

UCH-FC
DOC-B
W736
C.L

**CARACTERIZACION GENETICA Y BIOQUIMICA DE LA MICROCINA E492
DE *Klebsiella pneumoniae***

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología
Facultad de Ciencias

por

MARCELA ANDREA WILKENS ANWANDTER

Julio, 1996

25 OCT 2000



Director de Tesis: DRA. ROSALBA LAGOS MONACO

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO


Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Marcela Andrea Wilkens Anwandter

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 9 de Mayo de 1996.


Director de Tesis:

Dra. Rosalba Lagos Mónaco


.....

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Margarita Carú.....


.....

Dr. Manuel Rodríguez.....


25 OCT 2000


.....

Dr. Daniel Wolff.....


.....

Dr. Carlos Jerez.....


.....



Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile bajo la dirección de la Dra. Rosalba Lagos y fue financiada parcialmente por el Departamento Técnico de Investigación (DTI, Proyecto PGI 107), por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT, Proyectos 920005, 1930838 y 1961009).

La realización de esta Tesis fue apoyada por la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Santiago de Chile mediante una Comisión de Perfeccionamiento.

A Bernardo
Carolina y Rodrigo

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a todas las personas que participaron de alguna forma en la realización de esta tesis y temo que olvidaré nombrar a muchas de ellas.

A Rosalba Lagos y Octavio Monasterio por haberme dado su valioso apoyo, consejos y enseñanzas, que ayudaron en gran parte a mi formación, tanto en lo científico como en lo humano.

A Cecilia Vergara por su siempre abierta disposición a enseñarme a disfrutar de los canales iónicos.

A Carlos González por su amistad, su alegría y compañerismo, momentos compartidos que recordaré con mucho cariño.

A Carolina Jullian y Claudia Orellana por haberme ofrecido su valiosa amistad, haciendo más llevaderos los momentos difíciles. A José Jaime Arbildúa, Esteban Nova, Alfonso Cádiz y Juan Carlos Torres por esos momentos que fueron importantes en la convivencia diaria.

A Marcela Vargas por su especial ayuda, su siempre excelente disposición y buena voluntad.

A todos los integrantes del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, sin cuya ayuda no habría sido posible este trabajo.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE FIGURASx
LISTA DE TABLASxiii
ABREVIATURASxv
RESUMENxvii
ABSTRACTxxi
INTRODUCCION1
MATERIALES Y METODOS17
I. MATERIALES17
1. Reactivos17
2. Cepas bacterianas19
II. METODOS19
1. Medios de cultivo19
<i>Caldo Luria</i>19
<i>Medio mínimo M9</i>19
<i>Caldo PB (Plasmid broth)</i>19
<i>Placas de agar LB</i>19
<i>Placas de césped</i>19

2. Purificación de la microcina E492	21
3. Detección y cuantificación de la actividad de la microcina E492 provenientes de cultivos	21
4. Cuantificación de la actividad de microcina E492.....	24
5. Determinación de la actividad de proteasas.....	24
6. Caracterización de la microcina frente a distintas proteasas.....	26
7. Determinación de la concentración de proteínas.....	26
<i>Método de Lowry modificado</i>	26
<i>Método de la fluorescamina</i>	27
<i>Método de Bradford</i>	27
8. Estabilidad de la microcina E492 en solución acuosa distintos pH's y fuerzas iónicas	27
9. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	28
<i>Gel de poliacrilamida en gradiente</i>	28
<i>Gel de poliacrilamida continuo con SDS</i>	29
<i>Gel de poliacrilamida tricina-SDS</i>	29
10. Marcación de las proteínas con FITC.....	30
11. Efecto del ácido, álcali y temperatura sobre la actividad de la microcina E492	31
<i>Efecto del ácido y álcali</i>	31
<i>Efecto de la temperatura</i>	31
12. Microscopía electrónica de la microcina E492.....	32

13. Espectroscopía de fluorescencia y UV-visible de la microcina E492	32
14. Formación de canales iónicos	33
<i>Preparación de las muestras de microcina</i>	33
<i>Formación de las bicapas lipídicas</i>	33
<i>Determinación de la selectividad iónica del canal</i>	35
<i>Determinación de la permeabilidad del canal de la microcina frente a distintos cationes</i>	35
15. Purificación de la microcina E492 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	36
16. Clonamiento de los genes implicados en la producción e inmunidad de la microcina E492 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
<i>Electroforesis en geles de agarosa</i>	37
<i>Extracción del DNA total de K. pneumoniae</i>	37
<i>Digestión de DNA con enzimas de restricción</i>	37
<i>Ligamiento de los fragmentos de DNA al cosmidio pHCT9</i>	40
<i>Empaquetamiento in vitro del DNA ligado al cosmidio</i>	40
<i>Titulación de la genoteca</i>	41
<i>Amplificación de la genoteca de K. pneumoniae RYC492</i>	42

<i>Búsqueda de clones productores de microcina.....</i>	42
17. Preparación de células competentes.....	43
18. Transformación de células competentes.....	44
19. Transferencia de DNA desde geles de agarosa a filtros de nitrocelulosa e hibridización con DNA del cosmidio pHC79	45
20. Caracterización de la expresión de la inmunidad del clon JI	48
RESULTADOS	49
CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA MICROCINA E492.....	49
<i>Determinación de la concentración de proteínas en la preparación de microcina E492.</i>	49
<i>Detección de la banda de proteínas de microcina E492.....</i>	52
<i>Efecto del ácido, álcali y temperatura sobre la actividad de la microcina E492</i>	53
<i>Sensibilidad de la microcina E492 frente a proteasas.....</i>	56
<i>Estudio de la estabilidad de la microcina E492 en solución acuosa frente a distintos pH y fuerza iónica.....</i>	59
<i>Purificación de la microcina E492 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....</i>	61
<i>Microscopía electrónica y espectroscopía de fluorescencia y UV-visible de la microcina E492.....</i>	66

CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA

DE LA MICROCINA E49272

Formación de canales iónicos por la microcina E492.....72

Efecto de la quimiotripsina sobre la actividad

de los canales iónicos formados por la microcina

E49281

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA MICROCINA.....83

Obtención del DNA total de K. pneumoniae

RYC49285

Actividad de la microcina del clon E1 frente a

una cepa mutante en TonB89

Purificación y caracterización de la microcina

proveniente del clon E189

Inestabilidad del clon E1 frente a la producción

de microcina E49292

Análisis del DNA del clon E196

Caracterización de otros clones positivos.....97

Comparación de los DNAs de los clones E1 y J100

Purificación y caracterización de la microcina

del clon J100

Análisis del DNA del clon J102

Expresión de la microcina del clon J en medio

<i>de cultivo</i>	107
<i>Subclonamiento del DNA plasmidial del clon J</i>	109
<i>Análisis del mapa de restricción del clon JI</i>	111
<i>Caracterización de la expresión de la inmunidad del clon JI</i>	111
DISCUSION	116
CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFIA	136

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Dominios de la colicina A y el modelo de la inserción en membranas del dominio formador de poros	10
Fig. 2.	Detección de la actividad de la microcina.....	23
Fig. 3.	Cuantificación de la actividad de la microcina E492.....	25
Fig. 4.	Esquema del montaje experimental de la formación de canales iónicos en bicapas lipídicas.....	34
Fig. 5.	Visualización de la banda de microcina E492 mediante marcación con FITC	54
Fig. 6.	Efecto de tripsina y quimiotripsina sobre la banda de microcina E492	58
Fig. 7.	Actividad de la microcina E492 en solución acuosa frente a distintos pH y fuerza iónica.....	60
Fig. 8.	Perfil cromatográfico de la microcina E492 proveniente de una precolumna C ₄ (Brownlee).....	63
Fig. 9.	Perfil cromatográfico de la microcina E492 proveniente de una columna C ₄ (Vydac).....	65
Fig. 10.	Microfotografía electrónica de la microcina E492.....	68

Fig. 11. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de la microcina en metanol y agua.....	69
Fig. 12. Espectros de absorción UV-visible de la microcina E492	71
Fig. 13. Incorporación escalonada de canales de microcina E492 a la membrana lipídica	73
Fig. 14. Registro de un canal formado por la microcina E492.....	74
Fig. 15. Relaciones corriente-voltaje del subestado 2 del canal de la microcina E492	76
Fig. 16. Relaciones corriente-voltaje del canal de la microcina E492 en condiciones biológicas en diferentes soluciones salinas	79
Fig. 17. Efecto de la quimiotripsina sobre la actividad del canal iónico formado por la microcina en bicapas lipídicas	82
Fig. 18. Estrategia de clonamiento de los genes que expresan la microcina E492	86
Fig. 19. Digestión parcial del DNA total de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 con <i>Sau3A1</i> y análisis de las fracciones del gradiente de sacarosa	88
Fig. 20. Selección de clones productores de microcina desde la genoteca	90

Fig. 21. Visualización de la banda de microcina E492 obtenida del clon E1 mediante marcación con FITC	91
Fig. 22. Análisis del DNA plasmidial del clon E1.....	95
Fig. 23. Digestiones del DNA plasmidial pJ y pE1.....	101
Fig. 24. Registro (A) y relación corriente-voltaje (B) de la microcina E492 obtenida del clon J.....	103
Fig. 25. Digestiones del DNA plasmidial del clon J.....	105
Fig. 26. Southern blot del DNA del clon J digerido con distintas enzimas e hibridado con el cosmidio pHC79	108
Fig. 27. Expresión de la microcina por el clon J en la curva de crecimiento	110
Fig. 28. Análisis de digestiones dobles del DNA del clon JI.....	112

LISTA DE TABLAS

TABLA I.	Cepas utilizadas en este estudio.....	20
TABLA II.	Concentración de proteínas de las preparaciones de microcina E492.....	51
TABLA III.	Efecto del ácido, álcali y temperatura sobre la actividad de la microcina E492.....	55
TABLA IV.	Efecto de las proteasas sobre la actividad de la microcina E492	57
TABLA V.	Potenciales de inversión y razones de permeabilidad del canal de la microcina a diferentes cationes	80
TABLA VI.	Estabilidad de la expresión de la microcina E492 en el clon E1	94
TABLA VII.	Estabilidad de la expresión de la microcina E492 en otros clones	98
TABLA VIII.	Estabilidad de la expresión de la microcina E492 en distintas cepas bacterianas.....	99

TABLA IX. Tamaños de los fragmentos de DNA obtenidos por digestión con distintas enzimas de restricción.....	106
TABLA X. Estudio de la expresión de la inmunidad del clon JI	115

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	: persulfato de amonio
BSA	: albúmina de suero de bovino
CTAB	: bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DMSO	: dimetilsulfóxido
D.O.	: densidad óptica
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
FITC	: isotiocianato de fluoresceína
HEPES	: ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etano- sulfónico]
HPLC	: cromatografía líquida de alta resolución
IV	: relación corriente - voltaje
Mcc	: microcina
MES	: ácido 2-N(morfolino)etanosulfónico
MOPS	: ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico
pA	: pico Ampere
pS	: pico Siemens
PE	: fosfatidiletanolamina
PC	: fosfatidilcolina

PM	: peso molecular
PMSF	: fenilmetil sulfonil fluoruro
POPE	: palmitoiloleoilfosfatidil etanolamina
pS	: pico Siemens
RMN	: resonancia magnética nuclear
SDS	: dodecilsulfato de sodio
TCA	: ácido tricloroacético
TEAP	: ácido trietilamina fosfórico
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tricina	: N-tris[hidroximetil]metilglicina
Tris	: tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	: ultravioleta

RESUMEN

Las bacteriocinas son proteínas secretadas por enterobacterias que presentan actividad bacteriostática o bactericida sobre especies estrechamente relacionadas con las bacterias que las producen. Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas se clasifican en dos grupos según su peso molecular, siendo las colicinas de un peso molecular entre 30.000 a 80.000 y las microcinas con pesos moleculares inferiores a 10.000. Las microcinas son resistentes a temperaturas elevadas, a pH extremos y a algunas proteasas. *Escherichia coli* produce casi todas las microcinas hasta ahora descritas, con la excepción de la microcina E492 que es producida por *Klebsiella pneumoniae*. Se ha postulado que la acción bactericida de la microcina E492 sea debida a una despolarización de la membrana citoplasmática de la célula sensible. El objetivo de este trabajo fue la caracterización genética, bioquímica y electrofisiológica de la microcina E492, con el fin de determinar su mecanismo de acción bactericida como la expresión de los genes que codifican para la microcina e inmunidad.

La microcina E492 fue visualizada por primera vez en geles mediante la marcación covalente con el reactivo fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) y posterior electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones

desnaturantes, estimándose para ella un peso molecular de 6.000. Se determinó que la actividad de la microcina E492 es resistente a ácidos, sensible a álcalis y termoestable. La microcina fue sensible frente a quimiotripsina, subtilisina, proteinasa K y pronasa E, pero resistente a tripsina. La proteína es soluble en metanol 95% y su actividad permanece estable en estas condiciones. En cambio, en solventes acuosos, la actividad disminuye en el tiempo. Se determinó que la actividad en solución acuosa es más estable en un rango de pH de 4 a 5 y no muestra una dependencia de la fuerza iónica (0,5 y 1 M).

El análisis cromatográfico de alta resolución (HPLC) de una preparación semipurificada de microcina mostró varios picos de proteínas, asociándose la actividad a tres de ellos. La re-cromatografía del pico mayoritario resultó en varios picos, sólo uno de ellos activo, indicando que la microcina forma agregados.

Se determinó que la preparación de microcina induce la formación de canales iónicos en bicapas lipídicas, sugiriendo que la disipación del potencial de membrana en las bacterias sensibles es producida por la formación de estos canales. El canal iónico formado por la microcina presenta dos estados de conductancia y es de naturaleza catiónico. La conductancia del canal en condiciones simétricas (0,1 M KCl) y a un potencial aplicado de 60 mV fue de 160 pS para los potenciales positivos y de 110 pS para los potenciales negativos. Mediante la determinación del valor del potencial de reversión en condiciones asimétricas, en que la concentración de KCl fue mayor a un lado de

la bicapa, se determinó que el canal es 13,2 veces más permeable para iones K^+ que para Cl^- . Se determinó el valor del potencial de reversión que presenta el canal en condiciones biónicas de cationes monovalentes dando el orden de selectividad de $Tris^+ < Li^+ = Na^+ < K^+ = Rb^+ = Cs^+ < NH_4^+$. Este orden de selectividad no tiene una relación estricta con el radio iónico de los iones. El canal formado por la microcina es asimétrico, ya que presenta rectificación a potenciales negativos extremos. La asimetría del canal se confirmó mediante experimentos con proteasas. El registro del canal es alterado cuando se agrega quimiotripsina al lado trans permaneciendo abierto en un estado de conductancia, en cambio este efecto no se observó cuando se agregó esta proteasa en el lado cis de la bicapa lipídica.

Se preparó una genoteca del DNA de *K. pneumoniae* RYC492 en *E. coli* mediante el empaquetamiento *in vitro* en cabezas de fago λ usando el cosmidio pH79. De esta genoteca se aislaron 6 clones productores de microcina y de su inmunidad, indicando que estos genes de *K. pneumoniae* se expresan en forma activa en *E. coli*. El análisis de la producción de microcina de estos clones en subcultivos sucesivos demostró que sólo uno de ellos era estable (clon J). Se determinó que la segregación de una colonia productora de microcina en colonias productoras y no productoras no se debió a la cepa huésped empleada, sino a una alteración a nivel del DNA. El tamaño del DNA clonado fue de 50 kb, de las cuales 45 kb corresponden al inserto recombinante.

La expresión de microcina del clon J en *E. coli* fue máxima en la fase exponencial y decayó en la fase estacionaria, comportándose de manera similar a la cepa original, *K. pneumoniae* RYC492. Mediante subclonamiento con la enzima *Bst*IV se obtuvo un clon que no presentó actividad de microcina, pero que conservaba la inmunidad (clon JI). Mediante digestiones con enzimas de restricción del pJI se estableció el mapa físico que presentaba un inserto recombinante de 10 kb. Estudios de la expresión de la inmunidad mostraron que el clon JI era inmune a la microcina cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial y sensible a la acción de este antibiótico en la fase estacionaria. Este resultado sugirió que la expresión de la microcina y de la inmunidad es coordinada por un factor común. Se determinó que esta expresión diferencial en fase estacionaria no se debe a una regulación por el factor σ^S (característico de la fase estacionaria) ni a una inhibición por metabolitos secretados por la bacteria en la fase estacionaria.

ABSTRACT

Bacteriocins are proteins secreted by enterobacteria with bacteriostatic or bactericidal activity against closely related species. Bacteriocins produced by Gram negative bacteria are classified in two groups based on their molecular weight; colicins have molecular weights ranging from 30,000 to 80,000 and microcins have molecular weights lower than 10,000. Microcins are resistant to high temperatures, extreme pH and to some proteases. *Escherichia coli* produces almost all described microcins, with the sole exception of the microcin E492 which is produced by *Klebsiella pneumoniae*. The possible mode of action of microcin E492 is by depolarization of the cytoplasmic membrane. The aim of this work was to carry out the genetic, biochemical and electrophysiological characterization of the microcin E492, in order to understand the bactericidal mechanism and the expression of the microcin and immunity genes.

Microcin E492 was for the first time visualized in gels by covalent labelling with the fluorescent reactive FITC, and after polyacrylamide gel electrophoresis of the semi-purified microcin preparation under denaturant conditions, a molecular weight of 6,000 was estimated. Microcin E492 activity was acid resistant, alkali sensitive and thermostable. The microcin was sensitive to chymotrypsin, subtilisin, proteinase K and pronase E, but resistant to trypsin.

Microcin is soluble in 95% methanol and is stable under these conditions. However, in aqueous solvents, the activity diminishes with time. The activity in aqueous solutions was more stable in a pH range of 4 - 5 and was not dependent on the ionic strength (0,5 and 1 M).

High performance liquid chromatography (HPLC) of a semipurified microcin preparation showed many protein peaks, with the activity associated to three of them. The re-chromatography of the main peak resulted in many peaks, one of them active, suggesting that microcin forms aggregates.

On the other hand, it was determined that microcin forms ionic channels in lipid bilayers, suggesting that the membrane potential dissipation is produced by the formation of ionic channels. This ionic channel is cationic and has two conductance states. The channel conductance in symmetric conditions (0,1 M KCl) at 60 mV was of 160 pS for the positive potential and 110 pS for the negative potential. The reversion potential in asymmetric conditions, with a higher KCl concentration at one side of the bilayer, showed a 13,2 times more permeability for K^+ ions than for Cl^- . The reversion potential in biionic conditions was determined and resulted in the following order of selectivity: $Tris^+ < Li^+ = Na^+ < K^+ = Rb^+ = Cs^+ < NH_4^+$. This selectivity order does not have direct relation with the ionic ratio. The microcin channel is asymmetric, because of the rectification at extreme negative potentials. Experiments with proteases confirmed the channel asymmetry. The channel is altered when chemotrypsin is

added to the trans side (conductance state is kept open), but this effect was not observed when the protease was added to the cis side of the lipid bilayer.

A DNA genomic library of *K. pneumoniae* RYC492 was prepared in *E. coli* through *in vitro* packaging in λ phage heads with pHC79 cosmid. From this library, 6 microcin and immunity producer clones were isolated, indicating that *K. pneumoniae* genes are expressed in an active form in *E. coli*. Analysis of these clones after successive subcultures showed that only one of them (J clone) produces microcin stably. The segregation of one microcin producer colony into producer and non-producer colonies was not due to the host bacteria used, but to an alteration at DNA level. The size of the cloned DNA (J clone) was of 50 kb, 45 kb of which corresponded to the recombinant insert.

The microcin expression of J clone in *E. coli* was maximum at exponential phase and decayed during the stationary phase. This behaviour is similar to the parental strain, *K. pneumoniae* RYC492. Through subcloning with *Bst*IV enzyme an inactive but immune clone was obtained (JI clone). Digestions of JI clone with appropriate restriction enzymes showed the presence of an insert of 10 kb. Immunity expression studies of JI clone showed that it is immune when the culture is at the exponential phase and sensitive in the stationary phase. This observation suggests that microcin production and immunity are coordinately expressed. This differential expression in the stationary phase was not due to a σ^S factor regulation (characteristic of the stationary phase) and neither to an inhibition by metabolites secreted by the bacteria in the stationary phase.

INTRODUCCION

El intestino es un ecosistema complejo en donde habitan numerosas especies bacterianas. Las enterobacterias viven en un equilibrio dinámico sujetas a variaciones en las concentraciones de los nutrientes. Muchas de estas bacterias producen bacteriocinas que tienen como característica alterar el crecimiento de otras especies bacterianas. En general, la producción de antibióticos en ecosistemas tan competitivos no es un fenómeno raro (Kolter y Moreno, 1992).

Las bacteriocinas son proteínas que presentan actividad bacteriostática o bactericida sobre especies muy relacionadas con la bacteria que las produce. Las bacteriocinas de bacterias Gram negativas se han dividido en dos grupos según el peso molecular, siendo las colicinas de un peso molecular de 30.000 a 80.000 y cuya síntesis es inducible por daño al DNA (Pugsley, 1985), y las microcinas, con un peso molecular menor a 10.000 y no inducibles por el sistema SOS (sistema inducible por daño al DNA; Asensio y cols., 1976; Baquero y Moreno, 1984; Kolter y Moreno, 1992).

Las microcinas fueron descritas por primera vez por Asensio y cols. (1976). Las bacterias productoras de estas microcinas fueron aisladas de heces humanas, siendo *E. coli* la principal fuente. La actividad se detectó depositando

las bacterias sobre un césped de *E. coli* K12, observándose un halo de inhibición del crecimiento. Las microcinas son excretadas al medio extracelular, encontrándose la actividad en el sobrenadante de los cultivos líquidos (Asensio y cols., 1976). En general, la purificación de las microcinas se ha realizado mediante la concentración de los sobrenadantes por precipitación, por mezcla con carbono activado, filtración o calentamiento a 100°C (Asensio y cols., 1976; Baquero y Moreno, 1984). Entre las características de las microcinas están su mayor producción en medios pobres de nutrientes, la solubilidad en metanol, resistencia a altas temperaturas, a pH extremos y su resistencia frente a la acción de algunas proteasas. Esto último ha sugerido que las microcinas podrían cumplir un papel en el ecosistema intestinal, permitiendo a las bacterias productoras una mayor sobrevivencia en este medio en que varían drásticamente las concentraciones de nutrientes.

Las microcinas han sido divididas en grupos considerando criterios bioquímicos, genéticos y de inmunidad cruzada (Asensio y cols., 1976; Baquero y Moreno, 1984; Khmel y cols., 1993). Estos grupos son A, B, C, D, E, H y V, en que la única microcina descrita que no es producida por *E. coli* es la microcina E492 de *Klebsiella pneumoniae*. La microcina tipo A presenta un peso molecular menor de 500 y es un derivado no peptídico de la L-metionina (Pérez-Díaz y Clowes, 1980). Tiene un efecto bacteriostático probablemente por inhibición de la síntesis de proteínas (Baquero y Moreno, 1984). La microcina B es de naturaleza peptídica con un peso molecular de 4.000 y actúa bloqueando

a la DNA girasa, inhibiendo la replicación del DNA (Vizán y cols., 1991; Martínez y Pérez-Díaz, 1986), lo que resulta en un efecto bactericida. La microcina tipo C (MccC7) es un heptapéptido con un peso molecular de 900 y posee modificaciones en los extremos carboxilo y amino terminales (Guijarro y cols., 1995). La MccC7 tiene un efecto bacteriostático por inhibición de la síntesis de proteínas (García-Bustos y cols., 1984; Baquero y Moreno, 1984; Guijarro y cols., 1995). Las microcinas del grupo D son de un peso molecular de 500 y alterarían el potencial de membrana, ya que son altamente hidrofóbicas (Baquero y Moreno, 1984). Otra microcina que no ha sido clasificada en estos grupos, como la microcina 25 de *E. coli*, tiene como mecanismo de acción la inhibición de la división celular (Salomón y Farías, 1992), produciendo filamentación en las bacterias sensibles. La microcina E, cuya única representante es la microcina E492 de *K. pneumoniae* presenta como mecanismo de acción la alteración del potencial de membrana (de Lorenzo y Pugsley, 1985).

La colicina V que fue inicialmente clasificada como colicina, posee características que la relacionan mejor con las microcinas, ya que posee un peso molecular de 6.000 y su síntesis no es inducida por el sistema SOS de la bacteria (Faith y cols., 1992). La colicina V actúa a nivel de la membrana citoplasmática alterando el potencial eléctrico (Yang y Konisky, 1984). Los genes implicados en la expresión de la colicina V se encuentran en un plasmidio el cual contiene otros genes que están relacionados con la virulencia de la cepa

de *E. coli* que lo contiene. Entre ellos está la aerobactina, responsable de la captación de hierro (Chehade y Braun, 1988; Milch y cols., 1984).

La microcina E492 de *K. pneumoniae* fue purificada parcialmente del sobrenadante de cultivos de la cepa productora (de Lorenzo, 1984) y se determinó mediante técnicas de filtración un peso molecular aproximado de 5.000. Esta proteína con características hidrofóbicas es soluble en metanol 95%, su actividad es resistente a la acción de proteasas como tripsina, pero sensible frente a quimiotripsina y pronasa. Su actividad no se altera luego de un calentamiento por 10 min a 100°C (de Lorenzo, 1984), es sensible al álcali y resistente al ácido. En la caracterización realizada por de Lorenzo (1984) se determinó además que la microcina E492 es una proteína básica, con carga positiva a pH 7. Esta microcina tiene una acción bactericida frente a *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Erwinia* y no presenta actividad frente a cepas como *Shigella*, *Proteus*, *Serratia* y *Pseudomonas* (de Lorenzo, 1984).

La producción de las microcinas difiere de las colicinas, pues estas últimas son producidas por bacterias sometidas a condiciones extremas que inducen la respuesta SOS (sistema inducible por daño al DNA; Pugsley, 1984). La mayoría de las microcinas son producidas en la fase estacionaria temprana y no dependen de un sistema inducible, en cambio, la microcina E492 de *K. pneumoniae* es producida en la fase exponencial y decae en la fase estacionaria (de Lorenzo y cols., 1984; de Lorenzo, 1985). En estudios con cultivos mixtos,

K. pneumoniae productora y *E. coli* sensible a la microcina, se observó que la bacteria indicadora recuperaba la viabilidad en la fase estacionaria, sugiriendo que en esta fase del crecimiento se produce un antagonista de la actividad de la microcina (de Lorenzo y cols., 1984). Este inhibidor fue purificado y se determinó que se trata de una enteroquelina (Orellana y Lagos, 1996; Orellana, 1993).

Las bacterias productoras de bacteriocinas deben ser capaces de sintetizar el antibiótico, exportarlo hacia el medio extracelular y protegerse a sí mismas frente a su acción (Kolter y Moreno, 1992). Estas características son expresadas por varios genes los cuales se encuentran organizados en operones. Los genes que codifican para la expresión de las colicinas se encuentran en plasmidios (Pugsley, 1984; Baquero y cols., 1978).

Los genes involucrados en la síntesis de microcinas también se localizan en plasmidios, algunos del tipo conjugativos. Sólo se han descrito dos microcinas cuya localización genética es el cromosoma, la H47 de *E. coli* (Gaggero y cols., 1993) y la E492 de *K. pneumoniae* (de Lorenzo y Pugsley, 1985). *K. pneumoniae* posee dos plasmidios, uno conjugativo pVC1 de 60 Kb y uno de 4,3 Kb. Mediante conjugación con *E. coli* no se transfirió la capacidad productora de microcina en el plasmidio conjugativo y tampoco se encontró la actividad asociada al plasmidio de menor tamaño (de Lorenzo y Pugsley, 1985).

En el caso de las colicinas, se han identificado al menos 3 genes asociados a su producción, el gen que codifica para la proteína estructural, un

gen para la inmunidad de la bacteria productora y un gen necesario para la exportación. El gen de la exportación de las colicinas ha sido llamado gen de lisis, porque cuando es inducida la expresión de las colicinas, la bacteria productora es lisada por un aumento de la permeabilidad en la membrana citoplasmática (Pugsley y Schwartz, 1984). La proteína de exportación de la colicina E2 estaría activando una fosfolipasa A que sería la responsable de la alteración de la permeabilidad en la membrana (Pugsley y Schwartz, 1984).

En el caso de las microcinas más estudiadas, se ha determinado que los genes implicados se encuentran organizados en un operón. Así, el operón más complejo es el de la microcina B17 el que está constituido por 7 genes (Kolter y Moreno, 1992), los cuales se dividen en un gen estructural, 3 genes implicados en modificación post-traducciona l y un gen implicado en la inmunidad. Además de los genes del operón, se ha determinado mediante estudios con mutantes, que también son necesarios algunos genes cromosomales (del Castillo y cols., 1990; Laviña y cols., 1986; Rodríguez-Sáinz y cols., 1990). La colicina V está organizada en dos operones convergentes, uno compuesto por los genes que codifican para la colicina e inmunidad y el otro que codifica para los genes implicados en la exportación (Kolter y Moreno, 1992).

Las colicinas y las microcinas no poseen el típico péptido señal para su excreción que es característico de las proteínas que son liberadas al medio extracelular (Hirst y Welch, 1988, Fath y cols., 1991). El sistema de secreción independiente del péptido señal es relativamente universal, ya que existe una

complementación funcional en la secreción de la colicina V, α -hemolisina y la proteasa de *Erwinia* (Fath y cols., 1991). El sistema de exportación de la colicina V consiste en 3 componentes, uno de ellos es un gen cromosomal, TolC. La proteína CvaB está inserta en la membrana citoplasmática y contiene un sitio de unión para el ATP (Kolter y Moreno, 1992). Para MccB17 se determinó que son al menos dos las proteínas que participan en la exportación, McbE y McbF (Kolter y Moreno, 1992). Estas proteínas son muy eficientes en eliminar la microcina hacia el medio extracelular, por lo cual le confieren cierta inmunidad a las bacterias que contienen estos genes (Garrido y cols., 1988).

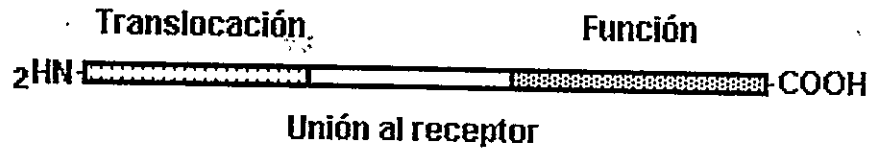
Los genes implicados en la modificación post-traducciona no han sido estudiados. En el caso de la microcina B17, la molécula madura contiene varios cromóforos unidos en forma covalente a serinas y cisteínas, a su vez modificados (Kolter y Moreno, 1992). Estas modificaciones son necesarias para la actividad de la proteína. Otra microcina que presenta modificaciones no peptídicas en su estructura es la microcina C7. La metionina del extremo amino terminal está sustituida por un grupo N-formilo y en el extremo carboxilo contiene un ácido 5'-adenílico fosfodiéster y un n-aminopropanol (AMPap), el cual va unido por un átomo de fósforo a un grupo amida formando una fosforamida (Guijarro y cols., 1995). La colicina V madura no ha sido purificada para su caracterización, por lo que no se conoce nada acerca de su estructura y las posibles modificaciones que pudiera presentar. Se han identificado y caracterizado muchas modificaciones post-traduccionales en antibióticos

peptídicos producidos por bacterias. Muchos de los antibióticos producidos por bacterias Gram positivas contienen aminoácidos inusuales como la lantionina y la deshidroalanina (Abee, 1995; Jack y cols., 1995; Jack y Sahl, 1995). Otras modificaciones consisten en anillos de S que resultan de un raro entrecruzamiento entre residuos de lantionina y metillantionina, cuya presencia define un grupo de bacteriocinas llamadas lantibióticos. Estos se dividen en dos grupos, lineales y circulares. Un representante de los lantibióticos lineales es la nisina que es producida por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* (Venema y cols., 1995). La nisina ha sido aprobada por la "Food and Drug Administration" de Estados Unidos para su aplicación como preservante en alimentos (Hansen, 1994). La mayoría de los lantibióticos tendrían un mecanismo de acción mediante la alteración de la membrana citoplasmática, formando canales dependientes de voltaje en la membrana (Schüller y cols., 1989; Kordel y cols., 1988; Gálvez y cols., 1991; Kolter y Moreno, 1992). Otro grupo de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas y que actúan a nivel de la membrana citoplasmática son las llamadas no-lantibióticos. Entre sus características están su bajo peso molecular (menor a 10.000), ser relativamente estables al calor y, en el caso de las lactococcinas A y B, ser además proteínas catiónicas e hidrofóbicas (Abee, 1995). Los no-lantibióticos forman poros o canales en la membrana de bacterias Gram positivas alterando la permeabilidad de la membrana. Se ha determinado que requieren de un receptor a nivel de la membrana, asemejándose su mecanismo de acción al de las colicinas.

