Tricina	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	Ultra violeta

Resumen

La microcina E492 es una bacteriocina producida por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 y activa sobre cepas de *Enterobacteriaceae*. Su mecanismo de acción requiere del reconocimiento en la membrana externa de la célula sensible por los receptores de catecoles FepA, Fiu y Cir, y de la proteína TonB para ejercer su acción tóxica en la membrana citoplasmática de la bacteria sensible.

Mediante el estudio de mutaciones puntuales de la microcina E492 se identificaron aminoácidos que son necesarios para la actividad antibacteriana. Así, dos mutantes (PL-G18S y PL-G18D) en el péptido líder no exportan la microcina al medio extracelular. Por otro lado la mutante PL-V¹5V permitió determinar que el predicho aminoácido 5 es el aminoácido en el cual se inicia la traducción de la microcina E492. La mutante Q8H es la única que afecta a la microcina E492 madura (una vez procesado el péptido líder). Esta mutación impide la translocación a través de la membrana externa de la célula blanco, pero mantiene la capacidad de formar canales iónicos y de ser activa sobre esferoplastos de bacterias sensibles. La microcina E492 Q8H se encuentra principalmente en forma oligomérica y se agrega espontáneamente formando fibras amiloides, las cuales se detectaron mediante la unión de las fibras de microcina a colorantes específicos rojo Congo y tioflavina T. La formación de estas fibras amiloides explica porqué la microcina E492 no es capaz de atravesar la membrana externa para ejercer su acción.

La microcina E492 disminuye la viabilidad de células tumorales (melanoma murino B16, adenocarcinoma colon-rectal murino MC38, carcinoma de colon humano HT29 y HCT116) sin afectar a cultivos primarios (esplenocitos y cultivos de médula ósea) o líneas celulares no tumorales (N2A y macrófagos). Estos resultados permiten explorar una nueva aplicación de la microcina E492 como agente antitumoral. Se determinó que la microcina E492 Q8H posee actividad citotóxica sobre células de melanoma murino B16 y carcinoma de colon humano HT29, y que es más eficiente en disminuir la viabilidad de estas células, pues disminuye la viabilidad en un tiempo de incubación menor y a más bajas concentraciones que la microcina E492 silvestre.

Finalmente se determinó que las fibras de microcina E492 silvestre disminuyen el tamaño de tumores de carcinoma de colon humano HT29 en un modelo *in vivo* de cáncer, el cual utiliza un ensayo "xenograft" en ratones "nude". Los resultados de estos experimentos muestran que se produce una disminución significativa del volumen y la masa de los tumores, incluso se observa remisión total en un 20% de los ratones tratados. Un efecto similar se obtiene cuando la microcina E492 es administrada por vía oral. No se observó ningún efecto tóxico en los ratones tratados con microcina E492, indicando que la microcina E492 es un buen candidato para ser usado como antitumoral.

Abstract

Microcin E492 is a bacteriocin active on several strains of the *Enterobacteriaceae* family that it is produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Its mechanism of action requires the recognition by the catecholocate receptor FepA, Fiu and Cir of the outer membrane and the protein TonB to exert the toxic activity in the inner membrane of the sensitive cells.

In this study, through point mutations on microcin E492, amino acids necessary for the antibacterial activity were identified. Thus, two mutants (PL-G18S and PL-G18D) in the leader peptide do not export microcin to the extracellular space. On the other hand, the PL-V¹5V mutant allowed the identification of the fifth amino acid as the start codon. The Q8H mutant affects mature microcin E492. This mutation interferes the translocation through the outer membrane, but maintains its capacity to form ionic channels and it is active over sensitive bacteria spheroplasts. Microcin E492 Q8H is found principally in an oligomeric form and aggregates spontaneously forming amyloid fibers, which were detected by the binding to specific colorants, such as Congo red and thioflavinT. The amyloid fiber formation would explain why this microcin mutant cannot pass through the outer membrane to exert its action.

Microcin E492 diminished the tumoral cells viability (murine melanoma B16, murine colo-rectal adenocarcinoma MC38, human colon carcinoma HT29 and HCT116) without affecting primary cell cultures (splenocytes and bone marrow cultures) or non tumoral cellular lines (N2A and macrophages). This

result allows to explore a new application of microcin E492 as an antitumoral agent. It was also determined that microcin E492 Q8H has cytotoxic activity over murine melanoma B16 cells and human colon carcinoma HT29, and that this mutant diminishes the cell viability at lower incubation times and lower concentrations than the wild type microcin.

On the other hand, it was determined that the wild type microcin E492 fibers diminished the size of human colon carcinoma HT29 tumor in an *in vivo* "xenograft" cancer model in "nude" mice. After the treatment, a significant volume and tumor mass reduction was produced, and total remission in a 20% of the treated mice was observed. A similar effect was obtained when microcin E492 was orally administrated. No toxic effect was observed in mice treated with microcinE492 indicanting that this bacteriocin is a good candidate to use as an antitumoral agent.

1. Introducción

Las bacteriocinas son un conjunto de proteínas o péptidos producidos por bacterias, que tienen actividad antibiótica sobre otras bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora. El papel fisiológico más probable de estas sustancias es permitir a la bacteria productora la colonización de un nicho, en el cual existen otras especies sensibles a la acción de la bacteriocina y que compiten con ella por los nutrientes. Las bacteriocinas actúan por mecanismos muy diversos, como la inhibición de la síntesis de proteínas (colicinas E3, E4, E5 y E6, microcina J25) (Boon, 1971; Bowman, 1971; Boon, 1972; Senior y Holland, 1971; Ogawa y cols., 1998; Tomita y cols., 2000; Bellomio y cols., 2007), degradación del DNA cromosomal (colicinas E2, E7, E8 y E9) (Toba y cols., 1998, Ohno-Iwashita y Imahori, 1980) o por la formación de poros en la membrana citoplasmática (colicinas A, B, E1, Ia, Ib, K y N, MccE492) (Luria, 1982; Cascales y cols., 2007, Ohno-Iwashita y Imahori, 1982, Lagos y cols., 1993). Según su peso molecular, las bacteriocinas de bacterias Gram negativas están clasificadas en colicinas (≥ 10 kDa) y microcinas (menor o igual a 10 kDa). Las colicinas son bacteriocinas que son liberadas al medio extracelular durante la respuesta SOS (Cotter y cols., 2005) y poseen una estructura modular compuesta por tres dominios con funciones independientes: el dominio de translocación, el dominio de unión al receptor y el

dominio tóxico (de Graaf y cols., 1978; Ohno-Iwashita y Imahori, 1980; Ohno-Iwashita y Imahori, 1982).

A diferencia de las colicinas, las microcinas no poseen dominios con función conservada, sin embargo algunas de ellas parecen poseer una organización modular, compuesta por pequeños motivos de aproximadamente 15 a 20 aminoácidos, donde cada uno de esos módulos posee un papel definido y esencial en la actividad bactericida (Azpiroz y Laviña, 2007; Destoumieux-Garzón y cols., 2002). Para ejercer su actividad algunas microcinas necesitan ser modificadas postraduccionalmente, por la adición de grupos tiazoles y oxazoles (microcina B17), formilación y unión a AMP amino propanol, en el caso de la microcina C7 (Kazakov y cols., 2007) o por la adición de salmoquelina en el caso de la microcina E492 (MccE492) y probablemente también el de las microcinas H47, M, I47 (Azpiroz y Laviña, 2007; Thomas y cols., 2004).

En este trabajo nos focalizaremos en el estudio de la microcina formadora de poros denominada MccE492.

1.1. Actividad bactericida de la MccE492.

La MccE492 es una bacteriocina producida por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 que posee actividad antimicrobiana sobre bacterias del género *Enterobacteriaceae*, tales como *Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella spp.* (de Lorenzo, 1984; Destoumieux-Garzón y cols., 2003). Mediante experimentos *in vitro* en bicapas lipídicas se ha determinado que la MccE492 forma poros en

membranas sintéticas. Esta actividad está correlacionada con la capacidad que tiene la MccE492 de disipar el potencial de membrana de la célula blanco, situación que lleva a la muerte de la bacteria (De Lorenzo y Pugsley, 1985; Lagos y cols., 1993; Destoumieux-Garzón y cols., 2003).

La MccE492 es secretada tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano (Corsini y cols., 2002), pero la forma activa se produce solo durante la fase exponencial, lo cual difiere de la mayoría de las bacteriocinas que son producidas exclusivamente durante la fase estacionaria. La pérdida de la actividad bactericida de la MccE492 durante la fase estacionaria está correlacionada con un descenso en la tasa de síntesis de las proteínas MceJI, necesarias para la modificación de la MccE492. De esta forma, en la fase estacionaria de crecimiento se acumula la forma no modificada de la MccE492 en el medio extracelular, la cual forma fibras amiloides, que contribuyen a inactivar las moléculas remanentes de MccE492 modificada (Corsini y cols., 2002; Bieler y cols., 2005).

1.2. Determinantes genéticos del sistema productor de MccE492.

Para la producción de la forma activa de MccE492 se requieren de al menos 7 determinantes genéticos que participan en los proceso de síntesis, Inmunidad, exportación y modificación de la MccE492 (Lagos y cols., 2001). Estos determinantes, ubicados en un segmento de 13 kpb del cromosoma de *Klebsiella pneumoniae* RYC492, han sido clonados y expresados en *E. coli*, permitiendo su estudio mediante mutagénesis por transposición, RT-PCR y

fusiones transcripcionales (Lagos y cols., 2001). Dentro de estos determinantes genéticos se encuentran el gen *mceA*, el cual corresponde al gen estructural de la MccE492 y codifica para una pre-proteína de 103 ó 99 aminoácidos, dependiendo de la metionina que se utilice como codón de inicio (Lagos y cols., 1999). La MccE492 es procesada proteolíticamente durante su exportación al medio extracelular, en un motivo del tipo doble glicina ubicado entre los residuos 18 y 19 (o 14 y 15 si se considera la metionina 5 como el inicio de la traducción). Además de la remoción del péptido líder, la MccE492 es modificada postraduccionalmente en su extremo carboxilo con una molécula del tipo salmoquelina (Figura 1). La salmoquelina consiste en un trímero de dihidroxibenzoil-L-serina (DHBS) (enterobactina), que está unida a una molécula de glucosa (Destoumieux-Garzón y cols., 2004). La enterobactina y salmoquelina son sideróforos que capturan el hierro extracelular y permiten la supervivencia de las bacterias en medios con muy bajas concentraciones de hierro. La modificación de la MccE492 ocurre mediante la acción conjunta de los genes propios de la bacteria productora implicadas en la síntesis de enteroquelina, entre los que destaca, *entF* que codifica para una sintetasa de enterobactina, y los genes del sistema productor de la MccE492, *mceC*, *mceI* y *mceJ* (Nolan y cols., 2007). Mutaciones en estos genes producen una microcina que es exportada al medio extracelular pero que no posee actividad bactericida. El gen *mceC* codifica para una glicosil transferasa, el gen *mceI* posee homología con una aciltransferasa y *mceJ* no posee homólogo conocido (Lagos y cols., 2001).

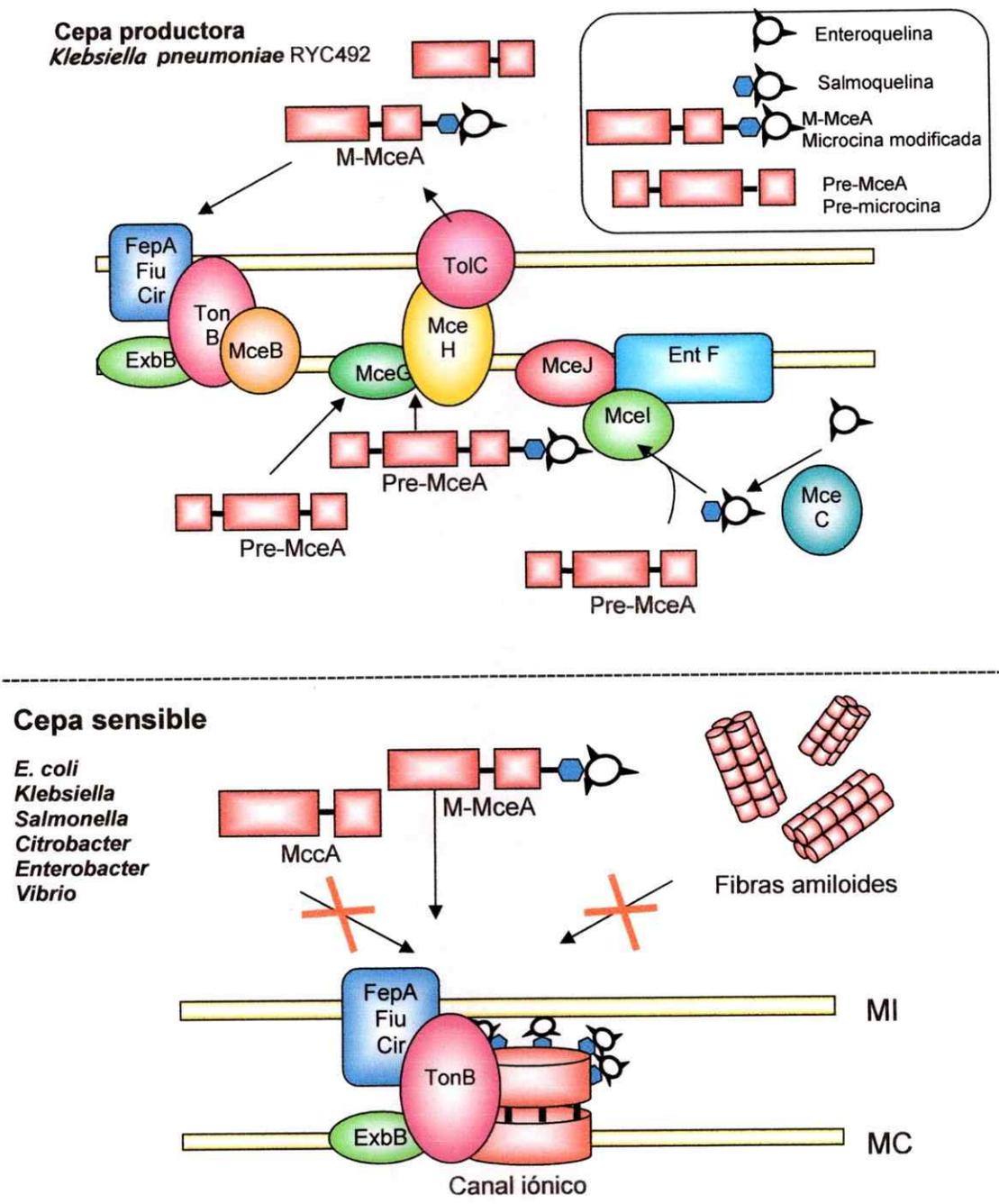


Figura 1: Modelo de la acción y producción de la MccE492.

En la parte superior de la figura se muestran las proteínas necesarias para la producción, modificación, exportación e inmunidad (MceB) de la MccE492. Se representan las proteínas del sistema de la microcina y las proteínas de la bacteria productora (EntF y TolC). En la parte inferior de la figura, se representa un diagrama de las proteínas necesarias para la actividad de la microcina E492 en la bacteria sensible (TonB, ExbB, FepA, Fiu y Cir). Se puede apreciar que en el medio extracelular se acumulan tres tipos de microcina: modificada, no modificada y fibras amiloides, de ellas solamente la microcina modificada es reconocida por los receptores de membrana externa y necesaria para la actividad bactericida.

Genes similares han sido descritos en los sistemas productores de microcinas H47, M, I47, sin embargo la participación de estos genes en la modificación de sus respectivas microcinas no ha sido aún demostrada (Azpiroz y Laviña, 2004). Las microcinas E492, H47, I47 y M presentan en su carboxilo terminal un motivo conservado rico en serina de aproximadamente 11 aminoácidos, que probablemente constituye la señal para la modificación postraduccional. En los sistemas de producción de las microcinas E492 y H47 la serina terminal es esencial para su actividad, pues la eliminación de este aminoácido del gen estructural produce una microcina inactiva (Bieler y cols., 2006). La modificación es esencial para el reconocimiento de la microcina por los receptores de membrana externa de la bacteria sensible, una vez en el espacio periplasmático, la microcina no requiere estar modificada para ejercer su acción bactericida (Lagos y cols., 2001, Azpiroz y Laviña, 2007).

El gen *mceB* codifica para la proteína de la inmunidad a la MccE492, es decir es la proteína que previene la actividad bactericida de la MccE492 sobre la cepa productora (Figura 1). Esta proteína se localiza en la membrana citoplasmática, posee 3 hélices transmembrana y su extremo amino y carboxilo se localizan en el periplasma y citoplasma respectivamente (Lagos y cols., 1999; Baeza, 2003). La actividad de protección de la inmunidad MceB ocurre por un mecanismo aún no definido, pero su asociación a la membrana citoplasmática permite inferir que evita la formación del poro en la membrana,

ya sea por interacción directa con la microcina o bien con la proteína TonB la cual es necesaria para la actividad de la MccE492.

Los otros determinantes genéticos en este sistema son los genes *mceG* y *mceH* los cuales forman parte de un sistema de exportación de tipo I (Figura 1), que es específico para la MccE492. En este sistema se procesa la pre-microcina, la cual posee un péptido líder en el extremo amino que es reconocido y clivado por el transportador ABC durante la exportación. El reconocimiento y clivaje del péptido líder ocurre en un motivo del tipo doble glicina ampliamente conservado en este tipo de exportadores. El péptido líder corresponde a un péptido de 18 aminoácidos (o 13 aminoácidos), necesario para reconocer el exportador. Este segmento de las microcinas es definido como un módulo, ya que actúa en forma independiente del resto de la bacteriocina.

Los sistemas de exportación tipo I son utilizados por variadas bacteriocinas, incluyendo la colicina V (Fath y Kolter, 1993). Está formado por una proteínas de membrana citoplasmática de la familia de transportadores ABC ("ATP binding cassette"), los cuales utilizan la hidrólisis de ATP para la exportación. En el sistema productor de la MccE492 éste corresponde al producto del gen *mceG*. El segundo componente sistema de exportación (MceH) corresponde a la proteína auxiliar, la cual se encuentra anclada a la membrana interna pero orientada hacia el periplasma. La función de MceH es conectar la proteína transportadora con la proteína de membrana externa TolC (Figura 1). La proteína TolC esta codificada en el cromosoma de *E. coli* y *K.*

pneumoniae y cumple variadas funciones, participando en la exportación de la MccE492 (Lagos y cols., 2001), colicina V (Hwang y cols., 1997), microcina J25 (Delgado y cols., 1999) y microcina H47 (Azpiroz y cols., 2001). Los tres componentes del sistema de exportación forman un canal que conecta el citoplasma con el espacio extracelular por el cual las moléculas son exportadas (Bleuel y cols., 2005).

1.3. Actividad bactericida.

1.3.1. Receptor de membrana externa.

En la bacteria sensible, la MccE492 es reconocida en la membrana externa por las proteínas FepA, Fiu y Cir, los cuales son receptores de sideróforos catecólicos (Figura 1). Estos receptores poseen una hoja plegada β en el dominio de interacción con la membrana externa y un segmento globular en el extremo amino terminal, el cual es necesario para la apertura y cierre del receptor (Ferguson y cols., 1998; Ferguson y cols., 2002; Locher y cols., 1998; Buchanan y cols., 1999; van der Helm y cols., 2002; Yue y cols., 2003; Cherezov y cols., 2006; Devanathan y Postle, 2007). La proteína FepA es el principal receptor de la MccE492, siendo el aporte de Fiu y Cir menor (Strahsburger y cols., 2005). La presencia de la modificación en el extremo carboxilo terminal de la MccE492 es esencial para el ingreso de la microcina a la célula, ya que preparaciones de microcinas a partir de los mutantes en los genes *mceC*, *mce IJ* son inactivas sobre bacterias sensibles, pero presentan actividad sobre esferoplastos, es decir células a las cuales se ha

permeabilizado la membrana externa. La modificación de la MccE492 corresponde a moléculas catecólicas derivadas de enterobactinas, las cuales son reconocidas por este tipo de receptores. Esto explicaría la necesidad de la modificación para la actividad bactericida. Se ha determinado que los últimos 11 aminoácidos de la MccE492 y H47 son esenciales para la modificación, por lo que podría clasificarse como un módulo, pues al igual que el péptido líder, funciona en forma independiente y cumple una función esencial en el mecanismo de acción de la bacteriocina. La utilización de molécula del tipo catecol para el ingreso de la bacteriocina a la bacteria blanco, es denominada estrategia caballo de Troya, pues estas moléculas son reconocidas por los receptores de sideróforos tipo catecólicos. La bacteria sería "engañada" y permitiría la entrada de una sustancia tóxica en vez de un compuesto beneficioso como los sideróforos unidos a hierro (Fishbach y cols., 2006).

1.3.2. TonB.

Luego que la MccE492 ingresa al espacio periplasmático, requiere de la presencia de TonB para su actividad bactericida (Figura 1). TonB es una proteína de 239 aminoácidos cuya función fisiológica es transducir energía desde la membrana citoplasmática a la membrana externa. Esta proteína está compuesta por tres dominios: El dominio amino terminal (aminoácido 1-65), que cumple la función de anclar la proteína a la membrana citoplasmática; el dominio central o segmento espaciador rico en prolinas (aminoácido 66-102), que se encuentra en el periplasma; y finalmente el dominio carboxi terminal

(aminoácido 103- 239), el cual es esencial para la interacción con los receptores ubicados en la membrana externa (Larsen y cols., 2003; Postle, 1990; Postle y Larsen, 2007). TonB participa en el transporte de nutrientes, tales como sideróforos y vitamina B12, que ocurre entre la membrana externa al espacio periplasmático mediante una interacción con receptores de membrana externa. Para la transducción de energía requiere de las proteínas ExbB y ExbD, proteínas ubicadas en la membrana citoplasmática (Larsen y cols., 1999). El mecanismo por el cual ocurre la transferencia de energía no está claro, solo se sabe ExbB y ExbD son necesarias para que ocurra el transporte TonB dependiente y que las proteínas ExbB y ExbD contribuyen a la estabilidad de la proteína TonB. TonB está involucrada en la actividad de las colicinas del grupo B: colicinas D, H, Ia, Ib, M, 5 y 10 las cuales ingresan por un transporte dependiente de TonB. La mayoría de estas colicinas incluyen una secuencia TonB box, al igual que los transportadores dependientes de TonB. Solo la colicina Js no requiere de la secuencia TonB box para ser importada, pero al igual que las microcinas, es una proteína de bajo peso molecular, lo cual podría explicar este fenómeno (Smajs y Weinstock, 2001; Cascales y cols., 2007). La MccE492 requiere de TonB a lo menos en los pasos siguientes a la captura mediada por los receptores. Esto se concluyó de la observación de los siguientes experimentos:

- 1.- Esferoplastos de bacterias sensibles a la MccE492, los cuales no tienen los receptores para la actividad bactericida, son sensibles a la MccE492.

2.- Esferoplastos de bacterias que carecen del gen que codifica para TonB, son resistentes a la actividad bactericida de la MccE492 (Lagos y cols., 2001). Esto indica que TonB podría ser necesaria en la formación de los canales iónicos, como parte del canal, ó contribuyendo a la inserción de la MccE492 a la membrana citoplasmática.

Mediante mutagénesis compensatoria, se determinó que el residuo S16 de TonB es importante para la interacción con ExbB (Larsen y cols., 2007). En nuestro laboratorio, mediante mutagénesis al azar se obtuvo la mutante TonB S16L y se demostró que este cambio aumenta significativamente la resistencia a la acción bactericida de la MccE492, indicando que el complejo TonB-ExbBD no es funcional. Además se describió una posible interacción entre la proteína de la inmunidad MceB y TonB la cual requiere del residuo S16 (Baeza, 2003), estos antecedentes indican que el residuo S16 de TonB es esencial para las interacciones de esta proteína con otras, como ExbB ó MceB.

1.3.3. Formación de poros.

La actividad formadora de poros de la MccE492 ha sido demostrada utilizando variados modelos. En modelos *in vitro* de bicapas lipídicas la MccE492 aumenta la conductividad de cationes y forma canales de iones (Lagos y cols., 1993). En experimentos *in vivo* se determinó que la MccE492 es capaz de permitir el ingreso de ONPG (o-nitrofenol β -D- galactopiranosido) sin producir la lisis total de la bacteria (Destoumieux-Garzon y cols., 2003). También *in vivo* la MccE492 produce una pérdida del potencial de membrana, lo

cual produce la muerte de la bacteria (de Lorenzo y Pugsley, 1985). Este mecanismo de toxicidad ha sido descrito para numerosas bacteriocinas, las cuales actúan por diferentes vías, sin poseer estructuras proteicas conservadas, siendo el denominador común sus propiedades altamente hidrofóbicas (Panchal y cols., 2002). Otro factor que es importante para la actividad de la MccE492 es el complejo de proteínas ManYZ, que corresponden a los componentes de la membrana interna de la manosa permeasa (Bieler y cols., 2006). La proteína manosa permeasa es la encargada de acoplar el transporte del azúcar manosa con su fosforilación (Erni y cols., 1989). A partir de una colección de mutantes obtenidas mediante transposición, se evaluaron mutantes resistentes a la MccE492 expresada en ausencia de la inmunidad. El rol de estas proteínas en la actividad bactericida de la MccE492 no ha sido definido aún, pero se piensa que podrían participar en la adquisición de la estructura activa necesaria para que la MccE492 se inserte en la membrana, o bien como parte de la estructura tóxica, es decir que participen en la formación del poro (Bieler y cols., 2006).

1.3.4. Formación de fibras amiloides.

Una característica interesante de la MccE492 es su capacidad de formar fibras amiloides. Estas son una estructura molecular formada por múltiples subunidades de MccE492, que adquieren una estructura característica y propiedades diferentes. Durante la formación de la fibra amiloide se observa que el contenido de estructura secundaria de la MccE492 cambia. La forma soluble de la MccE492 posee mayoritariamente estructura α -hélice, pero

cuando comienza a agregarse el contenido de hoja beta aumenta significativamente, al igual de lo que sucede con otras proteínas que forman fibra amiloide (Baxa y cols., 2007). Las fibras de MccE492 se han caracterizado por su interacción con colorantes específicos para las fibras amiloides, como tioflavina T y rojo Congo (Bieler y cols., 2005). Las fibras de MccE492 se forman a pH 7,0 *in vitro*, pero también se ha reportado que estas fibra se forman en el sobrenadante de un cultivo líquido en fase estacionaria de la bacteria productora, fase en la cual la MccE492 pierde su actividad bactericida (Bieler y cols., 2005). Las fibras amiloides de la MccE492 carecen de actividad bactericida, probablemente por su incapacidad de interactuar con el receptor de membrana externa. Es difícil diferenciar si la formación de fibras amiloides *in vivo* es la causa de la pérdida de la actividad bactericida durante la fase estacionaria de crecimiento bacteriano, o bien, si la acumulación de MccE492 no modificada en el medio extracelular, la cual se agrega con más facilidad y no posee actividad bactericida y que trae como consecuencia la formación del amiloide.

1.4. Actividad antitumoral de la MccE492.

En nuestro laboratorio se demostró que *in vitro* la MccE492 posee actividad citotóxica sobre células en cultivo de origen maligno (Hetz y cols., 2002) (Figura 2). El análisis del efecto citotóxico sobre distintos tipos de células (HeLa, Jurkat, RJ 2.2.5) mostró que esta actividad es específica para algunos tipos de células tumorales, sin producir efectos en cultivos primarios de células

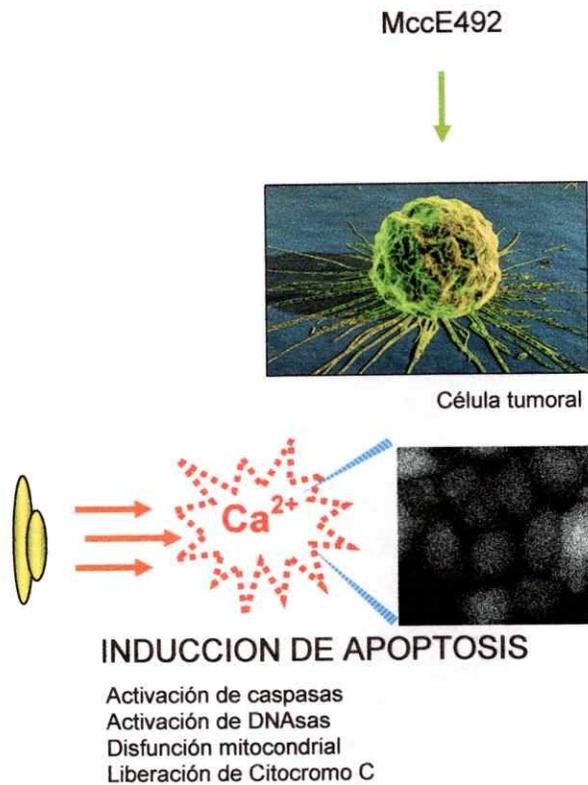


Figura 2: Actividad de la microcina E492 sobre células tumorales.

La figura muestra un esquema del mecanismo de acción de la microcina E492 sobre células tumorales. La microcina E92 induce la liberación de calcio desde los reservorios internos, la activación de caspasas, activación de DNAsas, disfunción mitocondrial y liberación de citocromo C, eventos presentes en la apoptosis.

normales (AMG-3). En células HeLa se describió que a bajas concentraciones la MccE492 induce apoptosis, en tanto que a altas concentraciones se produce necrosis. A bajas concentraciones (condición apoptótica), la MccE492 produce liberación de calcio de los reservorios intracelulares, activación de caspasas y degradación de DNA cromosomal (Figura 2) (Hezt y cols, 2002). Por otro lado, se demostró que las fibras amiloides de MccE492 son más tóxicas para las células tumorales que la MccE492 soluble o que es protofibrilar (Estrada, 2005). Se demostró que la microcina es capaz de producir disminución del volumen y masa tumoral *in vivo* en un modelo de tumor de melanoma murino (Estrada, 2005), y que la microcina se localiza en los tumores. Adicionalmente, el tratamiento produjo una disminución de la angiogénesis, sin infiltración de macrófagos, lo cual indicaría que el efecto observado no es debido a la acción del sistema inmune.

La determinación de cuales son los aminoácidos esenciales para su actividad bactericida ayudará a comprender el mecanismo de acción de la MccE492 y serviría para el diseño de moléculas en una aplicación como antimicrobiano. Por otro lado, la MccE492 posee propiedades antitumorales, lo cual hace importante el estudio de esta característica, de manera de evaluar su aplicación como anticancerígeno.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es determinar cuales aminoácidos son esenciales o importantes para la actividad bactericida y asociarlos con alguna

función dentro del mecanismo de acción. Adicionalmente, caracterizar la acción citotóxica en células tumorales.

Este objetivo se abordará desde un punto de vista genético, por mutagénesis al azar y posterior caracterización de mutantes que afecten los distintos pasos involucrados en la actividad bactericida de la MccE492.

El efecto de la MccE492 sobre células tumorales será abordado utilizando modelos de tumores *in vivo*:

a) Melanoma murino B16.

b) Carcinoma de colon humano HT29.

Estos modelos se evaluarán primero *in vitro* en cultivos celulares y posteriormente *in vivo* mediante la administración intratumoral y oral de la MccE492.

2. Materiales y Métodos

2.1 Reactivos químicos.

El anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa y el reactivo para detección por luminisencia ECL Plus, se obtuvieron de Amersham Biosciences, New Jersey, USA.

Metionina ^{35}S y el líquido de centelleo se obtuvo de Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA.

Ketamina (anestésico) se compró en Burns Veterinary Supply, Inc, UTMB, TX, USA.

Medio de cultivo celular RPMI 1640 con rojo fenol, medio de cultivo celular RPMI 1640 sin rojo fenol y medio de cultivo celular Mc Coy's se adquirieron en Cellgro, Manassas, VA, USA.

De Merck, (Darmstadt, Alemania) se obtuvo el azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, carbonato de sodio, cloruro de calcio, acetonitrilo.

El Suero fetal bovino (Fetalplex) se compró en *Gemini bio-products*, West Sacramento, CA, USA.

La penicilina-estreptomicina, Tryple express (trypsin-like), se obtuvieron de Invitrogen Life Technologies (California, USA).

De Winkler limitada (Santiago, Chile) se obtuvo cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio hexahidratado, tris, glicina, glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, β -mercaptoetanol, citrato de sodio, marcador de proteína

preteñido, agarosa, acetato de amonio, sacarosa, TEMED, acrilamida, marcador DNA escala 1 kb.

El solubilizador de tejidos se obtuvo de Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA.

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

De DIFCO Laboratorios (Detroit, Michigan, USA) se obtuvo triptona, extracto de levadura y casaminoácidos.

CellTiter96 Aqueous y Citotox96 se adquirieron en Promega (Madison, USA).

Las sales M9, xilazina (anestésico), bisacrilamida, SDS, fosfato di-ácido de potasio, azul brillante de coomasie, glucosa, Tween 20, Tricina, ácido trifluoroacético, rojo Congo, tioflavina T, PIPES se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA).

Las columnas Sep-Pak C18 y la resina C18 silica gel se compraron en Waters.

2.2. Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas de bacterias y plásmidos utilizados en este estudio están descritas en las Tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1: Cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio.

Cepas	Genotipo	Fuente/ Referencia
BL21	<i>F ompT hsd</i>	Novagen
BL21(DE3)	BL21 λ (DE3)	Novagen
X8605	<i>F', trpR Δ(lac)U169, strpA Δ(tonBlacP)</i>	Guarente y Beckwith., 1978
VCS257	DP50, <i>supF[^{supE44}, ^{supF58}, ^{hsd53(r_{BMB})}, ^{dapD8}, ^{lacY1}, ^{glnV44 Δ(gal-uvrB)47}, ^{tyrT58}, ^{gyrA29}, ^{tonA53Δ(thyA57)}]</i>	Stratagene

Tabla 2: Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Genotipo/fenotipo	Fuente/Referencia
pJAM434	Plásmido que contiene los genes para la producción de MccE492 activa. Derivado de pJ construido en el cosmidio pH79 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con Sau3A. Amp ^r .	Wilkins y cols., 1997
pJAM229	Plásmido derivado de pJ. Posee el fragmento interno XhoI invertido respecto a pJAM434. Produce MccE492 activa. Amp ^r .	Wilkins y cols., 1997
pJEM15	Derivado de pJAM229. Posee doble copia del en <i>mceF</i> . Sobreproductor de MccE492. Amp ^r .	Wilkins y cols., 1997
np108	Derivado de pJAM434 Tn5:: <i>mceG</i> .	Lagos y cols., 2001
np220	Derivado de pJAM434 Tn5:: <i>mceA</i> .	Lagos y cols., 2001
pBA	Genes <i>mceBA</i> clonados en el vector pACYC184.	Strahsburger y cols., 2004
T7pBA	Genes <i>mceBA</i> bajo el control del promotor T7 clonados en pACYC184.	Este trabajo
pBA Q8H	pACYC184 <i>mceBA</i> microcina mutante Q8H.	Este trabajo
T7pBAQ8H	pACYC184 <i>mceBA</i> microcina mutante Q8H bajo el control del promotor T7.	Este trabajo
pIM91	pSU2718 <i>tonB</i> .	Traub y cols., 1993
pIM91 Δ 43-239	<i>tonB</i> Δ 43-239.	Tello, M.
pIM91S16L	<i>tonB</i> S16L.	Baeza, 2003
p157	Fragmento de 0,3 kb <i>NdeI-EcoRI</i> (<i>mceB</i>) desde pBSC47 en pT7-7.	Lagos y cols., 1999

2.3. Líneas celulares y cultivos primarios.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: B16 (melanoma murino), MC38 (adenocarcinoma colon rectal murino), N2A (línea neuronal humana), HT29 (carcinoma de colon humano, ATCC HTB-38), HCT116 (carcinoma de colon humano, ATCC CCL-247) donadas por Dr. Claudio Soto, University of Texas Medical Branch, TX, USA. Cultivos primarios de linfocitos y monocitos/macrófagos de ratón se generaron siguiendo protocolos estándares (Estrada, 2005).

2.4. Animales.

Ratones C57BL/6 y "nude" se obtuvieron de Harlan Sprague Dawley. Los animales eran de aproximadamente dos meses de edad cuando se comenzaron los experimentos y se mantuvieron con un régimen estándar de alimentación *ad-libitum* y ciclos luz/oscuridad. Los animales "nude" se mantuvieron en condiciones de esterilidad, al igual que los alimentos y agua administrada en el bioterio.

2.5. Medios de cultivo.

Caldo Luria: Bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, NaOH 3,5 mM. Se utilizó para el crecimiento de las cepas de *E. coli*.

Medio SOB: Bactotripton 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 2,5 mM. Se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 5N.

Medio SOC: Al medio SOB estéril se le añadió glucosa a una concentración final de 0,02%. La solución de glucosa se preparó y esterilizó mediante filtración, utilizando filtros de 0,2 μm .

Medio mínimo (M9): Na_2HPO_4 6g/L, KH_2PO_4 3g/L, NaCl 0,5 g/L, NH_4Cl 1 g/L. Se suplementó con CaCl_2 0,1mM; MgSO_4 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1mg/mL, casaminoácidos 1mg/mL, y 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% de agar.

Placas con células indicadoras: Sobre placas de agar LB se depositaron 3 mL de agar LB al 0,7% en el cual se incluyó 300 μL de un cultivo bacteriano (cepa indicadora) crecido toda la noche.

Las células bacterianas se crecieron en placas o en medio líquido suplementado con antibióticos, cuya concentración final es la siguiente: ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ y cloramfenicol 50 $\mu\text{g/mL}$.

2.6. Técnicas moleculares.

Todas las operaciones no detalladas (subclonamientos, PCR, aislamiento de DNA, preparación de células electrocompetentes, transformación, electroporación, etc.) se realizaron utilizando métodos estandarizados (Sambrook y cols., 1989).

Para las reacciones de PCR se utilizaron los partidores que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Partidores utilizados en este estudio.

Partidor	Secuencia (5'→3')
AB carboxi	ATTAGGATCCTTTAACTACCCACTACCGGAACTGGA
RL1	CGGATAAAACATATGACATTACTTTCATTTGG
RL3	GAAATTTTCAGGCAGAATTCTGGTGCAGTTGCA
proT7	TAATACGACTCACTATAGGG
M13F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAAGG
MP18	AGCGGATAACAATTTCACACAGGAT

2.7. Aislamiento y purificación de MccE492.

2.7.1. Purificación de microcina mediante cromatografía en fase reversa.

La forma activa de la MccE492 se extrajo desde el sobrenadante de la cepa de *Escherichia coli* VCS257pJEM15 o BL21pJEM15, crecida en medio mínimo M9 (Miller, 1972) suplementado con citrato y glucosa al 2% p/v (Orellana y Lagos, 1996). El sobrenadante obtenido por centrifugación (a 8000 rpm por 30 min en un rotor GSA) de 1 L de cultivo inoculado a una dilución de 1/10000 y crecido durante 20 h se filtró a través de una columna Sep-Pack C18 (Waters). La columna se lavó con 5 mL de metanol 60% y ACN 35% y la microcina se eluyó con 3 mL de ACN al 50%. La microcina obtenida en acetonitrilo es estable y mantiene su actividad por meses.

2.7.2. Aislamiento y purificación de MccE492 en "batch".

Para la obtención de grandes cantidades de MccE492 se adaptó el método antes mencionado a un sistema de purificación en "batch" a partir de 5 litros de cultivo bacteriano. Las bacterias productoras de MccE492, silvestre o mutantes, se cultivaron en forma similar a lo descrito en Materiales y Métodos 2.7.1. El sobrenadante se incubó por 30 min con la resina C18, previamente activada en ACN al 100% durante toda la noche. El sobrenadante se descartó por filtración y la microcina unida a la resina se retuvo en un embudo Büchner con un papel filtro. La resina se lavó con 100 mL de metanol al 60% y 100 mL

de ACN al 25%. La microcina se eluyó utilizando 50 mL de soluciones de ACN entre las concentraciones de 30% y 100% v/v.

2.7.3. Cuantificación de la MccE492.

La microcina obtenida a partir de las purificaciones se cuantificó mediante el kit Micro BCA protein assay (Pierce), según las recomendaciones del fabricante.

2.8. Geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS).

Los geles se prepararon con tres fases: separadora, espaciadora y concentradora. El gel separador consistió en 16,5% de acrilamida (3% entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1% y glicerol 10%. El gel espaciador consistió en 10% de acrilamida (3% entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1%. El gel concentrador contenía 3% acrilamida (3% entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1%. A cada solución se le agregó persulfato de amonio y 2,2 mM de TEMED. Se utilizaron las siguientes soluciones de corrida: para el cátodo, Tris-HCl 0,1 M pH8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1%; para el ánodo Tris-HCl 0,2 M pH 8,9. El acetonitrilo de las muestras se evaporó mediante un concentrador CentriVap (Labconco), y luego se agregó amortiguador de carga 4X (glicerol al 40%, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, SDS 10 %, β -mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0,04% (p/v)). La mezcla se calentó en un termoblock a 95°C durante 3 min y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE.

2.9. Western blot.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h a 100 V y -20°C empleando amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% v/v) previamente enfriado. La membrana se bloqueó con leche descremada (Svelty) al 5% en TS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente, luego la membrana se incubó durante 2 h con una dilución 1:1000 de anticuerpo primario policlonal de conejo preparado contra el fragmento C-terminal de la MccE492 (SGSGYNSATSSSGSGS). Posteriormente la membrana se lavó con amortiguador TS-Tween y se incubó durante 2 h con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina o peroxidasa en una dilución 1:20000. Finalmente la membrana se reveló colocando la membrana en 10 mL de amortiguador para fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM), y se adicionó 33 µL de BCIP (0,5 g del reactivo disuelto en 10 mL de dimetilformamida 100%) y 66 µL de NBT (0,5 g del reactivo disuelto en 10 mL de dimetilformamida 70%), o por electroquimioluminiscencia.

2.10. Electroquimioluminiscencia (ECL).

La membrana se reveló en 10 mL de Tris-HCl 100 mM pH 8,5, con 50 µL de luminol 250 mM (preparado en DMSO al 100 %) y 22 µL de ácido p-cumárico 90 mM (preparado en DMSO al 100 %). La reacción de quimioluminiscencia se inició agregando 3 µL de peróxido de hidrógeno 30%.

La membrana se expuso entre 5 s y 2 min, dependiendo de la intensidad de la señal obtenida.

2.11. Ensayo de la actividad bactericida de las muestras de MccE492.

2.11.1. Ensayo de la viabilidad en cultivos líquidos.

Cada vez que se ensayó la actividad bactericida de la microcina en cultivo líquido, el acetonitrilo se evaporó y la muestra se resuspendió en el mismo volumen de agua o amortiguador correspondiente. Alícuotas de 100 μL de la muestra de MccE492 se mezclaron con 100 μL de un cultivo de la cepa a probar ($A_{600} \sim 0,6$) y se incubaron a 37°C por 30 min. Diluciones seriadas de esta mezcla se sembraron sobre agar-LB y el número de células sobrevivientes se determinó mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando el método de la microgota (10 μL). El porcentaje de células viables se determinó con respecto al control que corresponde a las células sin tratamiento. Como cepa indicadora sensible a la actividad bactericida se utilizó *E. coli* BL21(DE3)p11 α 2.

2.11.2. Ensayo de la actividad bactericida sobre césped bacteriano.

Alícuotas de 5 μL de diluciones seriadas de la muestra de MccE492 se depositaron sobre un césped de *E. coli* BL21(DE3)p11 α 2, que se incubó por 12 h a 37°C. La actividad bactericida se visualizó como un halo de inhibición de crecimiento y se expresó en unidades arbitrarias por mL (AU/mL) de acuerdo a

la última dilución en que se observó halo de inhibición (Mayr-Harting y cols., 1972).

2.12. Mutagénesis *in vitro* del gen *mceA*.

La mutagénesis se realizó de acuerdo a lo descrito por Miller (1992). El plásmido pBA (que porta los genes *mceBA*), se incubó durante 36 h a 37°C con 0,4 M hidroxilamina, 0,5 M fosfato de potasio, 5 mM EDTA. Las muestras se dializaron contra 2 L de 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA. pH 7,5 por 2 h a 4°C con cambios de amortiguador cada 40 min. El DNA se precipitó con etanol y se utilizó para transformar mediante electroporación la cepa *E. coli* VCS257np220 (mutante por transposición Tn5 en el gen *mceA*). Se seleccionaron los clones que no presentaron actividad bactericida sobre un césped sensible a MccE492. La ausencia de actividad bactericida se confirmó sembrando 5 µL de cultivo bacteriano de cada clon sobre el césped indicador, seleccionando los clones incapaces de formar halo de inhibición de crecimiento. Se aisló el DNA plasmidial y el gen *mceA* se secuenció utilizando los partidores RL1 y AB-carboxi (Tabla 3).

2.13. Preparación de esferoplastos.

Los esferoplastos se prepararon 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 $A_{600} \sim 0,5$. 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% sacarosa, pH 8,0. Mientras se mantenía una agitación constante, se adicionó lentamente 2 mL de una solución de 0,1 M EDTA, pH 8,0, y se incubó por 15 min. Posteriormente, también lentamente se adicionó 1 mL de una solución 2 mg/mL de lisozima y se incubó por 15 min. En forma rutinaria la cantidad de esferoplastos se determinó por la disminución del título celular después de diluciones seriadas en agua (solución hipotónica) *versus* la obtenida en presencia de sacarosa.

2.14. Ensayos de sensibilidad a MccE492 sobre esferoplastos.

Se incubaron durante 20 min alícuotas de 100 μ L de esferoplastos con 100 μ L de muestra de MccE492 en la concentración deseada y resuspendida en el amortiguador Tris-HCl, 100 mM, 20% sacarosa, pH 8,0. Se sembraron diluciones seriadas en el mismo amortiguador sobre placas agar-LB y el título celular se determinó mediante el conteo de UFC (unidades formadores de colonias). El porcentaje de viabilidad de los esferoplastos se estimó respecto del control sin tratamiento con MccE492.

2.15. Ensayo de inmunidad a la MccE492.

Alícuotas de 300 μ L de la cepa a analizar se mezclaron con 3 mL de agar blando (0,7% p/v) que fue depositado sobre placas de agar-LB. Se sembraron alícuotas de 5 μ L de diluciones seriadas de MccE492 purificada sobre este césped. Las células inmunes no presentaron la formación de halos de inhibición.

2.16. Formación de canales iónicos *in vitro*.

Para los experimentos de formación de canales iónicos en bicapas lipídicas se usó MccE492 purificada por el método de cromatografía de fase reversa y eluida con ACN al 50%. El eluido activo se concentró en concentrador CentriVap (Labconco) y se resuspendió en solución amortiguadora MES 10 mM pH 6,7.

Las membranas lipídicas se formaron con una mezcla de lípidos palmitoiloleoilfosfatidil etanolamina (POPE) y fosfatidilcolina (PC), en una relación de 4:1 con una concentración final de lípidos de 20 µg/mL en decano. Las membranas se formaron pincelando la mezcla de lípidos en un pequeño orificio (360 µm) que separa dos cámaras que contienen una solución salina de KCl 0,1M, MES-KOH 10 mM, pH 6,7-7,0. Una de las cámaras que separa la membrana (*cis*) fue conectado a una fuente de voltaje DC que permitía la aplicación de voltajes entre 0 a ± 200 mV. La corriente que pasa a través de la membrana como resultado del voltaje aplicado se midió mediante un transductor corriente-voltaje conectado al otro compartimiento (*trans*), que estaba a tierra virtual. La corriente fue monitoreada simultáneamente en un registrador de papel, en un osciloscopio y grabada en una cinta de video. Se trabajó con membranas que presentaban una capacidad de 100pF y que eran estables durante al menos 10 min. La MccE492 se aplicó pincelando los lípidos en el lado *cis*, obteniéndose la incorporación de canales en un breve lapso de tiempo (10 min como máximo).

2.17. Ensayo de agregación de la MccE492 *in vitro*.

2. 17.1. Preparación de las muestras de MccE492.

Las muestras purificadas de MccE492 se concentraron mediante concentrador CentriVap (Labconco), posteriormente y con el fin de disolver agregados preformados, se suspendieron en NaOH 10 mM pH 12 y se incubaron a 37°C por 15 min. Las muestras se centrifugaron a 16000 x g por 30 min a 4°C. Las muestras de MccE492 utilizadas en los ensayos de inoculación de ratones "nude" se concentraron mediante liofilización, para esto, las eluciones obtenidas en las purificaciones de MccE492 se congelaron en ACN al 50% y se concentraron en un liofilizador (Labconco), durante 24 h. Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante de las muestras tratadas mediante el kit Micro BCA protein assay (Pierce). Las muestras se diluyeron en amortiguador de agregación (10 mM PIPES-NaOH, pH 6,5, 0,5 M NaCl) a una concentración de 400–200 µg/mL y se incubaron con agitación a 37°C durante 15 h.

2.17.2. Detección de la formación de agregados amiloides.

2.17.2.1. Espectro de absorción de rojo Congo (RC).

Las muestras de MccE492 previamente agregadas se incubaron con 11 µM de RC por 15 min a 37°C y luego se determinó el espectro de absorbancia entre 400 y 700 nm en un espectrofotómetro con arreglo de diodos 8452A (HP). El espectro de RC unido se obtuvo restando el espectro de la MccE492 del

espectro de la MccE492 unida a RC. El espectro de RC libre se obtuvo restando el espectro del amortiguador utilizado del espectro de RC en el mismo amortiguador. Para cuantificar las fibras amiloides, se utilizó el ensayo de RC y se cuantificó el porcentaje de RC unido a las fibras, el procedimiento utilizado se describe a continuación. Posterior a la unión de RC a las fibras, las muestras se centrifugaron por 30 min a 14000 rpm. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a 490 nm, el porcentaje de RC unido se obtuvo respecto a la absorbancia del RC en amortiguador (100% RC libre). Las cinéticas de agregación en presencia de semillas preformadas (ensayo de "seeding") se detectaron mediante la unión de rojo Congo. Las semillas utilizadas se obtuvieron de muestras preagregadas por 48 h y sonicadas durante 10 s a una intensidad de 3.5 watts (Sonicator 3000, Micromix). El porcentaje final de semillas incorporadas al ensayo fue del 5 %.

2.17.2.2. Detección de fibras amiloides por emisión de tioflavina T.

Las muestras de 100 μ L de MccE492 a una concentración de 400-200 μ g/mL agregadas según el procedimiento en 2.17.1 se sonicaron (5 ciclos de un pulso de 30 s seguidos por una pausa de 1 min) y posteriormente se diluyeron a la mitad con glicina 100 mM pH 9,5. Se agregó tioflavina T (ThT) a una concentración final de 5 μ M y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se utilizó como longitud de onda de excitación 430 nm y se registró la emisión entre 440 y 700 nm.

2.18. Cultivo celular y ensayos de citotoxicidad de la MccE492.

2.18.1. Ensayos de citotoxicidad *in vitro*.

Las líneas celulares B16, N2A, macrófagos y cultivos primarios se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las líneas celulares HT29 y HCT116 se cultivaron en medio Mc Coy's suplementado al 10% con suero fetal bovino. Para los experimentos de toxicidad, las células B16, HT29 y HCT116 se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 100.000 células por mL. Habitualmente se usó 50 μ M de MccE492 o a la concentración indicada. La solución con MccE492 se incubó previamente a la luz UV por 10 min, se diluyó en medio de cultivo y posteriormente se agregó a las células.

2.18.2. Ensayos de proliferación celular.

Se determinó la citotoxicidad utilizando el kit de proliferación celular CellTiter96 AQueous (Promega). Luego de la incubación de las células en cultivo con la MccE492, se agregaron 20 μ L del reactivo MTS a cada pocillo. Después de 3 h de incubación a 37°C, las células vivas metabolizan el MTS al compuesto coloreado formazán. La viabilidad celular es directamente proporcional a la absorbancia del formazán a 490 nm.

2.18.3. Determinación de la muerte celular.

El ensayo consistió en la medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante utilizando el kit de LDH Citotox96

(Promega). Después del tratamiento de la célula en cultivo con la MccE492 la placa se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. Se transfirieron 50 μ L de cada sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos, a la cual se agregan 50 μ L de substrato, y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. La actividad de la enzima LDH es directamente proporcional a la absorbancia a 490 nm.

2.19. Ensayos de citotoxicidad de MccE492 en tumores *in vivo*.

2.19.1. Generación de tumores subcutáneos en ratones C57/BL/6.

Se crecieron células de melanoma B16 en RPMI 1640 10% suero fetal de bovino hasta 50% de confluencia. Posteriormente las células se trataron con tripsina, se lavaron con medio de cultivo y se pasaron a través de un colador (strainer) para descartar los agregados celulares. La concentración se ajustó a 1×10^6 células/mL. Los ratones C57BL/6 se inyectaron subcutáneamente en el abdomen con 100.000 células B16 utilizando una jeringa de insulina con aguja de 27½-G. Alrededor de 10 días después se comenzó a observar la aparición de un tumor visible.

2.19.2. Generación de tumores subcutáneos en ratones "nude".

Este procedimiento se realizó en forma similar a lo descrito en métodos 2.19.1, con las modificaciones que se mencionan a continuación. Las células HT29 se crecieron en medio Mc Coy's suplementado al 10% con suero fetal bovino y se colectaron en forma similar a lo descrito anteriormente. La concentración final se ajustó a 1×10^7 células por mL y se inyectaron 1×10^6

células en el abdomen del animal previamente anestesiado. El tratamiento, que se describe a continuación, comenzó a la semana de la inyección de las células o al día siguiente dependiendo del experimento.

2.19.3. Inyección intratumoral de MccE492.

La MccE492 se inyectó directamente en el tumor a través de inyecciones subcutáneas en el borde del mismo utilizando una jeringa de tuberculina con una aguja de 27¹/₂G. Las inyecciones se realizaron día por medio en un total de 21 días (modelo de melanoma murino), o todos los días por un total de 35 días (modelo de carcinoma de colon humano). Como control se utilizó una purificación de sobrenadante de bacterias que contienen todos los determinantes genéticos para la expresión de la MccE492, pero que posee una mutación en el *mceG*, y por tanto no exporta la MccE492 al medio extracelular (*E. coli* BL21np108).