El mecanismo de acción por despolarización de la membrana plasmática se ha estudiado bastante en el grupo de las colicinas, tales como colicinas A, E1, Ia, Ib, K y N, la mayoría de las cuales han sido estudiadas en detalle (Parker y cols., 1990, Cramer y cols., 1995). La colicina A tiene un PM de 63.000 y posee tres dominios. El extremo amino terminal está implicado en la translocación a través de la membrana, en el dominio central se produce la unión al receptor de la célula blanco, y el extremo carboxilo terminal es el responsable de la actividad antibacteriana mediante la formación de canales iónicos (Figura 1A; Lazdunski y cols., 1988). El dominio amino terminal es rico en glicinas y prolinas y está estructurada en la conformación β . El resto de la molécula está estructurada en α -hélices (Lazdunski y cols., 1988; Cramer y cols., 1995). El dominio carboxilo terminal de la colicina A puede ser separado del resto de la proteína (205 aminoácidos) mediante proteólisis y el fragmento es activo en la formación de canales iónicos en bicapas lipídicas (Lakey y cols., 1991). Este fragmento ha sido estudiado al detalle, con especial atención en el mecanismo de inserción en la membrana. La colicina A posee 10 α -hélices organizadas en tres capas, dos de cuyas hélices se encuentran hacia el interior de la proteína formando un dominio hidrofóbico (Figura 1B; Parker y cols., 1990). Sobre la base de datos experimentales, el modelo de inserción propone que habría inicialmente una interacción electrostática de la proteína con los lípidos cargados negativamente y luego una inserción de la estructura en la membrana a través de las hélices hidrofóbicas (Figura 1B; Parker y cols., 1990;

A

COLICINA A



B

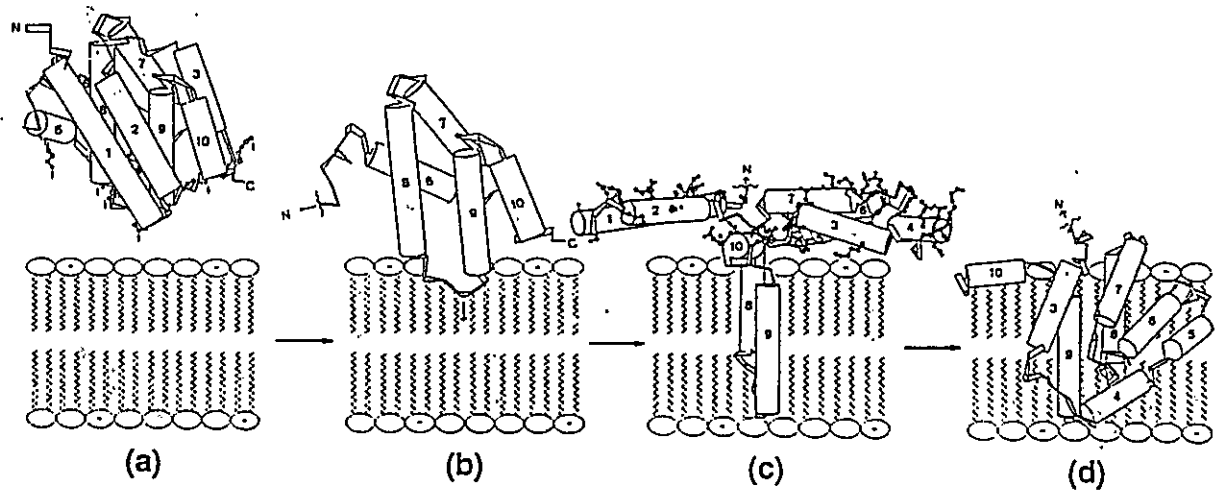


Figura 1. Dominios de la colicina A y el modelo de la inserción en membranas del dominio formador de poros. En A se muestran los dominios en la proteína. Tomado de Lazdunski y cols., 1988. En B, el modelo propuesto para la inserción en membranas del dominio formador de poros: en a, la interacción inicial con la membrana; b, penetración espontánea de la horquilla hidrofóbica; c, "conformación de paraguas" en que las capas externas de la proteína toman contacto con los grupos de las cabezas lipídicas polares, introduciéndose en el corazón hidrofóbico de la bicapa; y d, la aplicación de un potencial negativo en *trans* lleva a la formación de un canal abierto. El canal estaría constituido por un número de unidades monoméricas. Tomado de Parker y cols., 1990.

Parker y cols., 1989). La energía para insertar la proteína en la membrana provendría de la interacción de esta región hidrofóbica con los lípidos. Fuera de la membrana quedarían las dos capas cargadas de estructura α -hélice a modo de un paraguas. Se ha visto que la colicina A sufre cambios en su estado de agregación que varía según las condiciones de pH (Cavard y cols., 1988). Esta colicina se encuentra en forma de monómero en solución acuosa, pero a pH bajo 5, se produce una oligomerización a un tetrámero y aumenta la afinidad por los lípidos (Parker y cols., 1990). Este proceso de oligomerización favorecería aún más la formación de poros en la membrana. Un estudio equivalente se ha realizado con la colicina E1 que, al igual que la colicina A, presenta la actividad en el dominio carboxilo terminal. En este caso, también se determinó que la estructura que se inserta en la membrana son 4 α -hélices hidrofóbicas (Song y cols., 1991; Cramer y cols., 1995). En estos estudios se usó el dominio activo de las colicinas y no se consideró el mecanismo *in vivo* que implica una interacción más con la membrana externa y un reconocimiento en ella de receptores.

Las bacteriocinas que actúan a nivel de la membrana citoplasmática, deben atravesar la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Para ello deben interactuar con receptores, proteínas localizadas en la membrana externa que cumplen algún rol fisiológico en la bacteria. El estudio de la identificación de estos receptores ha sido mediante el análisis genético de las bacterias mutantes tolerantes a la acción de la bacteriocina. Las mutaciones

que generan resistencia a la microcina B17 se localizan en los genes *ompF* y *sbmA* (Kolter y Moreno, 1992). La proteína OmpF es una porina que permite el paso de pequeñas moléculas y iones a la célula y el producto del gen *sbmA* es una proteína de la membrana citoplasmática cuya función no se conoce (Hernández-Chico y cols., 1992; Kolter y Moreno, 1992). Otras proteínas relacionadas con la entrada de bacteriocinas son las proteínas TolM y TolC que participan en la translocación de las colicinas M (Braun y cols., 1980) y E1 (Morona y cols., 1983).

Los sistemas de penetración de las bacteriocinas a las células blanco por lo general están relacionados con los sistemas de captación de hierro (Konisky, 1982). Muchas colicinas ocupan los receptores a nivel de membrana externa utilizados por sideróforos para penetrar a la célula blanco (Konisky y cols., 1976; Konisky, 1982; Pugsley y Reeves, 1976; Pugsley y Reeves, 1977). La colicina V entra a la célula blanco a través de la proteína Cir, proteína que normalmente tiene la función de receptor para sideróforos tipo catecol. A nivel de la membrana citoplasmática, se encuentran elementos comunes entre el transporte de sideróforos y colicinas, por ejemplo las proteínas TonB y ExbB. Muchas proteínas específicas del transporte requieren de la proteína TonB; tal es el caso de la proteína receptora de la vitamina B₁₂, los receptores de sideróforos tipo hidroxamato y los de tipo fenolato (Silver y Walderhaug, 1992; Nau y Konisky, 1989). La proteína TonB se encuentra inserta en la membrana citoplasmática exponiéndose hacia el espacio periplasmático desde donde se

contactaría con la membrana externa. Una hipótesis de la función de TonB es que estaría asociando la membrana citoplasmática con los receptores en la membrana externa para que estos últimos se abran como canales iónicos (Silver y Walderhaug, 1992).

La penetración de la MccE492 a la célula blanco también estaría relacionado con el sistema de captación de hierro, pues se ha descrito que se requiere de la expresión de los genes *tonB* y *exbB* en *E. coli* para que la MccE492 ejerza su acción (Pugsley y cols., 1986), por tanto el mecanismo de entrada a la célula blanco sería a través del sistema TonB-ExbB. Como se mencionó anteriormente, la actividad de la microcina es inhibida por un antagonista identificado como un sideróforo (Orellana y Lagos, 1996; Orellana, 1993). La producción de sideróforos está regulada por la concentración de hierro en el medio de cultivo (Orellana, 1993), regulación que es inversa en relación a la actividad de la microcina en los sobrenadantes de los cultivos de *K. pneumoniae*. Cultivos suplementados con hierro produjeron una mayor actividad de microcina y una menor cantidad de antagonista. Este efecto no se debe a una mayor síntesis de microcina (Orellana, 1993).

Las bacterias productoras de bacteriocinas son inmunes a su propia acción, inmunidad dada por diversos mecanismos. Esta inmunidad debe ser altamente específica a la acción de la bacteriocina. Como se mencionó, los genes de inmunidad van estrechamente ligados a los genes estructurales y de exportación. En forma contraria a los genes de las colicinas, los genes de

inmunidad son expresados en forma constitutiva y en bajas concentraciones (Géli y Lazdunski, 1992). Las proteínas de inmunidad de estas colicinas han sido estudiadas en maxicélulas o por expresión bajo el promotor T7 y su localización determinada en la membrana citoplasmática (Géli y Lazdunski, 1992). Se estableció que bacterias productoras de colicina A con los genes de inmunidad y lisis mutados, no son afectadas por la colicina citoplasmática. Posiblemente, la colicina no pueda interactuar con la membrana desde el interior de la célula. Lo mismo ocurre con la colicina M que inhibe la síntesis del peptidoglicano. Mediante mutaciones puntuales y la síntesis de proteínas híbridas entre las colicinas A y B se determinó que el poro formado por estas proteínas interactúa con la proteína de inmunidad a través de las α -hélices hidrofóbicas. No se sabe si la proteína de inmunidad se mueve dentro de la membrana o interactúa con otra proteína (Géli y Lazdunski, 1992). En muchos casos no se conoce el mecanismo de inmunidad, aunque se han identificado los genes que participan en ella.

La microcina E se presenta como un modelo más ventajoso para intentar responder algunas interrogantes generales acerca del mecanismo de acción de antibióticos producidos por bacterias que actúan a nivel de la membrana citoplasmática. Las ventajas de este sistema estarían dadas por ser ésta una proteína de bajo peso molecular, pues sería más adecuada que las colicinas para el estudio estructural por técnicas espectroscópicas como lo son la fluorescencia y RMN. No sería necesario fragmentar la proteína para estudios

que permitan esclarecer tanto la estructura como el mecanismo molecular en detalle. Los lantibióticos poseen aminoácidos no usuales, lo que puede ser una desventaja en la proposición de mecanismos generales de la inserción de proteínas en la membrana citoplasmática. Por otro lado, los no-lantibióticos poseen una actividad restringida a bacterias Gram positivas en que no es necesario el reconocimiento inicial de un receptor en la membrana externa y su posterior translocación a la membrana citoplasmática. El estudio de estructuras proteicas formadoras de poros en membrana ha sido de gran importancia, pues permite postular modelos del mecanismo de inserción de proteínas en membranas, ya sean toxinas, antibióticos o proteínas que participan en el transporte.

El conocimiento acerca de la microcina E492 de *K. pneumoniae* es escaso. Esta microcina posee características que sugieren fuertemente que su mecanismo de acción bactericida es mediante la formación de canales iónicos. Estas características son su naturaleza hidrofóbica y que provoca en las células tratadas la despolarización de la membrana citoplasmática. Debido a que no fue posible asociar la expresión de la microcina a los dos plasmidios que contiene la *K. pneumoniae*, posiblemente su localización genética es en el cromosoma bacteriano.

El objetivo de este trabajo fue la caracterización bioquímica y electrofisiológica de la microcina para conocer su mecanismo de acción. Por otro lado, el conocimiento de los genes implicados en la síntesis y expresión de

la microcina e inmunidad ayudarán a entender su modo de acción.

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES

1. Reactivos

De Avanti Lipids, USA se obtuvo PC, PE y POPE.

De BRL se obtuvo acrilamida y bisacrilamida.

De DIFCO Laboratories se obtuvo Bactotripton, extracto de levadura, Casaminoácidos y Bacto-agar.

De Du Pont, Company, USA se obtuvo α -³²P-dCTP.

De Fluka Chemie se obtuvo acetato de potasio, acetato de sodio, cloruro de amonio, MgSO₄ y NaCl.

De Gelman Sciences, USA se obtuvo filtros Acrodisk.

De Gibco, BRL se obtuvo "Random primers DNA labeling system kit", TEMED y caseína.

De Harleco, Philadelphia se obtuvo reactivo de Folin.

De J. T. Baker Chemical Co. se obtuvo NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaOH, KOH y citrato de sodio.

De Laboratorios Chile se obtuvo ampicilina.

De Mallinckrodt, USA se obtuvo sacarosa.

De Merck se obtuvo: NaOH, HCl, NH₄Cl, Tris, MgCl₂, DMSO, KCl,

KH_2PO_4 , azul de bromofenol, metanol, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , CaCl_2 , FITC, ácido acético glacial, ácido bórico, ácido fosfórico, carbonato de sodio, decano, sulfato de cobre, tartrato de sodio y potasio, etanol, isopropanol, alcohol isoamílico, cloroformo, dioxano, 8-hidroxiquinolina, acetato de amonio, metanol y TCA.

De Pelco, California, USA, se obtuvo las grillas para microscopía electrónica y la resina formvar.

De Polaroid película instantánea 665.

De Serva, NY se obtuvo azul brillante de Coomassie G250.

De Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA, se obtuvo: acrilamida, APS, azul de bromofenol, bisacrilamida, BSA, CTAB, desoxicolato de sodio, DNA de esperma de salmón, EDTA, estándar de bajo PM para electroforesis (MWM-17-SDS), Ficoll, fluorescamina, formamida, glicerol, glucosa, Hepes, K_2HPO_4 , 2-mercaptoetanol, MES, PMSF, pronasa E, proteinasa K, quimiotripsina de tipo II (de páncreas de bovino), RbCl , RNasaA, SDS, Sigmacote, subtilisina, tiamina, tricina, Tris, Tripsina de tipo XI (de páncreas de bovino) y urea.

De Stratagene, USA, se obtuvo el kit Gigapack II Packaging Extract.

De Ted Pella, Inc., California, USA se obtuvo acetato de uranilo.

De Waters se obtuvo los cartuchos de Sep-Pak C_{18} .

De Wesphalan se obtuvo borato de sodio.

2. Cepas bacterianas.

En la Tabla I se describen las cepas utilizadas en este estudio.

II. METODOS

1. Medios de cultivo

Caldo Luria: bacto triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, NaOH 3,5 mM final (Sambrook et al, 1989). Se usó para el crecimiento de la cepa indicadora, los clones *E. coli* de microcina y, ocasionalmente para *Klebsiella pneumoniae* RYC492.

Medio mínimo M9: Na_2HPO_4 6 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH_4Cl 1 g/L.

Se suplementó con MgSO_4 2 mM, CaCl_2 0,1 mM, casaminoácidos 1 mg/mL, y uno de los siguientes reactivos como fuente de carbono: citrato de sodio 0,2%; glucosa 0,2%.

Caldo PB (Plasmid broth): 12 g/L triptona, 24 g/L extracto de levadura, 5 mL/L glicerol. Luego de esterilizar, se le adiciona 100 mL/L de solución amortiguadora fosfato de potasio pH 7,6.

Placas de agar LB: Se prepararon las placas con el medio caldo Luria con 1,5% de agar-agar.

Placas de césped: Sobre placas preparadas de agar LB (1,5% de agar) se esparcieron 3 a 5 mL de agar LB al 0,7% en que se incluyó una alícuota de un cultivo bacteriano crecido toda la noche o en fase exponencial.

TABLA I

Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>K. pneumoniae</i> RYC492	Km ^r , Mcc ⁺ , Mcc ^{inm+}	José Luis San Millán (de Lorenzo, 1984)
<i>E. coli</i> RYC1000	Mcc ^s	José Luis San Millán (de Lorenzo, 1984)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) 11α2	BL21(DE3) <i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λclts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5</i> - T7 gene 1) Amp ^r , Mcc ^s	González y Lagos
<i>E. coli</i> X8605	F ⁻ , <i>trpR</i> , Δ(<i>lac</i>)U169, <i>strA</i> Δ (<i>tonB</i> ⁻ <i>lacP</i>)	Guarante y Beckwith (1978)
<i>E. coli</i> DH5	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyr96 thi - 1 relA1</i>	Sambrook y cols. (1989).
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169</i> (φ80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook y cols. (1989).
<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>supE hsdR lacF^r proAB⁺ lacI^q lacZ</i> ΔM15	Sambrook y cols. (1989).
<i>E. coli</i> VCS257	<i>supE44, supF58, hsd53</i> (r _B ⁻ m _B), <i>dapD8, lacY1, glnV44 Δ(gal-uvrB)47, tyrT58, gyrA29, tonA53 Δ(thyA57)</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> ZK1000	ZK126 <i>katF::kan (rpoS::kan)</i>	Roberto Kolter (Bohannon y cols., 1991).

2. Purificación de la microcina E492.

La purificación de la microcina se realizó siguiendo el protocolo descrito por de Lorenzo (1984). A 1 L de medio mínimo M9 suplementado con citrato 0,2% se le agregaron 20 mL de un cultivo crecido en el mismo medio por toda la noche. Una vez alcanzada una D.O._{660nm} de 0,6, se centrifugó a 6.000 rpm por 30 min en un rotor GSA (10.400 x g). El sobrenadante, sometido a presión negativa, se pasó por una matriz hidrofóbica Sep Pak C₁₈ de 1 mL de volumen, preparada previamente haciendo pasar por ésta 3 ml de metanol 95% y 3 ml de agua desionizada. En esta matriz quedó retenida la actividad de la microcina. Se lavó la columna con 3 mL de metanol 65%, eliminándose en este lavado un contaminante de color amarillo. La actividad de la microcina se eluyó con 3 mL de metanol 95%. Algunas preparaciones fueron filtradas por un filtro Acrodisk con un poro de 0,22 μm .

3. Detección y cuantificación de la actividad de la microcina E492 proveniente de cultivos.

La actividad de la microcina proveniente de preparaciones descritas en Métodos, sección 2 se detectó depositando alícuotas de la muestra sobre un césped de una bacteria sensible preparado como está descrito en Métodos, sección 1. La detección de la actividad en colonias bacterianas se realizó sembrando la bacteria directamente sobre la placa de césped bacteriano. Las placas de césped se incubaron a 37° por 18 h. La actividad de la microcina se

visualizó por la presencia de halos de inhibición del crecimiento de la cepa sensible como se muestra en la Figura 2.

Para la detección de la actividad de la microcina proveniente de *K. pneumoniae* se usó la cepa sensible *E. coli* RYC1000 con placas de LB en ausencia de antibióticos. Para el caso de la detección de la actividad de microcina proveniente de los clones de *E. coli* VCS257 se usó como cepa sensible a *E. coli* BL21 11 α 2. Esta cepa contiene un plasmidio que le confiere resistencia a ampicilina.

La cuantificación de la actividad de la microcina proveniente de cultivos en crecimiento se realizó tomando 0,5 a 1 mL del cultivo en un tubo Eppendorf, el cual se calentó a 70 °C por 20 min. Las células se eliminaron por centrifugación en una microfuga a 15.000 rpm (aproximadamente 12.000 xg) durante 5 min. De este sobrenadante se tomaron alícuotas de 3 a 5 μ L las que fueron depositadas sobre un césped bacteriano.

La búsqueda de clones productores de microcina desde la genoteca en *E. coli* se realizó mediante el aislamiento de las colonias en una placa de agar LB con ampicilina y luego, mediante la técnica de réplica con terciopelo se depositaron las colonias sobre el césped de bacterias sensibles. De este modo es posible replicar muchas placas identificando exactamente cuál es la colonia productora de microcina por el halo de inhibición del crecimiento a su alrededor. Este método se usó en forma rutinaria con los clones ya aislados, para tener la seguridad de tomar colonias productoras de microcina.

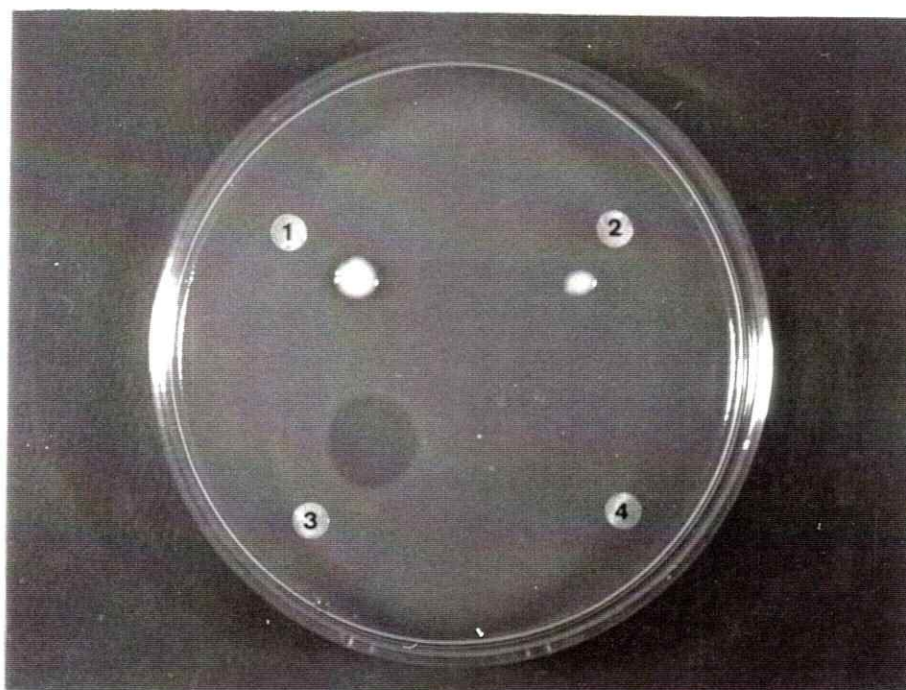


Figura 2. Detección de la actividad de la microcina. Césped de *E. coli* RYC1000 sobre el cual se depositaron la cepa *K. pneumoniae* RYC492 (1), *K. pneumoniae* no productora de microcina (2), 5 μ L de microcina proveniente del eluido con metanol 95% de Sep Pak (3) y 5 μ L de metanol 95% (4). La actividad de la microcina se visualiza por la presencia de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de la colonia productora o de la alícuota de microcina.

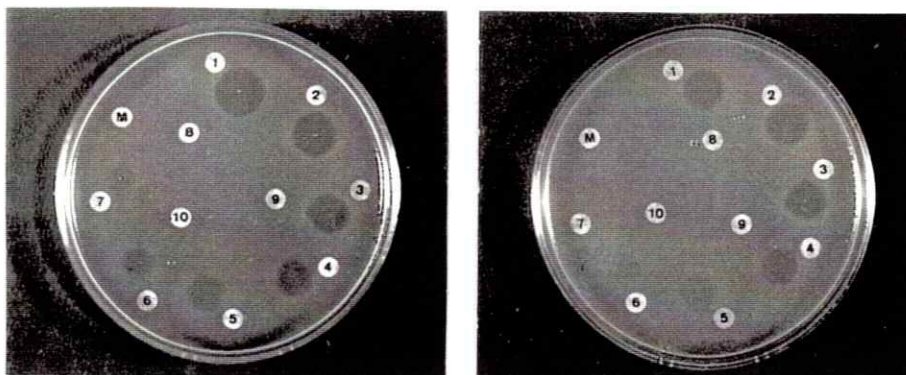
4. Cuantificación de la actividad de la microcina E492.

La cuantificación de la actividad de la microcina en los sobrenadantes de cultivos, como en las preparaciones semi-purificadas o purificadas, se realizó determinando la máxima dilución de la muestra donde es posible observar un halo de inhibición del crecimiento bacteriano del césped de la bacteria sensible (DMI, dilución mínima inhibitoria, Mayr-Harting y cols., 1972). Las muestras se diluyeron en forma seriada en igual volumen de NaCl 0,85% para las muestras provenientes de los sobrenadantes de cultivos y con metanol 95% los eluidos de Sep Pak. Alícuotas de estas diluciones se depositaron sobre placas de césped y se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento (Figura 3).

5. Determinación de la actividad de proteasas.

La actividad de las proteasas que se utilizaron sobre la microcina, fue determinada por el método que utiliza como sustrato la caseína (Bergmeyer, 1963). El método consistió en mezclar 1 mL de caseína 0,5% en solución amortiguadora fosfato 0,1M pH 7,6 con 3 mL de TCA al 5%, se agregaron 975 μ L de la solución amortiguadora y 25 μ L de la proteasa correspondiente. Esta mezcla se incubó por 30 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó 1,5 mL de la mezcla en un tubo Eppendorf en una microfuga a 15.000 rpm (aproximadamente 12.000 xg) por 5 min. Se midió la absorbancia en el sobrenadante a 280 nm. Se determinó la actividad de las proteasas utilizadas, las cuales fueron tripsina, quimiotripsina, subtilisina (proteasa tipo VIII), pronasa

A



B

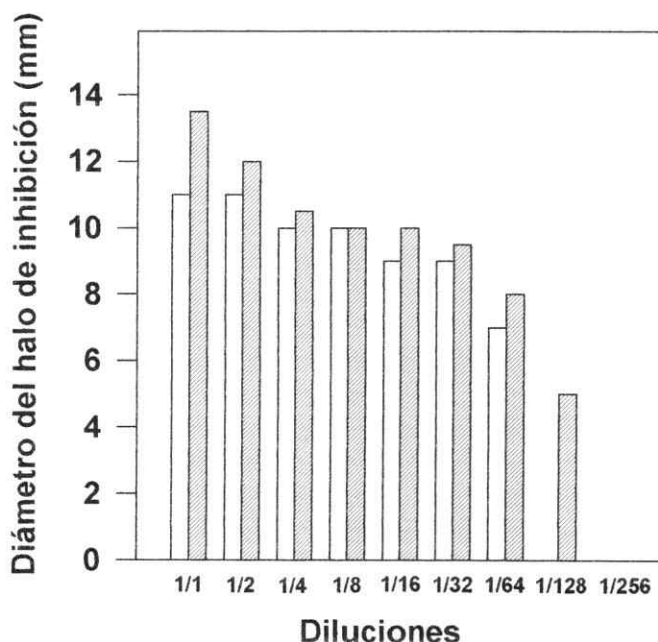


Figura 3. Cuantificación de la actividad de la microcina E492. A. Césped de *E. coli* RYC1000 sobre el cual se depositaron 5 μ L de diluciones seriadas de la microcina proveniente del eluido con metanol 95% de Sep Pak C₁₈. 1 al 10 corresponden a las diluciones 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 y 1/512. M corresponde a 5 μ L de metanol 95%. Cada placa corresponde a la cuantificación de la actividad de dos preparaciones de microcina.

B. Se graficaron los valores del diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano de las distintas diluciones de la microcina de ambas placas de césped. Las barras llenas y vacías corresponden a las placas de la izquierda y derecha, respectivamente.

E (proteasa tipo XIV) y proteinasa K.

6. Caracterización de la microcina frente a distintas proteasas.

El efecto de proteasas sobre la actividad de la microcina se determinó incubando 14 μL de microcina en metanol 95% con 56 μL de solución amortiguadora Tris 50 mM pH 7,5 MgCl_2 5 mM, 70 μL de tripsina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ preparada en solución amortiguadora por 60 min a temperatura ambiente. Para detener la reacción se agregó 3 μL de PMSF 6 mM en DMSO. Como control sin proteasa se agregó solución amortiguadora en ausencia de proteasas. La actividad bactericida de la microcina se determinó depositando 5 y 3 μL sobre un césped de una bacteria sensible.

7. Determinación de la concentración de proteínas.

Método de Lowry modificado. El protocolo de este método está descrito por Bensadaum y Weinstein (1976) y consistió en lo siguiente: A 900 μL de una solución de proteínas se agregó 10 μL de desoxicolato de sodio 2%. Luego de agitación, se mantuvo en reposo por 15 min. A esta mezcla se agregaron 300 μL de TCA 24% p/v, se agitó y centrifugó 15 min en una microcentrifuga a 15.000 rpm (aproximadamente 12.000 xg). Se descartó el sobrenadante por succión y el precipitado se disolvió en 100 μL de NaOH 1N. Se agregó 1 mL de reactivo de Lowry C (carbonato de sodio 1,92%; sulfato de cobre 0,01% y tartrato de sodio y potasio 0,02%), se agitó y se agregó 100 μL del reactivo de

Folin diluido 1:1 en agua. Luego de incubación por 45 min en oscuridad, se determinó la absorbancia a 660 nm. El blanco cooresponde a una solución sin proteínas luego del mismo tratamiento.

Método de la fluorescamina. Este método está descrito por Böhlen y cols. (1973). Se agregó una alícuota de la solución de proteínas a un amortiguador fosfato 50 mM pH 8,0 en un volumen final de 1,5 mL. Luego se agregó fluorescamina (0,3 mg/mL en dioxano) y se agitó rápidamente leyendo inmediatamente la fluorescencia. La longitud de onda de excitación fue de 390 y la de emisión de 475 nm con una ranura de 5 para ambas longitudes de onda. Es muy importante el tiempo transcurrido al agregar la fluorescamina y la lectura de fluorescencia, porque ésta se apaga con el tiempo. La curva estandar se realizó con cantidades de 10 a 120 μ g de BSA.

Método de Bradford. Se realizó la determinación de proteínas por una modificación del método descrito por Bradford (1976), adaptado a un volumen de 1,1 mL. A 100 μ L de la solución de proteínas se agregó 1 mL del reactivo de Bradford (Azul brillante de Coomassie G250 0,01%, etanol 4,7% p/v, ácido fosfórico 8,5% p/v) y se agitó. Luego de 2 min se leyó la absorbancia a 595 nm. La curva estandar se realizó con BSA y con cantidades entre 0 y 12 μ g.

8. Estabilidad de la microcina E492 en solución acuosa a distintos pH's y fuerzas iónicas.

La preparación del amortiguador se siguió según está descrito en "Data

for biochemical research" (Dawson y cols., 1969) y estaba compuesto por una mezcla de fosfato ácido de sodio, ácido cítrico y cloruro de potasio. El rango de pH estudiado fue desde 1,9 a 7,8 y a dos fuerzas iónicas diferentes, 1 y 0,5 M. 100 μ L de microcina proveniente del eluido de Sep Pak C₁₈ en metanol 95% se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en 100 μ L de la solución correspondiente a cada pH y fuerza iónica. Se depositaron 5 μ L de la mezcla sobre un césped bacteriano y diluciones de ella como 1/2, 1/4 y 1/8. La actividad se representó como la suma de los halos de inhibición de cada una de estas determinaciones. La actividad se siguió hasta las 147 h.

9. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se prepararon geles de poliacrilamida siguiendo distintos protocolos que se describen a continuación.

Gel de poliacrilamida en gradiente (método de Hashimoto modificado, Hashimoto y cols., 1983; C. Retamal y J. Babul, comunicación personal). Estos geles tienen la particularidad de ser en gradiente de poliacrilamida (18 al 12%), urea y sacarosa. Para ello se preparó la solución más concentrada con un 18,9% de poliacrilamida (grado de entrecruzamiento 4,7%), urea 7 M, Tris 0,45 M pH 8,8, SDS 0,1%, sacarosa 1%, TEMED 0,05% y persulfato de amonio 0,05%. La solución más diluida contenía 12,5% de poliacrilamida (grado de entrecruzamiento 4%), urea 3,5 M, Tris 0,45 M pH 8,8, 0,1% SDS, 4,5 mM TEMED y persulfato de amonio 0,05%. Tanto la mezcla concentrada como

diluida fueron desgasificadas antes de agregar el SDS, APS y TEMED. Para un minigel se pusieron 2,3 mL de cada una de las soluciones de poliacrilamida en los vasos de un formador de gradiente. El gradiente se formó entre dos placas de vidrio mezclando con agitación las dos soluciones en el vaso de salida. Sobre el gradiente se agregó isopropanol:agua en una proporción de 3:1. Luego de gelificado el gel separador, se eliminó el agua formada y se agregó el gel concentrador que estaba compuesto por 5% de poliacrilamida (grado de entrecruzamiento 2,7%), 8 M urea, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS y 40 mM TEMED.