2.19.4. Administración oral de MccE492.

Para este procedimiento se utilizó MccE492 agregada según el protocolo de formación de fibras amiloides (Materiales y Métodos 2.17). Se administró directamente en el estómago de los ratones a través de una sonda de alimentación para roedores pequeños. La administración se realizó día por medio por un total de 21 días (modelo melanoma murino), o bien cada día por un total de 35 días (modelo carcinoma de colon humano). Como control se utilizó una preparación a partir de sobrenadantes de la cepa *E. coli* BL21np108.

2.19.5. Medición del tamaño y peso del tumor.

El tamaño del tumor se registró día por medio, o cada día según el caso, midiendo los diámetros externos. Se extrapolo el volumen siguiendo la fórmula del elipsoide ($0.52 \times \text{ancho} \times \text{largo} \times \text{alto}$). Al final del tratamiento los animales se sacrificaron mediante exposición a CO_2 o bien dislocación cervical. Luego los tumores se extrajeron y la masa tumoral se determinó en una balanza analítica.

2.19.6. Determinación de parámetros de toxicidad.

La pérdida de peso en los animales que están bajo tratamiento con una droga es un indicador de toxicidad. Para observar variaciones importantes en el peso de los animales, los animales se pesaron durante el tratamiento con MccE492. Una vez sacrificados los ratones "nude", tratados oralmente con MccE492, se evaluaron efectos macroscópicos de toxicidad, tales como color, masa y volumen de los órganos vitales riñón, hígado, pulmón y bazo.

2.20. Ensayo preliminares de biodisponibilidad.

2.20.1. Obtención de [^{35}S] microcina E492.

Un cultivos de 5 L de *E. coli* BL21pJEM15 se creció durante 20 h en medio M9 suplementado con CaCl_2 0,1mM, MgSO_4 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1mg/mL, y como fuente de carbono glucosa 0,2% p/v, una mezcla de aminoácidos sin metionina y 3 μCi de metionina- ^{35}S . El sobrenadante se purificó en "batch", y se concentró en liofilizador (Labconco) por 24 h. Se determinó la concentración de proteína utilizando el kit Micro BCA (Pierce). Las

dpm (desintegraciones por minuto: $1\text{mCi} = 2,2 \times 10^9$ dpm) se midieron en un detector de centelleo para partículas beta LS1701 (Beckman).

2.20.2. Ensayo de biodisponibilidad y biodistribución de la MccE492 en ratones C57/BL/6.

Los animales se anestesiaron con 50 μL de uretano al 40% y posteriormente fueron inyectados con 4×10^5 dpm en 300 μL de MccE492 previamente agregada en la vena yugular. Los animales fueron sacrificados a 1, 5, 10, 60, 180, 360 y 720 min después de la inyección y se extrajeron inmediatamente sangre, corazón, bazo, hígado, pulmón, riñón y cerebro. Para cada tiempo se analizaron 3 o 4 ratones. El suero se obtuvo por centrifugación de 300 μL de sangre a 1600 x g por 10 min.

Los órganos se pesaron y molieron en 3 mL de solubilizador de tejido (Fisher Scientific), y se incubaron por 12 h a temperatura ambiental. Posteriormente se agregaron 10 mL líquido de centelleo (Perkin-Elmer). La radiactividad se midió en el contador de centelleo para partículas beta LS1701 (Beckman). Los cálculos de concentración de MccE492 inicial, tiempo medio de distribución, tiempo de vida media eliminación, volumen de distribución y "clearance" total (Cl_{tot}), se calcularon como se muestra a continuación.

El volumen de distribución es obtenido de:

$$Vd = \text{Dosis} / C_{p0}$$

donde C_{p0} corresponde a la concentración máxima.

El "clearance" total es obtenido de:

$$Cl_{tot} = k_{el} \times Vd$$

donde k_{el} corresponde a la constante de eliminación y se obtiene de la pendiente de la curva del logaritmo de la concentración de MccE492 en el suero vs tiempo.

El tiempo medio de eliminación se obtuvo de

$$t_{1/2} = 0.693 \times Vd / cl.$$

2.21. MALDI-TOF MS de muestras de MccE492.

Alícuotas de 100 μ L de muestras de MccE492 en ACN, se utilizaron para realizar ensayo de MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Inc.), con una matriz de α ciano-4-hidroxicinamato (10 mg/ml en ACN 0,1% ácido fórmico 1:1 v/v). Los datos se obtuvieron en polaridad positiva y modo reflexión. La calibración se realizó con un estándar externo usando una mezcla de péptidos de entre 7 y 5000-20000 (Bruker Daltonis Inc).

3. Resultados

3.1. Obtención de mutantes puntuales de la MccE492.

Con el fin de determinar cuales aminoácidos son esenciales para la actividad bactericida de la MccE492, el plasmidio pBA se sometió a mutagénesis química al azar con hidroxilamina, este plasmidio contiene los genes que codifican para la MccE492 y su inmunidad. El DNA así tratado se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* VCS257np220, la cual posee todos los determinantes genéticos para la modificación y exportación de la MccE492, pero que tiene una mutación en el gen estructural de la MccE492. Se realizó una búsqueda de mutantes en la actividad bactericida que produjeran y exportaran MccE492 inactiva. La primera etapa consistió, por tanto, en seleccionar colonias que son incapaces de formar halo de inhibición de crecimiento en un césped con la cepa indicadora (Figura 3). Se seleccionaron colonias sin actividad bactericida, las cuales se sometieron a un nuevo análisis, esta vez en cultivo líquido. La actividad bactericida del sobrenadante de estos clones se probó sobre césped de bacterias sensibles (resultado no mostrado). Se seleccionaron 10 clones que no poseían actividad bactericida. Se analizó la capacidad de cada uno de estos clones de producir MccE492 inactiva, y para ello se prepararon lisados totales de cultivos de cada clon y se sometieron a un inmunoblot (Figura 4). El resultado de este experimento mostró que 4 de los

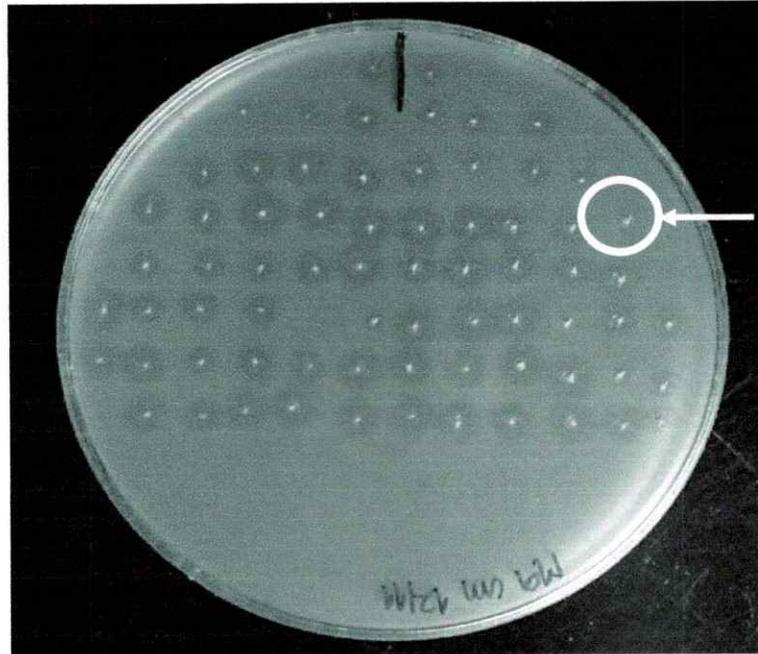


Figura 3: Búsqueda de mutantes en la actividad bactericida de la MccE492.

Las colonias obtenidas a partir de *E. coli* VCS257np220 transformada con pBA mutagenizado con hidroxilamina fueron analizadas sobre un césped sensible (*E. coli* BL21) a la MccE492. Se analizaron 20.000 colonias, y se obtuvieron 10 clones que no formaron un halo de inhibición de crecimiento. En el círculo blanco de la figura se muestra una colonia sin actividad bactericida.

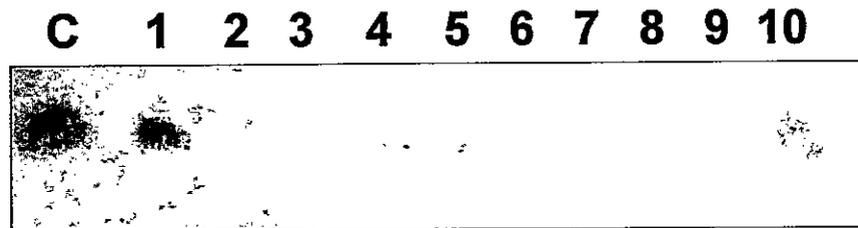


Figura 4: Analisis por inmunoblot de las mutantes carentes de actividad bactericida.

Lisados de cultivos líquidos de 10 clones mutantes sin actividad bactericida, se sometieron a PAGE y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa desde donde se detectó la presencia de la microcina utilizando el sistema de fosfatasa alcalina, (ver Materiales y Métodos). C: MccE492 purificada, carriles 1-10: extracto total de clones analizados, enumerados de 1 a 10.

clones seleccionados producían MccE492, por lo cual fueron elegidos para continuar con su caracterización. El análisis de la secuencia de pBA detectó una diferencia en el gen de la MccE492 respecto a la secuencia original (pJAM229). Esta diferencia se encuentra en el predicho codón 5 de la MccE492 y corresponde a un cambio de ATG (codón para metionina) a GTG (codón para valina o codón alternativo de inicio de la traducción). Dado que esta diferencia se localiza en el N-terminal procesado durante la exportación y que la actividad bactericida no está alterada, se decidió continuar con la selección de mutantes realizadas en esta construcción.

Las mutantes obtenidas por la metodología antes descrita se resumen en la figura 5. Se obtuvieron 4 mutantes puntuales, dos de ellas (clon 1 y 4) presentaron una mutación en el motivo tipo doble glicina del péptido líder, y se denominaron PL-G18S y PL-G18D respectivamente. El clon 5 posee una mutación silente en el quinto codón del péptido líder. Esta mutación consiste en un cambio de GTG a GTA. Ambos codones codifican para valina, sin embargo, el condón GTG también puede ser utilizado como codón de inicio alternativo de la traducción. El análisis de la secuencia de la MccE492 predice la presencia de dos posibles sitios de inicio de la traducción, uno ubicado en el primer codón y un segundo sitio ubicado en el quinto codón. La ausencia de actividad en la mutante silente en el quinto codón permitió evaluar si este corresponde al codón de inicio de la traducción. Esta hipótesis ha sido investigada en la tesis de pregrado de Mario Leiva, quien demostró que el inicio de la traducción de la MccE492 se produce en en el predicho quinto codón.

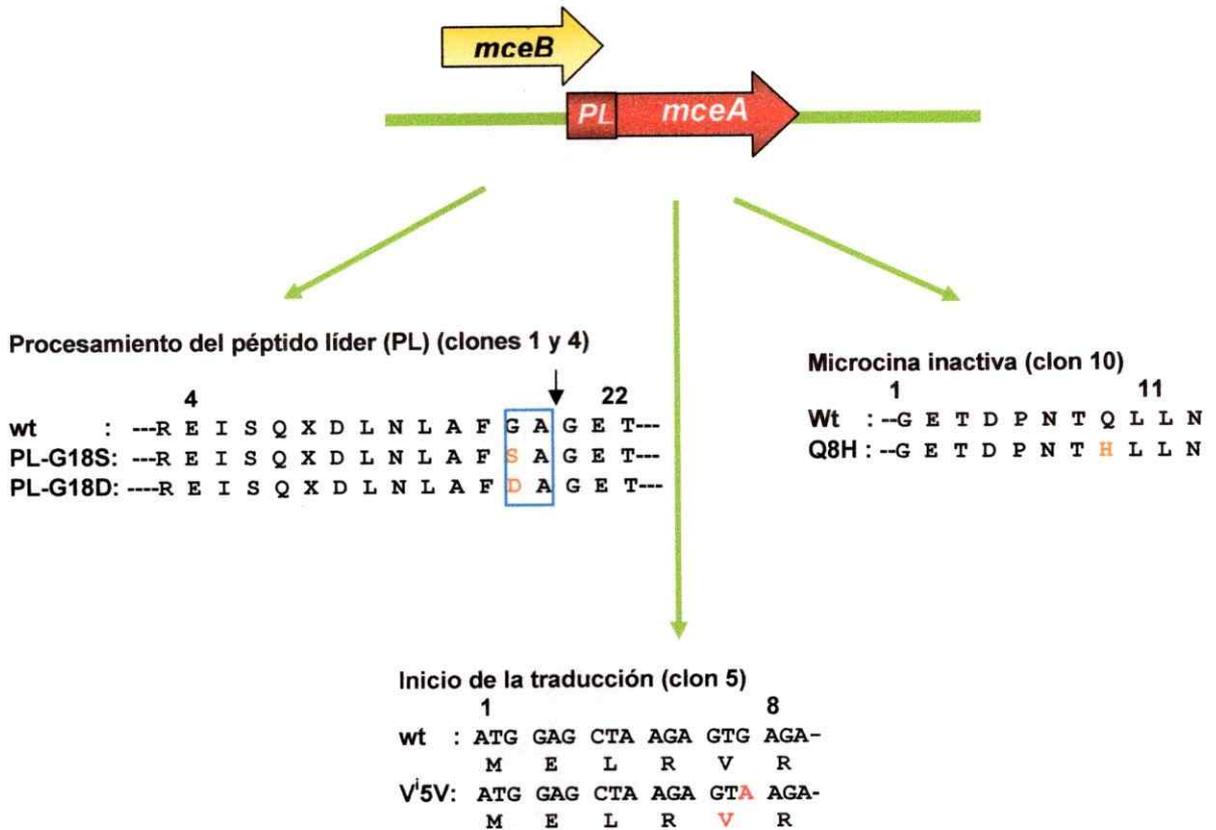


Figura 5: Análisis de las secuencias de las mutantes en la MccE492.

Las mutantes 1 y 4 corresponden a PL-G18S y PL-G18 D, respectivamente y poseen modificaciones en el motivo tipo doble glicina. El clon 5 corresponde a la mutantes PL-V'5V, y el clon 10 corresponde a la mutante Q8H. Las secuencias fueron analizadas en el programa vector 9.0.

Finalmente, la única mutante obtenida con un cambio en un aminoácido en la MccE492 madura fue el clon 10 que posee la mutación Q8H y cuya caracterización se presenta más adelante.

3.2. Caracterización de las mutantes PL-G18S y PL-G18D.

Los cambios encontrados en las mutantes PL-G18S y PL-G18D modifican el motivo glicina alanina de la MccE492 (equivalente al motivo doble glicina) que se encuentra en los péptidos bactericidas exportados por sistema secretores tipo I. Para determinar que la ausencia de actividad bactericida en estos mutantes se debe a que la MccE492 producida no es exportada al medio extracelular, se realizaron extractos proteicos a partir de las células y del sobrenadante de cultivos de estas bacterias. La presencia de la MccE492 fue analizada mediante inmunoblot (Figura 6). Debido a que las mutantes PL-G18S y PL-G18D son incapaces de exportarse al medio extracelular, están ausentes en purificaciones a partir de sobrenadantes analizados (Figura 6).

Se comprobó que las sustituciones de glicina por serina o ácido aspártico en el motivo tipo doble glicina evita la exportación de la proteína al medio extracelular.

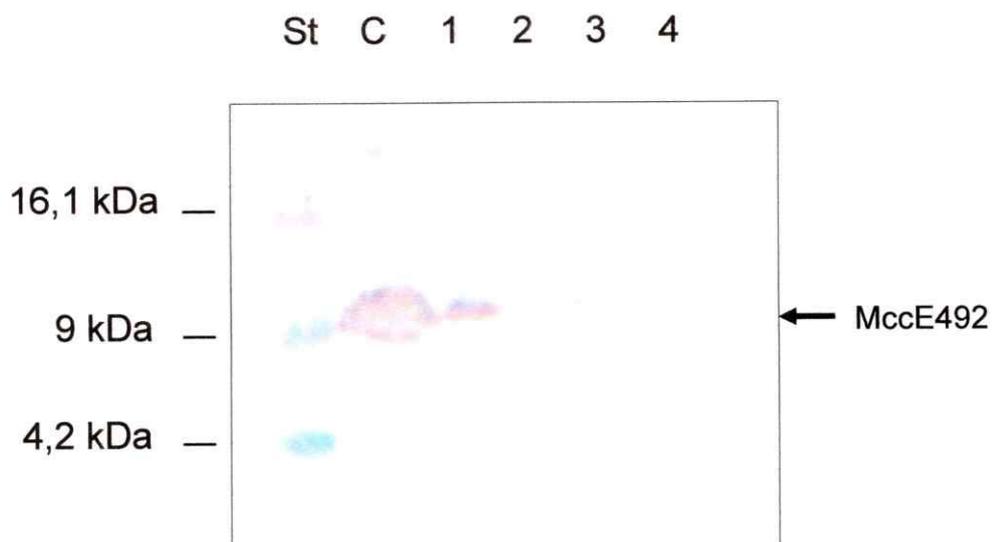


Figura 6: Análisis del sobrenadante de cultivos productores de MccE492.

Los clones que no poseían actividad bactericida pero que presentan MccE492 en extractos totales, se utilizaron para analizar la presencia de la microcina en el sobrenadante. Se purificó MccE492 desde el medio extracelular de cada clon y las muestras se analizaron mediante inmunoblot, reveladas con fosfatas alcalina. Carril St: Estándar de peso molecular. MccE492 purificada desde la cepa C: VCS257pJEM15, carril 1: VCS257np220 pBA-Q8H, carril 2: VCS257np220 pBA-PL-G18S, carril 3: VCS257np220 pBA-PL-G18D y carril 4: VCS257np220 pBA-PL-V5V. La flecha indica la banda correspondiente a la MccE492.

3.3. Caracterización de la mutante de la MccE492 Q8H.

3.3.1. Purificación de MccE492 Q8H a partir del sobrenadante de la bacteria productora.

Para comprobar si esta microcina se exporta, se purificó a partir de sobrenadante de cultivo productor de la MccE492 mutante. La purificación de la MccE492 Q8H se sometió a inmunoblot para determinar la presencia de esta proteína (Figura 6). El patrón de migración electroforética observado fue similar a la McE492 silvestre, pero en muestras purificadas independientemente, se observaron además bandas de tamaños superiores. Estas purificaciones con MccE492 Q8H de mayor peso molecular se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% y se determinó que las bandas corresponden a oligómeros de 5 y 10 subunidades de MccE492 (Figura 7).

3.3.2. Resistencia a proteasas y temperatura.

Se ha demostrado que la MccE492 forma fibras amiloide, las cuales son resistentes a algunos tratamientos físicos como la temperatura y sonicación.

Los resultados se analizaron mediante western blot de la electroforesis de un gel SDS-PAGE 16% e indican que los oligómeros obtenidos en algunas purificaciones de MccE492 Q8H son resistentes a estos tratamientos físicos (Figura 8).

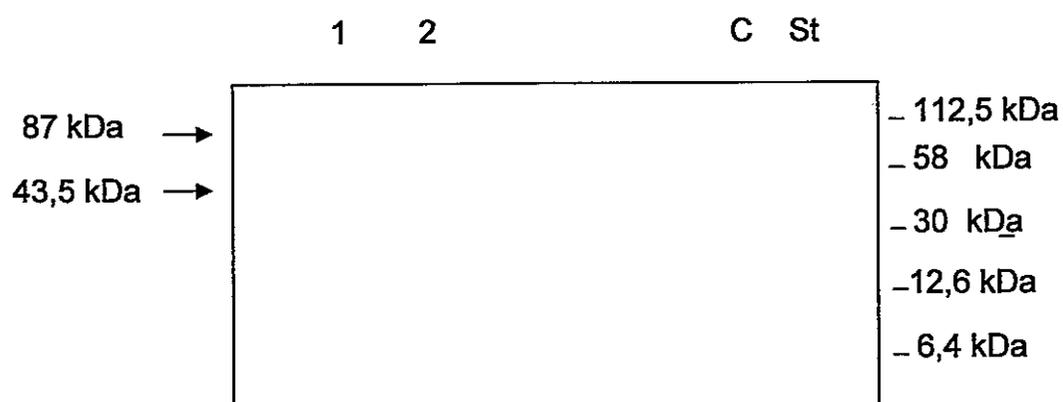


Figura 7: Oligomerización de la MccE492 Q8H.

Algunas preparaciones de microcina Q8H purificada presentaron oligómeros de MccE492. El tamaño de los oligómeros de microcina se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10% y sometidos a inmunoblot, el cual fue revelado mediante fosfatasa alcalina. La MccE492 Q8H (50 $\mu\text{g/mL}$) se encuentra en forma de oligómeros de 5 y 10 subunidades indicadas en las flechas.

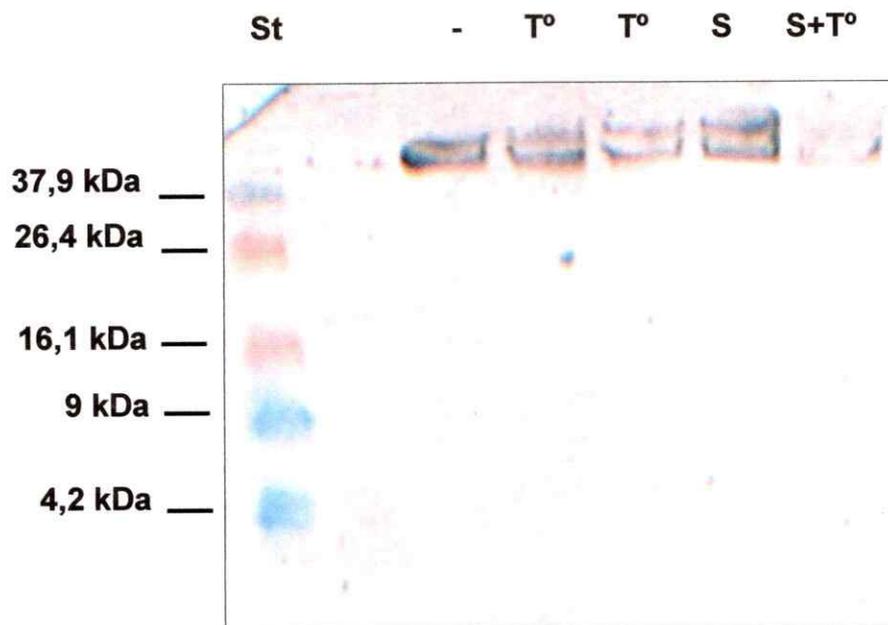


Figura 8: Resistencia de la MccE492 Q8H a altas temperaturas y sonicación.

La MccE492 Q8H fue incubada a 100 °C por 10 min, o sonicada. Las preparaciones después del tratamiento fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE en gel al 16 % que posteriormente se sometió a inmuno blot y revelado con fosfatasa alcalina. Carril -: MccE492 Q8H sin tratamiento, carril T°: microcina Q8H incubada por 10 min a 100 °C. Carril S: MccE492 Q8H sonicada. Carril S+T: MccE492 Q8H sonicada e incubada 10 minutos a 100 °C.

3.4. Construcción de los plasmidios T7pBA y T7pBA Q8H.

Con el propósito de obtener mayores cantidades de MccE492 Q8H, se clonó el DNA correspondiente a la MccE492 Q8H y la MccE492 silvestre bajo el control del promotor T7 de acuerdo al esquema de la figura 9 y como se describe a continuación. Mediante PCR y utilizando los partidores RL1 y AB carboxi, se amplificaron los genes *mceBA*, los cuales codifican para la inmunidad y la MccE492. Tanto este producto de PCR como vector el pT7-7 fueron digeridos con NdeI, y posteriormente ligados. Mediante PCR y utilizando los partidores proT7 y AB carboxi, se amplificaron los genes y el promotor T7. Finalmente el producto de PCR se ligó en el plasmido pACYC184 en el sitio como EcoRV. Los clones obtenidos se analizaron mediante réplica de placa, seleccionando aquellas colonias sensibles a tetraciclina, ya que el sitio EcoRV interrumpe el gen que confiere la resistencia a este antibiótico (Figura 9).

3.4.1. Expresión de MccE492 bajo el promotor inducible T7.

Se crecieron cultivos de las bacterias *E. coli* BL21(DE3)np220 complementadas con la construcciones T7pBA y T7pBA Q8H hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 500 nm. La expresión de la RNA polimerasa de T7 en estos cultivos se indujo con IPTG a una concentración final de 0,2 mM por 3 h a 37°C. Se prepararon extractos totales los cuales se analizaron mediante inmunoblot (Figura 10).

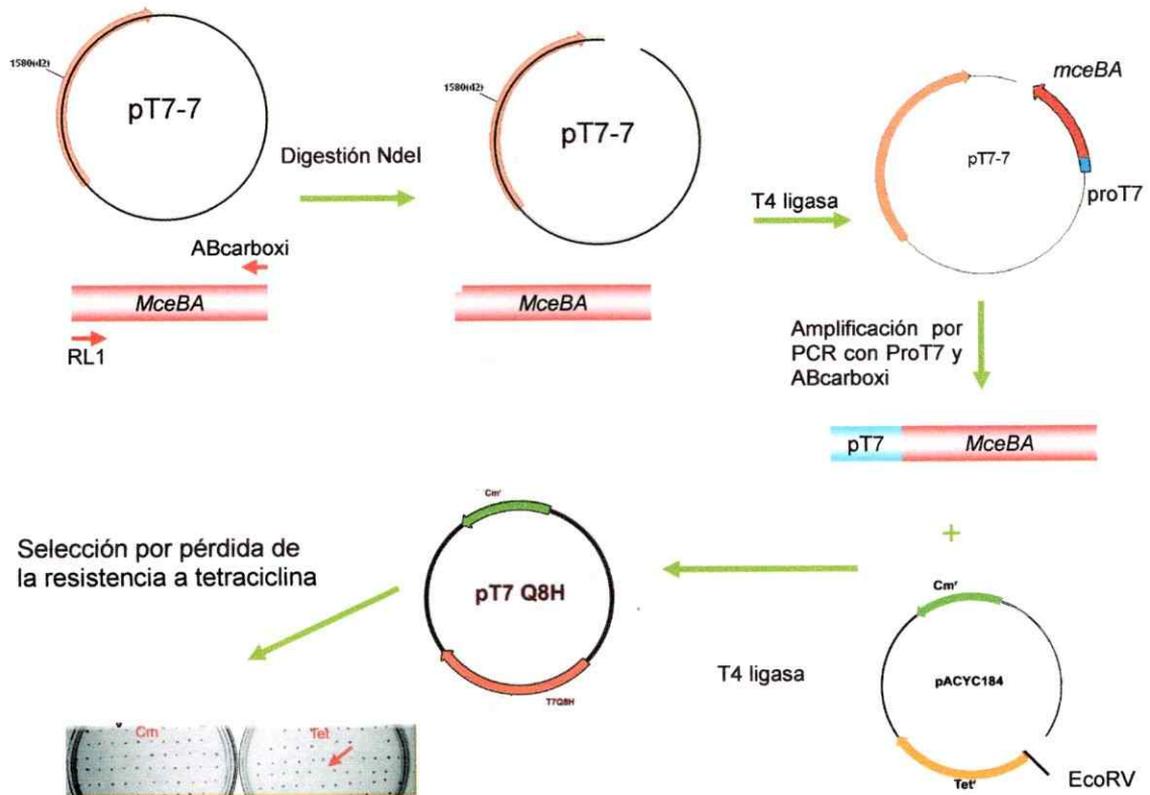


Figura 9: Esquema para construcciones *T7mceBA* y *T7mceBAQ8H*.

El gen que codifica para la microcina y su inmunidad fueron amplificados mediante PCR con los partidores RL1 y AB carboxi. Posteriormente el producto de PCR se digirió con la enzima de restricción NdeI, con la cual también se cortó el vector pT7-7. El producto de estas digestiones se ligó y ese DNA se utilizó como templado para una reacción de PCR en la cual se utilizan los partidores proT7 y AB carboxi, obteniendo como amplificado los genes *mceBA* bajo el control del promotor del fago T7. Este producto de PCR se clonó en el vector pACYC184 en el sitio EcoRV que se encuentra en el gen que otorga resistencia a tetraciclina. Se seleccionaron los clones que perdieron la resistencia a tetraciclina y que confieren inmunidad a la microcina y que confieren inmunidad a la microcina.

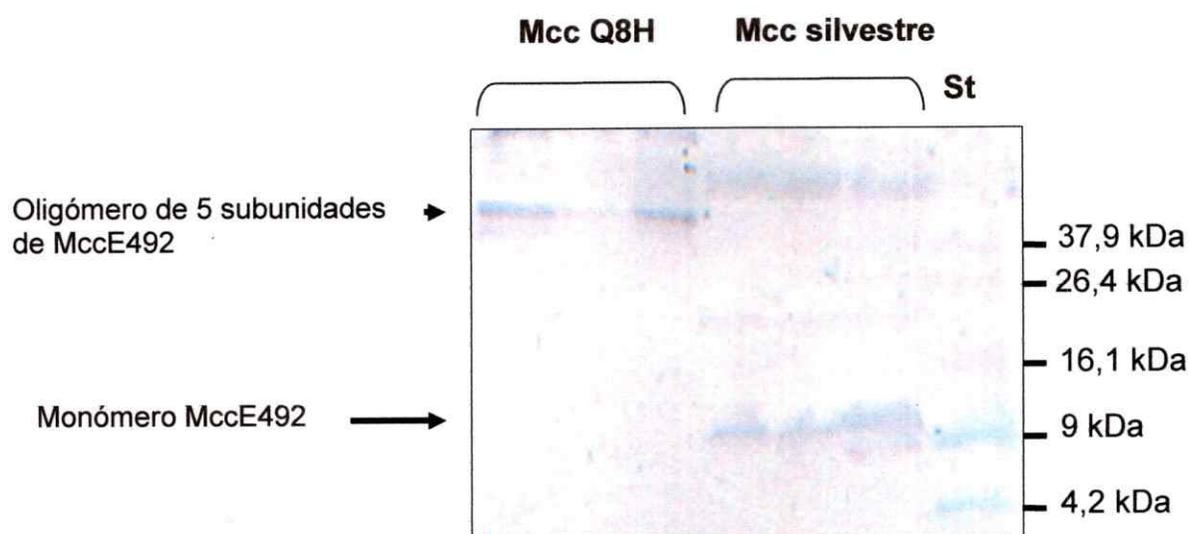


Figura 10: Expresión de MccE492 desde las construcciones T7pBA yT7pBA Q8H. Se prepararon lisados totales de la cepas de *E. coli* BL21(DE3) np220 T7pBA y BL21(DE3) np220 T7pBA Q8H y se analizó la presencia de la microcina mediante electroforesis SDS-PAGE en geles 16% y posterior inmunoblot.

3.5. Determinación de la actividad bactericida de la MccE492 Q8H sobre bacterias sensibles.

Se realizaron ensayos de viabilidad sobre la cepa de *E. coli* BL21 tratada con MccE492 silvestre y Q8H durante 20 min con el fin de comparar los niveles de actividad de ambas en bacterias sensibles, las que se plaquearon en LB agar en diluciones seriadas para determinar en número de unidades formadoras de colonias. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 11. Se confirma que la MccE492 Q8H no tiene actividad bactericida significativa sobre bacterias *E. coli* BL21(DE3), las cuales frente a la misma concentración de MccE492 silvestre presentaron un 0,027% de sobrevida.

3.6. Determinación de la actividad bactericida de la MccE492 Q8H sobre esferoplastos.

Para establecer si la mutación Q8H interfiere con el correcto reconocimiento de la MccE492 a nivel de receptor de membrana externa de las células sensible, se realizaron ensayos de viabilidad de la MccE492 sobre esferoplastos, los cuales son bacterias que mediante un tratamiento con EDTA y lisozima tienen permeabilizada la membrana externa. De esta forma, si la mutación Q8H solo interfiere con el paso de translocación de la membrana externa, las bacterias permeabilizadas serán sensibles a la acción de esta microcina. En la figura 12 se observa que existe una actividad significativa de la MccE492 Q8H sobre esferoplastos (7% de sobrevida), aunque los niveles de actividad son menores que los observados al utilizar microcina silvestre sobre

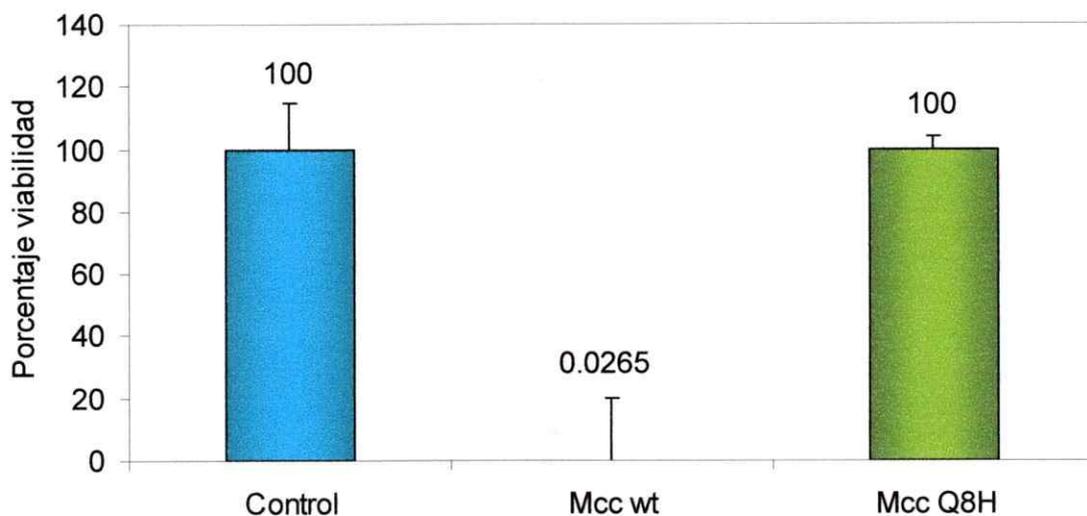


Figura 11: Ensayo de la actividad bactericida de la MccE492 Q8H sobre *E. coli* BL21(DE3).

3 mL de *E. coli* BL21 crecida en LB hasta una $DO_{600} \sim 0,6$, se centrifugaron y lavaron con medio de cultivo y se resuspendieron en 1 mL. Se incubaron 100 μ L de células por 20 min con 100 μ L de MccE492 a una concentración de 200 μ g/mL. Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por diluciones seriadas. Se considera 100% el número de UFC obtenidas en la condición control, en la cual las bacterias son incubadas con amortiguador en vez de MccE492. Ensayo en triplicado representativo de 3 experimentos independientes.

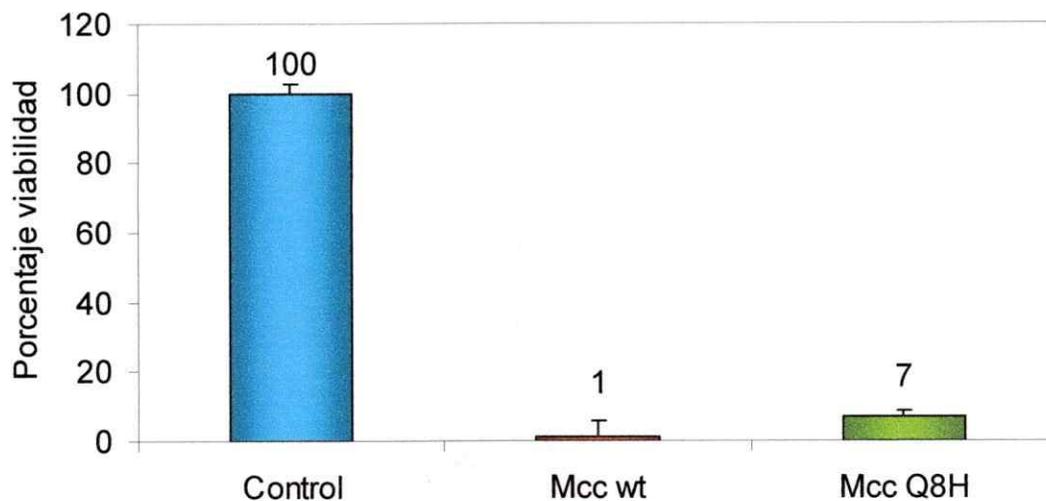


Figura 12 : Ensayo de la actividad bactericida de la MccE492 Q8H sobre esferoplastos de *E. coli* BL21(DE3).

Los esferoplastos se prepararon como está descrito en Materiales y Métodos. 100 μ L de células se incubaron por 20 min con 100 μ L de microcina a una concentración final de 200 μ g/mL, suspendida en amortiguador Tris-HCl 100 mM, 20% sacarosa, pH 8,0 y se determinaron las UFC. Se considera 100 % el número de UFC obtenidas en la condición control, en la cual las bacterias son incubadas con amortiguador en vez de microcina. Ensayo en triplicado representativo de 3 experimentos independientes.

esferoplastos de *E. coli* BL21 (1% de sobrevivencia). Esto indica que la mutación en el aminoácido 8 de la MccE492 afecta la traslocación de la membrana externa hacia el periplasma.

3.7. Co-producción de MccE492 silvestre y Q8H.

Para determinar si existe interacción *in vivo* entre la MccE492 silvestre y mutante se realizaron experimentos de co-expresión. Para esto se electrotransformó la cepa de *E. coli* VCS257pJEM15, la cual es una cepa sobreproductora de MccE492 silvestre, con el plásmido pBAQ8H. Se analizó la actividad bactericida en el sobrenadante del cultivo que co-expresa ambas microcinas y se determinó que éste carece de actividad sobre césped de bacterias sensibles (resultado no mostrado). Este resultado indica que la MccE492 Q8H induce la inactivación de la microcina silvestre cuando son co-expresadas, posiblemente por la formación de un oligómero inactivo. Adicionalmente, se purificó MccE492 desde el sobrenadante de la cepa que co-expresa ambas microcinas, y mediante ensayos sobre césped sensible, se determinó que esta microcina purificada no posee actividad bactericida (Figura 13).

3.8. Co-incubación de MccE492 silvestre y Q8H.

Con el fin de determinar si la MccE492 silvestre es capaz de interactuar *in vitro* con la MccE492 Q8H se realizaron co-incubaciones de muestras purificadas de ambas microcinas en diferentes concentraciones y diferentes

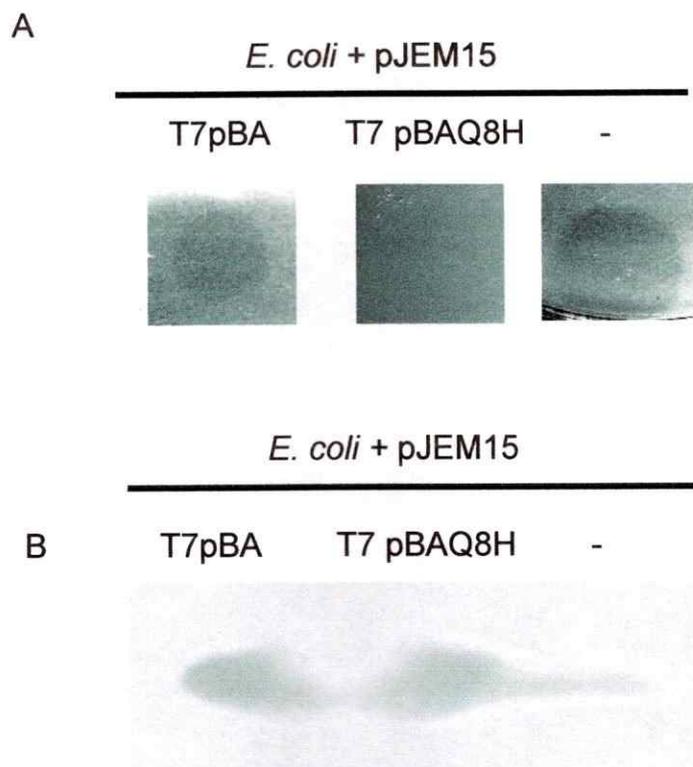


Figura 13: Purificación de MccE492 silvestre y Q8H co-expresadas en la misma célula.

Se purificó MccE492 a partir de células que coexpresan la MccE492 silvestre y mutante. A: Actividad de las distintas preparaciones sobre un césped sensible de *E. coli* BL21(DE3). B: inmunoblot de las siguientes preparaciones: *E. coli* VCS257 pJEM15T7pBA, *E. coli* VCS257 T7pBAQ8H, *E. coli* VCS257 pJEM15.

tiempos de incubación. La actividad se determinó sobre un césped de bacteria sensible. Los resultados de la Tabla 4 muestran que en las condiciones utilizadas en este ensayo, la MccE492 Q8H es incapaz de inactivar a la MccE492 silvestre, lo cual puede interpretarse que una vez que se forman los agregados de la MccE492 Q8H, no hay intercambio de subunidades con la MccE492 silvestre.

3.9. Formación de canales iónicos por la MccE492 Q8H.

Como parte de la caracterización de la mutante Q8H se quiso establecer si esta mutante era capaz de formar canales iónicos en bicapas artificiales. Muestras de MccE492 silvestre y Q8H concentradas en un concentrador CentriVap (Labconco) se pincelaron sobre una membrana sintética. Se aplicó un potencial constante de +40 mV a la membrana y se observó fluctuaciones discretas de corriente que se interpretaron como la incorporación de canales iónicos a la bicapa lipídica. La figura 14 muestra el registro de un canal único medido por el aumento de la corriente que pasa a través de la membrana.

Se realizó un registro de canales de MccE492 Q8H en condiciones simétricas de KCl 100 mM aplicando potenciales entre ± 100 mV. Se graficaron los valores de corriente en función al potencial aplicado como se muestra en la figura 15. En estas condiciones la curva de corriente *versus* voltaje no es lineal. A potenciales negativos el canal de MccE492 presenta un valor de conductancia menor que a potenciales positivos. Este comportamiento de la curva I vs V significa que el canal se comporta como un rectificador de la

Tabla 4: Actividad bactericida después de co-incubar *in vitro* muestras purificadas de MccE492 silvestre y Q8H.

Tiempo (h)	Actividad Bactericida (U.A.) *		
	MccE492 silvestre (200 µg/mL)	MccE492Q8H (200 µg/mL)	Mezcla 1/10* (200 µg/ml)
0	1/64	0	1/64
1	1/64	0	1/64
2	1/32	0	1/32
3	1/8	0	1/8
5	1/8	0	1/8

* La actividad está representada como la última dilución en que se observó un halo de inhibición de crecimiento. Ensayo representativo de 2 experimentos independientes.

* Las muestras (en agua nanopura) se incubaron en una proporción 1:10 (Q8H:wt) a la concentración final indicada.

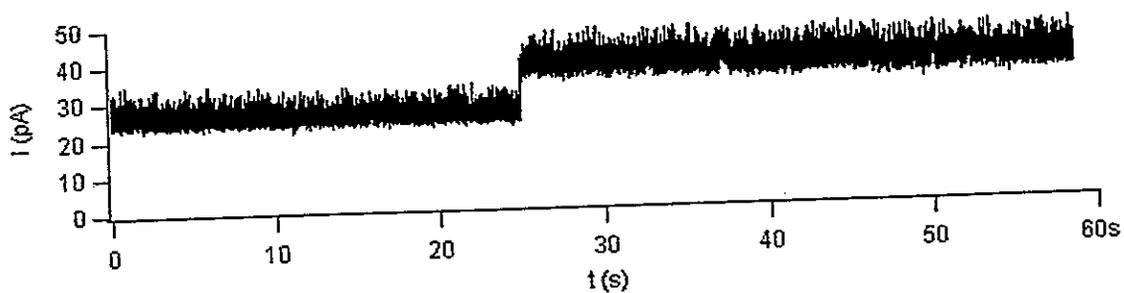


Figura 14: Registro de un canal formado por la MccE492 Q8H.
La membrana estaba compuesta por POPE: PC 4:1. Los registros se realizaron en presencia de KCl 100 mM, MES 10 mM, pH 6,7 a -80 mV.

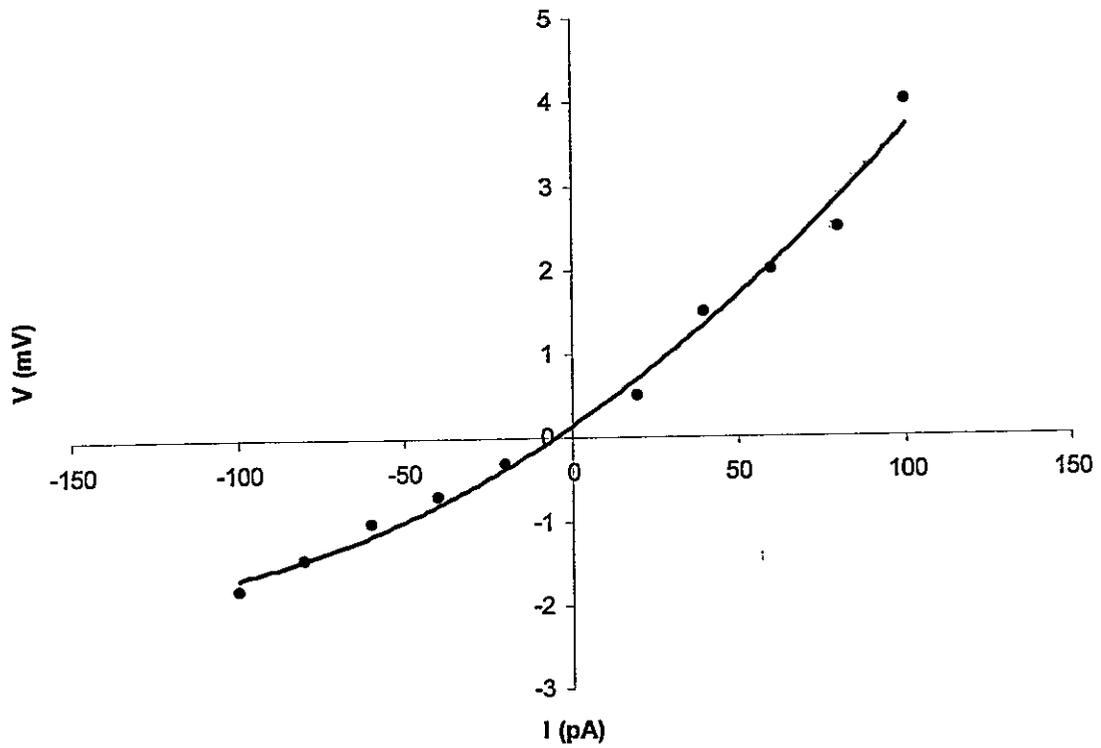


Figura 15: Curva corriente-voltaje del canal de la MccE492 Q8H.

Los registros se realizaron en condiciones simétricas de KCl 100mM, en amortiguador MES-KOH 10 mM, pH 6,7-7,0. La membrana utilizada consistió en una mezcla de lípidos POPE y PC en una relación 4:1.

corriente lo que sugiere que el poro es asimétrico (Figura 15). Este comportamiento es similar al de la MccE492 silvestre.

3.10. Cinética de agregación de la MccE492.

3.10.1. Unión de rojo Congo a la MccE492.

Al incubar MccE492 durante 15 h a 37°C a pH 7,0, esta se agrega formando fibras amiloides, las cuales no poseen actividad bactericida. La presencia de estas fibras puede detectarse mediante el uso de colorantes específicos para fibras amiloides, como el rojo Congo. El rojo Congo cambia el máximo de absorbancia de 490 nm a 520 nm al unirse a las fibras. La figura 16 muestra el espectro de absorbancia del rojo Congo libre y unido a la MccE492 Q8H luego de 24 h de incubación a 37°C y pH 7,0. El espectro de proteína agregada obtenido con la MccE492 Q8H fue similar al observado con la MccE492 silvestre agregada en las mismas condiciones (Bieler y cols., 2005).

3.10.2. Unión de tioflavina T.

Se realizó una cinética de la agregación de la MccE492 silvestre y Q8H la cual fue seguida por unión a tioflavina T. La tioflavina T es un colorante que se une específicamente a fibras amiloides emitiendo fluorescencia a 480 nm. Se detectó la agregación de la MccE492 silvestre después de 24 h de incubación, en tanto que la MccE492 Q8H presenta agregación desde el momento en que comienza el experimento. Este resultado se observó repetidas veces lo cual llevó a concluir que la microcina Q8H se agrega espontáneamente (Figura 17).

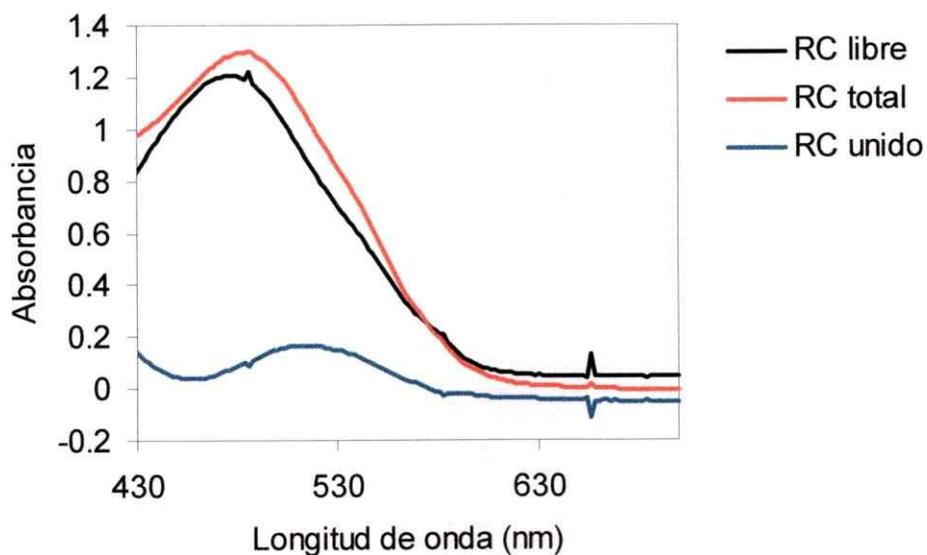


Figura 16: Ensayo de unión de rojo Congo a fibras amiloides.

La MccE492 Q8H a una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se agregó durante 24 h en amortiguador PIPES 100 mM; NaCl 0,5 M, pH 6,5. La formación de fibra se detectó mediante unión de rojo Congo (11 μM). La línea negra representa el espectro de absorción del rojo Congo libre, la línea roja muestra el espectro de absorción del rojo Congo total (unido y libre) incubado con las fibras de MccE492 Q8H obtenidas luego de 24 horas y la línea azul muestra el rojo Congo unido, el cual se obtiene de la resta de los espectros anteriores.

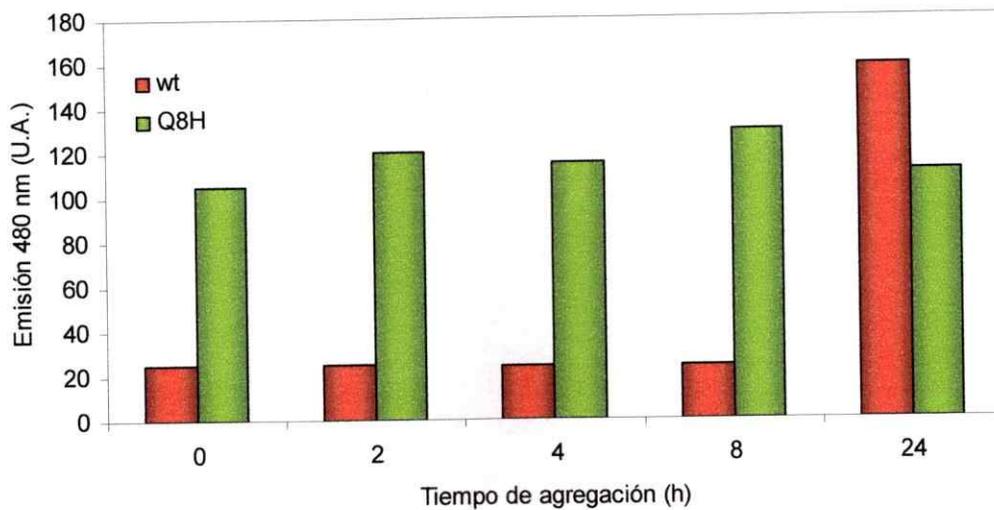


Figura 17: Agregación de MccE492 silvestre y Q8H en el tiempo.

La agregación de la microcina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se siguió mediante la emisión de fluorescencia a 480 nm producida por la unión de fibras amiloides a tioflavina T. Se hicieron mediciones de agregación a los tiempos indicados en el eje X de la figura.

3.10.3. Ensayo de "seeding" ..

Los amiloides se forman por un proceso en el cual la etapa limitante es la formación de una semilla o núcleo. Una vez formada la semilla, ésta es capaz de reclutar a la proteína soluble cambiando su estructura lo que acelera la incorporación de nuevas subunidades a la fibra. El ensayo denominado "seeding" consiste en incorporar fibras preformadas sonicadas al inicio de la reacción de agregación lo cual acelera la formación de fibras. Se ensayó la capacidad de la MccE492 Q8H de actuar como semilla de agregación de la microcina silvestre. Para esto, fibras preformadas de MccE492 Q8H se incubaron con MccE492 silvestre soluble, la formación de fibras amiloides se determinó mediante la unión de RC.

La figura 18 muestra que las semillas de MccE492 Q8H aceleraron la cinética de agregación de la MccE492 silvestre, pues en los puntos analizados se observa que la MccE492 en presencia de semillas de microcina Q8H, poseen un mayor porcentaje de RC unido, es decir, microcina en forma amiloide, lo cual contrasta con la agregación de microcina silvestre en ausencia de esta semillas, en que la agregación de esta muestra ocurre después de 40 h de incubación. Como control positivo se utilizó agregados de MccE492 silvestre, los cuales se comportaron como semillas, fenómeno que había sido descrito previamente (Bieler y cols., 2005).