La solución amortiguadora de corrida correspondió a 25 mM Tris-HCl, 0,19 M glicina y 0,1% SDS.

Gel de poliacrilamida continuo con SDS: este protocolo corresponde al descrito por Laemmli (1970), en el que el gel separador consistió en: 0,36 M Tris-HCl pH 8,8, 16% de acrilamida (2,7% de entrecruzamiento), 0,1% SDS, 0,5% persulfato de amonio y 3,3 mM TEMED. El gel concentrador consistió en 5% de poliacrilamida (grado de entrecruzamiento 2,7%), 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS y 40 mM TEMED. Esta solución fue desgasificada antes de agregar las 3 últimas soluciones.

La solución amortiguadora de corrida correspondió a 25 mM Tris-HCl, 0,19 M glicina y 0,1% SDS.

Gel de poliacrilamida tricina-SDS: Los geles se prepararon como está descrito por Schagger y von Jagow (1987) que separa proteínas de un rango de PM de

1 a 100 KDa. El gel separador contenía lo siguiente: 16,5% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), 1 M Tris pH 8,45, 0,1% SDS, 6M urea, y 10% glicerol. El gel espaciador contenía 10% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), 1 M Tris pH 8,45 y 0,1% SDS. Luego de desgasificar ambas soluciones se les agregó a cada una 0,033 % de persulfato de amonio y 2,2 mM de TEMED.

La solución de corrida de estos geles fue para el cátodo 0,1 M Tris, 0,1 M Tricina y 0,1% SDS, sin ajustar el pH. Para el ánodo, la solución fue 0,2 M Tris, pH 8,9. Los geles se sometieron a un voltaje de entre 70 y 100 V usando una fuente de poder EC-420 de EC Apparatus Corporation.

10. Marcación de las proteínas con FITC.

El método de marcación de péptidos con fluorescamina se describe en Ragland y cols. (1974), pero en el caso de la microcina se usó FITC en vez de fluorescamina. Para ello se concentraron 500 μ L del eluido de la columna Sep-Pak por evaporación en un baño maría hasta un volumen de 25 μ L. Se tomaron 7,2 μ L de este concentrado y se mezcló con 0,8 μ L de una solución borato de sodio 0,4 M y con 8 μ L de FITC (0,5 mg/mL en DMSO). La reacción se mantuvo por 10 min a temperatura ambiente agitando esporádicamente. Posteriormente se agregaron 4 μ L de mezcla de carga en una relación de 3 volúmenes de muestra con 1 volumen de mezcla de carga (2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol (v/v), 0,01% azul de bromofenol (p/v), 10% glicerol y 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; Laemmli, 1970). La muestra fue calentada durante 5 min a baño maría y se

cargaron en los geles.

Como marcadores de PM se usó Sigma MWM-17 SDS, el cual contiene: mioglobina PM 16.950 y fragmentos de mioglobina de PMs 14.440; 10.600; 8.160; 6.210 y 2.510. Estas proteínas fueron marcadas con FITC al igual que las muestras. Las bandas de proteínas fueron visualizadas con un transiluminador UV. Las fotografías se tomaron con película instantánea Polaroid 667.

11. Efecto del ácido, álcali y temperatura sobre la actividad de la microcina E492.

Efecto del ácido y álcali. Se incubaron 10 μ L de microcina proveniente del eluido con metanol 95% de la columna Sep Pak con 2 μ L de HCl 12 M ó 4 μ L de NaOH 5 M, durante 10 min a temperatura ambiente, neutralizándose con 90 μ L de Tris-HCl 0,5 M pH 7,5. Como control, se incubó la microcina con el amortiguador de neutralización. Se depositaron alícuotas de cada tratamiento sobre un césped bacteriano y la actividad se determinó por el diámetro del halo de inhibición.

Efecto de la temperatura. 10 μ L de microcina proveniente del eluido con metanol 95% de la columna Sep Pak se diluyeron con 10 μ L de agua y se calentó a 95 °C o se mantuvo a temperatura ambiente por 10 min. La actividad de la microcina se determinó de la misma forma que en el punto descrito anteriormente.

12. Microscopía electrónica de la microcina E492.

Las muestras de microcina provenían del eluido de Sep Pak en metanol 95%. 100 μ L de microcina fueron evaporados al baño maría hasta la mitad del volumen, correspondiente a una concentración de metanol del 50%. Una alícuota de 10 μ L se depositó sobre un trozo de parafilm en una placa de Petri. Sobre esta gota se puso una grilla preparada con una membrana de formvar y una película de carbón por un tiempo de 15 min. Posteriormente se tiñó la grilla con acetato de uranilo 1% en agua por 90 s y se dejó secar. Las muestras fueron observadas en un microscopio JEOL Modelo 100SX.

13. Espectroscopía de fluorescencia y UV-visible de la microcina E492.

Para realizar los espectros de fluorescencia de la microcina se usó un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer Modelo LS50. Las muestras de microcina analizadas provenían directamente del eluido en metanol 95% del Sep Pak o eran evaporadas a sequedad y resuspendidas en igual volumen de agua. Las determinaciones de excitación se realizaron midiendo la intensidad de la fluorescencia a 364 nm. Los espectros de emisión se obtuvieron excitando la muestra a 295 nm. Las ranuras usadas fueron 5 y 10 nm, dependiendo de la intensidad de fluorescencia obtenida.

Para los espectros de absorción UV-visible se prepararon las muestras de microcina como se describió anteriormente. El espectrofotómetro usado correspondió a un Hewlett Packard 8452A con arreglo de diodo. El barrido de

longitud de onda fue de 180 a 820 nm.

14. Formación de canales iónicos.

Preparación de las muestras de microcina. En los experimentos de formación de canales iónicos en bicapas lipídicas se usó microcina semipurificada obtenida de sobrenadantes de la cepa productora luego de elución en Sep Pak C₁₈ con metanol 95%. El eluido activo se secó al baño maría y se resuspendió en solución amortiguadora MES 10 mM pH 6,7.

Formación de las bicapas lipídicas. Las membranas lipídicas se formaron con diferentes mezclas de lípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y palmitoiloleoilfosfatidil etanolamina (POPE). La mezcla que dio mejores resultados fue POPE:PC en una relación de 4:1 con una concentración final de lípidos de 20 mg/mL de decano. Las membranas se formaron pincelando la mezcla de lípidos en un pequeño orificio (360 μ m) que separa dos compartimientos que contienen una solución salina de KCl 0,1 M, MES-KOH 10 mM, pH 6,7-7,0. Uno de los compartimientos que separa la membrana (*cis*) fue conectado a una fuente de voltaje DC que permitía la aplicación de voltajes entre 0 a \pm 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 (Figura 4). La corriente fue monitoreada simultáneamente en un registrador de papel, en un osciloscopio y grabada en una cinta de video. Se trabajó con membranas

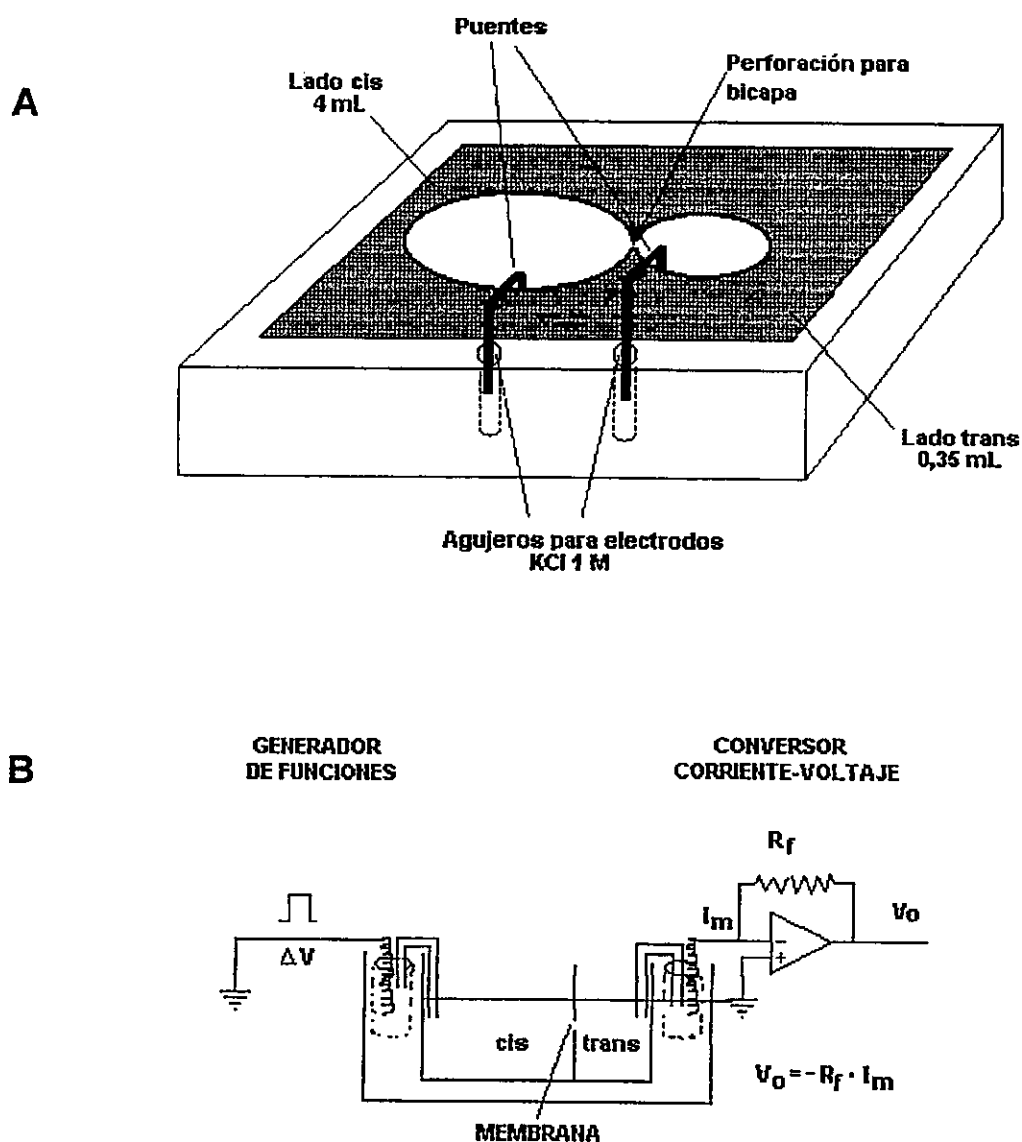


Figura 4. Esquema del montaje experimental de la formación de canales iónicos en bicapas lipídicas. En el dibujo superior (A) se representa la cámara donde se forma la bicapa en los experimentos de canales iónicos. En el esquema inferior (B) se muestran las conexiones eléctricas para la cuantificación de las corrientes que pasan por los canales. V_o , potencial de la salida; R_f , resistencia de retroalimentación; I_m , corriente que pasa por la membrana.

que presentaban una capacidad de 100 pF y que eran estables durante al menos de 10 min. La microcina se aplicó pincelando los lípidos en el lado *cis*, obteniéndose la incorporación de canales en un breve lapso de tiempo (10 min como máximo).

Determinación de la selectividad iónica del canal. La selectividad del canal se determinó cambiando la condición simétrica en la concentración de KCl a una asimétrica. El aumento de la concentración de la sal en uno de los lados de la bicapa produce un paso neto de iones desde el lado más concentrado al menos concentrado. Si el canal es más selectivo a cationes, se observarán saltos hacia valores positivos de la corriente a potencial 0 mV cada vez que el canal se abra. En condiciones asimétricas se determinó la magnitud de la corriente que pasa por el canal a distintos potenciales aplicados. Estos valores fueron graficados en una curva corriente vs voltaje (I/V). El valor del intercepto en el eje de las abscisas de esta curva representa el valor de potencial necesario para revertir la corriente que pasa por el canal en las condiciones asimétricas (potencial de inversión).

Determinación de la permeabilidad del canal de la microcina frente a distintos cationes. Inicialmente los compartimientos *cis* y *trans* contenían una solución de KCl 0,1 M, MES-KOH pH 7,0. El lado *cis* se perfundió con soluciones de distintos cationes monovalentes como sales de cloruro a una concentración de 0,1 M en el mismo amortiguador. En cada una de estas condiciones bi-iónicas se determinó la corriente a distintos potenciales aplicados para hacer un gráfico

de corriente vs potencial.

15. Purificación de la microcina E492 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La muestra de microcina para el análisis cromatográfico provenía del eluido de Sep Pak C₁₈ en metanol 95% con posterior filtración en un filtro Acrodisk. 500 µL de esta microcina se evaporaron al vacío en una centrífuga Speed Vac hasta un volumen cercano a los 10 µL. Las columnas de HPLC utilizadas fueron una columna C₁₈ (Hibar Lichrosorb RP18 de Waters) y una columna C₄ de Vydac, ambas con sus respectivas pre-columnas. Los equipos de HPLC utilizados fueron LKB, Hewlett Packard y Beckman. El protocolo utilizado en un inicio correspondió al descrito por de Lorenzo (1984), con una columna C₁₈ y un gradiente escalonado de metanol/agua en presencia del amortiguador TEAP al 0,5%, pH 3,5. Se varió este protocolo usando la misma columna, pero eluyendo con un gradiente de acetonitrilo 20-40% y de 2-propanol 0-40% en presencia de ácido trifluoroacético 0,1%. Con la columna C₄ se usó un gradiente lineal de metanol 5-100%. Variaciones de este gradiente se indican en las leyendas de las figuras.

La detección de los picos de proteínas se siguió a 215 nm y la actividad se determinó depositando alícuotas de las fracciones sobre un césped bacteriano.

16. Clonamiento de los genes implicados en la producción e inmunidad de la microcina E492 de *Klebsiella pneumoniae*.

Electroforesis en geles de agarosa. Estos se llevaron a cabo en una configuración horizontal, usando amortiguador Tris-acetato (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,1, en adelante TEA). La concentración de agarosa varió entre 0,7 y 1% (indicado en las leyendas de las figuras). Los volúmenes de muestra variaron entre 10 y 20 μ L, de acuerdo a la peineta usada. El colorante usado para poner la muestra contenía glicerol 20% y azul de bromofenol 0,25%. El volumen de los geles era de 13,2 mL (8x5,5x0,3), 45 mL (10x9x0,5) o 71,25 mL (15x9,5x0,5). La cámara de electroforesis era llenada con amortiguador TEA y el gel quedaba cubierto con 2 a 3 mm de líquido. La electroforesis se corrió a una intensidad de corriente de 45 mA y a un potencial de 80 V. Una vez que el colorante alcanzaba el extremo del gel, se teñía en una solución de 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio durante 20 min. Las bandas de DNA se visualizaban en un transiluminador UV y el gel se fotografiaba con una máquina Polaroid usando la película Polaroid 667.

Extracción del DNA total de K. pneumoniae. El DNA total de *Klebsiella pneumoniae* RYC492 se extrajo según el protocolo descrito por Ausubel y cols. (1992). El método consistió en la resuspensión de 1,5 mL de células crecidas a saturación en 567 μ L de amortiguador TE (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM), 30 μ L de SDS 10% y 3 μ L de proteinasa K 20 mg/mL. Luego de mezclar se incubó a 37 °C por 1 h. Se agregaron 100 μ L de NaCl 5M mezclándose muy bien.

Para eliminar los restos celulares, proteínas desnaturaladas y polisacáridos, se agregó el complejante CTAB (10% en NaCl 0,7M), mezcla que se incubó a 65 °C por 10 min. Estos complejos fueron extraídos con igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y luego de centrifugación en la microfuga a 15.000 rpm (aproximadamente 12.000 *xg*), se tomó la fase acuosa. El DNA se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol y el precipitado se tomó con una punta de micropipeta sellada a otro tubo. Este DNA se lavó con etanol 70% y se dejó secar a temperatura ambiente, resuspendiéndose en 100 μ L de amortiguador TE.

Digestión de DNA con enzimas de restricción. Las condiciones para la digestión del DNA con enzimas de restricción fueron tomadas del catálogo de BRL. En un volumen total de 10-30 μ L se agregaba 0,2-1 ng de DNA, el amortiguador comercial de la enzima correspondiente y 1 unidad de la enzima de restricción. La incubación de la mezcla se realizaba a la temperatura óptima para cada enzima por un tiempo mínimo de 1 hora. La reacción se detenía agregando la mezcla que contenía el colorante y el glicerol, descrita en la preparación de los geles de agarosa.

Para la digestión parcial del DNA total de *Klebsiella pneumoniae* se realizó una cinética con diluciones de la enzima de restricción *Sau3A1* y tomando muestras de la mezcla a distintos tiempos. De esta forma se determinó el tiempo de incubación y la dilución de la enzima necesarios para obtener fragmentos de un tamaño de alrededor de 30 Kb. Bajo estas

condiciones se realizó la digestión preparativa del DNA total de *K. pneumoniae*. En 12 tubos se realizó la digestión de 88 µg de DNA con 0,36 U de *Sau3A1* en un volumen total de 400 µL por un tiempo de 60 min. La digestión fue analizada tomando 2 µL de la mezcla. Se juntaron y se extrajeron 2 veces con fenol y 1 vez con cloroformo - alcohol isoamílico (24:1). El DNA fue precipitado con 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M pH 4,8 y 2,5 volúmenes de etanol a -20 °C por 3 h. Luego de centrifugación por 30 min a 12.000 xg, se lavó el precipitado con etanol 70% y se centrifugó nuevamente por 5 min. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 530 µL de TE. Se determinó la concentración del DNA por absorbancia como 900 µg/mL (factor Abs_{260nm}/Abs_{280nm} 1,74). El gradiente se formó con dos soluciones de sacarosa al 10 y 40% preparadas en el amortiguador 20 mM Tris pH 8,0, NaCl 1M y EDTA 5 mM. El volumen de cada tubo de centrífuga fue de 10,8 mL. Sobre la solución de sacarosa se depositaron 79 µg de DNA en un volumen de 100 µL. La centrifugación se realizó en una centrífuga Sorvall Combi y un rotor SW40 a 28.000 rpm a 20 °C (velocidad de aceleración de 5) por 24 h. Las muestras de los 6 tubos se sacaron introduciendo una micropipeta capilar hasta el fondo del gradiente sin perturbarlo. El capilar estaba unido a una manguera y el líquido se retiró mediante una bomba peristáltica a tubos Eppendorf en un volumen de 600 µL. 15 µL de los tubos fueron analizados en un gel de agarosa. Las muestras con fragmentos de DNA superiores a 30 Kb se juntaron (alrededor de 2,5 mL

por tubo de centrifuga) y se dializaron por toda la noche contra 2 L de TE. El DNA se precipitó con etanol en presencia de acetato de sodio y se resuspendió en TE. Se determinó mediante incubación a 37 °C en presencia de amortiguador de restricción que el DNA obtenido del gradiente no presentaba degradación. La concentración de DNA obtenido de uno de los tubos fue de 177,2 µg/mL.

Ligamiento de los fragmentos de DNA al cosmidio pHC79. El DNA del cosmidio pHC79 se linearizó con la enzima *Bam*HI y se desfosforiló para evitar el ligamiento de sus extremos. 3,6 µg del cosmidio desfosforilado se mezclaron con 5,1 µg de DNA proveniente del gradiente, en presencia de amortiguador ligasa, 0,4 mM ATP y ligasa. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 2 h, se precipitó con etanol en presencia de acetato de sodio y el precipitado se resuspendió en 10 µL de TE.

Empaquetamiento in vitro del DNA ligado al cosmidio. El protocolo del empaquetamiento *in vitro* se realizó como está descrito en el manual de Stratagene. El sistema Stratagene contenía 2 extractos, la cepa de *E. coli* VCS257 y DNA de fago λ. El protocolo consistió en lo siguiente: se sacó un tubo de cada extracto de -80°C y se pusieron en hielo seco. Se descongeló entre los dedos el tubo del extracto sonificado que contiene las precabezas del fago y se agregó rápidamente 3 µL del DNA ligado, dejándolo en hielo. Se agregaron 15 µL del extracto que contiene la proteína D y los demás

componentes necesarios para el empaquetamiento y se mezcló. Se centrifugó por 3-5 segundos en la microfuga para asegurarse que todo el contenido del tubo quedara en el fondo. Se incubó esta mezcla por 2 h a temperatura ambiente. Se agregaron 500 μL de amortiguador SM (0,1 M NaCl, 81 mM MgSO_4 , 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 0,01% gelatina) y 20 μL de cloroformo. Se agitó bien y se centrifugó en la microfuga por 1 min. El sobrenadante se guardó a 4 °C hasta su titulación.

Titulación de la genoteca. Para titular los fagos presentes luego del empaquetamiento del DNA se utilizó la cepa *E. coli* VCS257. Para ello se creció esta cepa en medio TB (0,5% NaCl, 1% bacto triptona, pH 7,4), suplementado con 10 mM MgSO_4 y 0,2% maltosa por toda la noche a 30 °C con agitación. El cultivo se centrifugó a 2.000 rpm por 10 min y las células se resuspendieron en $\frac{1}{4}$ del volumen original de 10 mM MgSO_4 estéril, las que se guardaron a 4 °C hasta su uso. Antes de usarlas, las células se diluyeron hasta una D.O._{600nm} de 0,5 con 10 mM MgSO_4 .

Para la titulación del DNA empaquetado en cabezas de fago, se diluyó 1:10 y 1:50 en amortiguador SM. Se mezclaron 25 μL de cada dilución con 25 μL de las células VCS257 a una D.O._{600nm} de 0,5 y se dejaron a temperatura ambiente por 30 min. Se agregó 200 μL de LB a cada muestra y se dejó por 1 hora a 37 °C con agitación cada 15 min, permitiendo en esta incubación que se exprese la resistencia a ampicilina. Se centrifugaron los tubos por 1 min en la

microfuga y las células se resuspendieron en 50 μL de LB. Las células fueron sembradas en una placa de LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron por toda la noche. Como control, se hizo este procedimiento con células sin DNA empaquetado. Como la cepa VCS257 es sensible a ampicilina, ésta no crecerá en presencia del antibiótico, a no ser que sea transformada con un DNA exógeno. El título del protocolo de empaquetamiento debería ser entre 1×10^5 y 1×10^6 transformantes/ μg de DNA.

Amplificación de la genoteca de K. pneumoniae RYC492. Para guardar la genoteca obtenida con el DNA de *K. pneumoniae*, es necesario amplificar los clones. Para ello se tomó 500 μL del DNA empaquetado y se diluyó a 5 mL con amortiguador SM. Esta solución se dividió en 33 tubos con 150 μL cada uno. A cada uno se le agregó 150 μL de células VCS257 a una D.O._{600nm} de 0,5 y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Se agregó 1,2 mL de LB y se mantuvo con agitación esporádica a 37 °C por 1 h. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 300 μL de LB. A 16 de los tubos se les agregó glicerol estéril a una concentración final de 20% y a los 17 restantes se les agregó DMSO a una concentración final de 5%. Esta genoteca se guardó a -80 °C.

Búsqueda de clones productores de microcina. Alícuotas de 100 μL de un tubo de la genoteca guardado a -80 °C se sembró en placas LB con ampicilina y se crecían por 18 h a 37 °C. Las colonias fueron replicadas en una placa con césped bacteriano en presencia de ampicilina mediante el método de réplica con

el terciopelo. Las réplicas eran incubadas por 18 h a 37 °C. Los clones que presentaban a su alrededor un halo de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora fueron estudiados en detalle para la producción de microcina.

17. Preparación de células competentes.

La preparación de células competentes se realizó según el protocolo descrito por Utermohlen (1994), con algunas modificaciones. El medio de cultivo y las soluciones fueron preparadas con agua de muy buena calidad, proveniente de un equipo Nanopure de Barnstead. Tres colonias grandes se inocularon en 6 a 7 mL de medio LB modificado. Este medio contenía bactotripton 2%, extracto de levadura 0,5%, KCl 10 mM; el pH se ajustó a 7,6 con KOH 1M. Luego de esterilizar y antes de usar, se agregó $MgSO_4$ a una concentración final de 0,4%. Las bacterias se crecieron con agitación vigorosa a 37 °C por 1,5 a 2 h hasta una D.O._{550 nm} de 0,3. Cinco mL de este cultivo se traspasaron a 100 mL del mismo medio LB modificado preincubado a 37 °C y se mantuvo con agitación hasta una D.O._{550 nm} de 0,5. Se enfrió el cultivo en hielo y se repartió en tubos de centrifuga preenfriados. Las células se sedimentaron por centrifugación a 5.000 rpm (rotor SS34) por 5 min y a 4 °C. El sobrenadante se retiró por aspiración y las bacterias se resuspendieron cuidadosamente en 30 mL de solución TFBI fría (RbCl 100 mM, $MnCl_2$ 50 mM, acetato de potasio 30 mM, $CaCl_2$ 10 mM, glicerol 15%, pH 5,8 ajustado con ácido acético 0,2 M; esta solución fue filtrada por Acrodisc 0,22 μm). Se repitió la centrifugación y

nuevamente se retiró el sobrenadante por aspiración. Las células se resuspendieron en 4 mL de solución TFBII (MOPS 10 mM pH 7,0 ajustado con NaOH 1 M, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol 15%; la solución fue filtrada). Las bacterias resuspendidas se alicuotaron en tubos Eppendorf y se congelaron en hielo seco para guardarlas a -80 °C.

18. Transformación de células competentes.

La transformación de células competentes se realizó con células preparadas como se describió en el punto anterior. Una alícuota (50 -100 µL) de estas células se descongeló en hielo y se agregó 3-5 µL de DNA. Esta mezcla se mantuvo en hielo por 15 min y luego se incubó por 2 min a 42 °C para posteriormente mantenerlo en hielo por 2 min. Se agregó 500 µL de caldo LB y se incubó a 37 °C por 30 min. Se sembraron 100 µL con rastrillo en una placa LB en presencia del antibiótico de selección. En forma paralela, se realizó el mismo protocolo con una muestra de células competentes sin agregar el DNA y luego de la incubación a 37 °C, se sembró 100 µL en una placa de agar LB en presencia de antibiótico y otra placa en ausencia del antibiótico. De estas dos placas, sólo aquella sin antibiótico presentó crecimiento bacteriano en forma confluyente.

19. Transferencia de DNA desde geles de agarosa a filtros de nitrocelulosa e hibridación con DNA del cosmidio pHc79.

El método usado para la transferencia de DNA es esencialmente el descrito por Southern (1975). Después de la electroforesis en gel de agarosa, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se cortaron las porciones no usadas del gel. El DNA se hidrolizó parcialmente incubando el gel en HCl 0,25 M durante 10 min. Luego, el DNA se desnaturó incubando el gel en NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M durante 45 min. El gel se lavó brevemente y se neutralizó con Tris-HCl 1 M pH 7,4, NaCl 1,5 M durante 30 min y se repitió el lavado por 15 min. Con papel Whatman 3MM se envolvió una placa de vidrio la cual se puso atravesada en una fuente, de modo que el papel formó un puente con el líquido que estaba en la fuente, y la placa de vidrio actuó como soporte de este papel. La fuente se llenó con 10 x SSC (1 x SSC contiene NaCl 0,15 M y citrato de sodio 0,015 M ajustado a pH 7,0) y se sacaron las burbujas que podía tener el papel. Se puso el gel sobre este papel mojado, y se cubrió con una membrana de Nylon (previamente humedecida con 2 x SSC) del mismo tamaño del gel, cuidando de no dejar burbujas entre el gel y la membrana. Sobre la membrana se puso dos capas de papel Whatman 3MM previamente humedecidos con 2 x SSC y cortados del mismo tamaño del filtro. Nuevamente se cuidó de no dejar burbujas. Finalmente sobre el papel filtro se puso toallas de papel absorbente (10 cm de espesor), presionando el papel con un objeto de un peso aproximado de 500 g. Para prevenir un corto circuito entre las toallas de papel y el papel

3MM que estaba bajo el gel, éste fue rodeado con parafilm. Se dejó que el DNA se transfiriera durante la noche (12 h), se sacó la membrana y se dejó secar a temperatura ambiente. El DNA fue fijado en forma covalente a la membrana mediante irradiación UV de 260 nm durante 5 min. Se procedió luego con la hibridación.

La hibridación se realizó en base a la técnica desarrollada por Southern (1975). La membrana fue incubada con solución de prehibridación (6 x SSC, 5 x reactivo de Denhardt (Ficoll 1%, polivinilpirrolidona 1% y 1% de la fracción V de BSA), SDS 0,5%, DNA desnaturado de esperma de salmón 100 µg/mL y formamida 50%) durante 4 h a 42 °C y luego se incubó por 24 h a 42 °C en la misma solución en presencia de la sonda marcada ($>10^9$ cpm/µg), previamente desnaturalizada mediante calentamiento a 90 °C por 5 min. Una vez terminada la hibridación, la membrana se lavó 2 veces con una solución de SSC 5 x y SDS 0,5% durante 15 min con agitación a temperatura ambiente. Luego se lavó 2 veces con una solución de SSC 1 x, SDS 0,5% durante 15 min a 37 °C y, finalmente, se lavó 3 veces en SSC 0,1 x, SDS 1% por 15 min a 65 °C. La membrana se secó a temperatura ambiente sobre papel 3MM, montado sobre este mismo papel y envuelto en plástico para la exposición autorradiográfica. Para esto se utilizó una película Kodak XAR-5 para rayos-X, que se expuso con el papel que sostenía el filtro por 19 h a -70 °C. El revelado de esta película se hizo usando la solución reveladora y fijadora para película Kodak de rayos-X.

La preparación del DNA del cosmidio pHC79 radiactivo se hizo siguiendo

el protocolo descrito por Feinberg y Vogelstein (1983 y 1984), el cual se basa en la marcación al azar con partidores de oligodeoxiribonucleótidos (sistema "Random primers DNA labeling system" de Gibco, BRL). Se desnaturaron 50 ng de DNA del cosmidio pH79 disueltos en 20 μ L de agua, mediante calentamiento en baño maría por 5 min e inmediatamente el tubo fue depositado en hielo. Luego, se agregó al tubo 6 μ L de una solución que contenía una mezcla equimolar de desoxiribonucleótidos (Tris-HCl 3 mM pH 7,0, Na₂EDTA 0,2 mM y 0,5 mM de los deoxinucleótidos dATP, dGTP y dTTP), 15 μ L de una mezcla de partidores sintéticos (Hepes 0,67 M, Tris-HCl 0,17 M, MgCl₂ 17 mM, 2-mercaptoetanol 33 mM, de BSA 1,33 mg/mL y 18 D.O.₂₅₅ U/mL de partidores sintéticos (hexámeros), 5 μ L de α -³²P-dCTP (50 μ Ci) y 3 μ L de agua destilada. La solución se mezcló suavemente y se agregó 1 μ L de una solución que contenía el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (3 U/ μ L de DNA polimerasa-Klenow, amortiguador fosfato de potasio 100 mM, pH 7, 2-mercaptoetanol 10 mM y glicerol 50% (v/v)). La reacción se incubó durante 3 h a 25 °C, luego se detuvo con 5 μ L de Na₂EDTA 0,2 M, pH 7,5. La sonda marcada fue separada de los nucleótidos no incorporados mediante sucesivas precipitaciones con 2 volúmenes de etanol en presencia de acetato de amonio 3,8 M. Finalmente, la sonda fue resuspendida en 100 μ L de agua y mantenida a -20 °C hasta ser utilizada.

20. Caracterización de la expresión de la inmunidad del clon JI.

Cultivos del clon JI en distintas fases de crecimiento fueron analizados para la expresión de la inmunidad hacia la actividad de la microcina. Se incubó un inóculo del clon JI por toda la noche en medio LB con ampicilina. 150 μ L de inóculo se agregaron a 10 mL de LB con ampicilina e igual cantidad de inóculo a 10 mL de LB diluido a 1/5 y a 1/10. Cuando los cultivos alcanzaron una turbidez de 30 unidades Klett, se tomaron alícuotas de 50, 100 y 300 μ L, las que se usaron para preparar césped con 4 mL de agar blando fundido y a 45 °C. Sobre estos césped se depositaron alícuotas de 5 μ L de microcina en metanol 95% diluidas en series de a 1/2 hasta la dilución 1/256. Como control se usó la cepa *E. coli* VCS257 transformada con el cosmidio pHc79.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA MICROCINA E492

En esta sección de la tesis se trabajó fundamentalmente con microcina purificada desde el sobrenadante del cultivo de *Klebsiella pneumoniae* RYC492 siguiendo el procedimiento descrito por de Lorenzo (1984, ver métodos), en el cual se obtiene 3 mL de microcina en metanol 95% por cada 1 L de cultivo. Se describirá la determinación de proteínas por métodos convencionales y fluorimétrico y el análisis de las proteínas presentes mediante geles de poliacrilamida y HPLC. Se incluirán en esta sección estudios de la actividad de la microcina frente a ácido, álcali, la temperatura y pH, y frente a la acción de proteasas.