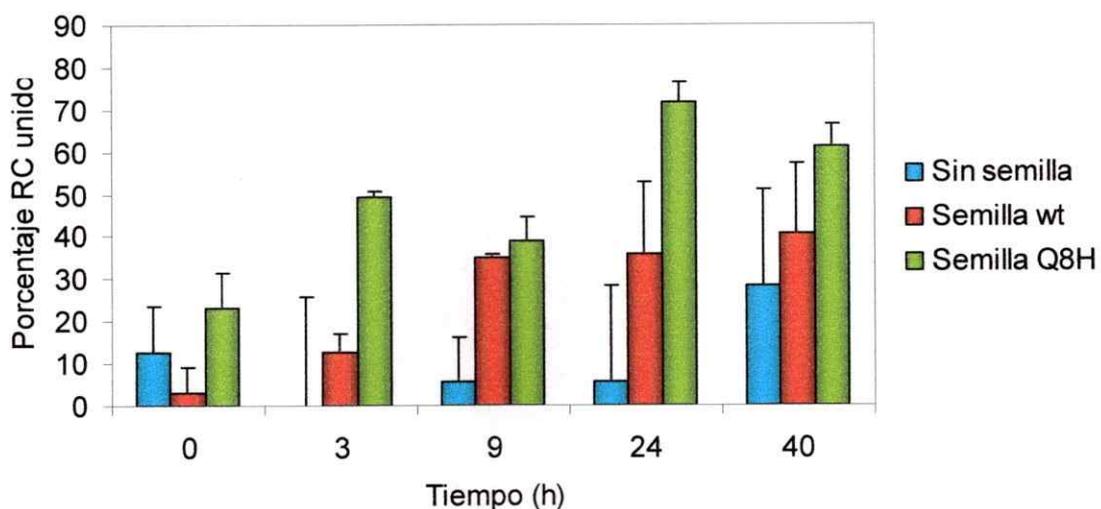


Figura 18: Ensayo de “seeding” usando como semilla fibras de MccE492 silvestre y Q8H.

MccE492 soluble (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con y sin semillas (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) provenientes de fibras previamente formadas y sonicadas a una intensidad de 3.5 watts por 10 s se incubó a 37 °C por los tiempos indicados en amortiguador fosfato 100 mM, pH 7,4. Posteriormente las muestras se incubaron con RC (11 μM) y se centrifugaron durante 30 min a 14000 rpm, quedando en suspensión el RC libre. Se determinó la cantidad de rojo Congo unido midiendo la absorbancia del sobrenadante de la muestra a 490 nm. Se consideró como el 100% de RC libre la absorbancia del amortiguador incubado con RC sometido a las mismas condiciones experimentales.

3.11. Actividad bactericida de la MccE492 sobre mutantes en TonB.

Como se mencionó en la Introducción, la presencia de TonB en la célula es necesaria para la actividad antibacteriana. Para entender el rol de esta proteína en la actividad de la MccE492 se realizaron estudios de viabilidad en bacterias y esferoplastos utilizando dos mutantes de la proteína TonB disponibles en el laboratorio: una mutante que produce una proteína trunca, TonB Δ 43-239, la cual contiene solo el segmento transmembrana de TonB; y una mutante puntual, TonB S16L, la cual ha sido reportada ser una mutante no funcional en el sistema TonB-ExbBD. Se utilizó como cepa hospedera a *E. coli* X8605, la cual posee una delección en el gen que codifica para TonB.

3.11.1. Ensayo de viabilidad de las cepas de *E.coli* X8605 TonB S16L y X8605 TonB Δ 43-239.

Se analizó la capacidad de la MccE492 de disminuir la viabilidad de las cepas que expresa versiones mutantes de TonB. Los resultados muestran que ambas son resistentes a la actividad bactericida de la MccE492, lo cual era esperado, ya que estas mutantes de TonB no son funcionales (Figura 19).

3.11.2. Ensayo de viabilidad en esferoplastos de las cepas mutantes en TonB.

Posteriormente se analizó la capacidad de la MccE492 de disminuir la viabilidad de esferoplastos de cepas que expresan TonB mutantes, de modo de evaluar el requerimiento de TonB una vez que la MccE492 se encuentra en el

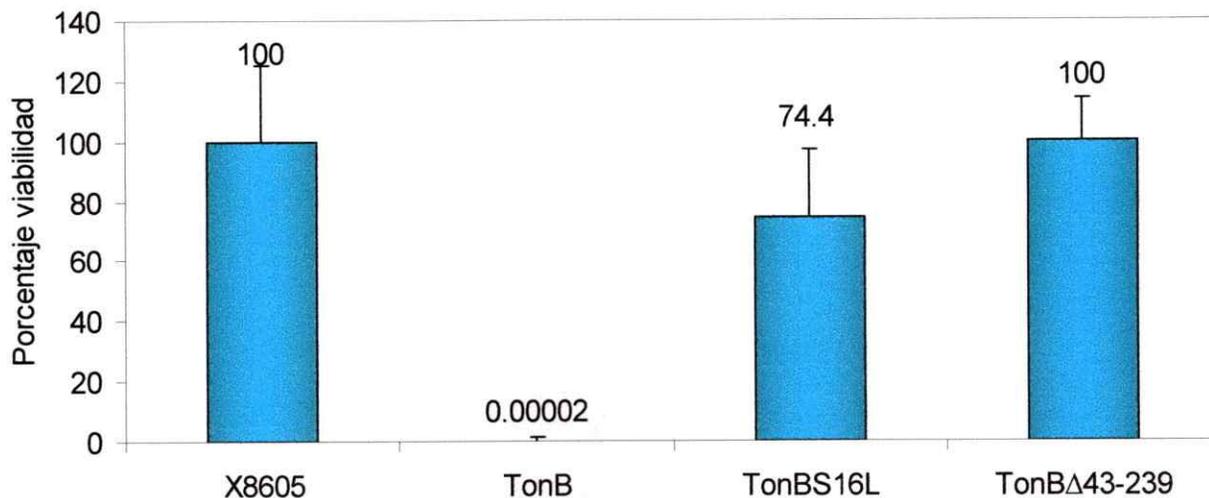


Figura 19: Ensayo de viabilidad de bacterias mutantes en TonB.

Los ensayos de viabilidad se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Las bacterias se incubaron con 100 μ L de MccE492 a una concentración final de 400 μ g/mL. Se considera como 100% el número de UFC obtenidas en las células tratadas con medio de cultivo en vez de MccE492. Como cepa sensible se utilizó *E. coli* BL21. Este experimento realizado por triplicado es representativo de 3 repeticiones independientes.

espacio periplasmático. En la figura 20 se observa que para su actividad bactericida la microcina requiere del segmento periplasmático de TonB, pues las cepas que expresan solo el segmento transmembrana son 100% resistentes a la actividad bactericida en esferoplastos. Por otro lado, esferoplastos de la cepa que expresan TonB S16L son parcialmente sensibles a la actividad de la MccE492 (19%), pero no en los niveles de la cepa que expresa TonB silvestre. La mutación S16L afecta la funcionalidad de la proteína TonB, por lo que estos resultados indican que no es necesario que la proteína esté funcional para cumplir con su rol en la actividad bactericida de la microcina una vez que esta alcanza el espacio periplasmático.

3.12. Ensayo de inmunidad de células mutantes en TonB.

Con el propósito de determinar si las mutaciones de TonB tienen algún efecto en la inmunidad de la microcina, se transformaron las cepas X8605 TonB, X8605 TonB Δ 43-239 y X8605 TonB S16L con el plasmidio p157, el cual expresa el gen *mceB*, que codifica para la proteína de la inmunidad de la MccE492. Se determinó la viabilidad de esferoplastos de éstas cepas al incubarse en presencia de MccE492. Los resultados de este experimento (Figura 21) muestran que la cepa que expresa la mutante TonB S16L no es inmune. Esto indica que la proteína de la inmunidad necesita de la serina de TonB para evitar la acción de la MccE492, o que requiere de una proteína TonB funcional. La mutante TonB Δ 43-239 es resistente a la actividad bactericida de

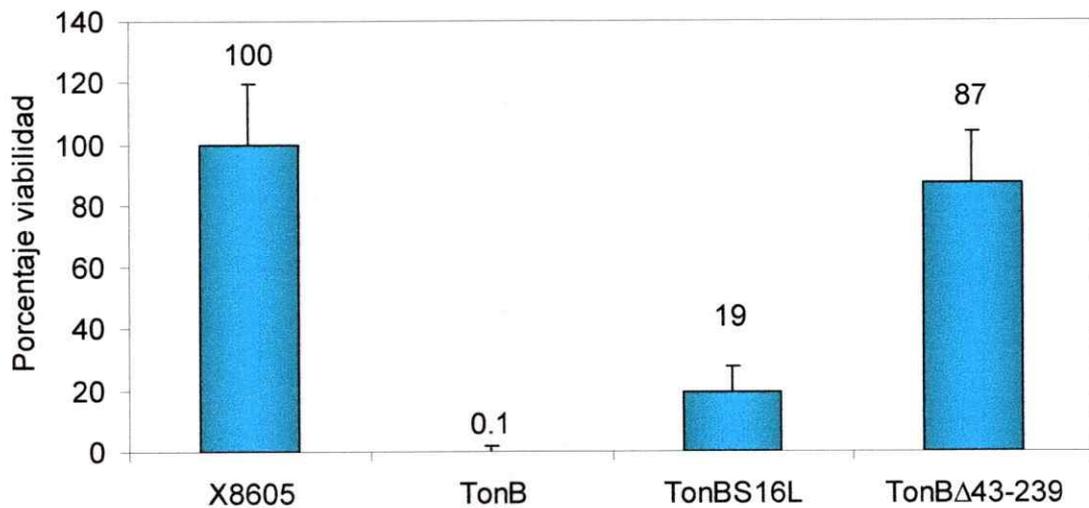


Figura 20: Ensayo de viabilidad de esferoplastos de bacterias mutantes en TonB.

Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los esferoplastos se incubaron con 100 μ L de MccE492 a una concentración final de 400 μ g/mL durante 20 min. Se considera como 100% los esferoplastos tratados con amortiguador Tris-HCl 100 mM, sacarosa 20%, pH 7,0. Como cepa sensible se utilizó *E. coli* BL21. Resultado obtenido de un triplicado que es representativo de tres experimentos independientes.

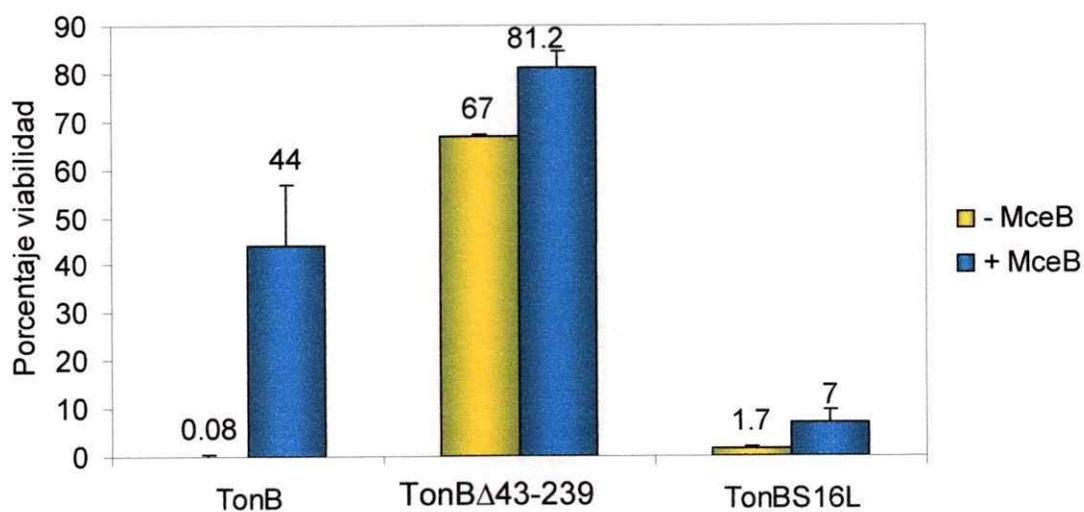


Figura 21: Ensayo de inmunidad sobre esferoplasto de cepas X8605 TonB Δ 43-239 y X8605 TonB S16L.

Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los esferoplastos de las cepas indicadas, transformadas con el plásmido p157 (*mceB*), se incubaron por 20 min con MccE492 a una concentración final de 300 μ g/mL. Se determinó por duplicado las UFC por diluciones seriadas. Este ensayo se realizó por triplicado y es representativo de dos experimentos independientes.

la MccE492, por lo que la presencia de la proteína MceB no afecta significativamente la viabilidad de la bacteria.

3.13. Efecto citotóxico de la MccE492 Q8H sobre distintas líneas tumorales.

En esta parte de la tesis se analizó la capacidad de las fibras de MccE492 de disminuir la viabilidad de líneas tumorales, comparando el efecto sobre líneas celulares no tumorales, como macrófagos, o sobre cultivos primarios. Los resultados de este experimento (Figura 22), muestran que las fibras de MccE492 afectan específicamente a las líneas celulares tumorales, y no a los cultivos primarios ni a las líneas no tumorales (N2A y macrófagos).

Con anterioridad se había descrito que las células de melanoma murino B16 son sensibles a la actividad citotóxica de la MccE492. Resultados preliminares mostraron que la MccE492 agregada disminuía la viabilidad de las células en cultivo (Estrada, 2005). Se demostró que las fibras de MccE492 son más tóxicas para las células de melanoma murino que la microcina soluble o protofibrilas, las cuales no son tan eficientes en reducir la viabilidad celular (Estrada, 2005). Este resultado indica que las fibras de microcina son las especies más tóxicas para las células tumorales, a diferencia de lo observado en bacterias, en que la formación de fibras en el sobrenadante se correlaciona con la pérdida de la actividad bactericida (Bieler y cols., 2005).

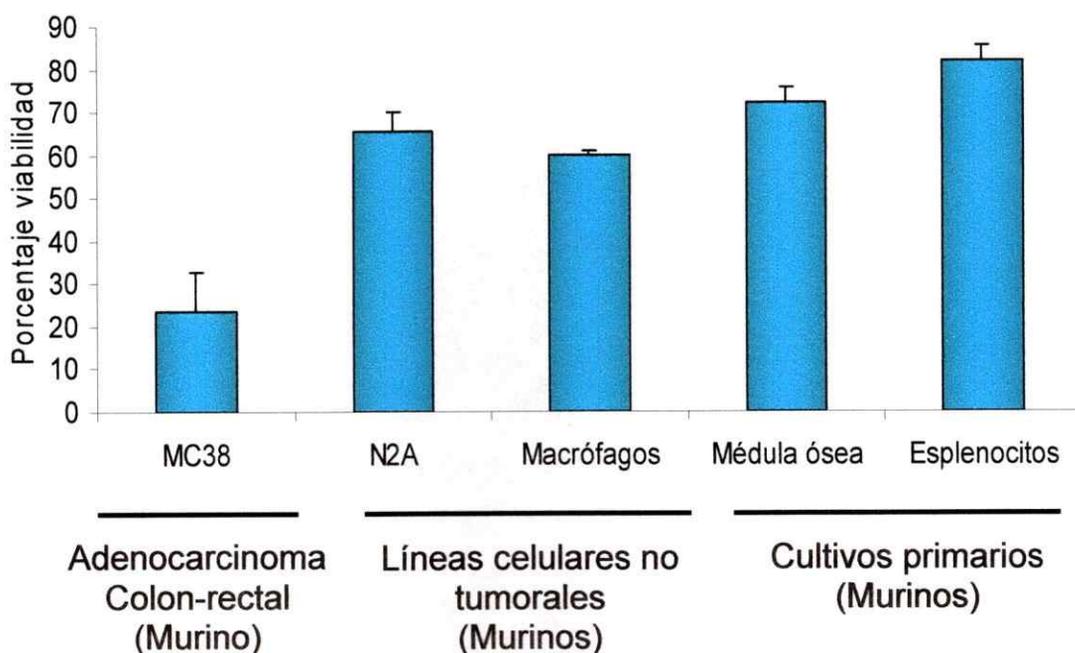


Figura 22: Actividad citotóxica de las fibras de MccE492 en distintos tipos celulares.

Las fibras de MccE492 se formaron como está descrito en Materiales y Métodos. Se utilizó MccE492 a una concentración de 50 μM sobre 1×10^5 células/mL, y la viabilidad se analizó después de 24 h de incubación. Los cultivos primarios utilizados fueron células aisladas de médula ósea y esplenocitos aislados de bazo; las líneas celulares no tumorales fueron N2A, una línea neuronal y cultivos de macrófagos; y la línea tumoral MC38. El efecto citotóxico se determinó mediante la liberación de LDH al extracelular mediante el kit Citotox96 (Promega). Las medidas se realizaon por triplicado. El 100% de viabilidad corresponde a la medición obtenida en las células incubadas con amortiguador PBS, resultado que se comparó con el obtenido purificaciones de la cepa *E. coli* BL21(DE3)np108, los cuales son similares.

Para establecer si la mayor agregación observada con la mutante Q8H se correlaciona con un mayor efecto citotóxico en células tumorales murinas B16, se realizaron experimentos de viabilidad celular con esta microcina. Es importante recordar que esta versión mutante de la MccE492 se agrega espontáneamente (Figura 17). Estos experimentos fueron realizados con la MccE492 silvestre y la MccE492 Q8H agregadas previamente, como se describe en Materiales y Métodos. La figura 23 muestra que la MccE492 Q8H, es capaz de disminuir la viabilidad más eficientemente que las fibras de MccE492 silvestre. Esto es particularmente notorio a las 24 h de incubación con las fibras, pues mientras que en estas condiciones la MccE492 silvestre afecta poco la viabilidad, las fibras de MccE492 Q8H la disminuyen a un 12%. Una viabilidad similar se observa con ambos tipos de MccE492 luego de 48 h de incubación (Figura 23). Para analizar más en detalle el efecto citotóxico de las fibras de MccE492 silvestre respecto a la MccE492 Q8H a las 24 h de incubación, se realizó un ensayo de viabilidad de células B16 utilizando concentraciones menores de fibras (12,5 y 25 μM) a las utilizadas en el experimento anterior (50 μM). Los resultados (Figura 24) indican que la MccE492 Q8H es más eficiente que la MccE492 silvestre en su acción citotóxica, ya que es capaz de disminuir significativamente a viabilidad de las células B16 incluso a las concentraciones más bajas (12,5 μM) que la MccE492 silvestre, la cual requiere de una concentración 4 veces superior para observar una disminución de 65,4% en la viabilidad en ese mismo tiempo de incubación.

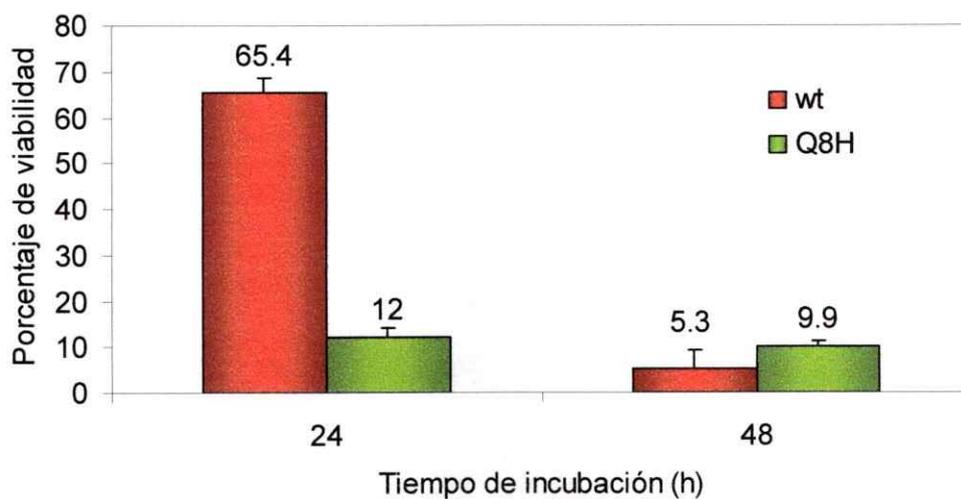


Figura 23: Viabilidad de células de melanoma murino B16 tratadas con fibras de MccE492 silvestre o Q8H.

Las células de melanoma murino B16 (1×10^5 células/mL) se incubaron con MccE492 silvestre o mutante previamente agregada ($50 \mu\text{M}$) durante los tiempos indicados. La viabilidad se determinó usando el kit Cell Titer96 Aqueous (Promega). Las medidas se realizaron por triplicado.

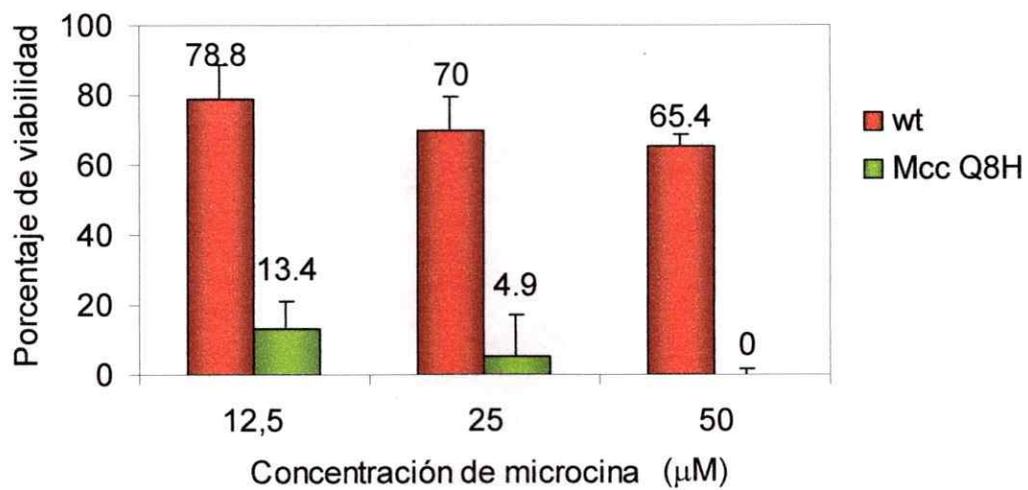


Figura 24: Efecto de distintas concentraciones de fibras de MccE492 silvestre y Q8H en células de melanoma murino B16.

Las células de melanoma murino B16 (1×10^5 células/mL) se incubaron con microcina durante 24 h en las concentraciones señaladas. La viabilidad se determinó usando el kit Cell Titer96 Aqueous (Promega). Las medidas se realizaron por triplicado.

Para determinar si el efecto citotóxico de las fibras de MccE492 Q8H sobre las células B16 se observa en otras células, se realizaron experimentos de viabilidad de las células de carcinoma de colon humano HT29, incubadas con MccE492 silvestre y MccE492 Q8H. Los resultados (Figura 25) muestran que luego de 24 h de incubación a 50 μ M tanto la MccE492 silvestre como la Q8H son tóxicas, disminuyendo la viabilidad a un 11,8% y 24,6% respectivamente. A las 48 h de incubación con microcina también se observa una disminución en la viabilidad, la cual es más evidente con MccE492 Q8H (5,2%). Al comparar el efecto de la concentración de la MccE492 sobre la viabilidad celular a las 24 h de incubación (Figura 26), se observa que el tratamiento con la MccE492 Q8H afecta la viabilidad a bajas concentraciones (12,5 y 25 μ M), a diferencia de la MccE492 silvestre que posee un efecto poco significativo (96% y 73,7% de viabilidad respectivamente). A 50 μ M de MccE492 se observan valores similares tanto para la forma silvestre como la mutante (11,8% y 24,2% respectivamente). Estos resultados indican que la MccE492 Q8H posee un efecto citotóxico similar a la MccE492 silvestre en la línea tumoral humana de carcinoma de colon HT29.

3.14. Desarrollo de un nuevo procedimiento de purificación de la MccE492 para su uso *in vivo* sobre tumores.

La cantidad de MccE492 necesaria para la administración a ratones es muy alta comparado con las cantidades que se requieren comúnmente en el laboratorio para ensayos microbiológicos. Por esta razón se buscó un nuevo

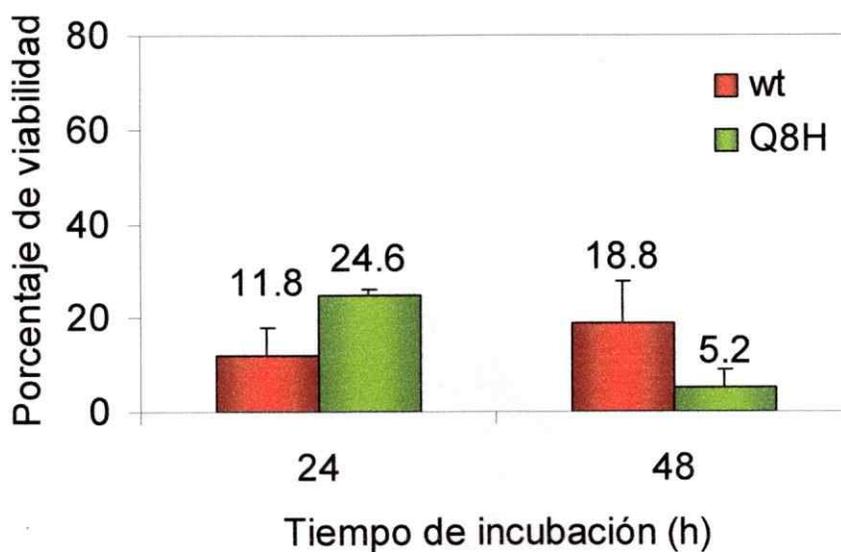


Figura 25: Porcentaje de viabilidad de las células de carcinoma de colon humano HT16 tratadas con fibras de MccE492 o MccE492 Q8H.

Las células de carcinoma de colon humano HT29 (1×10^5 células/mL) se incubaron con MccE492 silvestre o mutante previamente agregada ($50 \mu\text{M}$) durante los tiempos indicados. La viabilidad se determinó usando el kit Cell Titer96 Aqueous (Promega) Las mediciones se realizaron por triplicado.

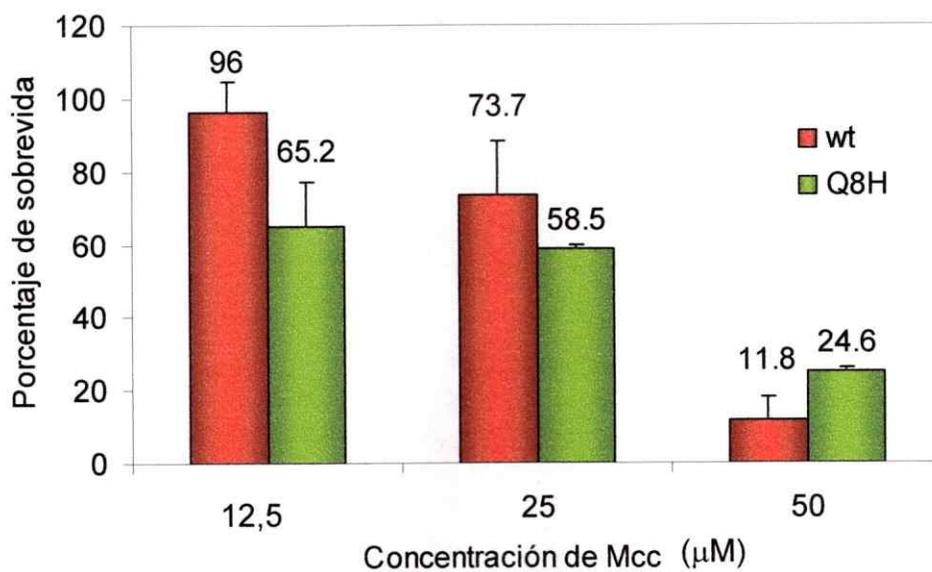


Figura 26: Efecto de distintas concentraciones de fibras de MccE492 silvestre y Q8H en células de carcinoma de colon HT29.