Determinación de la concentración de proteínas en la preparación de microcina E492. Para determinar la concentración de proteínas en el eluido de microcina obtenido del cartucho Sep Pak C₁₈, se utilizaron dos métodos: uno fluorimétrico (Böhlen y cols., 1973) que se basa en la unión del reactivo fluorescente fluorescamina a los grupos amino libres de la proteína, y el método de Lowry modificado (Bensadaum y Weinstein, 1976). Ambos métodos

detectan proteínas en el orden de los microgramos. Otro método utilizado para detectar proteínas en ese orden es el método de Bradford (Bradford, 1976), pero para las preparaciones de microcina este procedimiento dio valores de concentración muy bajos (10 - 20%) al compararlos con el método de la fluorescamina. Una posible explicación a este fenómeno es que el colorante azul de Coomassie que utiliza este método se une un poco a la microcina.

Para la determinación de la cantidad de proteínas fue necesario concentrar la microcina mediante evaporación del metanol en una microfuga al vacío (Speed Vac), puesto que la concentración de proteínas en el eluido del Sep Pak es muy baja. Como control, se evaporó la misma cantidad de metanol 95% y se trató de igual forma que la preparación de microcina.

En la Tabla II se muestran los resultados de la determinación de proteínas de diferentes preparaciones (A, B, C y D) de microcina a partir de sobrenadantes de cultivos de *Klebsiella pneumoniae*. El método de la fluorescamina dio valores de proteínas superiores a los obtenidos con el método de Lowry y con una dispersión mucho menor. La fluorescamina se une en forma covalente a los grupos amino, y la determinación se hace directamente, en cambio, el método de Lowry modificado implica la precipitación de las proteínas con TCA, lo que podría variar en distintas preparaciones, sobre todo considerando que la microcina tiene un bajo peso molecular y se encuentra en bajas concentraciones.

TABLA II.
Concentración de proteínas de las preparaciones de microcina E492.*

Método	Concentración de proteínas promedio µg/L de sobrenadante (% de variación)				
	A	B	C	D	Metanol
Fluorimétrico	233 (3,8%)	208 (6,5%)	196 (4,5%)	220 (7,1%)	0
1,58%	(n = 3)	(n = 2)	(n = 2)	(n = 2)	
Micro Lowry	157 (14%)	116	68 (30%)	107 (4,3%)	0
12,9%	(n = 2)	(n = 1)	(n = 2)	(n = 2)	

* A, B, C y D corresponden a diferentes preparaciones de microcina E492.
n es el número de determinaciones para obtener el promedio.

La estimación de µg/mL de proteína se hizo por extrapolación a una curva de calibración con BSA.

El valor en porcentaje bajo el método corresponde a la variación estándar de las variaciones porcentuales de las muestras.

Detección de la banda de proteínas de microcina E492. Hasta ahora, no había sido posible visualizar la microcina en geles de poliacrilamida usando los métodos de tinción clásicos como Azul de Coomassie y plata (de Lorenzo, 1984). La actividad de la microcina en un gel de poliacrilamida había sido localizada cortando el gel en pequeños trozos y depositándolos sobre un césped de una bacteria indicadora (de Lorenzo y Pugsley, 1985). Las proteínas analizadas en geles de poliacrilamida deben ser fijadas con una solución que contiene metanol 50% y ácido acético 10%. La microcina es una proteína de bajo peso molecular y soluble en metanol, y por tanto es posible que difunda desde el gel en estas condiciones, y esta sea la razón de por qué no es posible visualizar la microcina en estos geles. Por otro lado, como se mencionó en la sección anterior, la microcina parece unir mal el colorante azul de Coomassie (método de Bradford), lo cual implica que la tinción con este colorante no es lo adecuado. Para evitar los problemas recién mencionados, se probó otra técnica que consiste en marcar las proteínas en forma covalente con isotiocianato de fluoresceína (FITC), método modificado del descrito por Ragland y cols. (1974). Al igual que la fluorescamina, el FITC se une en forma covalente a los grupos amino de las proteínas. Esta marcación se realiza en forma previa a la separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida y las bandas de proteínas fluorescentes se visualizan mediante un transiluminador UV. De este modo no se necesita incubar el gel en medio líquido para la fijación y marcación de las proteínas, evitando de esta forma que se pierda la banda de microcina.

Con este procedimiento se analizó el eluido con metanol 95% del Sep Pak, tanto del sobrenadante de la cepa productora de microcina, como de una cepa de *K. pneumoniae* no productora, a la cual se aplicó el mismo protocolo de purificación. En la Figura 5 se observa la presencia de una banda de proteína de un tamaño molecular de 6.000 en la muestra proveniente de la cepa productora (carril 1, indicado con una flecha), banda que no se observa en la muestra proveniente de la cepa no productora (carril 3). Esta banda se cortó del gel y se eluyó en un pequeño volumen de metanol 95%. Este eluido presentó actividad bactericida al ser depositada sobre un césped de una cepa sensible a microcina. Como control, se eluyeron trozos de gel de poliacrilamida sin proteínas y con una banda de menor tamaño molecular. En ambos casos no se observó inhibición del crecimiento bacteriano (no se muestra).

Efecto del ácido, álcali y temperatura sobre la actividad de la microcina E492. Se determinó el efecto de ácido y álcali sobre la actividad de microcina, luego de tratarla con HCl 2,4 M o NaOH 1,4 M. Después de 30 min de incubación, se agregó a estas muestras una solución amortiguadora concentrada para llevar el pH a la neutralidad, y se determinó la actividad remanente (Tabla III). Como control, se mantuvo la microcina en solución amortiguadora. La actividad de la microcina se determinó mediante la formación de halos de inhibición del crecimiento sobre células sensibles. La actividad bactericida de la microcina E492 fue sensible al álcali, pero resistente al ácido.

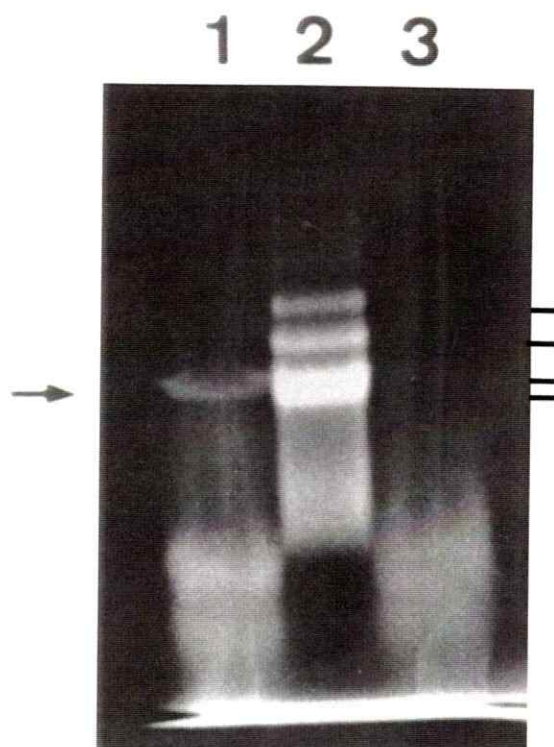


Figura 5. Visualización de la banda de la microcina E492 mediante marcación con FITC. La foto muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS - urea de la microcina proveniente del sobrenadante del cultivo de *K. pneumoniae* RYC492 (carril 1) y de una preparación paralela de una cepa no productora de microcina (carril 3). En el carril 2, estandar de PM, fragmentos de mioglobina marcados con FITC (14.440; 10.600; 8.160; 6.210, indicados a la derecha). La preparación y marcación de las muestras con el reactivo fluorescente FITC se detallan en métodos. La flecha indica la migración de la banda de microcina.

TABLA III.

Efecto del ácido, álcali y temperatura sobre la actividad de la microcina E492.

Tratamiento	Diámetro del halo de inhibición (mm)	
	Volumen de microcina	
	1 μ L	2 μ L
Control pH	5	7
Acido	5	4
Alcali	0	0
20 °C (control temperatura)	9,5	10
95 °C	7	8,5

Se incubaron 10 μ L de microcina proveniente del eluido con metanol 95% del Sep Pak con 2 μ L de HCl 12 M ó 4 μ L de NaOH 5 M, durante 10 min a temperatura ambiente, neutralizándose con 90 μ L de Tris-HCl 0,5 M pH 7,5. Como control se incubaron 10 μ L de microcina con 4 μ L de agua y se agregó 90 μ L de Tris-HCl 0,5 M pH 7,5. Para determinar el efecto del calentamiento, se diluyeron 10 μ L de microcina con 10 μ L de agua y se calentó a 95 °C o se mantuvo a temperatura ambiente por 10 min.

El efecto de temperatura se determinó incubando la microcina a 95 °C por 10 min (Tabla III). La incubación a 95 °C no tiene efecto sobre la actividad luego de 10 min. Aún utilizando tiempos de incubación al baño maría más prolongados, la actividad de la microcina no se vio alterada.

Sensibilidad de la microcina E492 frente a proteasas. La microcina se trató con distintas proteasas, cuya actividad proteolítica fue comprobada mediante el método de hidrólisis de la caseína (Bergmeyer, 1963). En la Tabla IV se resumen estos resultados, en los que se aprecia que la actividad de la microcina sólo es resistente a la acción de la tripsina, y sensible a la acción de quimiotripsina, subtilisina, proteinasa K y pronasa E. Se probó que el amortiguador no tuviese efecto sobre la actividad de la microcina (control sin proteasa), y que las proteasas por sí solas no afectasen el crecimiento bacteriano en el césped (control sin microcina).

A continuación se estudió el efecto de alguna de estas proteasas sobre la banda de microcina. Específicamente, se vio el efecto de quimiotripsina (que inactiva a la microcina) y el de tripsina (que no inactiva a la microcina). Muestras de microcina tratadas con estas proteasas fueron marcadas con FITC y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida - SDS como se muestra en la Figura 6. Se observa que luego del tratamiento con quimiotripsina (carril 4), la muestra no presenta la banda de 6.000 correspondiente a la microcina, banda que es evidente en el control sin tratamiento (carril 6). En el carril 4, se

TABLA IV.

Efecto de las proteasas sobre la actividad de la microcina E492.

Proteasa	Diámetro del halo de inhibición (mm)	
	Volumen de microcina	
	1 μ L	2 μ L
Tripsina	5	6
Quimiotripsina	0	0
Subtilisina	0	0
Proteínasa K	0	0
Pronasa E	0	0
Control sin proteasa	6	7,5
Control sin microcina	0	0

El efecto de las proteasas sobre la actividad de la microcina se determinó mezclando 14 μ L de microcina en metanol 95% con 56 μ L de solución amortiguadora Tris 50 mM pH 7,5 MgCl₂ y 70 μ L de proteasa 100 μ g/mL preparada en solución amortiguadora. Esta mezcla se incubó por 60 min a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con 3 μ L de PMSF 6 mM en DMSO. Como control se hizo lo mismo, pero en ausencia de proteasa, agregándose en cambio solución amortiguadora.

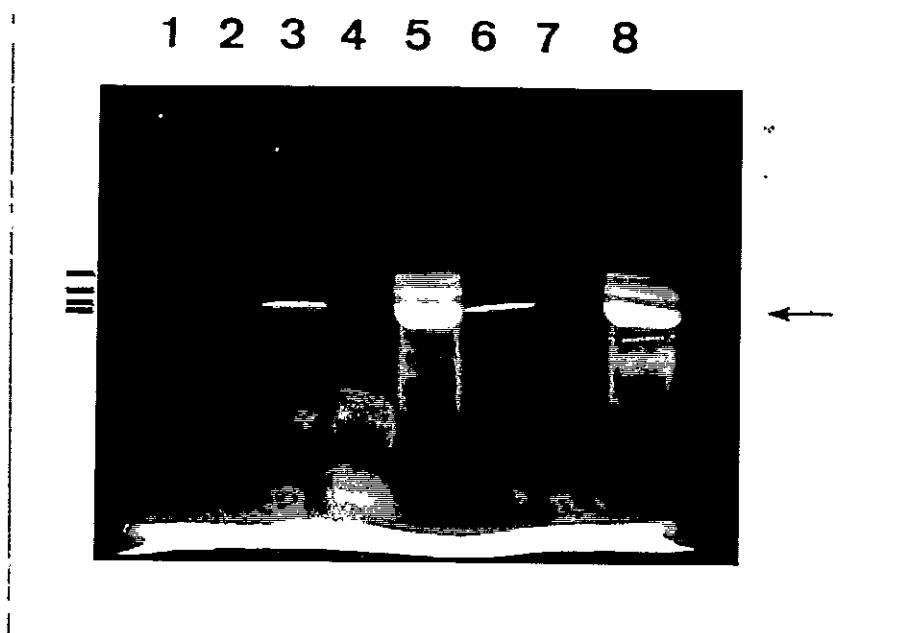


Figura 6. Efecto de tripsina y quimiotripsina sobre la banda de microcistina E492. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-urea de proteínas conjugadas a FITC con y sin tratamiento con proteasas. 1: sin proteínas; 2: tripsina; 3: microcistina tratada con tripsina; 4: microcistina tratada con quimiotripsina; 6: microcistina sin tratar; 7: quimiotripsina; 5 y 8: estandar de PM correspondientes a fragmentos de mioglobina de PM 14.400; 10.600; 8.160 y 6.210, señalados a la izquierda. Las condiciones experimentales de la digestión y marcación con FITC se detallan en métodos. La flecha indica la migración de la banda de microcistina.

observan además otras bandas de menor tamaño. Por otro lado, el tratamiento de la microcina con tripsina (carril 3) no alteró mayormente el patrón de bandas que se observa en el control sin tratamiento (carril 6). Este experimento corrobora lo observado en el análisis del efecto de estas proteasas sobre la actividad de la microcina, concluyéndose que la quimiotripsina inactiva la microcina por proteólisis.

Estudio de la estabilidad de la microcina E492 en solución acuosa frente a distintos pH y fuerza iónica. Las preparaciones de microcina obtenidas del eluido con metanol 95% provenientes de Sep Pak se mantuvieron a 4 °C en el mismo solvente, sin notarse cambios en su actividad en meses. Cuando se concentraban estas preparaciones y se llevaban a un volumen mayor con un solvente acuoso, la actividad disminuía en poco tiempo. La caracterización fisicoquímica se facilitaría al tener la microcina en medio acuoso, por lo que se decidió hacer un estudio de la estabilidad de la microcina. Se siguió la actividad en el tiempo incubándola en un amortiguador a distintos pH y a dos fuerzas iónicas diferentes, para de este modo, determinar cuál es la mejor manera de mantener la microcina en solvente acuoso. La actividad se determinó depositando una alícuota de la mezcla y diluciones de ésta sobre un césped de una bacteria sensible a la microcina y se midieron los halos de inhibición del crecimiento. El análisis de este resultado se muestra en la Figura 7, en que se graficó la suma de los halos de inhibición de cuatro mediciones de cada una de

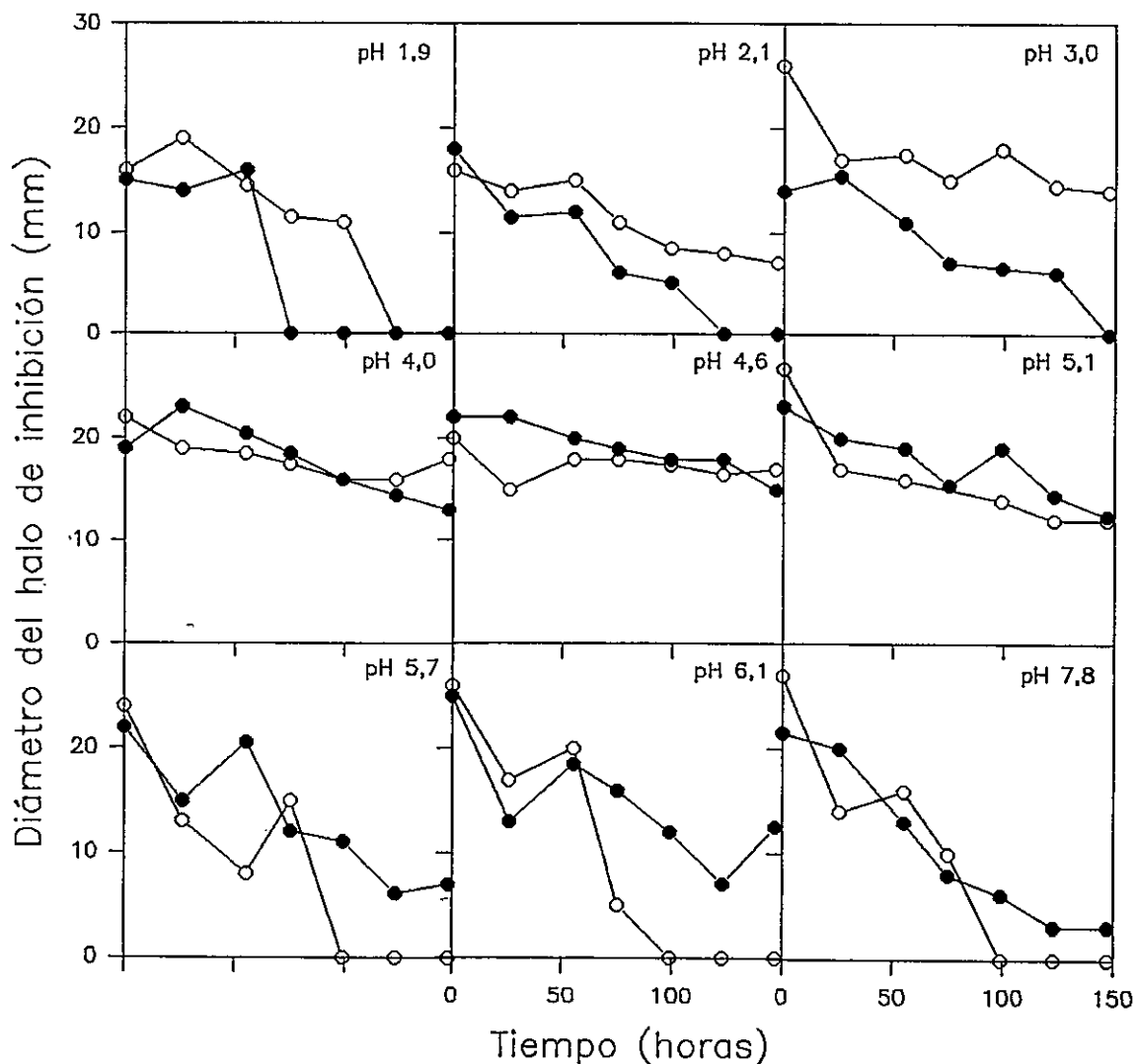


Figura 7. Actividad de la microcina E492 en solución acuosa frente a distintos pH y fuerza iónica. Se incubó la microcina en amortiguador a los pH que se indican y a fuerza iónica de 0,5 (O) ó 1 M (●). Se tomaron alícuotas en el tiempo y se determinó la actividad de 4 diluciones (1, 1/2, 1/4 y 1/8). Cada punto de las curvas corresponde a la suma de los halos de inhibición de estas diluciones.

las muestras. Estas mediciones corresponden a la muestra sin diluir y a las diluciones $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{8}$. El análisis del efecto del pH se realizó además a dos fuerzas iónicas (0,5 y 1 M), para determinar si la concentración iónica del medio afecta la actividad de la microcina. Como se observa en la Figura 7, la fuerza iónica no tiene un gran efecto sobre la actividad, ya que ésta no muestra variaciones notorias. Hasta pH 3,0, se observa que la actividad de la microcina disminuye más rápidamente en el tiempo analizado a fuerza iónica de 1 M que a 0,5 M. Este comportamiento es a la inversa a pHs superiores o igual a 5,7. En los pHs intermedios analizados, pHs 4,0; 4,6 y 5,1, las curvas de actividad de la microcina son iguales en ambas fuerzas iónicas y es coincidente con la estabilidad de la actividad a estos pH, en donde se mantiene hasta las 146 h bajando sólo un 5% de la actividad inicial. A pHs extremos, la actividad de la microcina disminuye en el tiempo analizado hasta llegar a cero.

Purificación de la microcina E492 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La purificación de la microcina desde el sobrenadante de cultivos de la cepa productora mediante el paso por Sep Pak C₁₈ da como resultado una preparación que contiene más de una banda de proteínas (ver Figura 5). De Lorenzo (1984) analizó esta preparación mediante HPLC usando una columna C₁₈ (Hibar LiChrosorb RP18 de Waters) aplicando un gradiente escalonado de metanol/agua en presencia del amortiguador ácido trietilaminafosfórico (TEAP) al 0,5%, pH 3,5. De esta forma obtuvo un pico con

actividad, el que fue re-cromatografiado. Obtuvo un rendimiento del 15% en cada etapa de HPLC.

Se repitió este protocolo descrito por de Lorenzo (1984) usando la misma columna y solventes, pero no se observaron picos de proteínas ni de actividad. Se repitió el protocolo con modificaciones en el solvente (gradiente de acetonitrilo 20-40% y de 2-propanol 0-40% en presencia de ácido trifluoroacético 0,1%), pero tampoco se obtuvo resultados positivos.

Estos resultados llevaron a pensar que la microcina E492 se unía muy fuertemente a la matriz hidrofóbica de la columna C₁₈, por lo cual se decidió probar columnas con menor capacidad de retención, como la columna C₄. La matriz de esta columna es menos hidrofóbica que la C₁₈ y es recomendada para proteínas y péptidos muy hidrofóbicos como proteínas de membrana. Las muestras de microcina aplicadas a la columna se prepararon evaporando el metanol en una centrífuga al vacío (Speed Vac) a un volumen mínimo y se inyectaron 10 µL. La detección de los picos de proteínas se siguió a una longitud de onda de 215 nm. Para un análisis preliminar, se usó sólo la precolumna C₄ (Brownlee), obteniéndose picos inactivos que eluyeron al comienzo del gradiente de metanol/agua a una concentración entre 5 y 10% (4-8 min). A 65% metanol/agua, eluyó un pico ancho que presentó actividad entre las fracciones 37 y 43 min (Figura 8). La actividad se determinó depositando alícuotas de las fracciones recolectadas sobre una placa de césped de una bacteria sensible (Figura 8, inserto). El pico con actividad fue re-

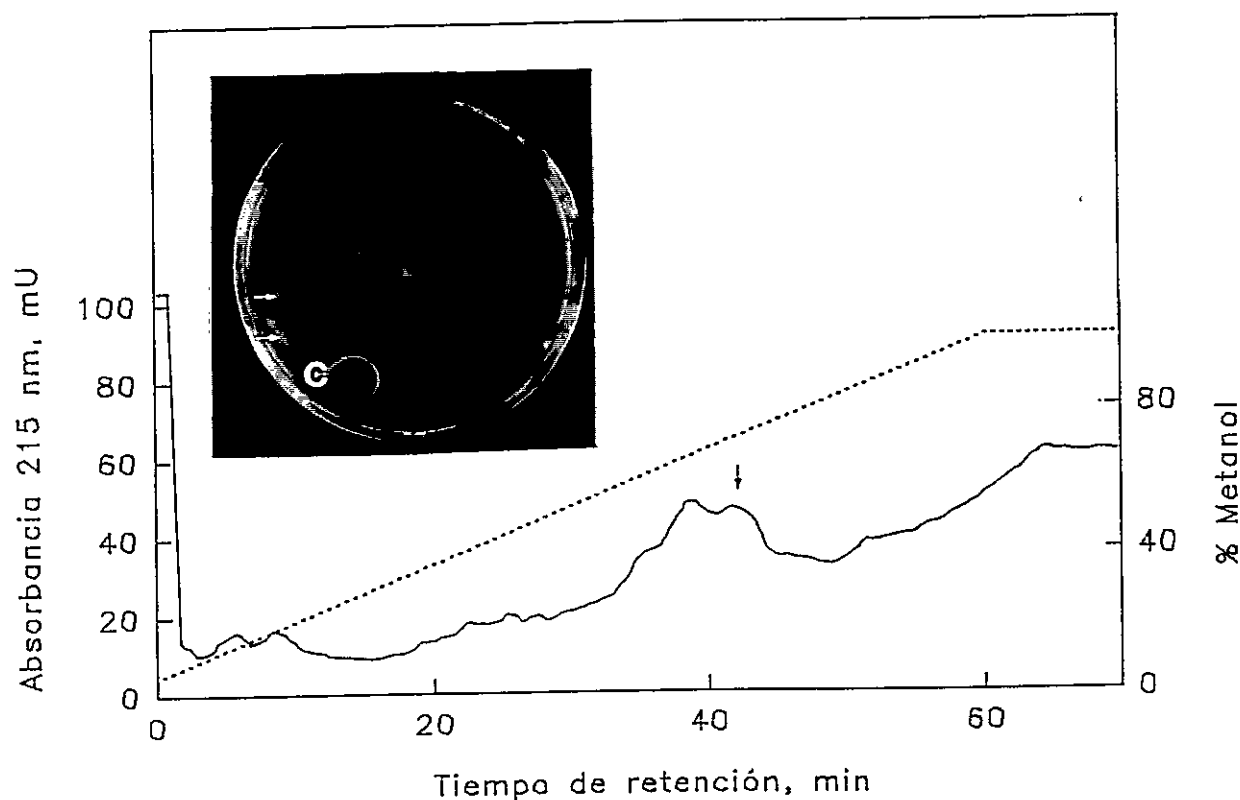


Figura 8. Perfil cromatográfico de la microcina E492 proveniente de una precolumna C₄ (Brownlee). Se concentraron 500 μ L de microcina proveniente de Sep Pak C₁₈ y se inyectaron 10 μ L en una precolumna C₄ Brownlee. La elución se realizó con un gradiente de metanol/agua 5 - 100% en un tiempo de 60 min y un flujo de 0,5 mL/min. Se colectaron fracciones de 0,5 mL. La flecha en el cromatograma indica el máximo de actividad de microcina. La fotografía inserta muestra el ensayo de actividad usando un césped de *E. coli* RYC1000 sensible a la microcina. Las fracciones fueron depositadas en el orden de izquierda a derecha. La flecha superior indica el primer halo de inhibición observado en la fracción 37 min y la flecha inferior corresponde a la fracción 43 min. En C se depositaron 3 μ L de la muestra que fue inyectada a esta precolumna.

cromatografiado en la columna C₄ (Vydac) asociada a la precolumna, pero el cromatograma no arrojó picos de proteínas ni tampoco se detectó actividad en el eluido. Adicionalmente, se realizó una cromatografía de microcina E492 a través de la precolumna y columna en tándem, en la cual no se obtuvieron picos de proteínas ni actividad.

Estos resultados indicarían que la microcina se inactiva cuando es recromatografiada o cuando se hace la cromatografía en la precolumna (Brownlee) y columna (Vydac) en tándem. Se decidió eliminar el paso de la precolumna, pues este paso se usa más bien para limpiar la muestra y proteger la columna, y realizar el análisis directamente con la columna C₄ (Vydac). Los resultados obtenidos en esta cromatografía se muestran en la Figura 9A, en donde se observan muchos picos de proteínas, asociándose la actividad a más de uno. Estos picos coinciden con la concentración de metanol en que eluye la microcina en la cromatografía por la precolumna (alrededor de 65%). Se tomó el pico que se asoció a la mayor actividad bactericida, se concentró por vacío y se inyectó nuevamente a la columna. La Figura 9B muestra el resultado de este cromatograma. El resultado es algo inesperado, ya que aparecen nuevamente muchos picos de proteínas, los cuales posiblemente son productos de distintos grados de agregación de la microcina. La actividad de la microcina va asociada a los picos que eluyen a una concentración de 67% de metanol (33 min).

El pico de proteínas que eluye a 67% de metanol y que tenía asociada la actividad de la microcina fue concentrado y microsecuenciado en el Centro de

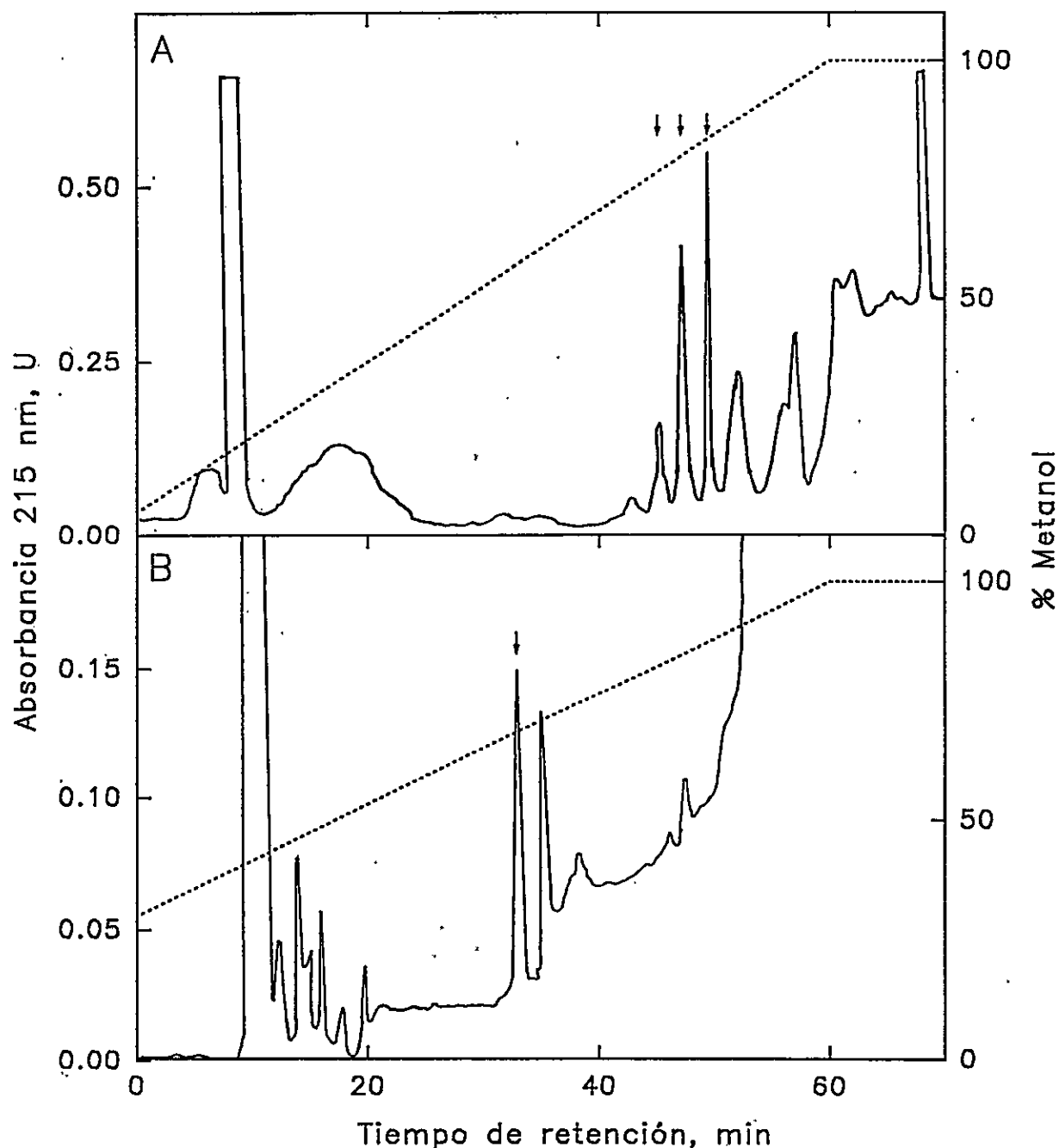
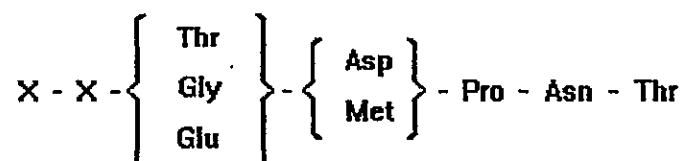


Figura 9. Perfil cromatográfico de la microcina E492 proveniente de una columna C₄ (Vydak). A. Se concentraron 700 μ L de microcina proveniente de Sep Pak C₁₈ y se inyectaron 20 μ L en una columna C₄ Vydak. Se aplicó un gradiente de metanol/agua 5-100% en 60 min con un flujo de 0,5 mL/min. Se colectaron fracciones de 0,5 mL y se determinó la actividad depositando 5 μ L sobre un césped de una bacteria sensible. Las flechas indican los picos con actividad de microcina. **B.** El pico correspondiente a la fracción 47 min. (flecha del centro, 9A) fue re-cromatografiado en la columna C₄ Vydak después de concentrar las fracciones a un volumen de 20 μ L. Se aplicó un gradiente de metanol/agua 30-100%. La flecha indica el pico con actividad de microcina.

Investigaciones Biológicas, Madrid, España. El resultado de esta microsecuenciación es el siguiente:



De esta microsecuenciación sólo fue posible tener certeza de sólo 3 aminoácidos, ya que los otros 2 tienen más de una posibilidad.

Microscopía electrónica y espectroscopía de fluorescencia y UV-visible de la microcina E492. Al concentrar por evaporación o baño maría las preparaciones de microcina provenientes del eluido en metanol 95% del Sep Pak, se observaba que la solución se ponía turbia. Esta turbidez disminuía cuando se agregaba metanol, no así cuando se agregaba agua. Una explicación para este fenómeno es que la microcina en soluciones acuosas forme estructuras agregadas, debido a la fuerte naturaleza hidrofóbica de esta proteína, y esta agregación le da la turbidez a las soluciones cuando se evapora el metanol.

Para determinar si la microcina E492 de *K. pneumoniae* forma estructuras agregadas, se hizo un estudio de microscopía electrónica, usando

preparaciones de diferentes concentraciones de metanol. En presencia de metanol 95% (Figura 10A), la microcina presenta agregados amorfos de estructuras pequeñas, en cambio en presencia de 50% metanol (Figura 10B) presenta estructuras agregadas asociadas a un cuerpo esférico que, posiblemente se trate de la matriz de sílica a la cual está unida C_{18} . A esa concentración de metanol la microcina se uniría a esta resina. La presencia de estos residuos de la resina es posiblemente consecuencia del procedimiento al vacío que se realiza para pasar por el Sep Pak C_{18} 1 L de sobrenadante de cultivo. Este resultado indicaría que la microcina formaría estructuras agregadas, las que se acentuarían dependiendo de la proporción de metanol en que se encuentra.

Con el objetivo de ampliar la información acerca de la influencia del solvente en la estructura de la microcina, se caracterizaron las propiedades fluorescentes de la microcina en diferentes solventes. El espectro de excitación de la microcina en metanol 95% y en agua se muestran en la Figura 11 (líneas continua y discontinua, respectivamente), en que la longitud de onda de emisión utilizada fue de 359 nm. La preparación de la microcina en agua se realizó tomando 500 μ L de la microcina en metanol 95% y evaporando el solvente mediante centrifugación al vacío hasta un volumen de 40 μ L, completando a 500 μ L con agua. El aspecto de esta solución fue opalescente. Se analizaron los espectros de emisión de la microcina en metanol 95% y en agua excitando los triptófanos a 295 nm (Figura 11, espectros de la derecha), observándose que la

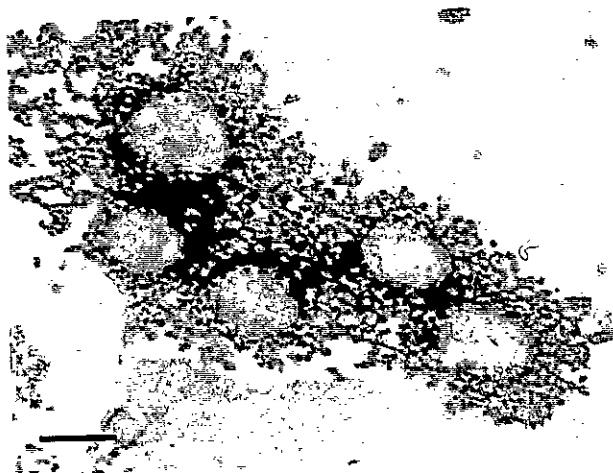
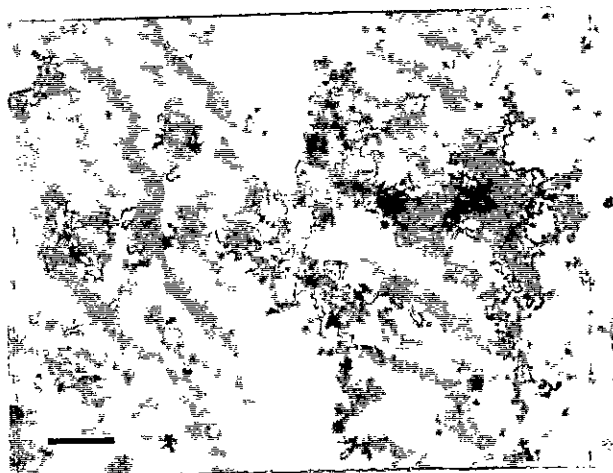


Figura 10. Microfotografía electrónica de la microcina E492. La tinción se realizó con acetato de uranilo 0,5%. **A.** Microcina en metanol 95%, la barra corresponde a 0,5 μm . **B.** Microcina en metanol 50%, la barra corresponde a 0,2 μm .

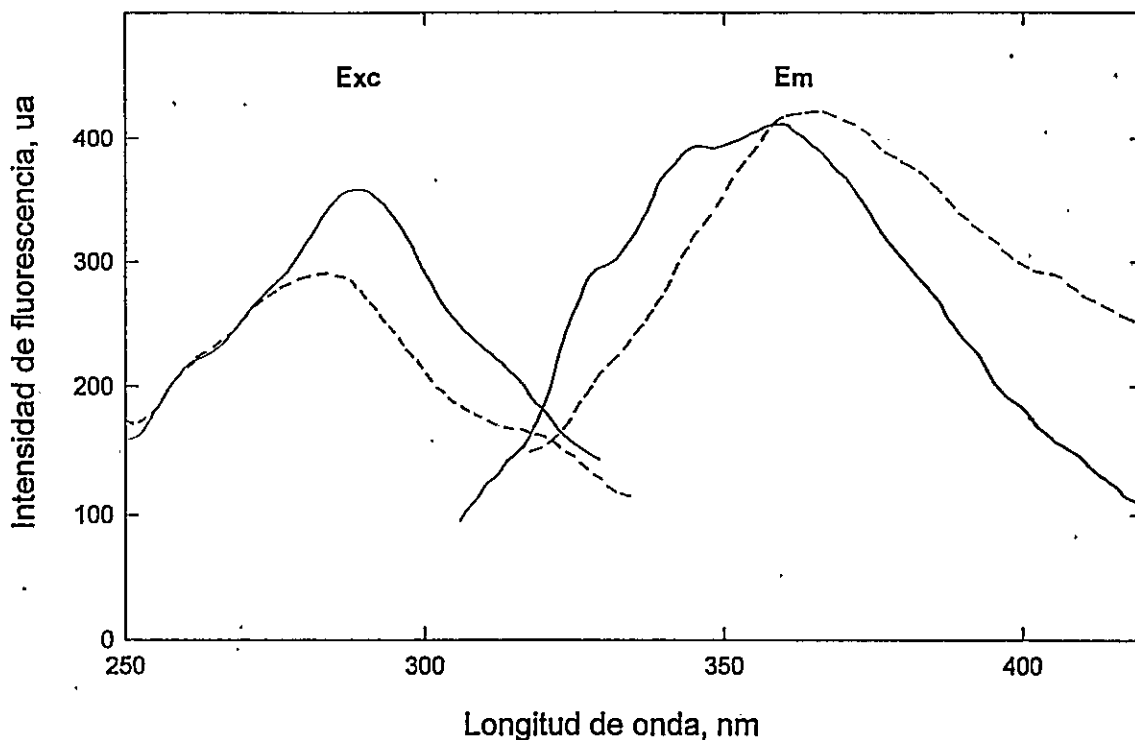


Figura 11. Espectros de excitación (exc) y emisión (em) de fluorescencia de la microcina en metanol y agua. Las determinaciones de excitación (exc) se realizaron midiendo la intensidad de la fluorescencia a 364 nm. La ranura de excitación fue de 10 nm; la escala de intensidad de fluorescencia para la microcina en agua fue aumentada 3,3 veces para obtener una señal equivalente a la microcina en metanol. Los espectros de emisión (em) se hicieron excitando la muestra a 295 nm. La línea punteada corresponde a la muestra de microcina en agua (ranura de emisión 10 nm) y la línea continua a la microcina en metanol 95% (ranura de emisión 5 nm).

microcina posee fluorescencia intrínseca dada por triptófano. El espectro de emisión de la microcina E492 en solución acuosa se muestra en la misma Figura 11. Al comparar los espectros de emisión tomados con diferentes solventes, se observa un corrimiento del máximo de intensidad de fluorescencia hacia el rojo, lo que indica que el ambiente para los triptófanos es más hidrofílico que en el espectro de la microcina en metanol. Esto quiere decir que él o los triptófanos quedan expuestos al agua. Por otro lado, la menor intensidad de fluorescencia de la microcina en solución acuosa (ver leyenda Figura 11, se cambió la escala y la ranura de emisión para observar una señal comparable a la de la microcina en metanol) podría deberse a un apagamiento por la turbidez de la solución, por apagamiento por los grupos carbonilos, pero también es probable que la microcina sufra cambios en solución acuosa que alteran su conformación ocultando sitios que contienen triptófanos.

Se determinó el espectro de absorción UV-visible en las condiciones acuosas y en presencia de metanol, los que se muestran en la Figura 12. En estos espectros se puede observar que en solución acuosa hubo un corrimiento de los picos y que el pico a 275 nm que se observó en presencia de metanol, ya no aparece cuando se cambia el solvente a agua, indicando un cambio en el estado de agregación de la microcina. Estos resultados concuerdan con los estados de agregación observados en las microfotografías electrónicas.

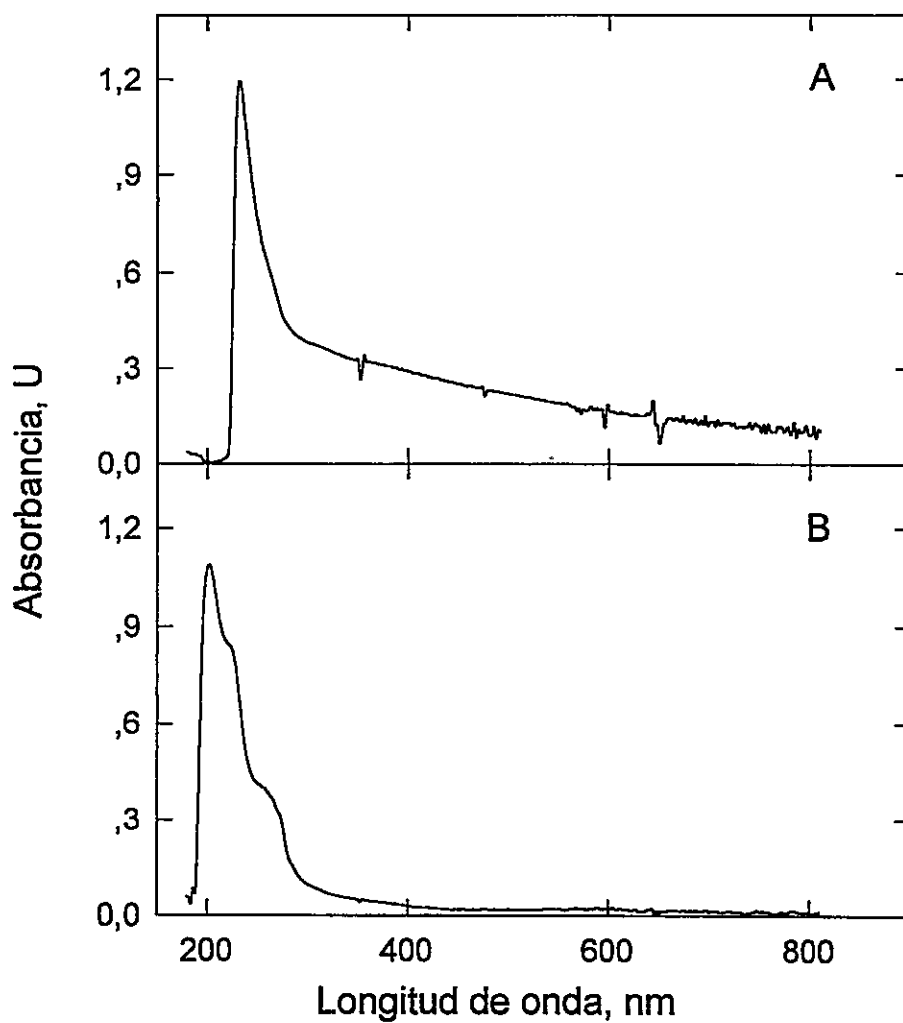


Figura 12. Espectros de absorción UV-visible de la microcina E492. En A y B, espectros de absorción de la microcina en agua y metanol, respectivamente. 500 μL de microcina en metanol 95% proveniente de la elución de Sep Pak se evaporaron y se resuspendieron en igual volumen de agua.

CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LA MICROCINA E492

La microcina E492 provoca en las células sensibles una disminución intracelular de algunos metabolitos como leucina, serina, fenilalanina y ácido diaminopimérico (De Lorenzo y Pugsley, 1985). Estos autores observaron que células cargadas con el ión lipofílico tetrametilfosfonio (TTP^+) tratadas con microcina, liberaban el TTP^+ al medio, determinándose de este modo que el sitio de acción de la microcina es la membrana citoplasmática.

Con el objeto de establecer si el mecanismo de acción de la microcina es mediante la formación de canales iónicos, se realizaron experimentos en bicapas lipídicas (para explicación del método ver Figura 4 en sección Métodos).

Formación de canales iónicos por la microcina E492. Se evaporó una alícuota de microcina proveniente del eluido de Sep Pak C₁₈ (100 a 300 μ L) al baño maría, y se sumergió una punta de micropipeta cortada en uno de sus lados en la solución concentrada de la microcina, pincelando la membrana con ésta. Al aplicar un potencial constante de +40 mV a la membrana y usualmente, antes de 10 min se observaron fluctuaciones discretas de corriente que se interpretaron como la incorporación de canales iónicos a la bicapa lipídica. La Figura 13 muestra una secuencia en la que se incorporaron consecutivamente 3 canales aumentando la corriente que pasa a través de la membrana en saltos discretos de la misma magnitud. La Figura 14 muestra el registro de un canal



Figura 13. Incorporación escalonada de canales de microcistina E492 a la membrana lipídica. La membrana estaba compuesta por PE de cerebro en presencia de KCl 100 mM, MES 10 mM, pH 6,7. El potencial aplicado fue de -40 mV.

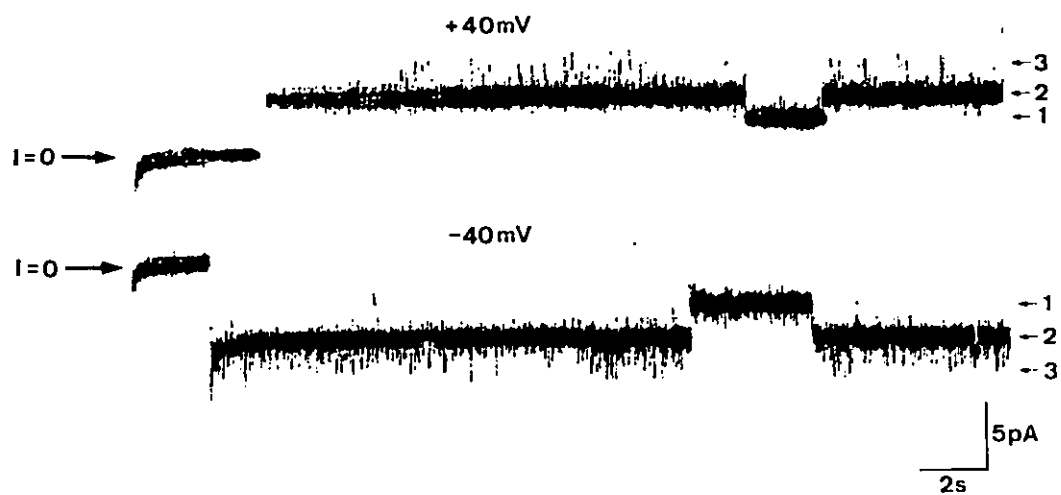


Figura 14. Registro de un canal formado por la microcina E492. La membrana estaba compuesta por PE de cerebro en presencia de KCl 100 mM, MES 10 mM, pH 6,7. Los estados de conductancia se señalan como 1, 2 y 3. El potencial aplicado fue de ± 40 mV.

único, que presenta preferentemente 2 estados de conductancia, que se señalan como 1 y 2. En esta figura también es posible observar un tercer estado de conductancia, que no era visitado con la frecuencia de los otros, por lo cual no se consideró en el análisis de las características electrofisiológicas.

Una de las propiedades que caracteriza cada canal iónico es su conductancia, que representa el número de iones que atraviesan el canal por unidad de tiempo a un determinado potencial aplicado. El valor de la conductancia se obtiene de la pendiente de las curvas de corriente vs voltaje (curvas I/V). Para determinar la conductancia del canal de la microcina, se realizó un registro de canales de microcina 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 I/V no es lineal, a potenciales negativos el canal de microcina presenta un valor de conductancia menor que a potenciales positivos (110 pS calculado para -60 mV). Incluso se observa que la pendiente tiende a disminuir a medida que los potenciales se hacen más negativos. Por otra parte, a potenciales positivos la conductancia va aumentando y llegando a un valor de 160 pS (a +60 mV). Este comportamiento de la curva I vs V significa que el canal se comporta como un rectificador de la corriente lo que sugiere que el poro es asimétrico.

Los canales iónicos pueden ser selectivos a cationes o aniones, es decir, más permeables a uno u otro ión. Para determinar la selectividad de un canal,

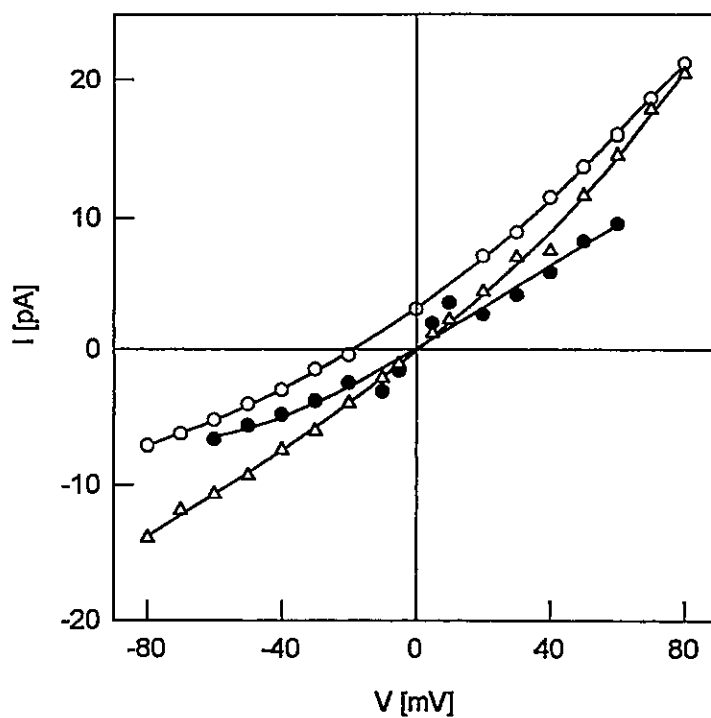


Figura 15. Relaciones corriente-voltaje del subestado 2 del canal de la microcistina E492. La bicapa era de PE de cerebro. Inicialmente los registros se hicieron en condiciones simétricas, de KCl 100 mM, MES 10 mM pH 6,7 (●). Luego se llevó la concentración de KCl del lado *cis* a 240 mM KCl (○). Finalmente se hicieron registros en condiciones simétricas de KCl 240 mM (Δ).

se debe realizar la curva I/V en condiciones asimétricas, es decir, en presencia de un gradiente de concentración de la sal a través de la membrana. Al aumentar la concentración de KCl en el lado *cis*, la corriente a un potencial de 0 mV puede tener un valor positivo o uno negativo al abrirse el canal. Si la corriente es positiva, el canal es catiónico. Si la corriente es negativa, es aniónico.

Para determinar la selectividad del canal de microcina, primero se analizó el comportamiento de este canal en condiciones simétricas, es decir, en presencia de KCl 100 mM en ambos compartimientos. Luego el canal se expuso a condiciones asimétricas aumentando la concentración de KCl a 240 mM en el lado *cis* y se determinó la relación corriente vs voltaje aplicado en estas condiciones (Figura 15). En la figura se observa que el canal es catiónico. El valor del potencial de inversión (V_{inv}) obtenido experimentalmente fue de -19 mV. Utilizando la ecuación de Goldman-Hodgkin y Katz (Hodgkin y Katz, 1949) se obtuvo un valor de razón de permeabilidad K^+/Cl^- de 13,2, es decir, el K^+ es 13,2 veces más permeable que el Cl^- .

La selectividad del canal a diferentes cationes monovalentes se determinó cambiando la sal de KCl 100 mM del lado *cis* por otra que contiene la sal de Cl^- de otro catión monovalente a la misma concentración, manteniendo la solución de KCl 100 mM en el lado *trans* (condiciones biiónicas). En estas condiciones biiónicas se determinaron las relaciones corriente-voltaje y los potenciales de inversión. El resultado de este análisis se muestra en la Figura

16. A potenciales negativos el canal presenta una conductancia semejante en las soluciones analizadas, debido a la rectificación a los potenciales negativos. En cambio, a potenciales positivos, se observa que la conductancia del canal es diferente para diferentes cationes. Esto indica que a voltajes positivos el canal conduce preferentemente unos cationes más que otros.

La selectividad del canal de microcina para cada uno de los cationes probados se obtuvo a partir de los valores de los potenciales de inversión (Tabla V). Esto dio el siguiente orden de selectividad:



La preparación de microcina utilizada para la caracterización electrofisiológica provenía del eluido en metanol 95% del Sep Pak, por lo que no es pura. Para eliminar cualquiera duda que pudiese surgir por el estado de purificación de la microcina empleada, se analizó la capacidad de formar canales iónicos a partir de una fracción activa obtenida de un pico de la pre-columna C₄ de HPLC. Esta fracción formó canales iónicos con las mismas características que las de la preparación no purificada. Asimismo, se analizó un eluido de una banda de microcina proveniente de un gel de poliacrilamida - SDS. Este eluido también formó canales iónicos, pero dichos canales presentaron un comportamiento alterado, debido probablemente a contaminantes del gel de poliacrilamida. De este modo se comprobó que la

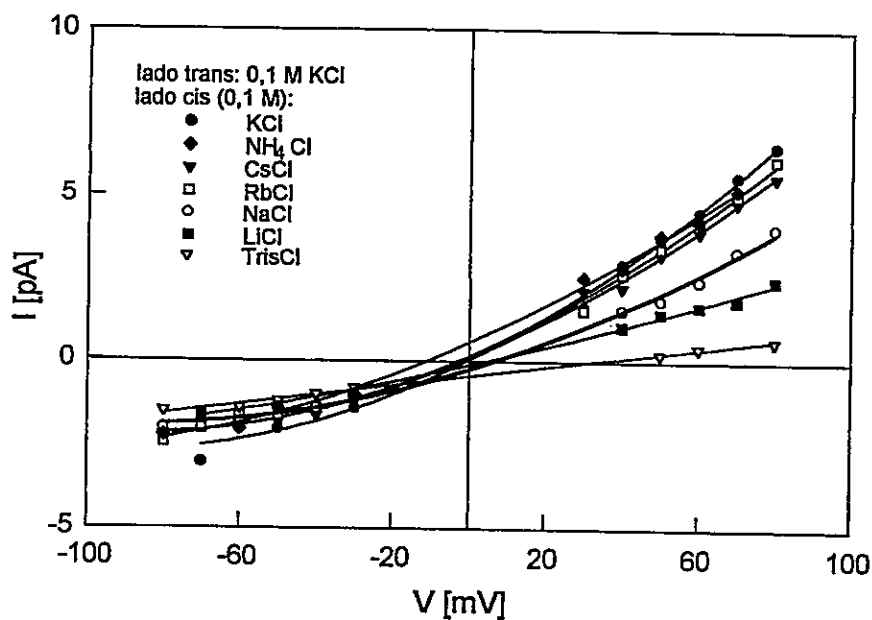


Figura 16. Relaciones corriente-voltaje del canal de microcistina E492 en condiciones biónicas en diferentes soluciones salinas. La membrana estaba constituida por POPE:PC en una relación de 8:2 en MES 10 mM, pH 6,7. En la figura se indican las sales empleadas de cada una de las curvas. Los valores de corriente graficados corresponden a los del subestado 2.

TABLA V.

Potenciales de inversión y razones de permeabilidad del canal de la microcina a diferentes cationes.

Catión	V_{inv}^a (mV)	P_K / P_X^b	Radio iónico ^c (nm)
Li ⁺	5,29	0,81	0,6
Na ⁺	7,29	0,75	0,095
K ⁺	0,17	1,00	0,133
Rb ⁺	-2,38	1,10	0,148
Cs ⁺	-1,33	1,05	0,169
NH ₄ ⁺	-10,56	1,52	0,15
Tris ⁺	33,57	0,26	0,29

a El potencial de inversión (V_{inv}) se calculó a partir de la intersección horizontal de las curvas de segundo orden de la figura 16.

b La razón de permeabilidad se calculó considerando que la permeabilidad al Cl⁻ es 0 por ser el canal selectivo a cationes. Se utilizó la expresión:
 $V_{inv} = 58 \log (P_K / P_X)$; (Hodgkin y Katz, 1949).

c Los datos del radio iónico se obtuvieron de Cecchi (1985) y Koryta (1982).

capacidad de formar canales iónicos está dada por la microcina E492 y no por posibles contaminantes que acompañan la preparación de Sep Pak.

Efecto de la quimiotripsina sobre la actividad de los canales iónicos formados por la microcina E492. En la sección de Resultados se describió que la quimiotripsina corta proteolíticamente e inactiva a la microcina. Esta proteasa fue escogida para estudiar el efecto que tendría la remoción de un fragmento de la microcina sobre los canales iónicos. La Figura 17 muestra que el comportamiento del canal no se ve alterado cuando la quimiotripsina se agregó en el lado *cis* (trazos c y d). En cambio, cuando esta proteasa se adicionó en el lado *trans*, se produjo un cambio en la cinética del canal: a ± 40 mV el canal se estabiliza en el subestado 2, en el que se mantuvo por un largo período de tiempo. Este efecto fue reproducible cuando se estudiaron canales provenientes de otras preparaciones de microcina. Este comportamiento se podría explicar por el corte de una parte de la microcina que forma el canal, posiblemente aquella que participa en esa transición.

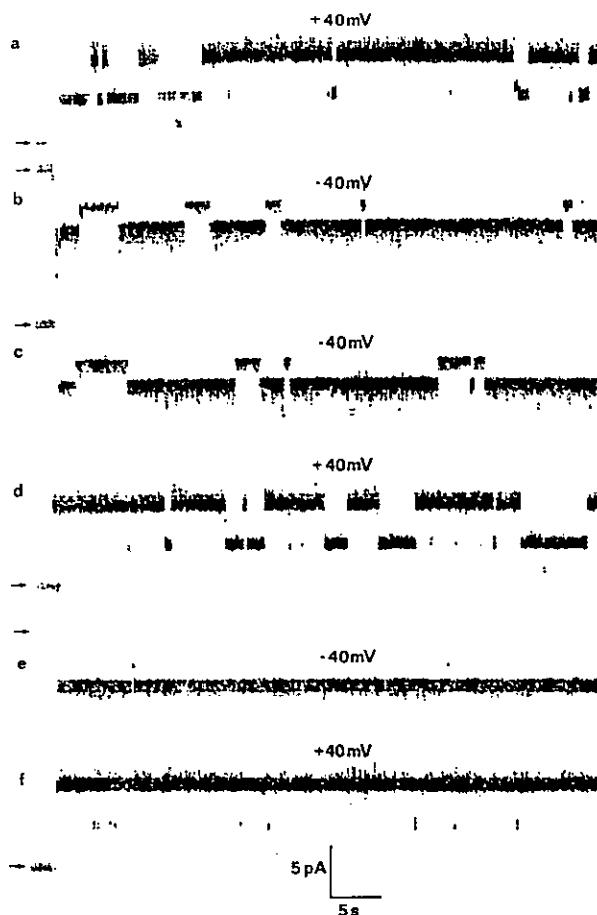


Figura 17. Efecto de la quimiotripsina sobre la actividad del canal iónico formado por la microcistina en bicapas lipídicas. Se muestran registros de corriente del canal de microcistina siguiendo la secuencia en que se agregaron los reactivos. En a y b: actividad del canal control; c y d: 0,7 mg/mL de quimiotripsina en el lado *cis* de la membrana; e y f: 0,7 mg/mL de quimiotripsina en el lado *trans* de la membrana. Los registros se hicieron a +40 y -40 mV en solución salina de KCl 100 mM, MES 10 mM, pH 6,7.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA MICROCINA E492

Los resultados de de Lorenzo y Pugsley (1985) en relación a la búsqueda de los genes de la microcina en los dos plasmidios que posee *K. pneumoniae* RYC492 indican que la microcina podría estar codificada en el cromosoma. Por lo tanto, se intentó el clonamiento con el DNA total de la bacteria, cromosomal y plasmidial. La primera estrategia fue usar las técnicas clásicas de clonamiento, consistentes en la digestión parcial del DNA total de *K. pneumoniae*, posterior ligación a un vector de clonamiento y transformación de *E. coli*. La selección de las posibles transformantes productoras de microcina se realizó mediante plaqueo en réplica de las colonias sobre placas de agar con césped de una bacteria sensible a la microcina. De este modo sería posible visualizar los halos de inhibición alrededor de la colonia productora. Por otro lado, si las transformantes son crecidas por toda la noche, se favorece el crecimiento de las posibles productoras de microcina, ya que las demás serían eliminadas por la actividad bactericida de la microcina. Mediante esta estrategia, se probaron distintas enzimas de restricción para la digestión del DNA, como también vectores y bacterias receptoras, pero no se obtuvo ninguna colonia productora de microcina entre las transformantes. Debido a la posibilidad de que la expresión de la microcina pudiese ser género específica, se intentó el clonamiento *in vivo* mediante la infección con el fago Mu. El fago utilizado correspondió al Muc(Can) que lleva la resistencia a cloranfenicol, antibiótico

frente al cual la *Klebsiella* es sensible. Además de tener las características de un transposón, posee un represor del ciclo lítico termosensible, es decir las funciones líticas del fago Mu se expresan cuando la temperatura de incubación se eleva a 42°C y se mantiene en forma lisógena a 30°C. El fago Mu infecta a la bacteria y se integra al DNA al azar, generando de este modo mutantes. Estaba descrito que el fago Mu no infecta *Klebsiella*, salvo que ésta sufra una mutación a nivel de sus componentes del lipopolisacárido. Como *K. pneumoniae* RYC492 resultó ser resistente a la infección, se realizó una mutagénesis química usando el reactivo dietilsulfato (Des) con el fin de obtener mutantes sensibles a la infección. Para ello se aislaron colonias mutagenizadas y cada una de las placas se replicaron sobre 2 placas que contenían el fago Mu en presencia de cloranfenicol mediante la técnica de réplica con terciopelo. Una de estas réplicas fue incubada a 30 °C y la segunda a 42 °C. A 30 ° crecerán aquellas colonias lisógenas y a 42 ° no crecerán, pues serían lisadas por el fago. Después de eliminar las resistentes espontáneas al cloranfenicol y las colonias termosensibles, se obtuvo 14 colonias resistentes a cloranfenicol sospechosas de ser sensibles a la infección por fago. Estas supuestas lisógenas no lisaron en medio líquido cuando se crecieron a 42 °C, temperatura a la cual el fago Mu entra al ciclo lítico lisando la célula infectada y produciendo partículas virales, por lo cual se concluyó que el fago Mu presenta dificultades para completar el ciclo lítico.

Se utilizó una tercera estrategia que es el clonamiento en un cosmidio.