Las células de carcinoma de colon humano HT29 (1×10^5 células/mL) se incubaron con MccE492 durante 24 h en las concentraciones señaladas. La viabilidad se determinó usando el kit Cell Titer96 Aqueous (Promega). Las medidas se realizaron por triplicado.

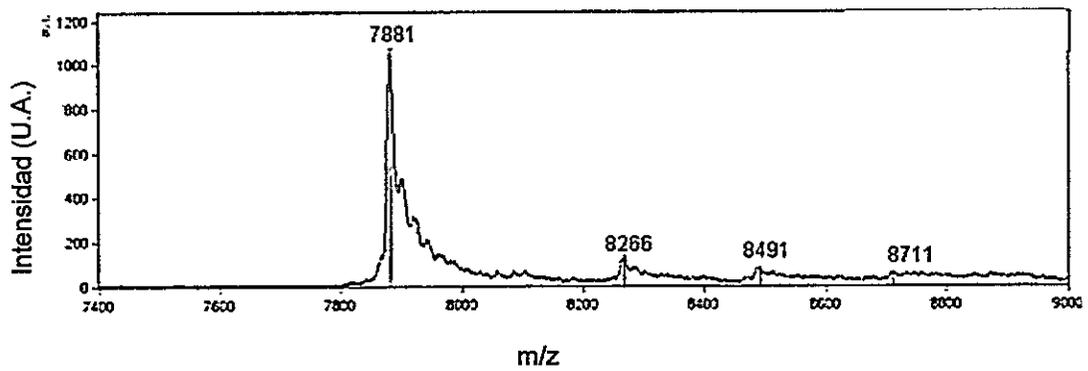
sistema de purificación para obtener mayores cantidades de microcina. Se diseñó y montó el sistema de purificación en "batch" descrito en Materiales y Métodos. Con este sistema de purificación se puede obtener MccE492 a un nivel de pureza comparable con el método de purificación por HPLC en fase reversa (Figura 27), y en las cantidades apropiadas para el estudio *in vivo*. Es importante destacar que es un sistema fácil de usar con grandes volúmenes de sobrenadante de cultivo bacteriano.

3.15. Procedimiento de agregación a altas concentraciones de MccE492.

Se estandarizó un procedimiento de agregación de la MccE492 obtenida mediante purificación en "batch" para los ensayos *in vivo*. Los ensayos realizados con anterioridad se realizaron en condiciones de baja concentración de proteína (150-200 µg/mL). Para analizar la capacidad de agregación de esta microcina a la concentración de 10 mg/mL, se realizó un ensayo de agregación por 24 h el cual fue seguido mediante la unión de tioflavina T. Los resultados de la agregación se muestran en la figura 28.

Para determinar la capacidad de las fibras de MccE492 de eliminar las células tumorales *in vivo*, se utilizó el modelo de tumor murino B16 en ratones C57/BL/6. Se inyectaron células tumorales B16 subcutáneamente en el abdomen de los ratones, se permitió el desarrollo de tumores y se realizó un tratamiento con la MccE492. En la primera etapa se analizó la capacidad de las fibras de la MccE492 de disminuir el volumen tumoral luego de la administración

A



B

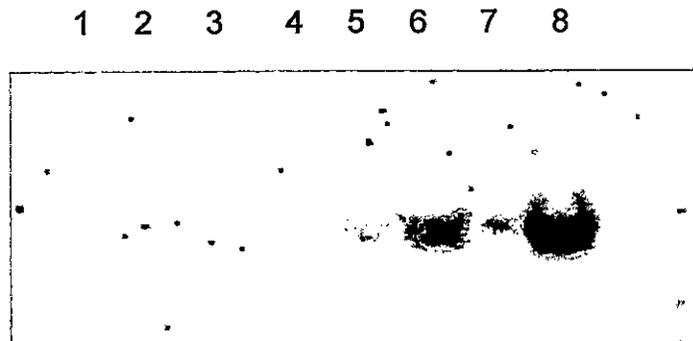


Figura 27: Purificación en "batch" de la MccE492.

A: MALDI-TOF MS de muestras de MccE492 purificadas en "batch". Se observa la presencia de microcina sin modificar (7881 m/z), y tres formas modificadas (8266, 8491 y 8711 m/z). B: Inmunoblot blot de muestras de microcina (200 μ L) eluidas a distintas concentraciones de acetonitrilo que fueron concentradas en CentriVap (Labconco) y resuspendidas en 50 μ L de agua. Se añadió 20 μ L de buffer de carga 4X y se calentó durante 10 min a 100°C. Se cargó 20 μ L en cada carril. Carriles 1: Elusión 100% ACN, carril 2: 90% ACN, carril 3: 80% ACN, carril 4: 70% ACN, carril 5: 60% ACN, carril 6: 50% ACN, carril 7: 40% ACN, carril 8: 30% ACN.

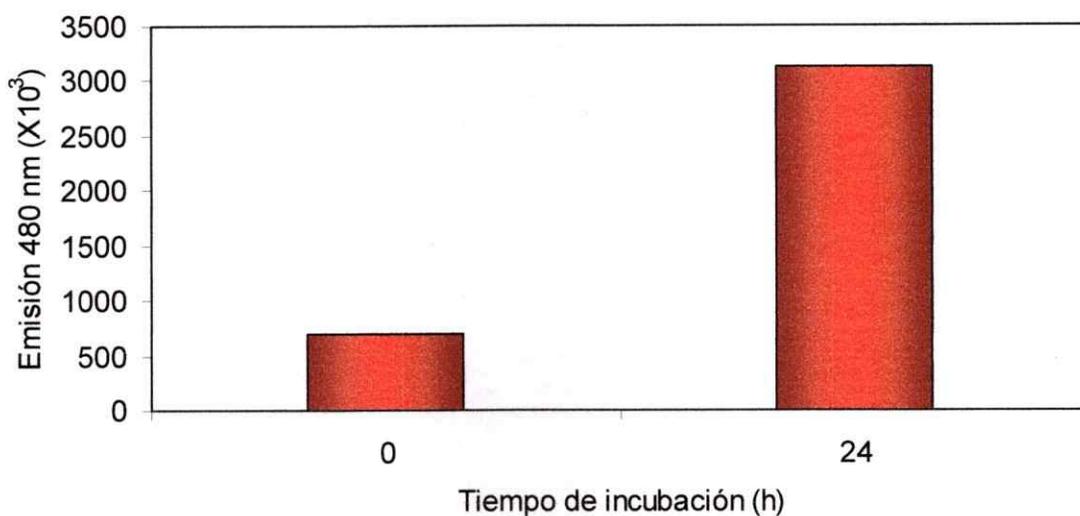


Figura 28: Agregación de MccE492 concentrada detectada por unión a tioflavina T.

La microcina (10 mg/mL) previamente incubada en amortiguador PBS a pH 7,0 a 37°C, por los tiempos indicados se analizó mediante unión a tioflavina T. La unión de la tioflavina T a la microcina se determinó mediante la fluorescencia emitida a 480 nm.

intratumoral. El primer protocolo contempló una dosis de 50 mg/Kg en diez inyecciones día por medio.

3.16. Efecto citotóxico de las fibras de MccE492 administrada intratumoralmente en un modelo de melanoma murino.

Los resultados (Figura 29A) indican que el tratamiento intratumoral con fibras de microcina disminuyó considerablemente el volumen tumoral en el curso del tratamiento. Este tratamiento no afectó el peso de los ratones durante el experimento. Se observaron diferencias significativas entre el volumen de los tumores de los controles (tratados con purificaciones de sobrenadante de bacterias incapaces de secretar MccE492). El efecto se hizo evidente a partir de la cuarta inyección de MccE492. Se observa además que la masa de los tumores determinada al final del experimento, una vez extraídos los tumores, es significativamente menor en la condición con MccE492 (Figura 29B). Los tamaños de los tumores del grupo control (tratados con purificaciones de sobrenadante de BL21(DE3)np108), son similares a los obtenidos al administrar PBS (Estrada, 2005).

3.17. Efecto citotóxico de la administración oral de fibras MccE492 en modelo de melanoma murino

Con el fin de determinar la capacidad citotóxica de la microcina y su potencial uso en el tratamiento del cáncer o tumores no operables, se estudió el

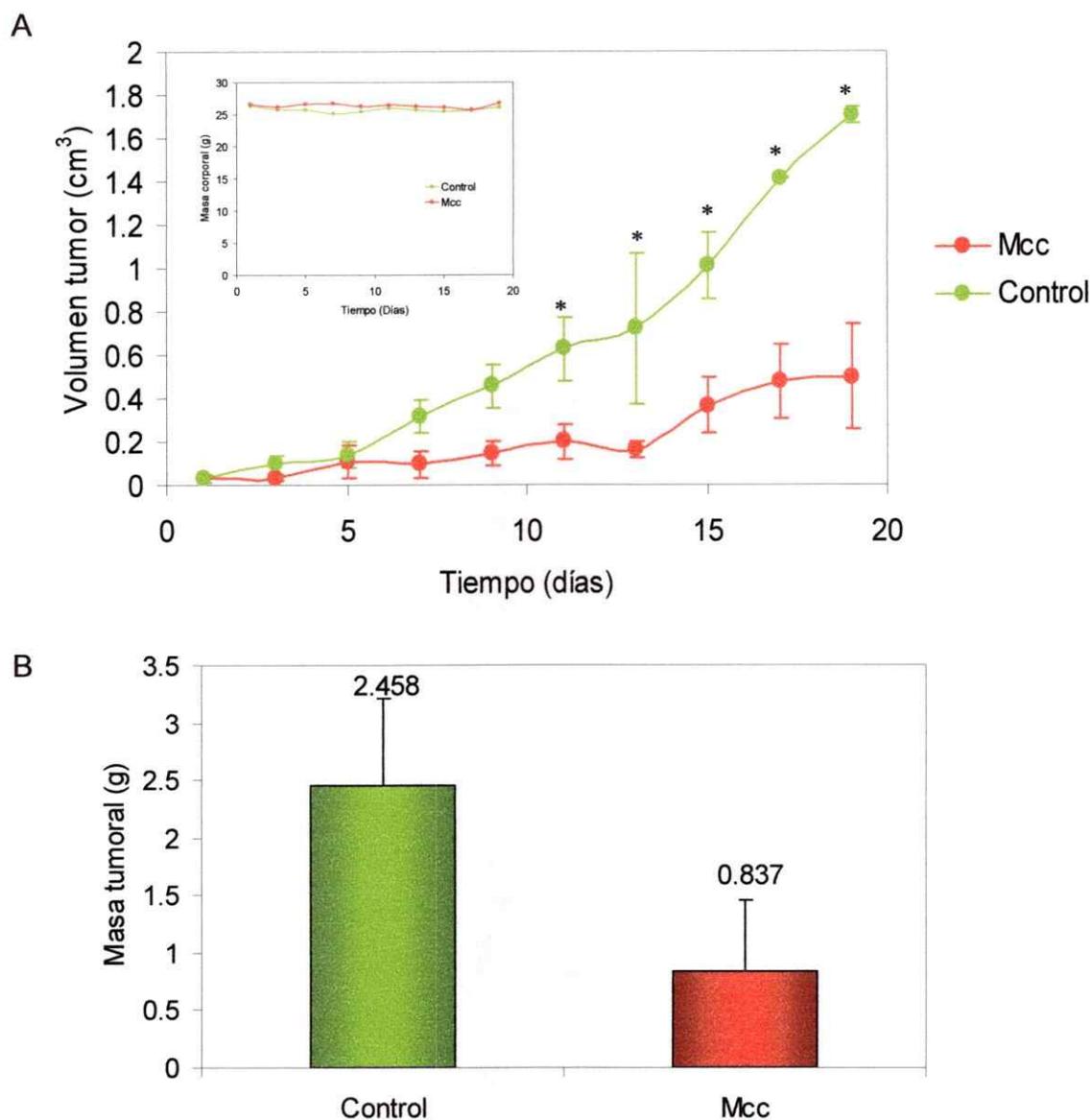


Figura 29: Efecto del tratamiento de MccE492 administrada intratumoralmente en tumores de melanoma murino.

Los tumores se generaron en ratones C57/B6/L mediante inyección subcutánea de 1×10^6 células B16/mL. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 25 mm^2 (alrededor de 7 días) se comenzó el tratamiento intratumoral día por medio con microcina (50 mg/Kg). Como control se utilizó purificaciones de sobrenadante de *E. coli* BL21np108. El volumen fue determinado usando un caliper y siguiendo la ecuación del elipsoide ($n = 5-6$ animales por grupo). A: Volumen tumoral durante el tratamiento. El inserto muestra el peso de los animales durante el tratamiento. ((*): indica los puntos estadísticamente significativos según *t*-Student) B: Masa tumoral al final del experimento que se muestra en A luego de las 10 inyecciones intratumorales de microcina. Las diferencias en la masa tumoral son estadísticamente significativas. Análisis *t*-Student $p = 0,017$.

efecto de las fibras de MccE492 administradas oralmente en ratones que desarrollan tumores de melanoma murino subcutáneamente. El tratamiento consistió en 10 administraciones de MccE492 50 mg/Kg día por medio (en 100 μ L), administradas mediante una sonda de alimentación gástrica. Los resultados de este experimento (Figura 30) indican que la MccE492 administrada oralmente no es capaz de reducir significativamente el volumen de los tumores de los ratones respecto a la condición control, pero se observa un leve retardo en el desarrollo de los tumores. Es posible que la dosis administrada oralmente no fuera suficiente para observar el efecto citotóxico sobre los tumores, pues la microcina debe ser distribuida desde el estómago al tumor, por lo cual se realizó un nuevo ensayo utilizando una dosis de 100 mg/Kg de fibras de microcina cada día (el doble de la usada en el experimento anterior) por un total de 10 administraciones. Los resultados de este experimento (Figura 31) muestran que durante los días de tratamiento no se observa una diferencia significativa en el volumen de los tumores, pero sí un claro retardo en el crecimiento del tumor. Sin embargo, una vez terminado el tratamiento, se extrajeron los tumores y se determinó la masa tumoral, (Figura 31B). Se observó una diferencia significativa en la masa de los tumores de los ratones sometido al tratamiento control y los tratados con MccE492. La diferencia significativa observada respecto de las mediciones de volumen pueden deberse a que el tumor crece hacia el interior del animal, por lo que el volumen es subestimado durante el tratamiento. Estos resultados indican que

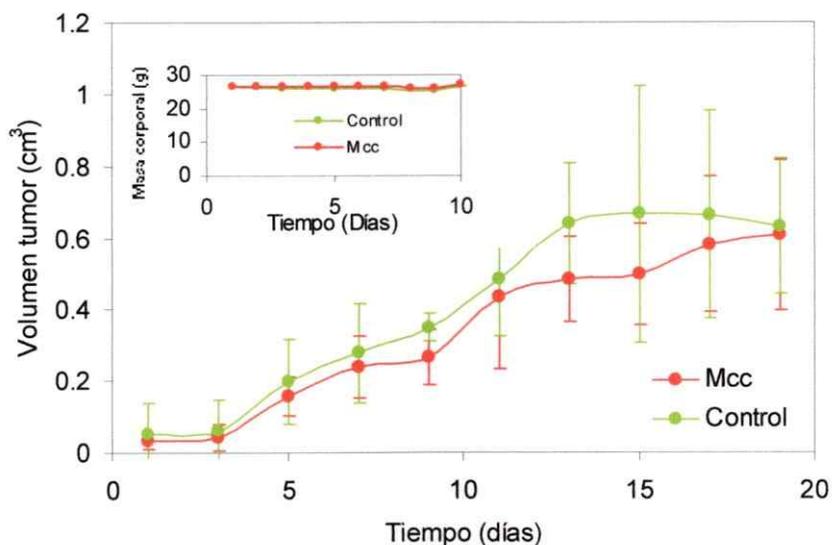
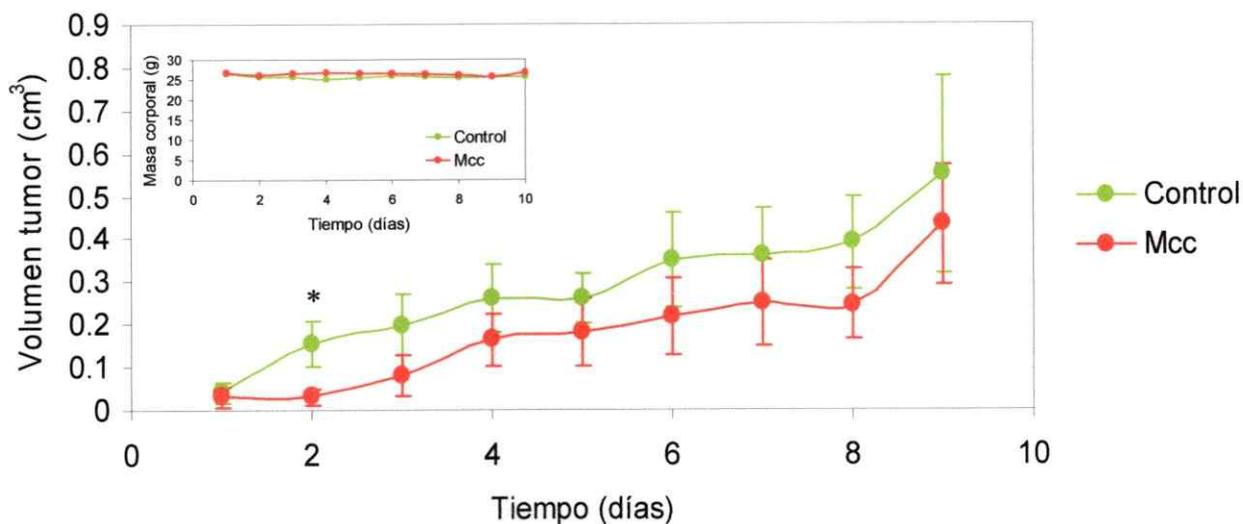


Figura 30: Efecto de la administración oral de MccE492 50 mg/Kg sobre el volumen de los tumores de melanoma murino en ratones C57/BL/6.

Los tumores se generaron como está descrito en la figura 29. Se administró oralmente MccE492 (en dosis de 50 mg/Kg). Como control se utilizó una muestra purificada del sobrenadante de *E. coli* BL21np108. El volumen de los tumores se determinó mediante caliper, y se analizaron cada dos días. La administración de microcina se realizó día por medio hasta completar un total de 10 administraciones (n=5-8).

A



B

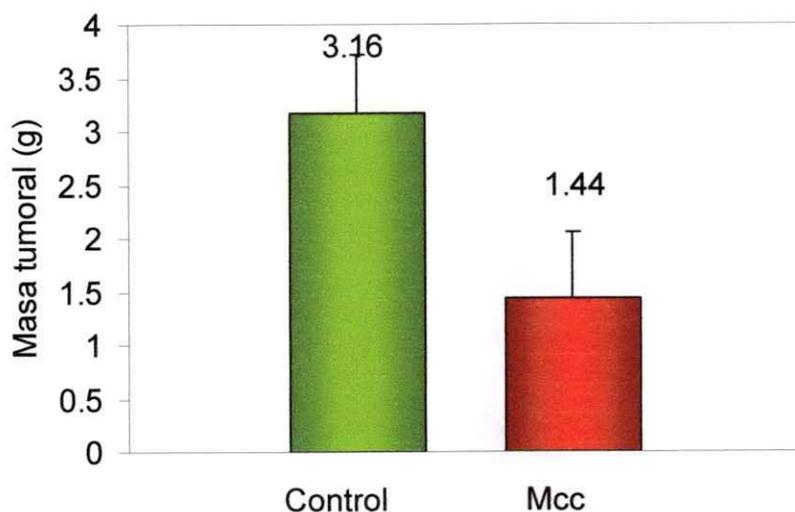


Figura 31: Efecto de la administración oral de MccE492 100 mg/Kg en el volumen de los tumores de melanoma murino en ratones C57/B6/L.

Se administró diariamente por medio de una sonda de alimentación 100 mg/Kg de MccE492 por 10 días. Como control se utilizó una muestra purificada desde sobrenadante de *E. coli* BL21np108 A: Determinación del volumen de los tumores durante el tratamiento oral de MccE492. El volumen de los tumores se determinó mediante un caliper. B: determinación de la masa tumoral de melanoma murino B16 en ratones C57/BL/6 (n=5-8) al final del tratamiento. Los datos se analizaron mediante el test *t*-Student ($p=0,028$).

las fibras de MccE492 son capaces de actuar sobre tumores subcutáneos cuando es administrada oralmente, lo cual implica que es capaz de ingresar a la circulación para acceder a los tumores. Es importante recordar que las fibras amiloides son resistentes al tratamiento con proteasas, y que al igual que los priones, que son un tipo de amiloide, podrían entrar a la circulación y actuar en su sitio blanco (Maignien y cols., 2005). En resumen, los resultados presentados en esta sección muestran que el tratamiento con las fibras de MccE492 disminuyen la viabilidad de las células tumorales de melanoma murino B16 *in vitro*, y reduce el volumen y la masa tumoral significativamente cuando es administrada intratumoralmente. Finalmente la administración oral de MccE492 produce un retardo en el desarrollo del tumor y la masa de estos es significativamente menor respecto al control al final del tratamiento.

3.18. Citotoxicidad de las fibras de MccE492 en células tumorales HT29 y HCT116 de carcinoma de colon humano.

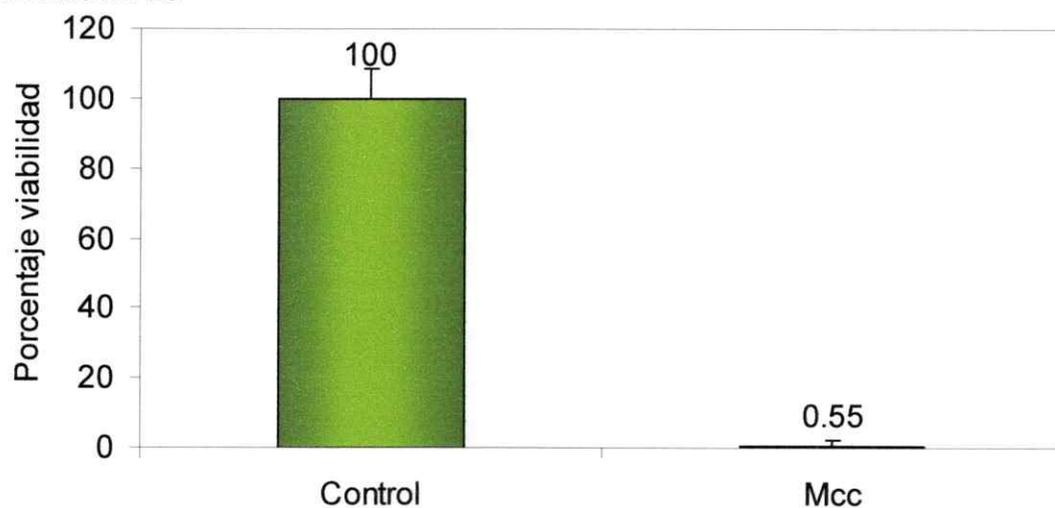
Se determinó el efecto citotóxico de las fibras de MccE492 sobre líneas tumorales humanas, con importancia por su prevalencia y difícil tratamiento en la población, para lo cual se eligieron diferentes aislados de células de carcinoma colon. HT29 y HCT116 son células tumorales aisladas desde un tumor primario usando el método de cultivo de explante, ambas causan carcinoma de colon rectal y son capaces de desarrollar tumor en ratones "nude" (<http://www.atcc.org>).

Los resultados de citotoxicidad *in vitro* (Figura 32) en las líneas tumorales humanas, muestran que las fibras de MccE492 son capaces de disminuir significativamente la viabilidad de estas células, por lo cual se procedió a continuar con la caracterización de la actividad antitumoral de la MccE492 en un modelo de tumor en ratones "nude".

3.19. Efecto citotóxico de la administración intratumoral de fibras MccE492 en modelo de carcinoma de colon humano.

Con el objetivo de determinar el efecto de las fibras de MccE492 en un modelo de tumores humanos *in vivo*, se realizaron ensayos "xenograft", que consisten en generar tumores humanos en ratones "nude", los cuales carecen de timo y por lo tanto, de sistema inmune. Así, estos ratones no producen rechazo a las células humanas. Con este modelo se puede estudiar el desarrollo de tumores humanos y el efecto que la administración de MccE492 tiene en su desarrollo. Inicialmente se evaluó el efecto en el crecimiento de los tumores en el tiempo, con un tratamiento que consiste en administrar MccE492 intratumoralmente cada día a una dosis de 5 mg/Kg. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 33. Se observa que la administración de fibras de MccE492 en los tumores producidos por las células HT29 disminuye el tamaño del tumor respecto de los controles. Los resultados presentados en la figura 33 corresponden a un promedio de los animales tratados. Si se examina individualmente el efecto en cada animal, se observa que la administración

A: Células HT29



B: Células HCT116

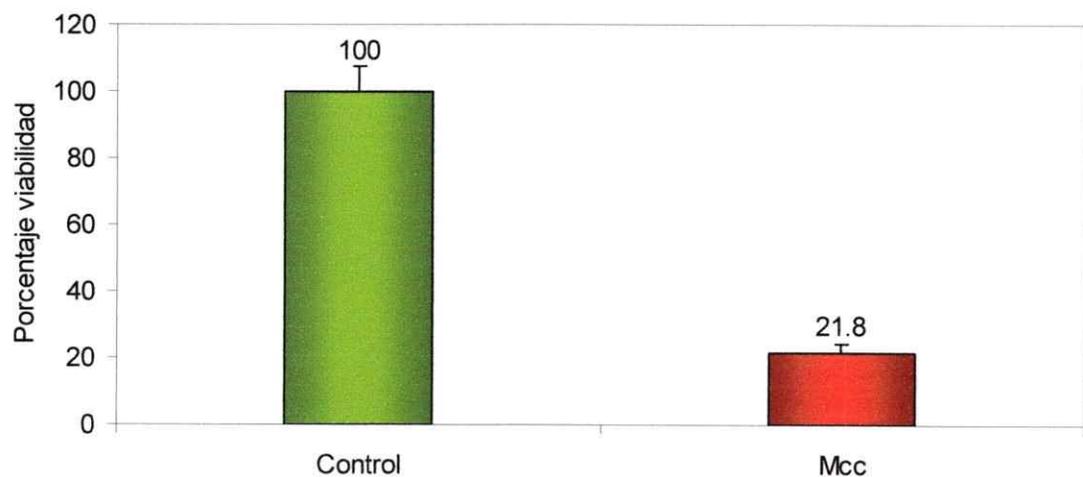
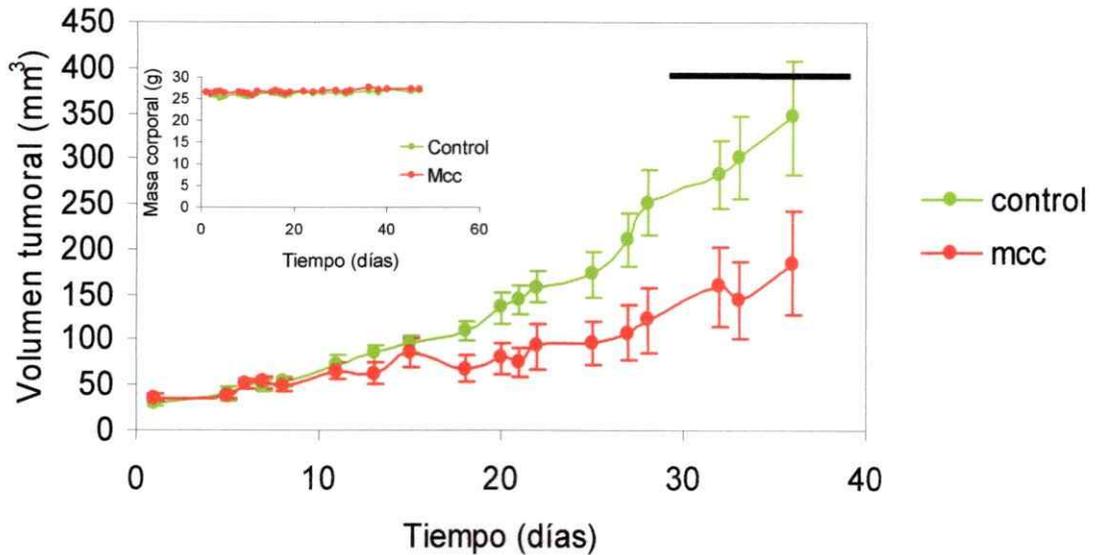


Figura 32: Efecto citotóxico *in vitro* de la MccE492 en células de carcinoma de colon humano.