Mediante la primera estrategia de clonamiento en plasmidios es difícil clonar grandes fragmentos de DNA. Los genes descritos para colicinas y microcinas se encuentran organizados en operones, siendo 5.000 pb el tamaño promedio de estos operones. Es posible que los genes de la microcina ocupen una región del DNA de mayor tamaño o no estén localizados en forma contigua, lo que haría difícil el clonamiento en fragmentos pequeños de DNA. Para obtener mediante clonamiento una transformante productora, ésta debe adquirir al menos dos genes: el gen estructural de la microcina y el gen o genes que le confieren la inmunidad a la cepa productora. Para minimizar la posibilidad de que sea el tamaño del DNA el problema de clonamiento y también para aumentar varias veces la representatividad del genoma de *Klebsiella*, se decidió usar el protocolo de empaquetamiento *in vitro* en cabezas de fago λ utilizando el cosmidio pH79, que está constituido por DNA del plasmidio pBR y un fragmento de DNA del fago λ con el sitio *cos*. En este protocolo, el DNA se une al sitio *cos*, el que es reconocido en este proceso por las proteínas del fago y lo encapsida, permitiendo el clonamiento de fragmentos de DNA de tamaños mayores a 30 Kb. La Figura 18 muestra esta estrategia de clonamiento y los resultados se detallan a continuación.

Obtención del DNA total de *K. pneumoniae* RYC492. *K. pneumoniae* es una bacteria bacilar gram negativo que presenta una abundante cápsula. La preparación de DNA total (cromosomal y plasmidial) de esta bacteria mediante

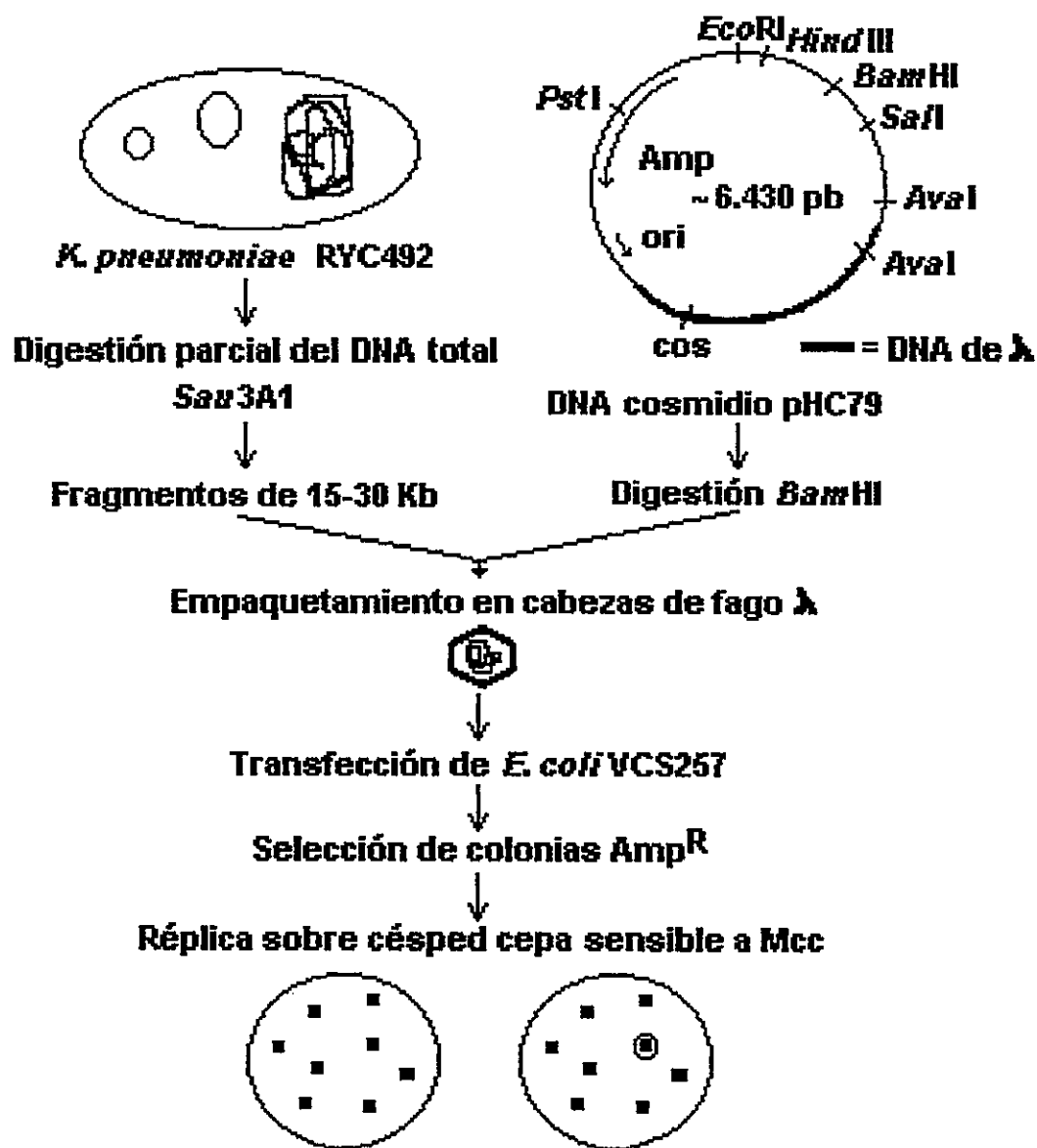


Figura 18. Estrategia de clonamiento de los genes que expresan la microcina E492.

el método de la lisis alcalina (Sambrook y cols., 1989) se vio alterada por la cápsula, dándole la apariencia de digerido parcial y haciendo difícil su digestión posterior. Es por ello que se debió usar el protocolo descrito por Ausubel y cols. (1992), que utiliza el reactivo CTAB, con lo que se obtiene un complejo con los polisacáridos, separándolos del DNA. De este modo fue posible obtener el DNA de *Klebsiella*, el que fue digerido parcialmente con la enzima *Sau3A1* (Figura 19A). Este DNA (377 μg) digerido parcialmente se sometió a una centrifugación en gradiente de sacarosa 40 al 10% (28.000 rpm por 24 h en un rotor SW40 a 20°C) y se analizaron las fracciones del gradiente en geles de agarosa (Figura 19B). Las fracciones que presentaron un tamaño de DNA igual o superior a 15 Kb se precipitaron y concentraron para ser utilizadas en la siguiente etapa. Una alícuota del resultado de esta preparación se muestra en la Figura 19C. Este DNA fue unido al cosmidio pHc79 digerido con *Bam*HI, (pHC es un derivado de pBR322, que posee un fragmento de DNA del fago λ con el sitio *cos*, ver Figura 18). Se realizó el empaquetamiento *in vitro* según el protocolo descrito por Stratagene (Gigapack II Plus), agregando 3 μL de DNA ligado. El título del empaquetamiento fue de $8,6 \times 10^5$ transductantes/mL, lo que está dentro de lo esperado (1×10^5 - 1×10^6 transductantes/mL). Se infectaron células de *E. coli* VCS257 y se amplificó por 1 y 3 h, se agregó DMSO a una concentración final de 20% o glicerol a una concentración final de 50%, y se guardó la genoteca a -80°C.

En la primera búsqueda de clones productores de microcina en la

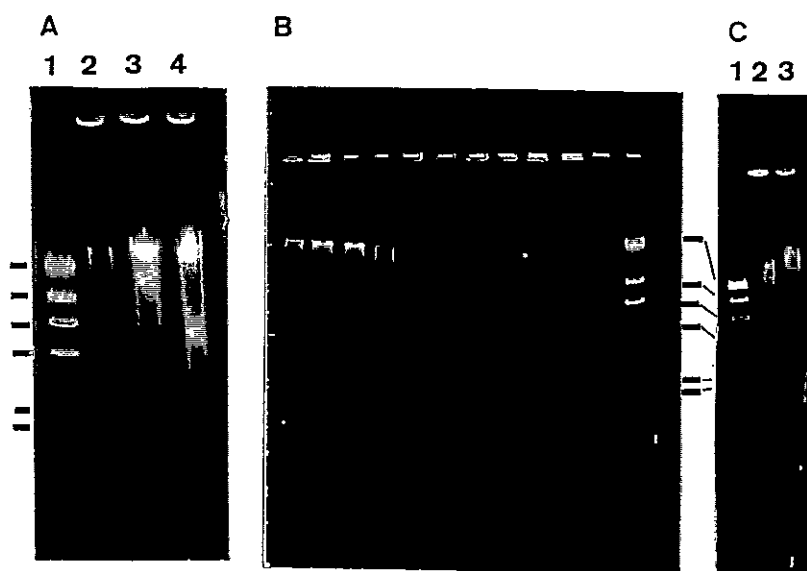


Figura 19. Digestión parcial del DNA total de *K. pneumoniae* RYC492 con *Sau3A1* y análisis de las fracciones del gradiente de sacarosa. Las fotografías corresponden a geles de agarosa al 1% y posterior tinción del DNA con bromuro de etidio. **A.** Carril 1: DNA de λ digerido con *HindIII*, 23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3 y 2,0 Kb, indicados con las barras. Carril 2: Control sin digerir del DNA total de *K. pneumoniae*. Los carriles 3 y 4 corresponden a dos muestras de digestiones parciales del DNA total de *Klebsiella* con *Sau3A1*. **B.** Se muestra el análisis electroforético de las fracciones recogidas del gradiente de sacarosa. El último carril de la derecha corresponde al DNA de λ digerido con *HindIII*. **C.** Carril 1: DNA de λ digerido con *HindIII*; carril 2: Fracciones colectadas del gradiente de sacarosa con un tamaño superior a 15 Kb; carril 3: DNA de *K. pneumoniae* control sin digerir.

genoteca, se analizaron 6.930 colonias, encontrándose 3 clones productores de microcina, clones E1, E2 y E3. La Figura 20 muestra una réplica sobre césped bacteriano de una placa de agar en donde se aislaron colonias de la genoteca. Alrededor de una de las colonias se observa un pequeño halo de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora (*E. coli* BL21 11 α 2, resistente a ampicilina).

Actividad de la microcina del clon E1 frente a una cepa mutante en TonB.

Está descrito que la microcina E492 de *K. pneumoniae* necesita como receptor en la bacteria sensible a la proteína TonB (Pugsley y cols., 1986). Se determinó si una cepa mutante en esta proteína es resistente a la acción de la microcina. Para ello se depositó una alícuota de la microcina purificada a partir del cultivo del clon E1 y de *K. pneumoniae* RYC492 sobre un césped de la cepa mutante (*E. coli* X8605). El césped no mostró un halo de inhibición de crecimiento, lo que es consistente con que esta actividad corresponde a la microcina de *K. pneumoniae* clonada en el DNA inserto en el cosmidio.

Purificación y caracterización de la microcina proveniente del clon E1. Se purificó microcina a partir del sobrenadante de 1 L de cultivo del clon E1 por el procedimiento habitual. La visualización de la banda de microcina proveniente de este clon se muestra en la Figura 21, carril 3. La banda de microcina de esta preparación se presenta en forma difusa comparada con la microcina proveniente de la preparación de *K. pneumoniae* (carriles 2 y 4). Se caracterizó

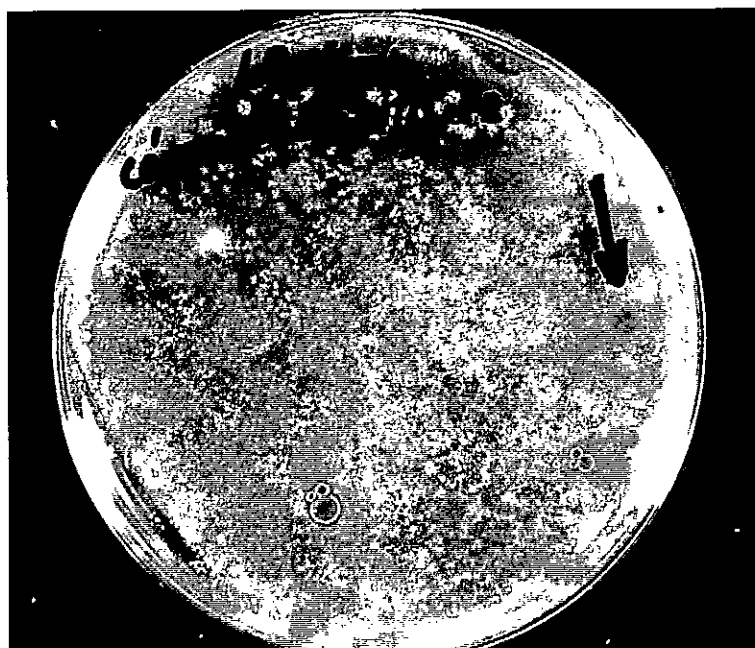


Figura 20. Selección de clones productores de microcina desde la genoteca. La fotografía muestra una placa de agar con un césped de *E. coli* BL21 11α2, sobre el cual se sembraron mediante plaqueo en réplica colonias aisladas de la genoteca. La flecha indica el único clon positivo en la producción de microcina y que presenta un halo de inhibición del crecimiento a su alrededor.

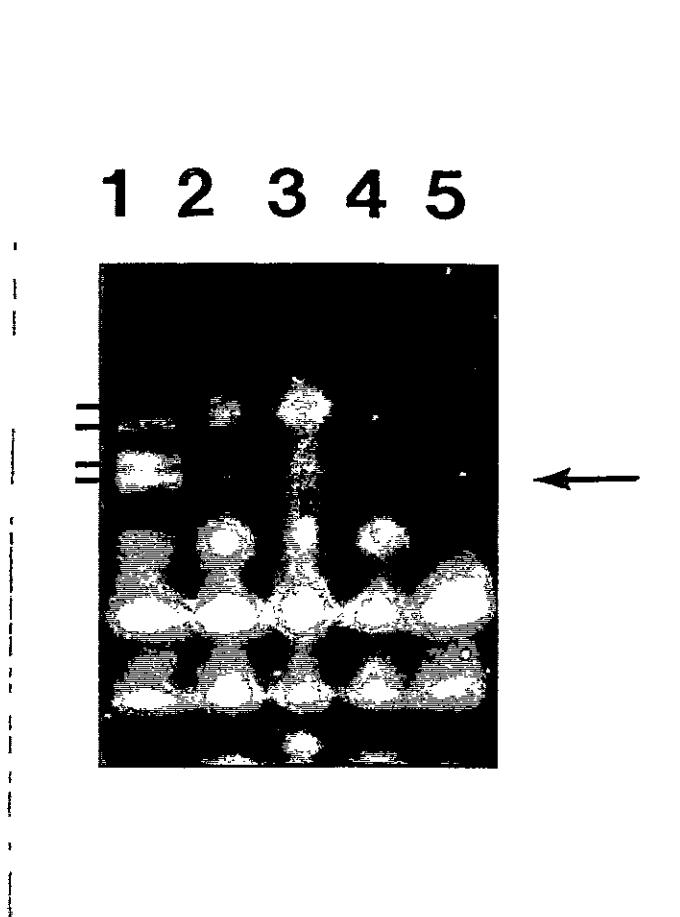


Figura 21. Visualización de la banda de la microcina E492 obtenida del clon E1 mediante marcación con FITC. La foto muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS-urea de la microcina proveniente del sobrenadante del cultivo del clon E1 (**carril 3**) y de *K. pneumoniae* RYC492 (**carriles 2 y 4**). En los **carriles 1 y 5**, estandar de PM marcado con FITC (14.440; 10.600; 8.160; 6.210). La preparación y marcación de las muestras con el reactivo fluorescente FITC se detallan en métodos. La flecha indica la migración de la banda de la microcina.

la actividad de la microcina del clon E1 frente a la acción de pH extremos y frente a alta temperatura. La actividad de la microcina recombinante resultó ser resistente a la acción del ácido, pero sensible frente al álcali, igual al resultado obtenido con la microcina proveniente de *K. pneumoniae*. La actividad se mantuvo estable cuando se incubó la microcina en 95% metanol en baño maría por 10 min.

Se determinó si esta microcina clonada en *E. coli* presenta actividad de formar canales iónicos en bicapas lipídicas. Se observó actividad de canal iónico con la microcina del clon E1 y que posee características similares al canal de la microcina de *Klebsiella*, de naturaleza catiónica y con varios subestados. En este caso, el registro presentó más de 5 estados de apertura del canal, por lo que resultó difícil cuantificar la distancia entre estos estados, distancia que se relaciona con la intensidad de corriente que pasa por el canal.

Inestabilidad del clon E1 frente a la producción de microcina E492. Una colonia positiva del clon E1 se creció en medio de cultivo líquido, a partir del cual se aislaron nuevas colonias, determinándose la actividad de estos clones mediante la técnica de la réplica con terciopelo sobre un césped bacteriano sensible a la actividad de la microcina y resistente a ampicilina (*E. coli* BL21 11 α 2). Sólo un porcentaje de las colonias aisladas de estos cultivos presentaron actividad. Se analizó en forma cuantitativa la estabilidad de los clones positivos aislados de la genoteca en subcultivos sucesivos. En la Tabla

VI se muestra el resultado de este análisis para tres trasposos del clon E1, resultando ser notoriamente inestables. Para caracterizar este DNA, se extrajo el DNA plasmidial a partir de una colonia productora de microcina del clon E1. La Figura 22A (carril 2) muestra el DNA obtenido de este clon, el que presenta una migración sobre un tamaño de 25 Kb, ya que la primera banda del estandar de DNA de λ digerido con *HindIII* tiene un tamaño de 23,1 Kb. Digestiones de este DNA con las enzimas *Sall* y *HindIII* se muestran en la Figura 22B. La digestión con *HindIII* muestra al menos 3 bandas (carril 4) y con *Sall* 5 bandas (carril 3). En esta figura se observan digestiones parciales cuyas bandas presentan menor intensidad. También se preparó DNA a partir de una colonia del clon E1 que perdió la capacidad de producir microcina. El patrón de digestión del DNA del clon E1 productor de microcina con *HindIII* (Figura 22B, carril 4) no fue idéntico a la digestión con *HindIII* del DNA proveniente de cultivos no productores de microcina (Figura 22C, carril 2), obviando las bandas producto de una digestión parcial. Los resultados no permiten descartar la posibilidad que la pérdida de la producción de la microcina se deba a deleciones o rearrreglos mayores del DNA.

La cepa utilizada para la preparación de esta genoteca fue *E. coli* VCS257. Para descartar que la inestabilidad de los clones positivos se deba a un problema cepa específico de la bacteria receptora de estos cosmidios, se transformó con DNA extraído de un clon positivo las cepas de *E. coli* XL1Blue y DH5 α . El resultado de la transformación en XL1Blue con este DNA dio una baja

TABLA VI.

Estabilidad de la expresión de la microcina E492 en el clon E1.

Traspaso	Colonias totales	Colonias Mcc ⁺	% Colonias Mcc ⁺
1	417	185	44
2	356	152	43
3	223	156	70

Se tomó una colonia productora de microcina del clon E1 crecida en una placa de agar LB con ampicilina, se sembró en caldo LB en presencia de ampicilina y se incubó por toda la noche a 37°C. Diluciones de este cultivo se sembraron en placas de agar LB + Amp con separación de colonias, las que se replicaron sobre un césped de *E. coli* BL21 11 α 2, en agar LB + Amp. De esta segunda placa se tomaron 2 colonias productoras de microcina repitiéndose dos veces el traspaso. Se cuantificaron las colonias productoras (Mcc⁺) de cada uno de los traspasos, las que se expresan en %.

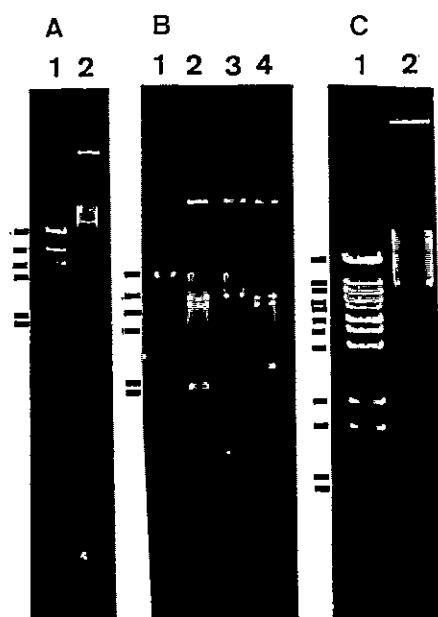


Figura 22. Análisis del DNA plasmidial del clon E1. Fotografías de tres geles de agarosa al 1%. **A:** Carril 1: DNA de λ digerido con *Hind*III (23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0 Kb); carril 2, DNA plasmidial extraído del clon E1(Mcc⁺). **B.** Carril 1, DNA de λ digerido con *Hind*III; carril 2, doble digestión de pE1(Mcc⁺) con *Hind*III y *Sal*I; carril 3, pE1(Mcc⁺)/*Sal*I; carril 4; pE1(Mcc⁺)/*Hind*III. **C.** Carril 1, DNA de λ digerido con *Bst*EII (14,1; 8,5; 7,2; 6,4; 5,7; 4,8; 4,3; 3,7; 2,3; 1,9; 1,4; 1,3 Kb); carril 2, pE1(Mcc⁺)/*Hind*III.

eficiencia, obteniéndose sólo 18 colonias transformantes mediante selección con ampicilina. De estas 18 colonias, sólo 1 dio actividad de microcina en la réplica sobre césped. Cuando se empleó la cepa DH5 α , se obtuvo alrededor de 450 transformantes, de las cuales sólo 3 expresaron la microcina. Estos resultados descartaron que la inestabilidad del clon E1 se deba a un problema cepa específico de la bacteria receptora del cosmidio recombinante. Por otro lado, se demostró que la actividad de la microcina es transferida a través del DNA plasmidial aislado del clon E1. El bajo rendimiento en la transformación podría explicarse por el gran tamaño del cosmidio recombinante y porque el DNA aislado de un clon positivo resulta en la segregación de este carácter y, por lo tanto, hay una mezcla de DNAs. Como se describió más arriba, los cambios en el DNA (posibles rearrreglos, deleciones o inserciones) no fueron evidentes al digerir este DNA con *HindIII* (Figura 22C), pero no pueden ser descartados. Por otro lado, al utilizar el DNA del clon E1 no productor para transformar la cepa VCS257, siempre se obtuvo un 100% de clones no productores, indicando que la forma no productora del DNA es permanente. Sin embargo, estos clones no productores conservan la inmunidad para la actividad de la microcina.

Análisis del DNA del clon E1. Se realizó una digestión semipreparativa del plasmidio del clon E1 con *HindIII* y luego se religó, con el objetivo que se produjeran reordenamientos del DNA, con menos fragmentos. Con este DNA religado se transformaron las cepas XL1Blue y DH5. Con la primera se obtuvo

33 transformantes y con la segunda, 224, de las cuales ninguna fue positiva para la actividad de microcina. Es probable que *HindIII* corte el DNA pE1 en algún gen esencial para la expresión de la microcina generándose un fragmento muy pequeño, el que se pierde en la ligación. Se debe considerar además que el DNA que se preparó proviene de una población que permanentemente está segregando en productora y no productora de microcina, lo que disminuye la probabilidad de encontrar un transformante positivo.

Caracterización de otros clones positivos. La inestabilidad de los clones productores de microcina representa un problema para realizar subclonamientos, por lo cual se siguió buscando en la genoteca de DNA de *Klebsiella pneumoniae* RYC492 clones productores de microcina que presentaran estabilidad frente a este carácter. Se encontraron 4 nuevos clones con actividad de microcina (J, VS21b, VS21a y VS1-3). Se determinó la estabilidad de este carácter (Tabla VII), encontrándose que uno de ellos era 100% estable en la producción de microcina (clon J). Para verificar que este clon era estable independientemente de la cepa bacteriana, se aisló el plasmidio y se transformó *E. coli* DH5 α . Las transformantes productoras de microcina fueron analizadas en subcultivos sucesivos (Tabla VIII). El clon J mostró nuevamente que es 100% estable en la producción de microcina, independiente de la cepa, en tanto, los otros clones mantuvieron la característica de inestabilidad.

TABLA VII.

Estabilidad de la expresión de la microcina E492 en otros clones.

CLON	% Mcc+ Subcultivo	
	1	2
J	100	100
VS21b	80	98
VS21a	40	23
VS1-3	95	100
E1		82

El procedimiento experimental de los subcultivos se explican en la leyenda de la Tabla V.

TABLA VIII.

Estabilidad de la expresión de la microcina E492 en distintas cepas bacterianas.

TRASPASO	CEPA	COLONIAS TOTALES	COLONIAS Mcc+	% Mcc+
1	VCS257/pJ	133	133	100
1	VCS257/VS1-3	101	93	92
1	DH5 α /pJ	152	152	100
1	DH5 α /VS1-3	125	119	95
2	VCS257/pJ	24	24	100
2	VCS257/VS1-3	41	33	80
2	DH5 α /pJ	143	143	100
2	DH5 α /VS1-3	106	58	54

El procedimiento experimental de los subcultivos se explican en la leyenda de la Tabla V.

Comparación de los DNAs de los clones E1 y J. En la Figura 23 se muestra una comparación de las digestiones del DNA con la enzima *HindIII* del clon E1 y el clon J. El DNA de pJ presenta al menos 5 bandas de 19,5; 17,4; 10,0; 4,6 y 1,7 Kb, lo que da un tamaño total de 53,2 Kb. El DNA del clon E1, en cambio, presenta 5 bandas con un tamaño estimado en 24,2; 10,1; 8,9; 7,5 y 2,7 Kb con un tamaño total de 53,4 Kb. De esta comparación no es posible establecer la existencia de fragmentos comunes entre los DNA de ambos clones.

Purificación y caracterización de la microcina del clon J. Se purificó microcina desde el sobrenadante del cultivo del clon J siguiendo el protocolo descrito para la microcina de *K. pneumoniae*. La actividad de este eluido fue menor (DMI = 1/32) que el obtenido con la microcina de *K. pneumoniae* (DMI = 1/128-256), posiblemente debido a las dificultades que presenta la cepa transformante de *E. coli* de crecer en medio mínimo suplementado con glucosa.

Se analizó en geles esta preparación de microcina proveniente del sobrenadante del clon J, donde apenas es posible observar la banda de microcina. Tal como se comentó para el clon E1, es posible que los sobrenadantes de *E. coli* contengan otras proteínas que se unen a Sep Pak C₁₈, ya que los geles muestran una mancha difusa con una migración correspondiente a un tamaño menor a 6.000.

La actividad de esta microcina se caracterizó frente al efecto de temperatura, resultando resistente a un calentamiento al baño maría por 10 min.

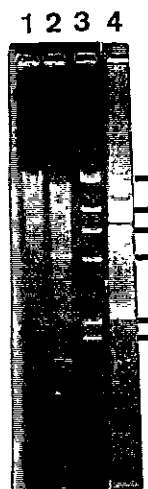


Figura 23. Digestiones del DNA plasmidial pJ y pE1. La fotografía muestra un gel de agarosa al 1%, luego de teñir el DNA con bromuro de etidio. **Carril 1:** pJ; **carril 2:** pJ/*Hind*III; **carril 3:** estandar de PM, DNA de λ digerido *Hind*III (23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0 Kb); **carril 4:** pE1/*Hind*III.

De esta misma forma fue concentrada la muestra para el análisis electrofisiológico, por lo tanto su actividad tanto *in vivo* como *in vitro* no se vio afectada. Al igual que la microcina de *K. pneumoniae*, la microcina purificada del clon J no presentó actividad en cepas mutantes en el receptor TonB.

La microcina obtenida del clon J se ensayó para la formación de canales iónicos en bicapas lipídicas. El canal mostró las mismas características del canal de la microcina de *K. pneumoniae*, esto es, la presencia de más de un estado, canal catiónico y asimétrico. El análisis de la curva *IV* de este canal (Figura 24) permitió determinar una conductancia de 160 pS para el potencial 60 mV y de 97 pS para -60 mV.

Análisis del DNA del clon J. La preparación de DNA plasmidial del clon J presentó dificultades, ya que este DNA es de alto peso molecular y se degrada con mucha facilidad. El rendimiento en las extracciones del DNA plasmidial mediante el protocolo que usa la lisis alcalina en presencia de SDS fue bajo, haciendo difícil el análisis. Para obtener buenas preparaciones de DNA, se usó el sistema comercial de Qiagen. Este sistema se basa en la ruptura de las bacterias por lisis alcalina, centrifugación para eliminar los restos celulares y el DNA cromosomal, y posterior purificación del DNA en una columna. Para aumentar el rendimiento se usó el medio PB que, por ser muy rico en nutrientes, aumenta la masa celular. A pesar de las múltiples precauciones tomadas, en algunas preparaciones se obtuvo un DNA semidegradado.

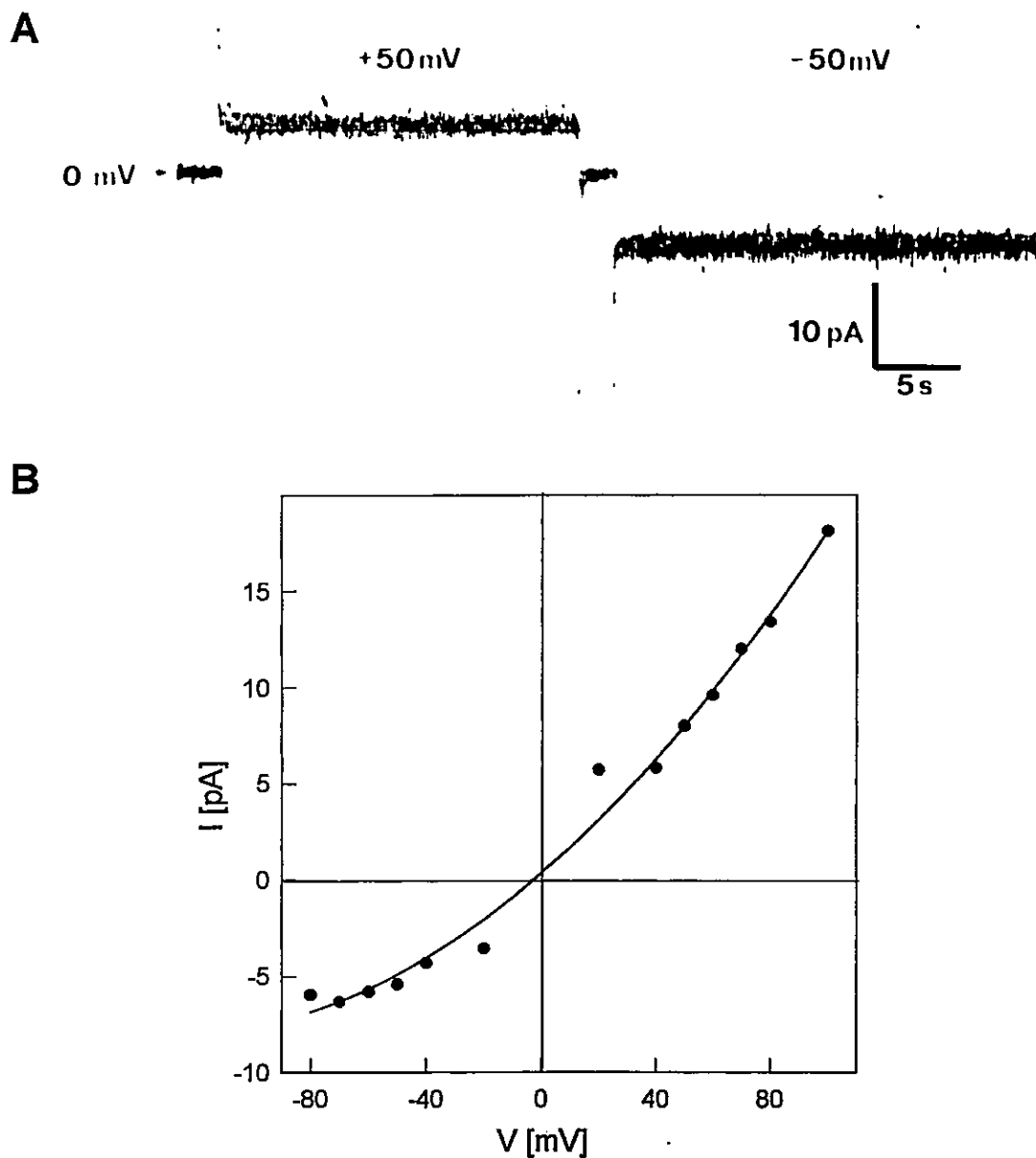


Figura 24. Registro (A) y relación corriente-voltaje (B) de la microcina E492 obtenida del clon J. La membrana fue de POPE:PC (4:1) en presencia de KCl 100 mM, MES 10 mM pH 6,7.

Con buenas preparaciones de DNA plasmidial del clon J se realizaron digestiones con distintas enzimas de restricción. En la Figura 25A se muestra un gel de agarosa al 1% en donde se analizaron los fragmentos de DNA obtenidos después de digerir con las enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Con *HindIII* (Figura 25A, carril 3) es posible observar que se generan 5 fragmentos. La suma de estos fragmentos daría un tamaño total de alrededor de 53,2 Kb (Tabla IX), y como el cosmidio pH79 tiene un tamaño molecular de 6,3 Kb, el inserto sería de alrededor de 46,9 Kb. El corte con *EcoRI* (Figura 25A, carril 2) generó 5 fragmentos y se estima que la primera banda es un duplete por la mayor intensidad relativa. El tamaño total estimado sería de 51,1 Kb (resumen en Tabla IX). Esta diferencia en tamaños puede explicarse por la presencia de cortes parciales o que a esa concentración de agarosa se pierden fragmentos pequeños. Con estas enzimas se realizó una digestión preparativa en forma independiente y se realizó una ligación de esta mezcla para obtener rearrreglos al azar. Se obtuvo un total de 1086 colonias transformantes (1059 con *HindIII* y 27 con *EcoRI*). Todas estas transformantes fueron negativas para la producción de microcina.

Siguiendo con el análisis de digestión del pJ, se usaron las enzimas *BamHI* y *SaII*. Como se observa en la Figura 25B, la enzima *BamHI* generó alrededor de 12 fragmentos, con un tamaño total aproximado de 42,1 Kb. A su vez, la digestión con *SaII* genera 6 fragmentos con un tamaño total aproximado de 54,9 Kb. Se realizó una digestión preparativa del pJ con la enzima *SaII* y la

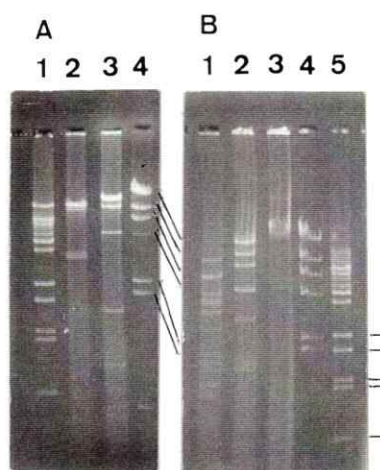


Figura 25. Digestiones del DNA plasmidial del clon J. Se muestra un gel de agarosa al 1% en donde se analizaron las siguientes muestras: **A. Carriles 1 y 4:** estandar de PM, DNA de λ digerido con *BstEII* (tamaños que se señalan a la derecha: 2,3; 1,9; 1,4; 1,3 Kb) y *HindIII* (23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0 Kb), respectivamente; **carriles 2 y 3:** pJ digerido con *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente. **B. Carril 1:** pJ digerido con *BamHI*; **carril 2:** pJ digerido con *SalI*; **carril 3:** DNA del clon J; **carriles 4 y 5:** estandar de PM, DNA de λ digerido con *HindIII* y *BstEII*, respectivamente.

TABLA IX.

Tamaños de los fragmentos de DNA obtenidos por digestión con distintas enzimas de restricción.

pE1(Mcc ⁺)			pE1					pJ					pJl				
Sall	HindIII		HindIII	EcoRI	BamHI	Sall	BstIV	SmaI	HindIII	BstIV	EcoRI	Sall	BstIV	HindIII	Sall	BstIV	HindIII
	Sall	HindIII															
18,6	24,2	21,4	19,8	19,5	16,5 ^d	10,1	21,5	21,1	18,4	17,7	15,5	15,2	13,6	9,4	7,6		
8,9	10,1	8,9	11,9	17,4	10,7	6,2	16,4	18,4	12,9			0,8	1,7	6,5	5,8		
7,7	8,9	7,7	8,5	10,0	3,4	4,4	7,8	6,9	5,1								
4,8	7,5	2,7	3,8	4,6	3,1	4,6	4,7	6,0	4,4								
2,7	2,7	2,4		1,7	0,9	3,5	2,9	4,0	3,8								
		1,7				3,1	1,6	1,7	3,5								
						2,5			2,2								
						1,9			1,4								
						1,7											
						1,6											
						1,3											
						1,2											
41,8	53,4	60,1	44,0	53,2	51,1	42,1	54,9	58,1	51,7	17,7	15,5	16,0	15,3	15,4	15,1		

d: duplete.

mezcla de los fragmentos se ligaron al vector KS-Bluescript digerido a su vez con la misma enzima y tratado con fosfatasa alcalina. Se transformó la cepa *E. coli* DH5 α y se obtuvieron 877 transformantes, ninguna de ellas positivas para la producción de microcina.

Para determinar cuál fragmento del DNA del clon J digerido con distintas enzimas contiene el DNA del vector, se marcó DNA de pHc79 mediante el método de "random primer" (Feinberg y Vogelstein, 1983 y 1984) y se usó para hibridarlo con DNA del clon J digerido con las enzimas *Bst*IV, *Sal*I, *Hind*III y *Sma*I. La fotografía del gel de agarosa y la autorradiografía se muestran en la Figura 26. En las 4 digestiones (carriles 2 a 5) es posible observar una banda que hibrida con el vector, que correspondería a DNA refractario a la digestión, pues en todos los casos presenta la misma migración. El vector está presente en la segunda banda de los fragmentos generados por las enzimas de digestión *Bst*IV y *Sma*I (carriles 2 y 5, respectivamente), en la tercera banda con la enzima *Hind*III (carril 4) y en la primera y quinta banda de los fragmentos de digestión con la enzima *Sal*I (carril 3). Este último se explica por la presencia de 1 corte *Sal*I dentro del vector, generando 2 fragmentos que hibridan con la sonda usada.

Expresión de la microcina del clon J en medio de cultivo. La expresión de la microcina en la cepa productora *K. pneumoniae* RYC492 ha sido estudiada por de Lorenzo y cols. (1984), de Lorenzo (1985) y Orellana y Lagos

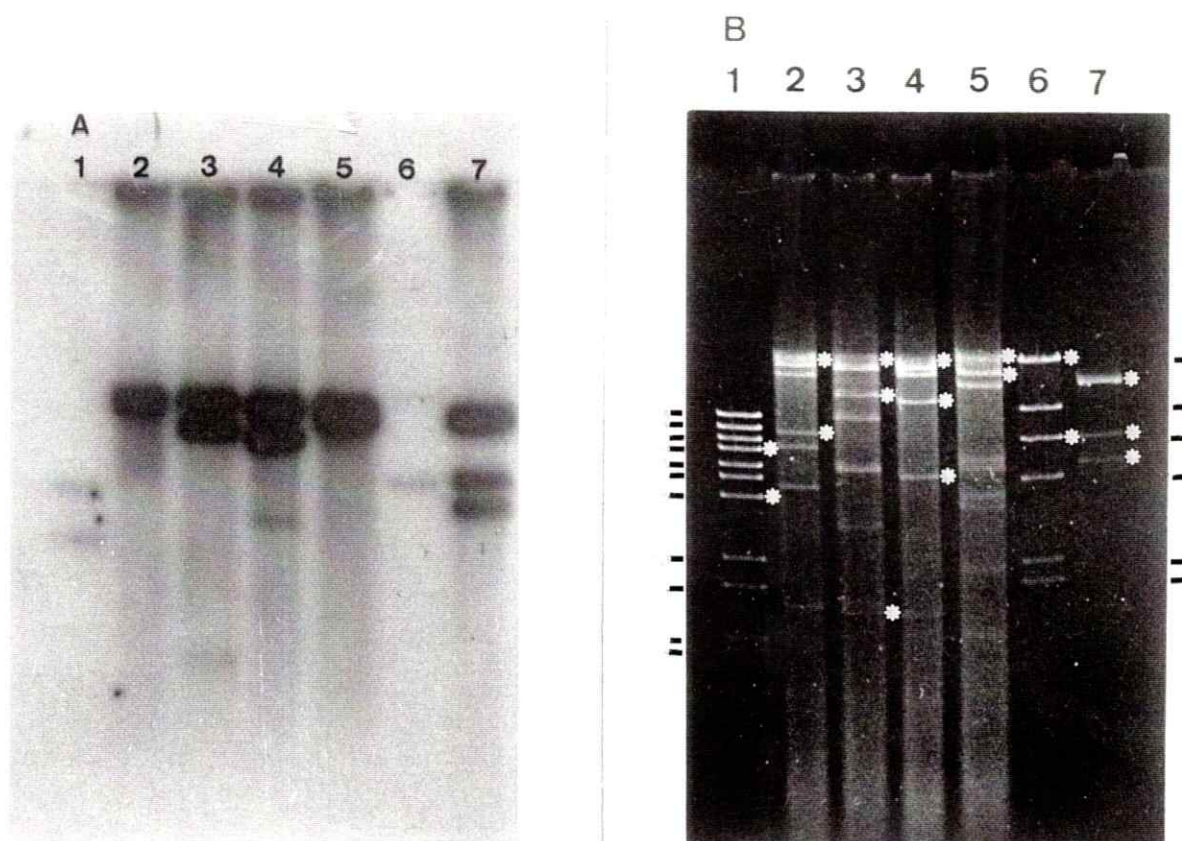


Figura 26. Southern blot del DNA del clon J digerido con distintas enzimas e hibridado con el cosmidio pHC79. En A se muestra la autorradiografía de las digestiones que se muestran en B. El carril 1 y 6 corresponden al estándar de PM, DNA de λ digerido con *Bst*EII (14,1; 8,5; 7,2; 6,4; 5,7; 4,8; 4,3; 3,7; 2,3; 1,9; 1,4; 1,3 Kb) y *Hind*III (23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0 Kb), respectivamente; carril 2 al 5, DNA del clon J digerido con *Bst*IV, *Sal*I, *Hind*III y *Sma*I, respectivamente; en el carril 7, DNA del cosmidio pHC79.

(1996), quienes determinaron que se expresa en la fase exponencial para luego decaer en la fase estacionaria. Se estudió el patrón de expresión durante el crecimiento de la microcina producida por el clon J para establecer si se comporta como la producida por *K. pneumoniae*. Se creció el clon en medio LB y PB y se determinó la actividad de la microcina en los sobrenadantes de los cultivos, luego de eliminar las bacterias (ver Métodos). En la Figura 27 se observa que la microcina se expresa fuertemente en la fase exponencial y disminuye en la fase estacionaria. La actividad fue expresada como el diámetro del halo de inhibición y corregida por la masa celular expresada en unidades Klett (Orellana y Lagos, 1996). El crecimiento del clon J en medio mínimo suplementado con glucosa ha sido dificultoso, lográndose un crecimiento muy pobre. Si se analiza mediante tinción de Gram una alícuota de estos cultivos se encuentran sólo restos celulares. Es posible que en medio mínimo el clon J produzca altas cantidades de microcina que afecta la cepa productora.

Subclonamiento del DNA plasmidial del clon J. El tamaño del plasmidio del clon J es de alrededor de 50 Kb, lo cual representa un problema para hacer un análisis genético por técnicas de DNA recombinante. Como un intento de reducir este tamaño, se subclonó el fragmento de restricción *Bst*IV de 16 Kb, que contiene al cosmidio (J. Chnaiderman y R. Lagos, resultados no publicados). Este clon fue llamado clon J1 y no presentó actividad de microcina, pero sí presentó inmunidad frente a la microcina. A continuación se describen el

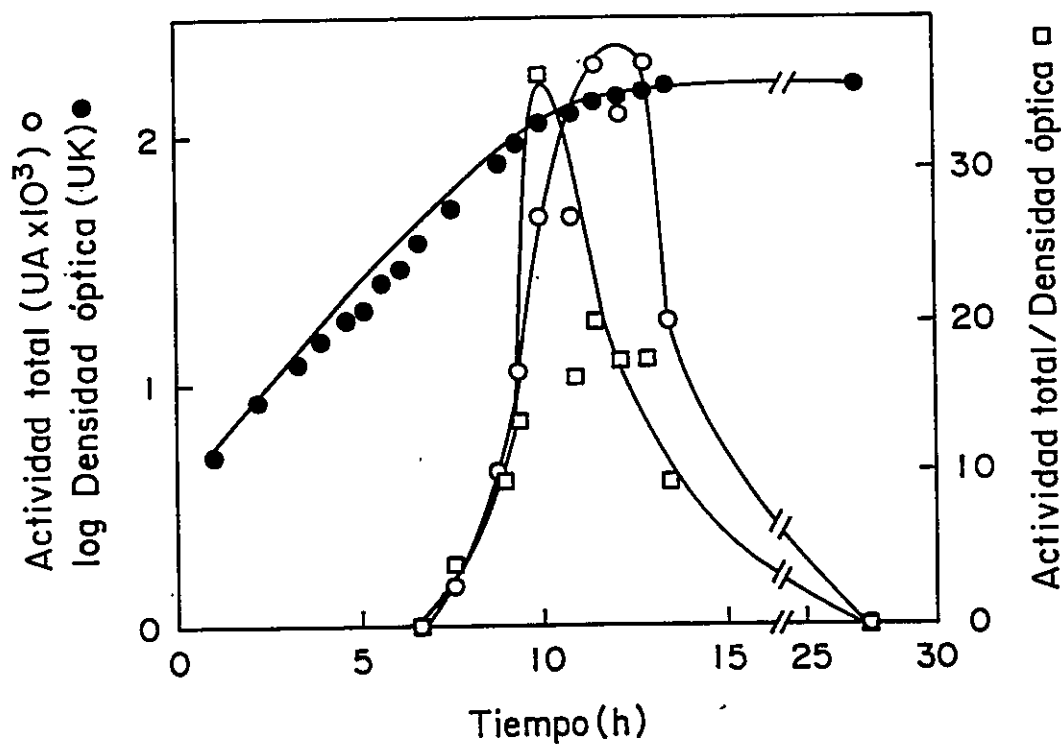


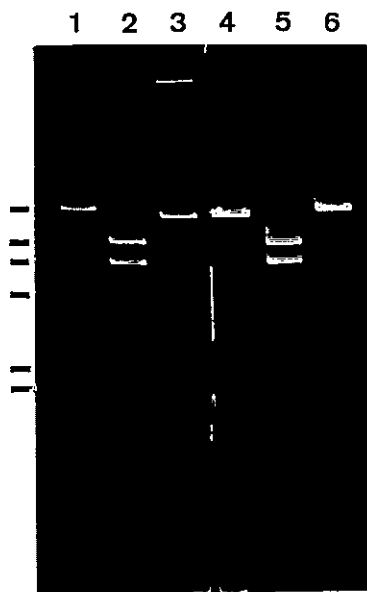
Figura 27. Expresión de la microcina por el clon J en la curva de crecimiento. La curva de crecimiento se inició mediante la dilución 1:10 de un cultivo de toda la noche del clon J en medio LB en presencia de ampicilina. El crecimiento se siguió por determinación de la densidad óptica. A distintos tiempos se tomaron muestras de 0,5 mL y se determinó la actividad de microcina como se detalla en métodos.

mapa de restricción y la caracterización de la expresión de la inmunidad frente a la microcina.

Análisis del mapa de restricción del clon JI. Se realizaron digestiones dobles con las enzimas *HindIII* y *Sall*, la que se muestra en la Figura 28A, carril 5. Se observan fragmentos que tienen un tamaño estimado en 7,6; 5,8 y 1,7 Kb que sumados, dan un tamaño de 15,1 Kb. En el carril 4 se muestran los dos fragmentos generados por *Sall*, de 13,6 y 1,7 Kb. Las enzimas *HindIII* y *BstI* linearizan el plasmidio (carriles 3 y 6). La digestión doble con *HindIII* y *BstI* dio 2 fragmentos de 9,4 y 6,5 Kb, mientras que la digestión con *EcoRI* genera 2 fragmentos de 15,2 y 0,8 Kb. *Aval* generó 5 bandas, siendo la de mayor tamaño de 8,9 Kb. Con estos resultados fue posible hacer un mapa de restricción que se muestra en la Figura 28B.

Caracterización de la expresión de la inmunidad del clon JI. El clon JI posee el fragmento *BstI* de 16 Kb obtenido del plasmidio del clon J. Este fragmento contiene el vector de 6,3 Kb y un inserto de 9,7 Kb. Este clon no presentó actividad de microcina, pero fue inmune a la actividad, determinada mediante la preparación de un césped de la bacteria en el cual se depositó una alícuota de microcina. La expresión de la inmunidad del clon JI depende de la fase de crecimiento de la bacteria, pues cuando se prepara el césped con bacterias en fase estacionaria, se observa un halo difuso de inhibición del

A



B

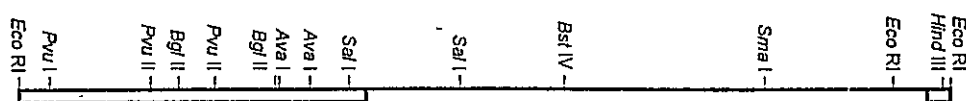


Figura 28. Análisis de digestiones dobles del DNA del clon JI. A. La foto muestra un gel de agarosa al 1% en que se analizaron las siguientes digestiones: **carril 2:** digestión doble con *Bst*IV y *Hind*III; **carril 3:** pJI/*Bst*IV; **carril 4:** pJI/*Sal*I; **carril 5:** digestión doble con *Hind*III y *Sal*I; **carril 6:** pJI/*Hind*III. En el **carril 1**, DNA de λ digerido con *Hind*III (23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0 Kb). B. Mapa de restricción parcial del DNA del clon JI. La barra corresponde al DNA del vector, pHC79; la línea corresponde al inserto del clon JI.

crecimiento. Se determinó que esta disminución de la inmunidad no se debe a algún producto de la actividad metabólica de la bacteria. Para ello se mezclaron células en fase exponencial con sobrenadantes de un cultivo en fase estacionaria. El césped preparado con esta mezcla presentó inmunidad. Bacterias en fase estacionaria a las que se les agregó sobrenadante de un cultivo en fase exponencial no recuperaron la inmunidad. Como la pérdida de la inmunidad podría deberse a la densidad celular en fase estacionaria, se creció el clon JI en condiciones de privación de nutrientes, con LB diluido a 1/5 de su concentración. El patrón de inmunidad observado con el medio LB completo no varió. En fase estacionaria las bacterias perdieron la inmunidad, en cambio en la fase exponencial el césped presentó inmunidad frente a la microcina. Este resultado indica que la expresión de la inmunidad del clon JI no se debe a un efecto de la alta densidad celular. Las bacterias en fase estacionaria expresan un factor σ específico llamado RpoS (Mulvey y cols., 1990), el que determina la expresión de algunos genes en forma específica. La expresión de este factor σ es inducida por benzoato de sodio. Bacterias en fase exponencial expuestas a benzoato de sodio presentan un estado metabólico característico de bacterias en fase estacionaria. Se realizó una curva de crecimiento del clon JI en presencia y ausencia del benzoato de sodio y se determinó la expresión de la inmunidad en la fase exponencial y estacionaria de ambos cultivos. Las bacterias en fase exponencial presentaron la inmunidad a pesar de la presencia del inductor de la expresión del factor σ . Para corroborar que la pérdida de la

inmunidad es independiente del factor σ^{70} , se transformó con pJI una cepa mutante que no expresa el factor σ (ZK1000) y, como control, con el cosmidio pHC79. Se analizó la expresión de la inmunidad de estas transformantes en fase exponencial y estacionaria. En fase exponencial se expresó la inmunidad, pero en fase estacionaria estas células fueron sensibles a la microcina. La transformante control fue sensible en ambas fases de crecimiento. El resumen de estos resultados se muestran en la Tabla X.

TABLA X.

Estudio de la expresión de la inmunidad del clon JI.

CONDICIÓN	INMUNIDAD *
Fase exponencial	+
Fase estacionaria	-
Fase exponencial + sobrenadante fase estacionaria	+
Fase estacionaria + sobrenadante fase exponencial	-
Fase exponencial en privación de nutrientes	+
Fase estacionaria en privación de nutrientes (bajo número de células)	-
Fase exponencial + ácido benzoico	+
Fase estacionaria + ácido benzoico	-
Fase exponencial cepa <i>rpoS</i>	+
Fase estacionaria cepa <i>rpoS</i>	-

* Si en la preparación del césped se usan células en fase estacionaria en muy pequeña cantidad (que requieren de un gran número de divisiones para alcanzar la densidad final) las células recuperan la inmunidad.

DISCUSION

Los resultados de esta tesis indican que el mecanismo de acción de la microcina E492 de *Klebsiella pneumoniae* es a través de la formación de canales iónicos en la membrana citoplasmática de la bacteria sensible. De Lorenzo y Pugsley (1985), mediante experimentos que se realizaron *in vivo* determinando la salida de metabolitos y del ión lipofílico TPP^+ de las bacterias tratadas, demostraron que el sitio de acción de la microcina E492 es la membrana citoplasmática. Estos autores mostraron que bacterias cargadas con el ión lipofílico TPP^+ no retenían este ión en presencia de la microcina. Este compuesto es acumulado en forma pasiva, dependiente del gradiente del potencial electroquímico a través de la membrana. Este resultado sugiere que la microcina altera el potencial de la membrana y, como las bacterias no desarrollaron una permeabilidad inespecífica a solutos, se descarta un efecto solubilizante de la microcina de los fosfolípidos de la membrana plasmática. Estos experimentos, sin embargo, no demostraron que el mecanismo de acción de la microcina sea a través de la formación de canales iónicos.

La formación *in vitro* de canales dependientes de voltaje está descrito para varias colicinas, tales como las colicinas A, B, E1, Ia, Ib y K (Pattus y cols., 1983; Pressler y cols., 1986; Tokuda y Konisky, 1978 y 1979; Schein y cols.,

1978). Estudios con la colicina K mostraron que una molécula de esta bacteriocina es capaz de depletar las células de *E. coli* del 90% del potasio intracelular en aproximadamente 10 min (Wendt, 1970). Estos experimentos fueron realizados *in vivo* resuspendiendo las células en NaCl 20 mM y considerando una concentración de K^+ intracelular de 200 mM. Schein y cols. (1978) confirmaron estos resultados en membranas artificiales. El canal formado por la colicina K presenta una pobre selectividad iónica, permitiendo el paso de sodio, cloruro y potasio. Además, su conductancia de 1,3 - 3 pS (Schein y cols., 1978) en condiciones de 0,1 M de KCl permitirían el flujo de salida del potasio descrita por Wendt (1970). Por otro lado, demostraron que existe una dependencia lineal entre la conductancia del canal y la concentración de la colicina.

En este trabajo se determinó que la microcina induce la formación de canales iónicos en bicapas lipídicas (Lagos y cols., 1993). Se descartó la posibilidad de que esta actividad sea producida por algún contaminante que co-purifique con la microcina, ya que muestras obtenidas mediante HPLC mostraron la actividad tanto *in vivo* sobre un césped bacteriano como *in vitro* en las bicapas lipídicas. El canal de la microcina mostró en forma recurrente y característica más de un estado de conductancia. Las características del canal de microcina son similares a las observadas en el de colicina K (Schein y cols., 1978). Este también presenta distintos estados de conductancia. El canal de la colicina E1 también muestra múltiples subestados (Cramer y cols., 1995). Dado

que la curva I/V para el canal formado por la microcina E492 no es lineal, presenta diferentes valores de conductancia a potenciales positivos y negativos: 110 pS a -60 mV y de 160 pS a +60 mV. Estos valores de conductancia son mucho mayores que los descritos para las colicinas, aunque las condiciones en que se determinaron fueron diferentes. El canal de la colicina K presenta una conductancia de 1,3 - 3 pS (Schein y cols., 1978) en condiciones de KCl 0,1 M. Para el canal de colicina E1 se determinó una conductancia de 20 pS en NaCl 1 M (Bishop y cols., 1986), 13,7 pS para el canal colicina B (Pressler y cols., 1986) y 16 pS para colicina A (Lazdunski y cols., 1988), estas últimas en KCl 1 M.

La dependencia de la conductancia del potencial (rectificación) en el canal de microcina indica que éste es asimétrico. Esto sugiere que la estructura del poro formado por la microcina en la bicapa lipídica es asimétrica, presentando diferentes conformaciones de la molécula hacia uno y otro lado de la membrana. Esta característica asimétrica se visualiza más drásticamente en el canal formado por colicina K (Schein y cols., 1978). Este canal presenta una conductancia constante que oscila entre los valores 1,3 a 3 pS cuando el potencial aplicado es menor de -40 mV, pero a potenciales mayores la conductancia disminuye para llegar a un valor de 0.

La asimetría estructural de una proteína inserta en una membrana se puede determinar mediante tratamiento con proteasas. Este efecto sobre la actividad de un canal fue descrito para la colicina E1 (Slatin y cols., 1986; Cramer y cols., 1995), canal que posee la característica de mantenerse cerrado

a potenciales negativos aplicados en el lado *cis*, en el mismo lado que se aplica la colicina. Se demostró que el canal es afectado por pepsina en el lado *cis* en donde se aplicó la colicina y sólo se observa el efecto cuando el canal está cerrado. Si la proteasa es agregada en el lado *trans*, la actividad del canal no es afectada por la proteasa en el estado abierto o cerrado. Estos resultados indican que el canal de la colicina E1, además de ser asimétrico, sufre cambios conformacionales al pasar de un estado abierto a uno cerrado. Mediante el estudio de proteólisis de la colicina E1 con carboxiquinasa (Slatin y cols., 1986) se determinó que el extremo carboxilo terminal de la proteína inserta en la membrana se encuentra en el lado *cis* y es sensible a esta proteasa en ambos estados, abierto o cerrado.

La asimetría del canal formado por la microcina E492 fue corroborada mediante los experimentos con la proteasa quimiotripsina. La actividad de la microcina es sensible a la acción de la quimiotripsina, lo que se visualizó en los geles de poliacrilamida por la desaparición de la banda de 6.000 y la pérdida de actividad determinada sobre un césped bacteriano (Lagos y cols., 1993). El efecto de la quimiotripsina sobre la actividad de canal iónico sólo fue observada cuando la proteasa fue agregada al lado *trans* de la membrana, lo que sugiere que todas las moléculas se insertan con la misma orientación. Esta orientación estaría siendo inducida por la diferencia de potencial de la membrana. La quimiotripsina es una proteasa que hidroliza las proteínas en un aminoácido aromático (Metzler, 1977), por lo tanto a un lado de la bicapa lipídica se estaría

exponiendo un aminoácido de este tipo.

Una de las características generales que presentan las colicinas es su pobre selectividad frente a cationes o aniones. Esto es congruente con la acción bactericida que presentan estas bacteriocinas sobre bacterias sensibles, ya que los canales que forman permiten el paso de iones de manera no selectiva, presentando en general una preferencia por aniones o cationes.

Para la colicina K se determinó una razón de permeabilidad del Na^+ sobre el Cl^- de 4:1 (Schein y cols., 1978), mostrando así su naturaleza catiónica. El canal de la microcina E492 es también de naturaleza catiónica, siendo 13,2 veces más permeable al K^+ que al Cl^- . En condiciones biológicas se determinó que el canal presenta un orden de selectividad, determinado por el valor del potencial de reversión ($\text{Tris}^+ < \text{Li}^+ = \text{Na}^+ < \text{K}^+ = \text{Rb}^+ = \text{Cs}^+ < \text{NH}_4^+$). Si el radio iónico fuese determinante en la selectividad del canal (ver Tabla V), el orden sería $\text{Li}^+ < \text{Tris}^+ < \text{Cs}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+$. Nuestros resultados indican que en este caso la selectividad no depende del radio iónico solamente. Estarían involucradas otras características del canal, como la carga interna del poro, la cual podría estar determinando la entrada de los iones.

En el caso descrito para la colicina B y colicina A (Pressler y cols., 1986), de los iones analizados (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ y $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$), la menor conductancia fue para Li^+ lo que se explicaría por el tamaño del radio de hidratación de este ion. El orden de selectividad no pareciera estar relacionado con el tamaño del ión, ya que ambas colicinas presentan una mayor

conductancia con el ión NH_4^+ , que presenta un radio iónico intermedio entre Rb^+ y Cs^+ . En el caso del NH_4^+ , la mayor conductancia se explicaría por la exposición de grupos químicos polarizables en el interior del poro, posiblemente carbonilos (Pressler y cols., 1986).

El requerimiento de un pH ácido para la inserción de las colicinas en las membranas *in vitro* parece ser una característica general para las bacteriocinas (Parker y cols., 1990; Cramer y cols., 1995). Esta dependencia la presenta la colicina E1 y el fragmento activo de ella (Bullock y cols., 1983; Bishop y cols., 1986). En estudios realizados tanto con vesículas de membranas bacterianas como bicapas lipídicas, esta colicina presenta una actividad alta a pH 4 y baja actividad a pH 6. Por otra parte, estudios de las propiedades hidrodinámicas de la colicina A determinaron que bajo pH 5 ocurre una oligomerización de la proteína desde un monómero a un tetrámero (Cavard y cols., 1988), indicando que el pH no sólo altera la actividad *in vitro*, sino que también la estructura de la proteína sufre cambios conformacionales drásticos. Mediante estudios de fluorescencia en que se determinó la transferencia de energía de resonancia de la unión de la colicina E1 a membranas, se determinó que la unión depende de la fuerza iónica, de la carga neta positiva de la proteína y de la carga negativa de la superficie de la membrana (Cramer y cols., 1995). El aumento del pH y de la fuerza iónica no revierte la unión, lo que implica que en el ligamen participan además interacciones hidrofóbicas que siguen al proceso electrostático.

La actividad de la microcina fue más estable en un solvente acuoso

cuando el pH fue alrededor de 4,6. Este resultado sugiere que en solventes acuosos, la microcina requiere de un ambiente relativamente ácido para mantener una estructura estable para su actividad. Para ejercer su efecto en la bacteria sensible, la microcina debe primero unirse a un receptor en la membrana externa, unión que podría ser de naturaleza electrostática. De ser así, el pH de la solución en que se encuentre la microcina jugará un rol importante en su acción bactericida.

La alta conductancia y la selectividad de los canales determinan que la bacteria pierda rápidamente los iones intracelulares despolarizándose la membrana. Esto último conlleva la inhibición del transporte activo celular y de todos los procesos energéticos a nivel de la membrana citoplasmática. Si bien es cierto no se han realizado experimentos con la microcina E492 como los realizados con la colicina K en vesículas de membrana (Schein y cols., 1978), sí se han realizado experimentos de cinética de inactivación (de Lorenzo, 1984). A bacterias sensibles en la fase exponencial de crecimiento se les agregó microcina E492, cayendo bruscamente y en forma exponencial la viabilidad celular para luego alcanzar un plateau. Esta cinética exponencial de la muerte celular debida a la microcina indica que corresponde a una cinética en un golpe único (single hit). El nivel del plateau alcanzado depende de la dosis de la microcina agregada, por lo que las células que sobrevivieron eran aquellas que no incorporaron moléculas de microcina. En experimentos con colicina K, Schein y cols. (1978) demostraron que a bajas concentraciones de colicina, una

molécula depleta a la célula del 90% de su K^+ intracelular en 10 min. El flujo de K^+ a través del canal formado por la colicina K es de 10^{-18} mol/seg e *in vivo* el flujo es de 5×10^{-19} mol/seg x molécula de colicina K (Latorre y Alvarez, 1981; Schein y cols., 1978; Wendt, 1970). Por otra parte, la conductancia del canal formado por la colicina K es de 3 pS y posee una pobre selectividad iónica ($P_{Na^+} : P_{Cl^-} = 4:1$), características que son suficientes para depletar la célula de K^+ , Mg^{2+} y otros iones pequeños en tan solo 3 min (Latorre y Alvarez, 1981). Estudios con la colicina E1 indican que la acción bactericida se explica por la capacidad de una molécula de formar un canal iónico dependiente de voltaje (Cramer y cols., 1995). Este canal permite el paso de 3×10^6 iones/seg, lo que sería suficiente para depolarizar una célula con una bomba de protones que transporta 10^6 H^+ /célula-seg. Este efecto del canal iónico formado por la colicina E1 va acoplado a la inhibición del transporte activo, la salida de ATP intracelular, K^+ , y parte del fosfato (Cramer y cols., 1995), lo que finalmente lleva a la muerte celular.

La microcina E492 posee una conductancia mucho mayor que la colicina K (110-160 pS) y una mayor selectividad ($P_{K^+} : P_{Cl^-} = 13,2 : 1$) a cationes. Estos antecedentes sugieren fuertemente que la acción bactericida de la microcina E492 de *Klebsiella pneumoniae* es por la formación de canales iónicos en la membrana citoplasmática de las células.