A: Efecto en células HT29. B: efecto citotóxico en células HCT116. 1×10^5 células/mL fueron tratadas con fibras de microcina a una concentración de $50 \mu\text{M}$ durante 48 h. El porcentaje de viabilidad se determinó mediante el kit de proliferación CellTiter96 Aqueous (Promega). El control se realizó con purificaciones de sobrenadante de cultivos de la cepa *E. coli* BL21np108. Las mediciones se realizaron por triplicado.

A



B

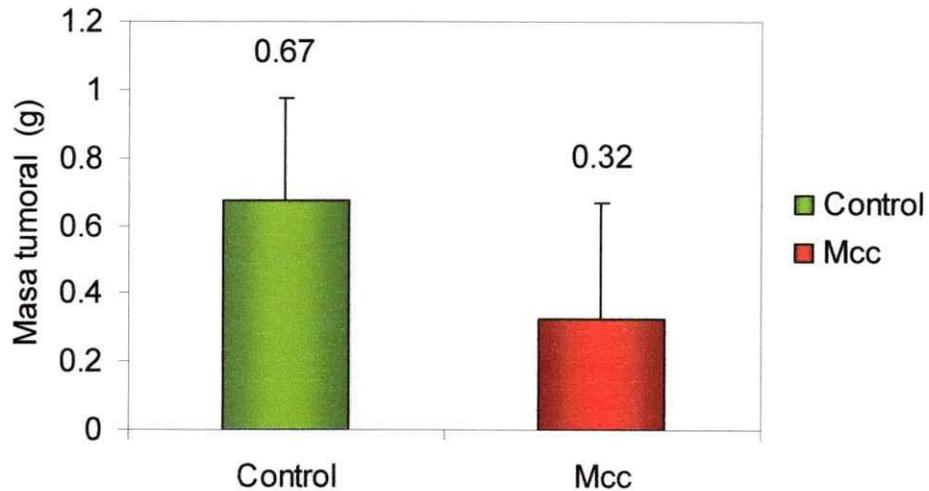


Figura 33: Efecto antitumoral de las fibras de microcina administradas intratumoralmente en el modelo de cáncer de colon humano HT29.

A: Efecto en el volumen tumoral durante el tratamiento con microcina. La barra negra indica los puntos que son estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$) B: Efecto en la masa de los tumores luego de 35 días de tratamiento. ($n=12$ por grupo). El inserto muestra el peso de los animales durante el tratamiento. El experimento consistió en administrar intratumoralmente cada día una dosis de 5 mg/Kg de fibras de MccE492 mediante una inyección. Como control se utilizó purificaciones de sobrenadantes de cultivos de *E. coli* BL21np108. Los datos se analizaron mediante test de *t*-Student ($p=0,03$).

intratumoral de MccE492 produce la remisión total de aproximadamente un 20% de los ratones tratados, los cuales al comienzo del tratamiento poseen tumores visibles y de un volumen de aproximadamente 12-13 mm³ (Tabla 5). En la figura 33B se muestra la masa tumoral, determinada en el momento en que se terminó el tratamiento con microcina. Se observa una reducción significativa de la masa tumoral. En la Tabla 5 se analizan los resultados presentados en esta figura considerando el tamaño de los tumores y los casos de remisión. Así, podemos observar que los ratones tratados con la muestra control, poseen tumores de grandes dimensiones, en cambio, aquellos tratados con fibras de MccE492, posee una distribución diferente de tumores, se observan mayor número de tumores pequeños y además remisión. Este resultado es muy importante ya que el tratamiento de los tumores con MccE492 comienza cuando los ratones presentan un tumor de dimensiones de 12-13 mm³, por lo que la administración de MccE492 elimina las células tumorales que se duplican y además las existentes.

3.20. Efecto citotóxico de la administración oral de fibras MccE492 en modelo de carcinoma de colon humano HT29.

Se analizó la capacidad de las fibras de MccE492 de disminuir el desarrollo de tumores humanos, pero esta vez administrando la MccE492 en forma oral. Para ello se utilizó una dosis de MccE492 de 50 mg/Kg que corresponde a 10 veces la dosis que fue administrada intratumoralmente.

Tabla 5: Distribución de la masa de los tumores de carcinoma de colon HT29 tratados intratumoralmente con 5 mg/Kg de MccE492.

	Control (%)	+ Microcina (%)
Tumores pequeños (0,05-0,5g)	36	60
Tumores grandes (0,51-1,5g)	64	20
Remisión total (0 g)	0	20

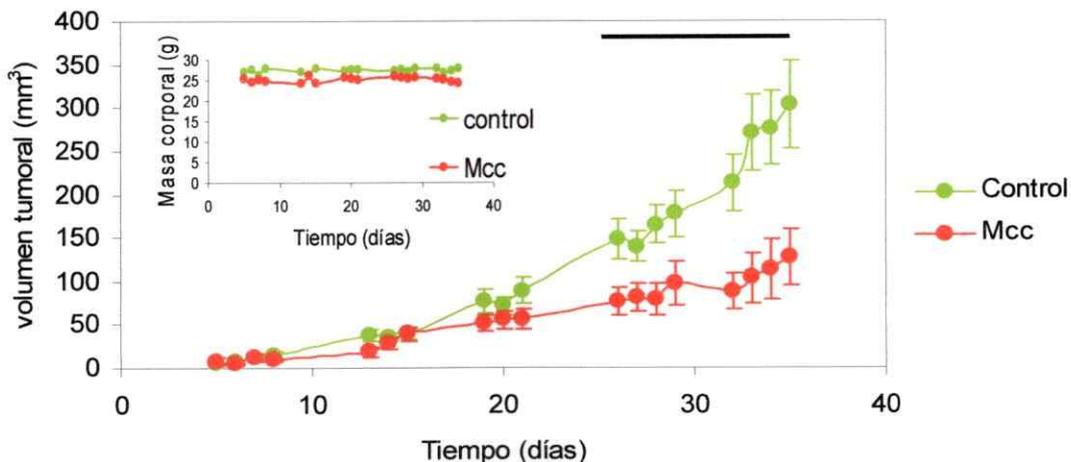
Los datos corresponden a la masa de los tumores extraídos al final del experimento de la figura 33.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 34. Se observa que la administración oral de MccE492 redujo el volumen de los tumores, y el análisis de los tumores el último día de tratamiento muestra que existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con MccE492. La distribución del tamaño de los tumores se presenta en la Tabla 6. Los ratones controles tienen un 67% de tumores grandes, en tanto que los tratados con MccE492 poseen mayoritariamente tumores de tamaños pequeños (70%). Es importante destacar que el 15% de los ratones tratados con MccE492 presentan remisión total de los tumores.

3.21. Toxicidad de las fibras de MccE492 administradas crónicamente.

Con el propósito de establecer si la MccE492 tiene un efecto tóxico sobre los animales tratados, se analizó el efecto del tratamiento sobre distintos órganos de los ratones tratados oralmente con una dosis de 50 mg/Kg de MccE492. Para ello se evaluó la masa de algunos órganos como bazo, hígado, pulmones y riñón comparado con la masa corporal de los animales durante el tratamiento (Tabla 7). Los resultados de este análisis muestran que la MccE492 no produce cambios significativos en la masa de los órganos analizados, ni sobre el peso corporal de los animales durante el tratamiento. Es importante evaluar la toxicidad a través de histología de los órganos, los cuales se encuentran en desarrollo en estos momentos.

A



B

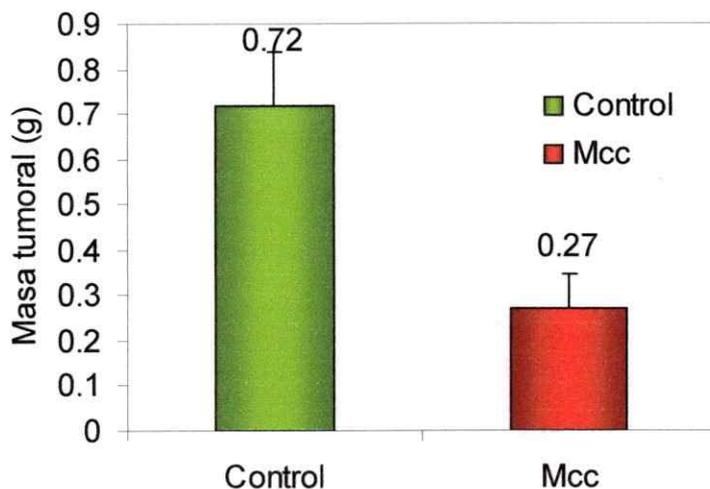


Figura 34: Efecto antitumoral de las fibras de MccE492 administradas oralmente en el modelo de carcinoma de colon humano HT29.

A: Efecto en el volumen tumoral durante el tratamiento. La barra muestra los puntos estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$). B: Efecto en la masa tumoral luego de 35 días de tratamiento. ($n= 12$ por grupo). Se administró una dosis de 50 mg/Kg cada día durante 35 días, mediante una sonda de alimentación intragástrica. Los datos se analizaron mediante test de t -Student ($p=0,04$).

Tabla 6: Distribución de la masa de los tumores carcinoma de colon HT29 tratados oralmente con 50 mg/Kg de McE492.

	Control (%)	+ Microcina (%)
Tumores pequeños (0,05-0,5g)	33	70
Tumores grandes (0,51-1,5g)	67	15
Remisión total (0 g)	0	15

Los datos corresponden a la masa de los tumores extraídos al final del experimento de la figura 34.

A



B



Fotografía de ratones con tumores al fin del tratamiento con MccE492 por vía oral.

A: Imagen de tumor representativo del 67 % del grupo control (tumores grandes). B: Imagen de un tumor representativo del 15 % del grupo tratado con MccE492 que presentan remisión total.

Tabla 7: Masa corporal y masa de los órganos de los animales tratados con MccE492

	Sin Tratamiento		Con Tratamiento Mcc	
	Masa (g)	Coefficiente M.órgano/M. animal X100	Masa (g)	Coefficiente M.órgano/M. animal X100
Animal	28,1±2,2		26,0±1,9	
Bazo	0,21±0,1	0,75±0,13	0,15±0,05	0,57±0,19
Hígado	1,3±0,2	4,69±1,25	1,16±0,2	4,47±0,77
Riñón**	0,2±0,05	0,7±0,16	0,18±0,03	0,67±0,1
Pulmón*	0,08±0,04	0,3±0,14	0,06±0,03	0,22±0,14

Los datos se obtuvieron de los ratones utilizados en en el tratamiento de 50 mg/Kg de MccE492 por vía oral.

La masa relativa de los órganos se obtuvo de la siguiente expresión:

$[Masa\ órgano\ (g) / Masa\ corporal\ (g)] \times 100$

* Se evaluó la masa del pulmón derecho.

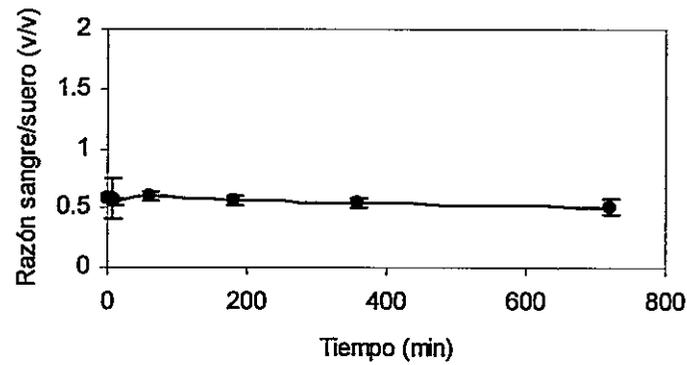
** Se evaluó el riñon derecho de cada animal.

3.22. Estudios farmacocinéticos.

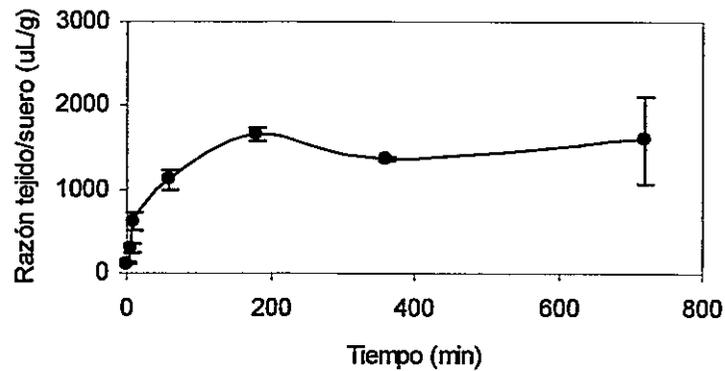
Para la utilización de la MccE492 como droga deben realizarse estudios farmacocinéticos, de modo de evaluar tanto la biodisponibilidad al ser administrada por vía intravenosa u oral, como la biodistribución en los distintos tejidos. Con esta información se puede establecer cual sería el "clearance" de la MccE492, es decir el volumen de plasma del cual es eliminada la droga por unidad de tiempo. El volumen de distribución (Vd) corresponde a la cantidad de droga en el cuerpo dividido por la cantidad de droga en la sangre, y el tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$ eliminación) corresponde al tiempo necesario para disminuir la concentración de droga en el plasma a la mitad.

Los resultados (Figura 35 y Tabla 8) muestran la distribución, en el tiempo de la microcina en los distintos órganos de los ratones, en la sangre y en el plasma, la cual se determinó por cuantificación de la radiactividad en detector de centello para partículas beta (LS1701, Beckman). Se observa que la MccE492 se distribuye rápidamente en el cuerpo del animal, pues a los pocos minutos se puede detectar la MccE492 en todos los órganos y no se observa acumulación importante de la microcina en órganos tales como el bazo o hígado. Por último, el tiempo que la microcina esta disponible en el organismo es mayor al esperado (19 h), ya que la naturaleza proteica de la microcina hacía predecir un tiempo de vida media más corto (por ejemplo la enzima superóxido dismutasa tiene una vida media de 5 min (Yamamoto y cols, 2004)).

A. Sangre



B. Hígado



C. Suero

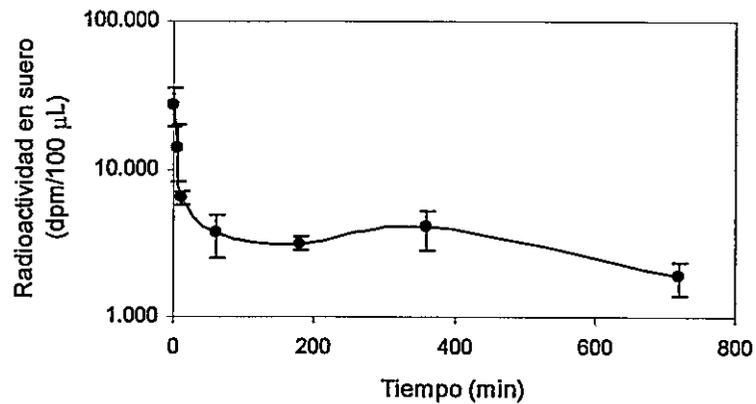


Figura 35: Curvas concentración $[^{35}\text{S}]$ microcina en los tejidos (respecto al suero) en el tiempo.

A: concentración de $[^{35}\text{S}]$ MccE492 en la sangre respecto al suero, B: Hígado y C: concentración de $[^{35}\text{S}]$ MccE492 en el suero. La MccE492 marcada radioactivamente se administró por vía intravenosa y los animales fueron sacrificados en los tiempos indicados. Se extrajeron los órganos y el suero se obtuvo mediante centrifugación de 300 μL de sangre. La radioactividad se midió en contador de centelleo de radiación beta. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Tabla 8: Parámetro farmacocinéticos de [³⁵S]MccE492 luego de inyectarla vía intravenosa en ratones C57/BL/6.

Parámetros		[³⁵ S]MccE492
C ₀	(%ID/mL)	34,1±6,9
t _{1/2} distribución	(min)	3,05±0,59
t _{1/2} eliminación	(h)	19,1±8,5
V _c	(mL)	3,23±0,75
V _{ss}	(mL)	23,3±2,4
CL _{tot}	(mL/min)	0,019±0,007

C₀: concentración inicial en el suero, %ID: porcentaje de la dosis inyectada, t_{1/2}: tiempo de vida media, V_c: volumen inicial de distribución, V_{ss}: estado estable del volumen de distribución, CL_{tot}: "clearance" del cuerpo total.

4. Discusión

La aparición de cepas resistentes a los antibióticos convencionales ha impulsado el estudio y desarrollo de agentes antimicrobianos que utilizan nuevos mecanismos de acción. En este contexto el estudio de diferentes bacteriocinas se ha convertido en un área de gran interés, pues son una nueva alternativa como agentes antimicrobianos y pueden ser utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias (Gillot y cols., 2005). La utilización de estos agentes para el control de bacterias patógenas requiere del conocimiento de los mecanismos de acción con el fin de utilizarlos en humanos o bien modificarlos para aumentar su eficiencia o espectro de acción.

Por otro lado, algunas cepas productoras de bacteriocinas han sido utilizadas por años como probióticos, un ejemplo de ello es Mutaflor[®], una cepa de *E. coli* llamada Nissle 1917, la cual no es patógena. Esto indica que las cepas productoras de bacteriocinas pueden aplicarse exitosamente en la población (Altenhoefer y cols., 2004).

En esta tesis se profundizó en el estudio de la MccE492, pues no existía información sobre los residuos importantes para la actividad de esta bacteriocina. Para esto se realizaron experimentos basados en la estrategia de mutagénesis al azar encontrándose dos mutaciones que interfieren con la secreción de la MccE492 al medio extracelular, una mutación que interfiere con

el inicio de la traducción (Leiva, 2008) y una mutación que promueve la agregación de la MccE492.

4.1. Mutaciones en el péptido líder de la MccE492.

La exportación de la MccE492 al medio extracelular requiere de un transportador ABC específico y una secuencia del péptido líder específica en el extremo N-terminal de la MccE492 (Lagos y cols., 2001); éste posee un motivo conservado glicina-alanina (del tipo doble glicina), que es esencial para la exportación. Se han descrito numerosos péptidos tanto de bacterias Gram negativas (colicina V, microcina 24, PA4141 de *Pseudonoma aeruginosa*), como de bacterias Gram positivas (lacticina 481, variacina, mutacina II) que utilizan este sistema de exportación (Michiels y cols., 2004; Nagao y cols., 2006; Pons y cols., 2002). En el desarrollo de esta tesis, se encontraron dos mutantes en el motivo tipo doble glicina, con los siguientes cambios: PL-G18S y PL-G18D. La caracterización de estas mutantes confirmó la necesidad de conservar estos aminoácidos para la exportación al medio extracelular.

4.2. Codón de inicio de la traducción de la MccE492.

El plasmidio pBA posee un reemplazo en el quinto codón: ATG por GTG, que cambia una metionina por una valina. Esta sustitución no afecta a la MccE492 madura y tampoco la cantidad que se produce. Durante la búsqueda de microcinas mutantes sin actividad bactericida, se seleccionó un clon que poseían la misma secuencia aminoacídica que la microcina producida por la

construcción pBA, pero utilizaba el codón GTA para la valina en la posición 5. Los resultados preliminares obtenidos en esta Tesis y complementados con los obtenidos durante el desarrollo de la Tesis de Mario Leiva, determinaron que el aminoácido 5 corresponde al codón de inicio de la traducción de la MccE492, que inicialmente no fue detectado en la construcción pBA porque el codón GTG puede ser utilizado como codón de inicio de la traducción (Fotheringham y cols., 1986; Sazuka y Ohara, 1996; Genser y cols., 1998).

4.3. MccE492 Q8H.

Durante este trabajo se obtuvo una mutación en la secuencia de la microcina exportada, esta corresponde a la MccE492 Q8H. La caracterización de esta mutante muestra que posee actividad bactericida sobre esferoplastos y que es capaz de formar canales iónicos *in vitro*. Estos resultados sugieren que la ausencia de actividad se debe a la incapacidad de ingresar a través de la membrana externa de la bacteria sensible. Posteriores ensayos de cinéticas de agregación, demostraron que la MccE492 Q8H se agrega espontáneamente, formando fibras amiloides. Por otro lado es posible observar a la MccE492 Q8H en forma oligomérica en algunas purificaciones. Estos resultados sugieren que la MccE492 Q8H se agrega inmediatamente después de la exportación, lo cual la inactivaría rápidamente. La actividad bactericida observada en esferoplastos, puede explicarse por la presencia de pequeñas proporciones de microcina soluble posiblemente oligoméricas asociadas a las fibras, las cuales podrían interactuar con la membrana citoplasmática, formar canales iónicos y matar a la

bacteria. Una explicación alternativa a esta observación es que los oligómeros de microcina Q8H son muy estables, pero su tamaño no es el adecuado para ingresar vía receptores de membrana externa, los cuales podrían requerir que la MccE492 se encuentre en forma de monómeros. En los esferoplastos, estos oligómeros serían capaces de ingresar al periplasma y de ejercer su acción bactericida (Figura 36).

La co-expresión de MccE492 silvestre y Q8H produce una mezcla que no posee actividad bactericida. Esto indica que al momento de producirse ambas microcinas interactuarían y probablemente hacia la formación de agregados inactivos. Esto podría explicarse por una aceleración en la formación de fibras amiloides o la transmisión de un cambio conformacional desde la MccE492 Q8H a la MccE492 silvestre que carece de actividad. Este proceso sería similar al observado en el modelo de formación de fibras, en el cual la etapa limitante es la formación de la semilla (Figura 36). Una vez que ésta se genera, la proteína soluble rápidamente se incorpora a la fibra amiloide (Westermarck, 2005). Al realizar ensayos de co-incubación *in vitro* de MccE492 silvestre y Q8H no se observó la pérdida de actividad, lo cual sugiere que no existe un intercambio de formas oligoméricas entre ambas microcinas. Una situación diferente ocurriría *in vivo*, pues en el proceso de exportación la MccE492 se encuentra desplegada, y una vez en el espacio extracelular se asociarían y plegarían probablemente formando oligómeros mixtos los cuales son inactivos. La MccE492 Q8H presenta unión a rojo Congo y tioflavina T, ambas

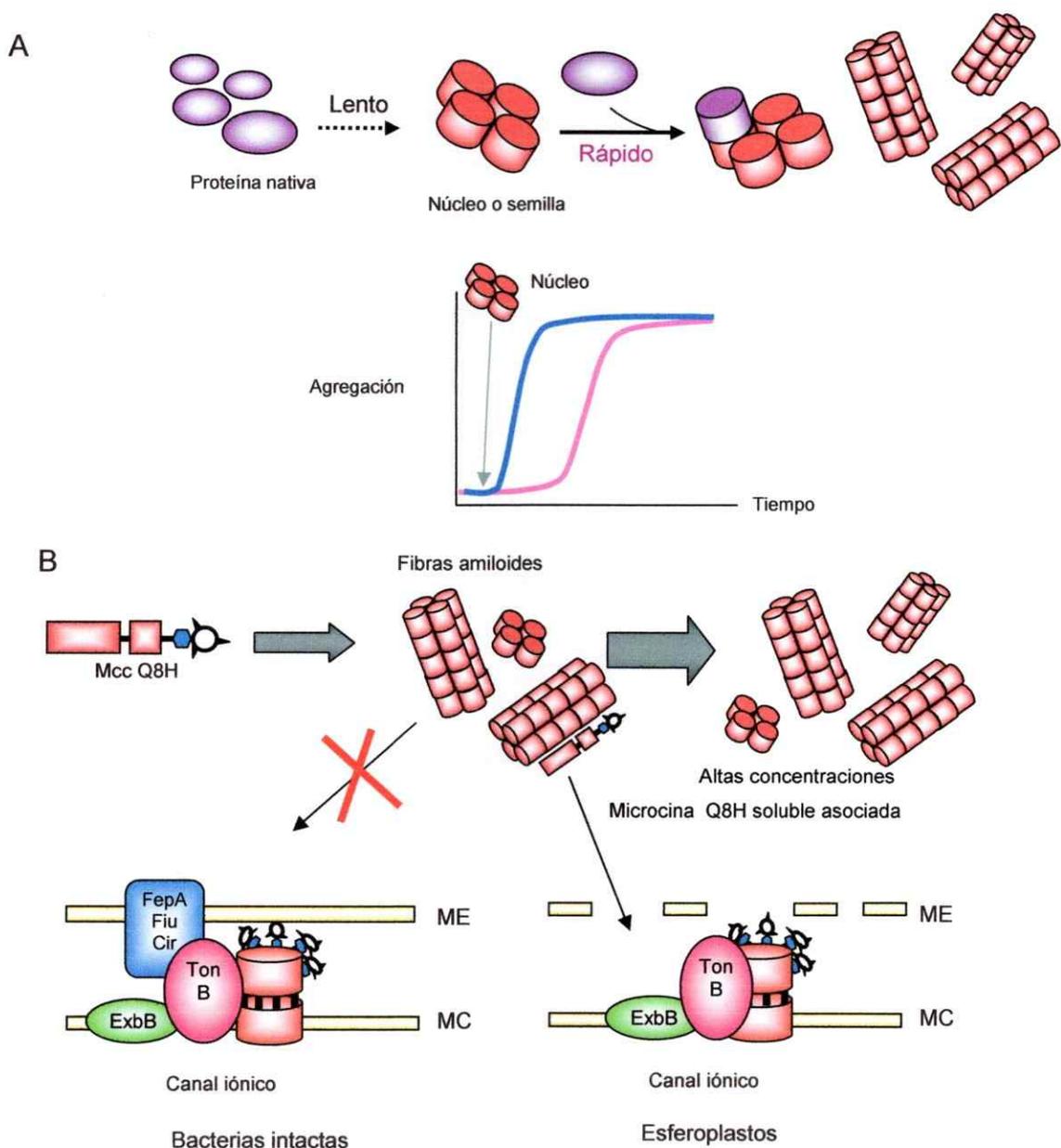


Figura 36: Modelo del comportamiento de la microcina Q8H.