Como se dijo anteriormente, la microcina E492 posee un tamaño molecular de 6.000 con 50-52 aminoácidos, muy inferior a los tamaños descritos

para las colicinas que tienen igual mecanismo de acción. La única bacteriocina producida por bacterias Gram negativas que podría ser similar a la microcina por el tamaño (4.000) y el sitio de acción (la membrana citoplasmática), es la colicina V. Yang y Konisky (1984) determinaron que esta colicina altera el potencial eléctrico de la membrana, pero no lograron inducir la incorporación de canales iónicos en bicapas lipídicas. Las demás colicinas poseen un peso molecular superior a 55.000 (colE1 57.000, colA 63.000, colB 60-76.000, colla e lb 80.000, colK 70.000, Pugsley, 1984). Las proteínas de membrana o aquellas que forman canales iónicos estarían formadas por estructuras de α -hélice que cruzan la bicapa fosfolipídica. Estas α -hélices tendrían que ser hidrofóbicas o anfipáticas, de manera de orientar la región apolar hacia los lípidos de la membrana y la parte polar hacia el lumen del poro (Lazdunski y cols., 1988). Mediante predicciones de la estructura secundaria de los dominios carboxilos y por el análisis estructural por cristalografía de rayos X se han propuesto modelos de la estructura inserta en la membrana de las colicinas A, E1, la y N. La colicina A presenta una estructura de 10 α -hélices organizadas en 3 capas (ver Figura 1). Las dos α -hélices centrales de la estructura son altamente hidrofóbicas y están rodeadas por un anillo de 8 cargas positivas en un extremo de la molécula (Cramer y cols., 1995). Como el diámetro del poro es de un mínimo de 8 Å, se requerirían 4 α -hélices, por lo que se sugiere que el canal estaría formado por dos moléculas de colicina A (Lazdunski y cols., 1988, Parker y cols., 1989 y 1990). En el caso de la colicina E1 son 4 α -hélices las

que se insertan en la membrana para formar el canal (Cramer y cols., 1995). Tomando en cuenta estos antecedentes, el canal iónico formado por la microcina E492 debiera estar constituido por más de dos moléculas. La capacidad de la microcina E492 de formar estructuras oligoméricas quedó en evidencia en el análisis cromatográfico mediante HPLC. La asociación de la actividad a más de un pico de proteínas y que la re-cromatografía de uno de ellos resulte en numerosos picos, indicaría que la microcina forma una estructura oligomérica que eluye de la columna en forma diferencial.

Mediante microscopía electrónica se demostró que la estructura de la microcina en un solvente apolar es agregada, pero si el solvente se hace más polar, la microcina se agrega a las partículas de C₁₈. Este resultado sugiere que la microcina cambia su estado de agregación según la polaridad del solvente en que se encuentre. Mediante los estudios de fluorescencia, se determinó que la microcina presenta fluorescencia intrínseca debido a la presencia de triptófanos. Como resultado de la excitación de los triptófanos de la microcina en distintos ambientes, se observaron corrimientos de los máximos de intensidad de la fluorescencia, cambios que indican cambios conformacionales de la proteína.

Al excitar los triptófanos en metanol el espectro de emisión mostró un máximo de intensidad de fluorescencia a una longitud de onda alrededor de 360 nm, la que corresponde a un entorno hidrofóbico. Este máximo se desplaza hacia el rojo cuando la microcina se cambia a un ambiente acuoso, donde es más hidrofílico el ambiente que rodea a los triptófanos. Es muy posible,

entonces, que la microcina sufra cambios en su estructura dependiendo de la polaridad del solvente. Por otro lado, se observó un efecto de apagamiento de la intensidad de la fluorescencia cuando la microcina E492 estaba en un medio acuoso. El apagamiento observado es consecuencia de la turbidez de la solución debido a la presencia de agregados (Monasterio y cols, 1993), confirmando que en solventes polares la microcina formaría estructuras oligoméricas.

El modelo propuesto para el fragmento formador de poros de la colicina A (Parker y cols., 1990; Cramer y cols., 1995) en base a cristalografía de rayos X, propone una interacción inicial de tipo electrostática en que las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana atraen a las cargas positivas expuestas de la proteína. Esta atracción orientaría a la proteína ubicando en forma perpendicular las hélices hidrofóbicas que se insertarían en la membrana. En este modelo no se consideró el resto de la proteína, como tampoco el mecanismo *in vivo* en que se deben considerar otros factores como la presencia de la membrana externa y los receptores. La microcina E492 representa un modelo ideal para el estudio mediante técnicas de resonancia magnética nuclear de la inserción de proteínas en membranas, ya que por su bajo peso molecular, esto podría realizarse sin alterar la estructura de la proteína. Usando esta técnica espectroscópica es posible estudiar la estructura de la microcina en solución. Otras bacteriocinas descritas que actúan a nivel de la membrana y que poseen características comunes con las microcinas son las producidas por

las bacterias Gram positivas (lantibióticos y no-lantibióticos; Jack y cols., 1995; Abee, 1995; Venema y cols., 1995). El espectro de acción de estas bacteriocinas son principalmente bacterias Gram positivas. Tanto los lantibióticos como los no-lantibióticos afectan la permeabilidad de la membrana por la formación de canales o poros, probablemente por un mecanismo de formación de barriles (semejante a la estructura de las porinas).

Una característica general de la expresión de las microcinas es que su producción comienza al final de la fase exponencial y es máximo cuando el cultivo se encuentra en la fase estacionaria del crecimiento (Kolter y Moreno, 1992; Baquero y Moreno, 1984). Se ha sugerido que estas proteínas podrían ser metabolitos secundarios, ya que además su producción se ve disminuida en condiciones en que el medio de cultivo es rico en nutrientes. La máxima producción de microcina E492 sin embargo, se produce en la fase exponencial para decaer en la fase estacionaria del crecimiento (de Lorenzo y cols., 1984; de Lorenzo, 1985; Orellana, 1993). Esta disminución de la expresión de la microcina en la fase estacionaria coincide con la producción de un antagonista (de Lorenzo y cols., 1984), que fue caracterizado por Orellana y Lagos (1996). Este antagonista corresponde a un sideróforo tipo enteroquelina cuya producción es inducida cuando la concentración de Fe^{+3} en el medio de cultivo es baja (Orellana, 1993). Un posible mecanismo de acción de este antagonista podría ser por competencia con TonB, un componente de la membrana que es necesario tanto para la entrada de la MccE492 como la de hierro vía sideróforos

o citrato. Esta hipótesis es sustentada por el hallazgo que el mecanismo de entrada de muchas colicinas a la célula blanco es a través de los receptores utilizados por sideróforos (Konisky, 1982, Konisky y cols., 1976, Pugsley y Reeves, 1976, Pugsley y Reeves, 1977).

Los estudios realizados con el clon J mostraron que la regulación de la expresión de la microcina en *E. coli* es similar a lo observado en *K. pneumoniae*. No se analizó la presencia de un inhibidor en el clon J, pero se sabe que *E. coli* produce enteroquelinas que inhiben la actividad de la microcina E492 (Orellana, 1993; Orellana y Lagos, 1996).

La bacteria productora de microcina debe poseer un sistema de inmunidad frente a la acción de su propia proteína. Los genes que confieren la inmunidad están estrechamente ligados al gen de la proteína estructural. Es así como en todos los casos descritos, tanto para colicinas como microcinas, los genes se encuentran organizados en operones (Novoa y cols., 1986; Frick y cols., 1981; Garrido y cols., 1988; Weaver y cols., 1981). Los genes responsables de la expresión del gen estructural de la microcina E492 de *K. pneumoniae* y los genes que le dan la inmunidad a la bacteria productora estarían organizados en un operón. Los resultados obtenidos en el estudio realizado con el clon J1 muestran que la inmunidad se expresa en la fase exponencial, lo que correlaciona con la expresión de la microcina en el clon J, la cual también ocurre en la fase exponencial. Estos resultados indicarían que existe una relación en la regulación de la expresión de estos genes.

E. coli sufre cambios en su metabolismo cuando su crecimiento entra en la fase estacionaria debido a la escasez de nutrientes. Estos cambios la hacen más resistente y de esta forma logra sobrevivir a las condiciones adversas (Bohannon y cols., 1991; Mulvey y cols., 1990). En los estudios realizados por Bohannon y cols. (1991) se demostró que los genes que son expresados en forma específica durante la fase estacionaria, están bajo el control de un promotor de la transcripción cuyo reconocimiento está dado por un factor σ diferente (σ^S). La producción de la microcina B17 ocurre en la fase estacionaria, pero su expresión no está regulada por el factor σ^S de la RNA polimerasa. Bohannon y cols. (1991) demostraron que la región promotora de la transcripción del gen *mcbAp* (-54 al +11), que corresponde a la proteína estructural, es necesaria para la inducción de la expresión *in vivo*, y no es dependiente de σ^S . La expresión de la microcina E492, al igual que la microcina B17, no está regulada por la presencia del factor σ^S .

No fue posible estudiar la expresión de la inmunidad del clon J, pues si ésta desaparece en la fase estacionaria, como ocurre en el clon JI, resulta en un fenotipo no viable. Altas diluciones de los cultivos del clon J crecidos durante la noche no eran capaces de retomar el crecimiento. Se probaron diferentes diluciones del cultivo para determinar la dilución a la cual se logra retomar el crecimiento (1:15 a 1:20, máxima dilución con la cual retoma el crecimiento). El efecto se hizo más evidente en un medio de cultivo pobre en nutrientes, condición determinada para *K. pneumoniae* como favorable para la producción

de microcina. Cuando se realizaron diluciones del cultivo de toda la noche del clon J en medio mínimo M9 suplementado con glucosa fue posible observar un pequeño aumento de la turbidez del cultivo para luego descender, observándose al microscopio la presencia de restos celulares y muy pocas células enteras. Estos resultados sugieren que el clon J en fase estacionaria ha perdido su capacidad de resistir a la acción de la microcina y, cuando es diluido, se produciría la lisis de las bacterias. En el caso de la cepa productora original, *K. pneumoniae* RYC492 no se observa la pérdida de la inmunidad, lo cual es aparentemente contradictorio con el resultado obtenido en *E. coli*. Se debe considerar que la *K. pneumoniae* posee una ventaja estructural que no presenta *E. coli*, y que es la presencia de una abundante cápsula. Se ha descrito que la cápsula en bacterias las hace más resistentes frente a antibióticos (Bayer y Bayer, 1994; Camprubí y cols., 1992), especialmente por los problemas de difusión en este polisacárido.

Los genes implicados en la producción e inmunidad de las microcinas B17 y C7 se encuentran en operones, los que son transcritos a partir de uno o más promotores. En el caso del operón de la microcina B17 participan dos promotores, expresándose la inmunidad a partir de dos promotores (Kolter y Moreno, 1992). El operón de la colicina V también posee dos promotores, que están orientados en forma inversa y en el cual el gen de la inmunidad y el gen estructural están en una misma unidad transcripcional (Kolter y Moreno, 1992). Por otra parte, el operón de la microcina C7 posee sólo un promotor que dirige

la expresión de los 5 genes que lo componen.

Los resultados obtenidos en el estudio de la expresión de la actividad de la microcina con el clon J y de la inmunidad con el clon JI sugieren que los genes involucrados estarían regulados bajo un mismo tipo de promotor. Los resultados de la expresión de otros subclones indican que el operón presenta al menos dos promotores (J. Cofré y R. Lagos, comunicación personal). Estos promotores no estarían regulados por la presencia del factor σ^S . Tampoco se debería la expresión de la inmunidad a factores en el sobrenadante de las bacterias en estado estacionario, indicando que la presencia de un metabolito en el medio extracelular no es el responsable de la disminución de la producción de la inmunidad a la microcina E492. Una posible regulación sería mediante la inducción de la expresión de un represor que inhibe la expresión del operón de la microcina. Por otra parte, esta regulación se demostró que existía tanto en *K. pneumoniae* como en *E. coli* y en dos cepas de esta última, lo cual confirma que esta característica se encuentra en el DNA clonado y no es dependiente de la cepa bacteriana huésped.

En la búsqueda de los clones productores de microcina de la genoteca se obtuvieron varios clones productores, pero sólo uno de ellos fue estable en la expresión de la microcina. Los demás clones presentaron un gran porcentaje de segregación de la expresión de la microcina, aunque esta segregación no involucró al gen de la inmunidad. Las colonias que segregaron a Mcc^- mantuvieron esta condición, al menos luego de dos subcultivos sucesivos. Se

demonstró además, que el DNA plasmidial obtenido de una colonia no productora de microcina y utilizado para una transformación nunca revirtió a un fenotipo productor. Estos resultados indican que el DNA clonado sufre alguna alteración que resulta en la inactivación de la microcina y que este cambio es estable de generación en generación. Esta alteración no sólo podría ser en el gen estructural, sino también en otros genes, tales como los genes que codifican para las proteínas implicadas en la exportación o necesarias para las modificaciones post-traduccionales esenciales para la actividad de la microcina. Hasta el momento, se desconoce si la microcina E492 sufre modificaciones post-traduccionales.

Existen diversas alternativas que explicarían la segregación de las colonias productoras de microcina en no productoras, tales como deleciones, inserciones e inversiones de un fragmento del DNA. El tamaño del fragmento de DNA que sufriría estas modificaciones debería ser pequeño, pues el DNA plasmidial preparado a partir de colonias productoras y no productoras y analizado mediante enzimas de restricción, no mostró un patrón distinto en la resolución de un gel de agarosa al 1%. Hay que considerar sin embargo, que el DNA preparado a partir de una colonia productora siempre tendrá un porcentaje de DNA que ha sufrido el cambio hacia uno no productor y esto podría estar enmascarando las diferencias entre los dos plasmidios.

Si se analiza la frecuencia con que ocurre la segregación del carácter productor (alrededor del 80% de las colonias son productoras), ésta es muy alta

para ser mutaciones, aún cuando se piense en un "hot spot". La variación de fase en *Salmonella*, en que el cambio de sentido de un fragmento de DNA provoca la inactivación o activación de un gen, presentan en general una frecuencia de ocurrencia más alta (Eisenstein, 1981). Este fenómeno está descrito para la expresión de la fimbria tipo 1 de *E. coli*, cuya presencia es 1 por cada 1.000 bacterias/generación (Eisenstein, 1981). Cabe destacar que la frecuencia varía según sea el sentido del cambio, siendo 3 veces más frecuente hacia la expresión de la fimbria que hacia la ausencia de ésta. Se ha descrito otro mecanismo de variación de fase en *E. coli* que regula la expresión del operón *pap* que codifica las proteínas involucradas en la síntesis y ensamblaje de los pili asociados con la pielonefritis (Braaten y cols., 1994). La expresión del operón está regulada por la metilación en dos sitios previos al promotor que poseen la secuencia GATC, a los cuales se unen dos proteínas regulatorias (PapI y Lrp). La transcripción es inhibida cuando la proteína Lrp se une al sitio más cercano al promotor, pero esta unión es desestabilizada cuando ocurre la metilación. En el otro sitio metilable se unen ambas proteínas regulatorias cuando se encuentra desmetilado (Braaten y cols., 1994). La expresión de la microcina en los clones inestables de *E. coli* podría estar siendo inactivada por una metilación en algún sitio del gen estructural, metilación que sería irreversible.

La posible alteración en el DNA que resulta en la pérdida de la expresión de la microcina no afecta al gen de la inmunidad, cuya expresión se conserva.

Como se propuso anteriormente, la regulación de la expresión del gen estructural de la microcina y el de la inmunidad estarían coordinados. De producirse el cambio en el DNA a nivel del gen estructural de la microcina, necesariamente el gen de la inmunidad sería previo al gen de la microcina, pues la expresión de éste no se ve afectado. Alternativamente, existe la posibilidad que los genes afectados sean los genes implicados ya sea en el procesamiento o modificación de la microcina.

CONCLUSIONES

1. Se purificó y caracterizó bioquímicamente la microcina E492 de *Klebsiella pneumoniae*.
2. El análisis de los resultados obtenidos con la microcina E492 muestra que es una proteína de características hidrofóbicas, que forma estructuras oligoméricas las cuales darían cuenta de la formación de canales iónicos en la membrana de las bacterias sensibles.
3. La alta conductancia del canal formado por la microcina E492, su baja selectividad, sumado a la cinética de muerte celular del tipo golpe único, sugieren fuertemente que el mecanismo de acción bactericida sería por la formación de canales iónicos.
4. Se demostró que la microcina E492 de *K. pneumoniae* se expresa en *E. coli* en forma activa.
5. La expresión de la microcina y la inmunidad aparentemente estarían reguladas en forma coordinada y esta regulación no sería a través de la expresión de σ^S en la fase estacionaria.

BIBLIOGRAFIA

- Abee, T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**: 1-10.
- Aguilar, A., Pérez-Díaz, J.C., Baquero, F. y Asensio, C. (1982). Microcin 15m from *Escherichia coli*: mechanism of antibiotic action. *Antim. Ag. Chemother.* **21**: 381-386.
- Asensio, C., Pérez-Díaz, J.C., Martínez, M.C. y Baquero, F. (1976). A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **69**: 7-14.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1992). En "Short protocols in molecular biology, a compendium of methods from current protocols in molecular biology". 2^{da} Edición, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons. Unit 2.4 p. 2-10 - 2-12.
- Baquero, F., Bouanchaud, D., Martínez-Pérez, M.C. y Fernández, C. (1978). Microcin plasmids: a group of extrachromosomal elements coding for low-molecular-weight antibiotics in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **135**: 342-347.
- Baquero, F. y Moreno, F. (1984). The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 117-124.
- Bayer, M.E. y Bayer, M.H. (1994). Biophysical and structural aspects of the bacterial capsule. *ASM News* **60**: 192-198.
- Bensadaum, A. y Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**: 241-250.
- Bergmeyer, H.-U. Ed. (1963). *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York. p. 811.
- Bishop, L.J., Cohen, F.S., Davidson, V.L. y Cramer, W.A. (1986). Chemical modification of the two histidine and single cysteine residues in the channel-forming domain of colicin E1. *J. Membrane Biol.* **92**:237-245.

- Bohannon, D.E., Connell, N., Keener, J., Tormo, A., Espinosa-Urgel, M., Zambrano, M.M. y Kolter, R. (1991). Stationary-phase-inducible "gearbox" promoters: differential effects of *katF* mutations and role of σ^{70} . *J. Bacteriol.* **173**: 4482-4492.
- Böhlen, P., Stein, S., Dairman, W. y Udenfriend, S. (1973). Fluorometric assay of proteins in the nanogram range. *Arch. Biochem. Biophys.* **155**: 213-220.
- Braaten, B.A., Nou, X., Kaltenbach, L.S. y Low, D.A. (1994). Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**: 577-588.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Braun, V., Frenz, J., Hantke, K. y Schaller, K. (1980). Penetration of colicin M into cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **142**: 162-168.
- Bullock, J.O., Cohen, F.S., Dankert, J.R. y Cramer, A. (1983). Comparison of the macroscopic and single channel conductance properties of colicin E1 and its COOH-terminal tryptic peptide. *J. Biol. Chem.* **258**: 9908-9912.
- Camprubí, S., Merino, S., Benedí, J., Williams, P. y Tomás, J.M. (1992). Physicochemical surface properties of *Klebsiella pneumoniae*. *Curr. Microbiol.* **24**: 31-33.
- Cavard, D., Sauve, P., Hetz, F., Pattus, F., Martinez, C., Dijkman, R. y Lazdunski, C. (1988). Hydrodynamic properties of colicin A. *Eur. J. Biochem.* **172**: 507-512.
- Cecchi, X. (1985). Tesis de Doctorado en Bioquímica titulada "Mecanismos de transporte y selectividad iónicos en el canal de hemocianina". Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Cehade, H. y Braun, V. (1988). Iron-regulated synthesis and uptake of colicin V. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 177-182.
- Cramer, W.A., Heymann, J.B., Schendel, S.L., Deriy, B.N., Cohen, F.S., Elkins, P.A. y Stauffacher, C.V. (1995). Structure-function of the channel-forming colicins. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**: 611-641.

Davagnino, J., Herrero, M., Furlong, D., Moreno, F. y Kolter, R. (1986). The DNA replication inhibitor microcin B17 is a forty-three-amino-acid protein containing sixty percent glycine. *Proteins: Structure, function, and genetics* **1**: 230-238.

Dawson, R.M.C., Elliott, W.H. y Jones, K.M. (1969). En "Data for Biochemical research". 2^{da} Edición, Oxford University Press, London.

Del Castillo, Y., Gómez, J.M y Moreno, F. (1990). *mprA*, an *Escherichia coli* gene that reduces growth-phase-dependent synthesis of microcins B17 and C7 and blocks osmoinduction of *proU* when cloned on a high-copy-number plasmid. *J. Bacteriol.* **172**: 437-445.

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

De Lorenzo, V., Martínez, J. L. y Asensio, C. (1984). Microcin-mediated interactions between *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 391-400.

De Lorenzo, V. (1985). Factors affecting microcin E492 production. *J. Antibiotics* **28**: 340-345.

De Lorenzo, V. y Pugsley, A.P. (1985). Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antim. Ag. Chemother.* **27**: 666-669.

Eisenstein, B. (1981). Phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* is under transcriptional control. *Science* **214**: 337-339.

Fath, M.J., Skvirsky, R.C. y Kolter, R. (1991). Functional complementation between bacterial MDR-like export systems: colicin V, alpha-hemolysin, and *Erwinia* protease. *J. Bacteriol.* **173**: 7549-7556.

Fath, M.J., Skvirsky, R., Gilson, L., Mahanty, H.K. y Kolter, R. (1992). The secretion of colicin V. *NATO ASI Series H-65*: pp. 331-348. En "Bacteriocins, microcins and lantibiotics". Eds. James, R., Lazdunski, C. y Pattus, F. Springer Verlag.

Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.

- Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1984). Addendum to: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**: 266-267.
- Frick, K.K., Quackenbush, R.L. y Konisky, J. (1981). Cloning of immunity and structural genes for colicin V. *J. Bacteriol.* **148**: 498-507.
- Gaggero, C., Moreno, F. y Laviña, M. (1993). Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J. Bacteriol.* **175**:5420-5427.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. y Valdivia, E. (1991). Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **173**: 886-892.
- García-Bustos, J.F., Pezzi, N. y Asensio, C. (1984). Microcin 7: purification and properties. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **119**: 779-785.
- Garrido, M.C., Herrero, M., Kolter, R. y Moreno, F. (1988). The export of the DNA replication inhibitor microcin B17 provides immunity for thr host cell. *EMBO J.* **7**: 1853-1862.
- Géli, V. y Lazdunski, C. (1992). Immunity protein to pore forming colicins. NATO ASI Series H-65: 127-138. En "Bacteriocins, microcins and lantibiotics". Eds. James, R., Lazdunski, C. y Pattus, F. Springer Verlag.
- Guarante, L. y Beckwith, J. (1978). Mutant RNA polymerase of *Escherichia coli* terminates transcription in strains making defective rho factor. *Proc. Natl Acad. Sci.* **75**: 294-297.
- Guijarro, J.I., González-Pastor, J.E., Baleux, F., San Millán, J.L., Castilla, M.A., Rico, M., Moreno, F. y Delepierre, M. (1995). Chemical structure and translation inhibition studies of the antibiotic microcin C7. *J. Biol. Chem.* **270**: 23520-23532.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-
- Hansen, J.N. (1994). Nisin as a model food preservative. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition* **34**: 69-93.
- Hashimoto, H., Horigome, T., Kanbayashi, M., Yoshida, K. y Sugano, H. (1983). An improved method for separation of low - molecular - weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **129**: 192-199.

- Hernández-Chico, C., Mayo, O., Vizán, J.L., Laviña, M. y Moreno, F. (1992). Uptake and mode of action of the peptide antibiotic microcin B17. *NATO ASI Series H-65*: 15-17. En "Bacteriocins, microcins and lantibiotics". Eds. James, R., Lazdunski, C. y Pattus, F. Springer Verlag.
- Hille, B. (1984). En "Ionic channels of excitable membranes". Ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachussets.
- Hirst, T.R. y Welch, R. (1988). Mechanisms for secretion of extracellular proteins by Gram-negative bacteria. *Trends in Biochem. Sci.* **13**:205-209.
- Hodgkin, A.L. y Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* **352**: 37-77.
- Jack, R.W. y Sahl, H.-G. (1995). Unique peptide modifications involved in the biosynthesis of lantibiotics. *Trends in Biotechn.* **13**: 269-278.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 171-200.
- Khmel, I.A., Bondarenko, V.M., Manokhina, I.M., Basyuk, E.I., Metlitskaya, A.Z., Lipasova, V.A. y Romanova, Y.M. (1993). Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains producing microcins of B and C types. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**: 269-274.
- Kolter, R y Moreno, F. (1992). Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**: 141-163.
- Konisky, J., Soucek, S., Frick, K., Davies, J. K. Hammond, C. (1976). Relationship between the transport of iron and the amount of specific colicin Ia membrane receptors in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **127**: 249-257.
- Konisky, J. (1982). Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Ann. Rev. Microbiol.* **36**: 125-144.
- Kordel, M., Benz, R. y Sahl, H.-G. (1988). Mode of action of the staphylococcinlike peptide Pep 5: voltage-dependent depolarization of bacterial and artificial membranes. *J. Bacteriol.* **170**: 84-88.
- Koryta, J. (1982). En "Ions, electrodes and membranes". Ed. John Wiley & Sons Ltd.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X. y Monasterio, O. (1993). Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**: 145-148.

Lakey, J.H., Baty, D., González-Mañas, J.M., Duché, D. y Pattus, F. (1991). Site directed fluorescence spectroscopy as a tool to study the membrane insertion of colicin A. *NATO ASI Series H-65*: 127-138. En "Bacteriocins, microcins and lantibiotics". Eds. James, R., Lazdunski, C. y Pattus, F. Springer Verlag.

Latorre, R. y Alvarez, O. (1981). Voltage - dependent channels in planar lipid bilayer membranes. *Physiol. Rev.* **61**: 77-150.

Laviña, M., Pugsley, A.P. y Moreno, F. (1986). Identification, mapping, cloning and characterization of a gene (*sbmA*) required for microcin B17 action on *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1685-1693.

Lazdunski, C.J., Baty, D., Geli, V., Cavard, D., Morlon, J., Lloubes, R., Howard, S.P., Knibiehler, M., Chartier, M., Varenne, S., Frenette, M., Dasseux, J.-L. y Pattus, F. (1988). The membrane channel-forming colicin A: synthesis, secretion, structure, action and immunity. *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 445-464.

Martínez, J.L. y Pérez-Díaz, J.C. (1986). Isolation, characterization, and mode of action on *Escherichia coli* strains of microcin D93. *Antim. Ag. Chemother.* **29**: 456-460.

Mayr-Harting, A., Hedges, A.J. y Berkeley, C.W. (1972). Methods for studying bacteriocins. *Methods in Microbiol.* **7A**, 315-422. Eds. J.R. Norris y D.W. Rebbons, Academic Press, London y New York.

Metzler, D.E. (1977). *Biochemistry, the chemical reactions of living cells.* Academic Press, London y New York.

Milch, H., Nikolnikov, S. y Czirók, É. (1984). *Escherichia coli* colV plasmids and their role in pathogenicity. *Acta Microbiol. Hungarica* **31**: 117-125.

Monasterio, O., Acoria, M., Díaz, M.A. y Lagos, R. (1993). The binding of terbium ions to tubulin induces ring formation. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 582-587.

Morona, R., Manning, P.M. y Reeves, P. (1983). Identification and characterization of the TolC protein, an outer membrane protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**: 693-699.

Mulvey, M.R., Switala, J., Borys, A. y Loewen, P.C. (1990). Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 6713-6720.

Nau, C.D. y Konisky, J. (1989). Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport proteins: nucleotide and amino acid sequences of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *J. Bacteriol.* **171**: 1041-1047.

Novoa, M.A., Díaz-Guerra, L., San Millán, J.L. y Moreno, F. (1986). Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C7 production and immunity. *J. Bacteriol.* **168**: 1384-1391.

Orellana, C. y Lagos, R. (1996). The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcin antagonist. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**: 297-303.

Orellana, C. (1993). Tesis para optar al título de Bioquímico titulada "Modulación de la actividad de la microcina E492 de *Klebsiella pneumoniae* por un antagonista". Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Parker, M.W., Pattus, F., Tucker, A.D. y Tsernoglou, D. (1989). Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* **337**: 93-96.

Parker, M.W., Tucker, A.D., Tsernoglou, D. y Pattus, F. (1990). Insights into membrane insertion based on studies of colicins. *Trends in Biochem. Sci.* **15**: 126-129.

Pattus, F., Martínez, M.C., Dargent, B., Cavard, D., Verger, R. y Lazdunski, C. (1983). Interaction of colicin A with phospholipid monolayers and liposomes. *Biochem.* **22**: 5698-5703.

Pérez-Díaz, J.C. y Clowes, R.C. (1980). Physical characterization of plasmids determining synthesis of a microcin which inhibits methionine synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **141**: 1015-1023.

Pressler, U., Braun, V., Wittmann-Liebold, B. y Benz, R. (1986). Structural and functional properties of colicin B. *J. Biol. Chem.* **261**: 2654-2659.

Pugsley, A.P. y Reeves, P. (1976). Characterization of group B colicin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12: colicin resistance and the role of enterochelin. *J. Bacteriol.* **127**: 218-228.

Pugsley, A.P. y Reeves, P. (1977). The role of colicin receptor in the uptake of ferrienterochelin by *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **74**: 903-911.

Pugsley, A.P. (1984). The ins and outs of colicins. Part I: Production, and translocation across membranes. *Microbiol. Sci.* **1**: 168-175.

Pugsley, A.P. y Schwartz, M. (1984). Colicin E2 release: lysis, leakage or secretion? Possible role of a phospholipase. *EMBO J.* **3**: 2393-2397.

Pugsley, A.P. (1985). *Escherichia coli* K12 strains for use in the identification and characterization of colicins. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 369-376.

Pugsley, A.P., Moreno, F. y de Lorenzo, V. (1986). Microcin-E492-insensitive mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3253-3259.

Pugsley, A.P. (1988). The immunity and lysis genes of ColN plasmid pCHAP4. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 335-341.

Ragland, W.L., Pace, J.L. y Kemper, D.L. (1974). Fluorometric scanning of fluorescamine - labelled proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **59**: 24-33.

Rodríguez-Sáinz, M.C., Hernández-Chico, C. y Moreno, F. (1990). Molecular characterization of *pmbA*, an *Escherichia coli* chromosomal gene required for the production of the antibiotic peptide MccB17. *Mol. Microbiol.* **4**: 1921-1932.

Salomón, R.A. y Farías, R.N. (1992). Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 7428-7435.

Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^{da} Edición, Cold Spring Harbor Laboratory.

Schägger, H. y von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.

Schein, S.J., Kagan, B.L. y Finkelstein, A. (1978). Colicin K acts by forming voltage-dependent channels in phospholipid bilayer membranes. *Nature* **276**: 159-163.

Schüller, F., Benz, R. y Sahl, H.-G. (1989). The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. *Eur. J. Biochem.* **182**: 181-186.

Silver, S. y Walderhaug, M. (1992). Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **56**: 195-228.

Slatin, S.L., Raymond, L. y Finkelstein, A. (1986). Gating of a voltage-dependent channel (colicin E1) in planar lipid bilayers: the role of protein translocation. *J. Membrane Biol.* **92**: 247-254.

Song, H.Y., Cohen, F.S. y Cramer, W.A. (1991). Membrane topography of ColE1 gene products: the hydrophobic anchor of the colicin E1 channel is a helical hairpin. *J. Bacteriol.* **173**: 2927-2934.

Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Tokuda, H. y Konisky, J. (1978). *In vitro* depolarization of *Escherichia coli* membrane vesicles by colicin Ia. *J. Biol. Chem.* **253**: 7731-7737.

Tokuda, H. y Konisky, J. (1979). Effect of colicins Ia and E1 on ion permeability of liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 6167-6171.

Utermohlen, J. (1994). RbCl transformation procedure for improved efficiency. *The NEB Transcript* **6**: 7.

Venema, K., Venema, G. y Kok, J. (1995). Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbiol.* **3**: 299-304.

Vizán, J.L., Hernández-Chico, C., del Castillo, Y. y Moreno, F. (1991). The peptide antibiotic microcin B17 induces double-stranded cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *EMBO J.* **10**: 467-476.

Weaver, C.A., Redborg, A.H. y Kinisky, J. (1981). Plasmid-determined immunity of *Escherichia coli* K-12 to colicin Ia is mediated by a plasmid-encoded membrane protein. *J. Bacteriol.* **148**: 817-828.

Wendt, L. (1970). Mechanism of colicin action: early events. *J. Bacteriol.* **104**: 1236-1241.

Yang, C.-C. y Konisky, J. (1984). Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J. Bacteriol.* **158**: 757-759.