La microcina Q8H posee una cinética de agregación acelerada que lleva la formación de fibras amiloide. A: Modelo de la cinética de agregación de las fibras amiloide. Se observa que el paso limitante es la generación de un núcleo o semilla, con línea punteada se señala el paso que estaría favorecido por la MccE492 Q8H. La incorporación de un núcleo o semilla a una muestra de microcina soluble, acelera la generación de fibras. La microcina Q8H podría actuar como una semilla al encontrarse en presencia de microcina silvestre, acelerar la agregación e inactivar a la microcina. B: Modo de acción de la microcina Q8H en canales iónicos y esferoplastos. Las fibras no poseen actividad bactericida. La microcina Q8H forma canales iónicos y es activa en esferoplastos, lo cual indica que existe un defecto para atravesar la membrana externa. En el lado derecho se esquematiza en esferoplastos, donde oligómeros pequeños de microcina Q8H podrían formar canales iónicos y matar a la bacteria.

características propias de fibras amiloide. Se está analizando mediante microscopia electrónica la morfología de las fibras de la mutante para evaluar si estas son similares a las fibras de la MccE492 silvestre. A diferencia de lo observado en las fibras producidas por la MccE492 silvestre, que son mayoritariamente helicoidales, la MccE492 Q8H forma fibras planas. Esto último posiblemente esté relacionado con un aumento de las interacciones laterales.

4.4. Efecto de TonB en la actividad bactericida.

TonB es una proteína de la membrana citoplasmática esencial para la actividad de la MccE492. Este trabajo demuestra que el C-terminal de TonB es necesario para el paso siguiente en la actividad bactericida de la microcina, ya sea la formación del poro, como parte del poro, o contribuyendo a la inserción de la microcina en la membrana. Los resultados con las mutantes TonB S16L y TonB Δ 43-239 muestran que es necesario tener esta proteína en estado funcional para observar la actividad bactericida, pues ambas mutantes resultaron resistentes a la MccE492. Esferoplastos de la mutante TonB Δ 43-239 son completamente resistentes a la MccE492, lo que indica que no solo el segmento transmembrana es necesario para la actividad, sino también el dominio que interactúa con los receptores. Por otro lado esferoplastos de la mutante TonB S16L muestran sensibilidad a la MccE492. El residuo 16 de TonB es esencial para la actividad de TonB (Larsen y cols., 2007). En presencia de altas dosis de MccE492 (300 μ g/mL) los esferoplastos de células que expresan TonB S16L son parcialmente sensibles, con un 10% de viabilidad. Por lo tanto,

la MccE492 en el espacio periplasmático, requiere de la secuencia completa de esta proteína TonB, sin una estricta necesidad de que esta proteína sea funcional. La literatura indica que el aminoácido 16 es importante en la interacción de TonB con ExbB (Larsen y cols., 2007), una de las proteínas que energiza a TonB permitiendo la transferencia de energía a la membrana externa. Las células que expresan TonB S16L y la proteína de la inmunidad MceB, siguen siendo sensibles a la acción de la microcina (en esferoplastos), a diferencia de lo que ocurre en presencia de TonB silvestre. Este resultado indica que el segmento transmembrana de TonB, y específicamente el aminoácido 16, también sería importante para la acción de la inmunidad de la MccE492. Una explicación alternativa es que se requiere de la proteína TonB funcional para la actividad de la proteína de la inmunidad.

Recientemente se ha descrito que las proteínas MazYZ (permeasas de manosa), que se ubican en la membrana citoplasmática, son esenciales para la actividad. Aún no se ha descrito el rol que estas proteínas cumplen en la actividad bactericida de la MccE492 (Bieler y cols., 2006). Esto abre la posibilidad de que exista un paso posterior a TonB necesario para la actividad de la MccE492, o bien la acción en la membrana de TonB es conjunta con ManYZ.

4.5. Fibras amiloides.

La MccE492 forma fibras amiloides durante la fase estacionaria de crecimiento bacteriano, o *in vitro* al incubarla a pH 7,0 durante 15 h.

Experimentos *in vitro* o *in vivo* muestran que estas fibras carecen de actividad bactericida y que existe una relación directa entre la pérdida de la actividad en fase estacionaria y la formación de fibras (Bieler y cols., 2005). Se ha descrito que durante la fase estacionaria de crecimiento bacteriano los genes *mcelJ*, necesarios para la modificación e ingreso de la microcina a la bacteria sensible, no se expresan, por lo se presume que la MccE492 no modificada se acumularía en el medio extracelular, promoviendo la formación de semillas las cuales captarían a la MccE492 soluble evitando su acción. A pesar de la ausencia de actividad bactericida de las fibras de MccE492, nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio del doctor Claudio Soto, demostraron que estas fibras disminuyen significativamente a viabilidad de líneas de células tumorales.

4.6. Citotoxicidad.

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud público, debido a su alta prevalencia y mortalidad. La búsqueda de nuevos tratamientos para esta enfermedad ha sido el objeto de estudio de numerosos grupos y con aproximaciones experimentales muy diversas.

Se ha descrito que algunas bacteriocinas parcialmente purificadas producidas por *E. coli* o *Pseudomonas aeruginosa*, tiene la capacidad de disminuir la viabilidad de células malignas, causantes de cáncer (Abdi-Ali y cols., 2004). Estudios de nuestro laboratorio describieron que la MccE492 es capaz de disminuir significativamente la viabilidad de algunas células

eucarióticas. Estudios de la capacidad citotóxica de la MccE492 determinaron que afecta a líneas de células tumorales, HeLa, B16 y Jurkat siendo inactiva en cultivos primarios y líneas de células no tumorales (Hetz y cols., 2002). El mecanismo por el cual la MccE492 es tóxica en estas células es por inducción de apoptosis. Se ha observado activación de caspasa 3, degradación de DNA y liberación de calcio de los reservorios internos, típicos de apoptosis. Pero altas concentraciones de MccE492 en cultivo de estas células provoca muerte por necrosis (Hetz y cols., 2002).

La formación de fibras amiloides se han asociado a enfermedad neurodegenerativas y algunas enfermedades sistémicas como la diabetes (Meng y cols., 2007; Soto y Estrada, 2008). Las fibras asociadas a enfermedad poseen como blanco distintas células, produciendo diversas enfermedades dependiendo de la célula blanco de su actividad tóxica (Angorogiannis y cols., 2004, Glabe y Kayez, 2006). Durante años se ha asociado un tipo de células blanco para diferentes agregados amiloides, pero aún no se ha determinado que factor dirige esta especificidad (Cecchi y cols., 2005). La toxicidad de las fibras está dada principalmente por estructuras oligoméricas, o intermediarios de la agregación.

La citotoxicidad provocada por la MccE492 se observa con todas sus formas: MccE492 modificada, microcina no modificada, microcina en forma soluble y amiloide, lo cual indica que el efecto tóxico se debe a una propiedad de la MccE492, probablemente relacionada con la capacidad de formar canales iónicos. Las fibras de MccE492 Q8H requiere menos tiempo para causar el

efecto citotóxico en las células tumorales, lo cual podría deberse a que la entrega de MccE492 en las células es más eficiente en este mutante, o bien, que las fibras de MccE492 Q8H poseen toxicidad mayor.

4.7. Efecto antitumoral de la MccE492.

El efecto antitumoral de las fibras de amiloide de la MccE492 silvestre se evaluó *in vivo* en el modelo de cáncer murino, el melanoma B16 en ratones C57/BL/6. Se eligió este modelo tumoral porque es muy agresivo, por tanto si se observa algún efecto era plausible encontrar también buenos resultados en otros tumores. En el modelo de melanoma murino se observa un efecto antitumoral significativo tanto en el volumen, como en la masa de los tumores cuando es administrada intratumoralmente. La administración oral solo muestra un retardo en el desarrollo de los tumores, cuando se evalúa el volumen de los tumores en el tiempo, pero la masa tumoral de los ratones tratados oralmente con microcina resultó ser estadísticamente menor. Esta diferencia se puede atribuir a que muchos de los tumores crecen hacia el interior del animal, por lo que la estimación del volumen del tumor esta sujeta a errores.

Se analizó el efecto antitumoral de las fibras de MccE492 en un modelo de carcinoma de colon humano. Para desarrollar estos experimentos, utilizamos ratones "nude", los cuales permiten la implantación de células humanas, ya que carecen de sistema inmune. Los efectos observados en los tumores no se deben a una reacción inmune, sino que a una propiedad específica de la MccE492. Los resultados observados muestran que la MccE492, al igual que en

el modelo de cáncer de melanoma murino, disminuye el desarrollo de los tumores de carcinoma de colon humano, al ser administrado intratumoralmente. La administración oral de la MccE492 produjo la disminución del tamaño de los tumores y en un 15% de los casos, produjo remisión total. De esta manera el uso en el tratamiento del cáncer de una proteína bacteriana por vía oral, y más aún, una proteína en forma amiloide, es algo no reportado hasta la fecha, y un importante antecedente en la búsqueda de terapia para esta enfermedad. La entrega oral de fibras amiloides puede haber sido un punto esencial en los resultados obtenidos, pues estas fibras son resistentes a tratamiento de pH ácidos, como los del estómago. Esto podría permitir que la microcina llegue a los tumores sin afectar su actividad. Se ha descrito que los amiloides pueden ingresar a la circulación, pues en el caso de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob producida por la proteína prionica, que forma amiloide, es ingerida en la carne contaminada y posteriormente ingresa al cerebro donde transforma la proteína prionica humana a la forma patógena (Wadsworth y cols., 2007).

Los resultados de esta Tesis indican que la MccE492 puede ser utilizada tanto como antibiótico sobre bacterias Gram negativas, como en el tratamiento de carcinoma de colon sin producir efectos tóxicos, lo cual la convierte en un modelo de estudio de los mecanismos involucrados en la toxicidad de ambos tipos de células.

5. Conclusiones

- El aminoácido 8 (glutamina) de la MccE492 madura está implicado en la interacción entre monómeros. Su reemplazo por histidina produce una microcina que se agrega rápidamente y que no puede atravesar la membrana externa.
- La MccE492 una vez en el periplasma no requiere de la proteína TonB funcional para ejercer su actividad bactericida. El carboxilo terminal de esta proteína es necesario para la acción tóxica de la MccE492. La proteína de la inmunidad requiere de TonB funcional.
- Las fibras de MccE492 son tóxicas para las células eucariotes y esta toxicidad es específica para algunos tipos de líneas tumorales, sin afectar cultivos primarios o líneas no tumorales.
- La MccE492 disminuye el volumen y la masa de tumores de melanoma murino B16 y carcinoma de colon humano HT29, al ser administrada por vía intratumoral y oral.

6. Referencias

- Abdi-Ali, A., Worobec, E., Deezagi, A., Malekzadeh, F. (2004).** Cytotoxic effect of pyocin S2 produced by *Pseudomonas aeruginosa* on the growth of three human cell lines. *Can. J. Microbiol.* 50: 375-381.
- Altenhoefer, A., Oswald, S., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J., Oelschlaeger, T. (2004).** The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40: 223-229
- Agorogiannis, E., Agorogiannis, G., Papadimitriou A., Hadjigeorgiou G. (2004).** Protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30: 215-224
- Azpiroz, M., Rodríguez, E., Laviña, M. (2001).** The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45: 969-972.
- Azpiroz M. y Laviña M. (2004).** Involvement of enterobactin synthesis pathway in production of microcin H47. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48: 1235-1241.
- Azpiroz M. y Laviña M. (2007).** Modular Structure of Microcin H47 and Colicin V. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51: 2412-2419.
- Baeza, M., (2003).** Mecanismo de inmunidad y de translocación de la microcina E492 en la célula blanco. Tesis Doctorado en Ciencias, Mención Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Baxa, U., Wickner, R., Steven, A., Anderson, E., Marekov, L. (2007).** Characterization of β - sheet structure in Ure2^{p1-89} yeast prion fibril by nuclear magnetic resonance. *Biochemistry.* 46: 13149-13162.
- Bellomio, A., Vicent, P., Aruri, B., Farías, R., Morero, R. (2007).** Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *J. Bacteriol.* 189: 4180-4186.
- Bieler S., Estrada, L., Lagos, L., Baeza, M., Castilla, J., Soto, C. (2005).** Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *J. Biol. Chem.* 280: 26880-26885.

- Bieler, S., Silva, F., Soto, C., Belin, D. (2006).** Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease J. *Bacteriol.* 188: 7049-7061.
- Bleuel, C., Große, C., Taudte, N., Scherer, J., Wesenberg, D., Krauß, G., Nies, D., Grass, G. (2005).** TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187: 6701-6707.
- Boon, T. (1972).** Inactivation of ribosomes *In vitro* by colicin E3 and its mechanism of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 549-552.
- Boon T. (1971).** Inactivation of ribosomes *in vitro* by colicin E3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2421-2425.
- Bowman, C., Dahlberg, J., Iemura, T., Konisky, J., Nomura, M. (1971).** Specific inactivation of 16S ribosomal RNA by colicin E3 *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 964-968.
- Buchanan, S., Smith, B., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., Deisenhofer, J. (1999).** Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* 6: 56-63.
- Cascales, E., Buchanan, S., Duché D., Kleanthous, C., Lloubés, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., Cavard, D. (2007).** Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 158-229.
- Cecchi, C., Baglioni, S., Fiorillo, C., Pensalfini, A., Liguri, G., Nosi, D., Rigacci, S., Bucciantini, M., Stefani, M. (2005).** Insights into the molecular basis of the differing susceptibility of varying cell types to the toxicity of amyloid aggregates. *J. Cell. Sci.* 118: 3459-3470.
- Cherezov, V., Yamashita, E., Liu, W., Zhahnina, M., Cramer, W., Caffrey, M. (2006).** *In Meso* structure of the cobalamin transporter, BtuB, at 1.95 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 364: 716-734.
- Chumchalová J. y Smarda, J. (2003).** Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia. Microbiol.* 48: 111-115.
- Coppi, G., Bondi, M., Coppi, A., Rossi, T., Sergi S., Iannuccelli V. (2008).** Toxicity and gut associated lymphoid tissue translocation of polymyxin B orally administered by alginate/chitosan microparticles in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 60: 21-26.

Cotter, P., Hill, C., Ross P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777-778.

Corsini, G., Baeza, M., Monasterio, O., Lagos, R. (2002). The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochimie.* 84: 539-544.

de Graaf, F., Stukart, M., Boogerd, F., Matselaar, K. (1978). Limited proteolysis of cloacin DF13 and characterization of the cleavage products. *Biochemistry.* 17: 1137-1142.

Delgado, M., Solbiati, J., Chiuchiolo, M., Farias, R., Solomón, R. (1999). *Escherichia coli* outer membrane protein TolC is involved in production of the peptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* 181: 1968-1970.

de Lorenzo, V. (1984). Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Microbiol.* 139: 72-75.

de Lorenzo, V. y Pugsley, A. (1985). Microcin E492, a low molecular weight peptide antibiotic which cause depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 27: 666-669.

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

Destoumieux-Garzón, D., Thomas, X., Santamaria, M., Goulard, C., Barthélémy, M., Boscher, B., Bessin, Y., Molle, G., Pons, A., Letellier, L., Peduzzi, J., Rebuffa, S. (2003). Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 49: 1031-1041.

Destoumieux-Garzón D., Peduzzi, J., Thomas, X., Djediat, C., Rebuffat, S. (2006). Parasitism of iron-siderophore receptors of *Escherichia coli* by the siderophore-peptide microcin E492m and its unmodified counterpart. *BioMetals.* 19: 181-191.

Devanathan, S., y Postle k. (2007). Studies on colicin B translocation: FepA is gated by TonB. *Mol. Microbiol.* 65: 441-453.

Erni, B., Zanolari, B., Graff, P., Kocher, H. (1989). Mannose permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264: 18733-18741.

- Estrada, L. (2005).** Efecto antitumoral de la microcina E492, un amiloide bacteriano. Memoria de título Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Farkas-Himsley, H. y Cheung, R. (1976).** Bacterial proteinaceous products (bacteriocins) as cytotoxic agents of neoplasia. *Cancer. Res.* 36: 3551-3567.
- Farkas-Himsley, H., Rosen, R., Arab, S., Lingwood, C. (1995).** The bacterial colicin active against tumor cells *in vitro* and *in vivo* is a verotoxin1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6996-7000.
- Fath, M. y Kolter, R. (1993).** ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57: 995-1017.
- Ferguson, A., Hofmann, E., Coulton, J., Diederichs, K., Welte, W. (1998).** Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science.* 282: 2215-2220.
- Ferguson, G., Watterson, K., Palmer, T. (2002).** Subtype-Specific regulation of receptor internalization and recycling by the carboxy-terminal domains of the human A₁ and rat A₃ adenosine receptors: consequences for agonist-stimulated translocation of arrestin3. *Biochemistry.* 41: 14748-14761.
- Fischbach, M., Lin, H., Liu, D., Walsh, C. (2006).** How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat. Chem. Biol.* 2: 132-138.
- Fotheringham, I., Dacey, S., Taylor, P., Smith, T., Hunter, M., Finlay, M., Primrose, S., Parker, D., Edwards, R. (1986).** The cloning and sequence analysis of the *aspC* and *tyrB* genes from *Escherichia coli* K12. Comparison of the primary structures of the aspartate aminotransferase and aromatic aminotransferase of *E. coli* with those of the pig aspartate aminotransferase isoenzymes. *Biochem. J.* 234: 593-604.
- Genser, F., Renner, G., Schwab, H. (1998).** Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis genes from *Alcaligenes latus* DSM1124. *J. Biotechnol.* 64: 125-135.
- Gillor, O., Nigro, L., Riley, M. (2005).** Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.* 11: 1067-1075.
- Glabe y Kayez, R. (2006).** Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology.* 66: 74-78.

- Guarente L. y Beckwith J. (1978).** Mutant RNA polymerase of *Escherichia coli* terminates transcription in strains making defective rho factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 294-297.
- Hetz, C., Bono, M., Barros, F., Lagos, R. (2002).** Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induce apoptosis in some human cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 2696-2701.
- Hill, R. y Farkas-Himsley, H. (1991).** Further studies of the action of a partially purified bacteriocin against a murine fibrosarcoma. Cancer. Res. 51: 1359-1365.
- Hwang, J., Zhong, X., Tai, P. (1997).** Interactions of dedicated export membrane proteins of the colicin V secretion system: CvaA, a member of the membrane fusion protein family, interacts with CvaB and TolC. J. Bacteriol. 179: 6264-6270.
- Kazakov, T., Metlitskaya, A., Severinov, K. (2007).** Amino acid residues required for maturation, cell uptake and processing of translation inhibitor microcin C. J. Bacteriol. 189: 2114-2118.
- Kim, H., Kim, B., Kim, J., Eom, J., Bang, I., Bang, S., Lee, I., Park, Y. (2008).** N-terminal residues of SipB are required for its surface localization on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology. 154: 207-216.
- Lagos, R., Villanueva J., Monasterio, O. (1999).** Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its Immunity protein. J. Bacteriol. 181: 212-217.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X, Monasterio, O. (1993).** Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. FEBS Lett. 321: 145-148.
- Lagos, R., Baeza, M., Corsini G., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J., Vergara, C., Monasterio, O. (2001).** Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. Mol. Microbiol. 42: 229-243.
- Lancaster, L., Wintermeyer, W., Rodnina, M. (2007).** Colicins and their potential in cancer treatment. Blood Cells. Mol. Dis. 38: 15-18.
- Larsen, R., Thomas, M., Postle, K. (1999).** Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. Mol. Microbiol. 31: 1809-1824.

- Larsen, R., Letain, T., Postle, K. (2003).** *In vivo* evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 49: 211-218.
- Larsen, R., Deckert, G., Kastead, K., Devanathan S., Keller, K., Postle, K. (2007).** His₂₀ provides the sole functionally significant side chain in the essential TonB transmembrane domain. *J. Bacteriol.* 189: 2825-2833.
- Leiva, M. (2008).** Importancia de la serina 84 y el motivo glicina serina 83-84 de la Microcina E492 en la modificación postraduccional y la actividad bactericida. Memoria de Título Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Locher, K., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J., Moras, D. (1998).** Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structure of free and ferrichrome-bound state reveal allosteric changes. *Cell* 95: 771-778.
- Luria, S. (1982).** The mistaken identity of colicin A. *J. Bacteriol.* 149: 386.
- Maignien T., Shakwehb, M., Calvo P., Marcé M., Sales M., Fattal, E., Deslys J., Couvreur, P., Lasmezas C. (2005).** Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE. *Int. J. Pharm.* 298: 293-304.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A., Berkeley, C. (1972).** *Methods Microbiol.* 7A, 315-422.
- Meng, F., Abedini, A., Song, B., Raleigh, D. (2007).** Amyloid formation by pro-islet amyloid polypeptide processing intermediates: Examination of the role of protein heparan sulfate interactions and implications for islet amyloid formation in type 2 diabetes. *Biochemistry* 46: 12091-12099.
- Mercado, G., Tello, M., Marin, M., Monasterio, O., Lagos, R. (2008).** The production *in vivo* of microcin E492 with antibacterial activity depends on salmochelin and EntF. *J. Bacteriol.* 190: 5464-5471.
- Michiels, J., Dirix, G., Vanderleyden J., Chuanwu J. (2001).** Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram negative bacteria. *Trends Microbiol.* 9: 164-168.
- Miller J. (1972).** *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miller J. (1992).** *A short course in bacterial genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Nagao, J., Asaduzzaman, S., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., Sonomoto, K. (2006).** Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *J. Biosci. Bioeng.* 102: 139-149.
- Nolan, E., Fischbach, M., Koglin, A., Walsh, C. (2007).** Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 14336- 14347.
- Ogawa, T., Tomita, K., Ueda, T., Watababe, K., Uozumi, T., Mazaki, H. (1998).** A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons. *Science* 283: 2097-2100.
- Ohno-Iwashita, Y., Imahori, K. (1980).** Assignment of the functional loci in colicin E2 and E3 molecules by the characterization of their proteolytic fragments. *Biochemistry* 19: 652-659.
- Ohno-Iwashita, Y. and Imahori, K. (1982).** Assignment of the functional loci in the colicin E1 molecule by characterization of its proteolytic fragments. *J. Biol. Chem.* 257: 6446-6451.
- Orellana C., Lagos, R. (1996).** The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcin antagonist. *FEMS Microbiol. Lett.* 136: 297-303.
- Panchal R., Smart M., Bowser D., Williams D., Petrou S. (2002).** Pore-forming proteins and their application in biotechnology. *Curr Pharm. Biotechnol.* 3: 99-115.
- Patzer, S., Baquero, M, Bravo, D., Moreno, F., Hantke, K. (2003).** The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catechol siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron. *Microbiology* 149: 2557-2570.
- Peduzzi, J. y Rebuffat, S. (2003).** Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 49: 1031-1041.
- Poey, M., Azpiroz, M., Laviña, M. (2006).** Comparative análisis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 1411-1415.
- Pons, A., Laneluc, I., Cottenceau, G., Sable, S. (2002).** New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie* 84: 531-537.
- Postle, K. y Kadner, R. (2003).** Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* 49: 869-882.

- Postle, K. y Larsen, R. (2007).** TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals* 20: 453-465.
- Rodríguez, E. y Laviña, M. (2003).** The proton channel is the minimal structure of ATP synthase necessary and sufficient for microcin H47 antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 181-187.
- Saito, H., Watanabe, T., Tomioka, H. (1979).** Purification, properties, and cytotoxic effect of a bacteriocin from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 15: 504-509.
- Sazuka T. y Ohara O. (1996).** Sequence features surrounding the translation initiation sites assigned on the genome sequence of *Synechocystis* sp. strain PCC6803 by amino-terminal protein sequencing. *DNA Res.* 3: 225-232.
- Sambrook J., Fritch, E., Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning.* Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sano, Y., Matsui, H., Kobayashi, M., Kageyama, M. (1993).** Molecular structures and functions of pyocins S1 and S2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 175: 2907-2916.
- Senior, B. y Holland, I. (1971).** Effect of colicin E3 upon the 30S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 959-963.
- Smajs D. y Weinstock, G. (2001).** Genetic Organization of Plasmid ColJs encoding colicin Js activity, immunity and release genes. *J. Bacteriol.* 183: 3949-3957.
- Soto, C. y Estrada L. (2008).** Protein Misfolding and Neurodegeneration. *Arch. Neurol.* 65: 184-189.
- Strahsburger, E., Baeza, M., Monasterio, O., Lagos, R. (2005).** Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu, and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 3083-3086.
- Suzuki, I. (1978).** Colicin E3 inhibits rabbit globin synthesis. *FEBS Lett.* 89: 121-125.
- Thomas, X., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Afonsos, C., Blond, A., Birlirakis, N., Goulard, C., Dubost, L., Thai, R., Tabet, J., Rebuffat, S. (2004).** Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.* 279: 28233- 28242.

- Toba, M., Masaki, H., Ohta, T. (1988).** Colicin E8, a DNase which indicates an evolutionary relationship between colicins E2 and E3. *J. Bacteriol.* 170: 3237-3242.
- Tomita, K., Ogawa, T., Uozumi, T., Watanabe, K., Masaki, H. (2000).** A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8278-8283.
- Traub, I., Gaisser, S., Braun, V. (1993).** Activity domains of the TonB protein. *Mol. Microbiol.* 8: 409-423.
- van der Helm, D., Chakraborty, R., Ferguson, A., Smith, B., Esser, L., Deisenhofer, J. (2002).** Bipartite gating in the outer membrane protein FecA. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 708-710.
- Wadsworth, J. y Collinge, J. (2007).** Update on human prion disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1772: 598-609.
- Weiss, R. (1976).** Protoplast formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 128: 668-670.
- Westermarck, P. (2005).** Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS J.* 272: 5942-5949.
- Wilkens, M., Villanueva, J., Cofré, J., Chnaiderman, J., Lagos, R. (1997).** Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 179: 4789-4794.
- Winklhofer, K., Tatzelt, J., Haass, C. (2008).** The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J.* 27: 336-349.
- Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Kamada H, Sato K, Okamoto T, Mukai Y. (2004).** Poly(vinylpyrrolidone-co-dimethylmaleic acid) as a novel renal targeting carrier. *J. Controlled Release* 95: 229-237.
- Yue, W., Grizot, S., Buchanan, S. (2003).** Structural evidence for iron- free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrana transporter FecA. *J. Mol. Biol.* 332: 353-368.
- Zitzer, A., Wassenaar T., Walev, I., Bhakdi, S. (1997).** Potent membrane-permeabilizing and cytotoxic action of *Vibrio cholerae* cytolysin on human intestinal cells. *Infect. Immun.* 65: 1293-1298.

Zhou, Z., Lai, J., Walsh, C. (2006). Interdomain communication between the thiolation and thioesterase domains of EntF explored by combinatorial mutagenesis and selection. *Chem. Biol.* 13: 869-879.