



La lucha por la sobrevivencia: las bacterias se protegen de la acción letal de las colicinas formadoras de canales

Vidal Rodríguez-Lemoine
Guillermina Alonso

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina -
Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Las bacterias han desarrollado mecanismos de protección contra la acción letal de las colicinas producidas y excretadas al medio por las bacterias colicinógenas. Hasta ahora se han descrito cuatro mecanismos de protección: inmunidad, resistencia, tolerancia y el carácter PacB. Los tres primeros protegen de un grupo específico de colicinas, y han sido extensamente estudiados y caracterizados. El carácter PacB confiere protección contra todas las colicinas formadoras de canales. Esta nueva propiedad está codificada en plásmidos no colicinógenos del Complejo de Incompatibilidad H. El fenotipo PacB está ligado al de resistencia a oxianiones de telurio. Los estudios fisiológicos y moleculares de la región PacB-Te del plásmido Mip233 (IncHI3) condujeron a la proposición de un modelo mecanístico, en el cual se considera que el producto del determinante PacB, tiene actividad de reductasa (determina la resistencia a Telurito) y actúa a nivel de membrana interaccionando con proteínas del sistema de translocación Tol y/o otros componentes de la envoltura celular impidiendo la formación del canal transmembrana.

INTRODUCCIÓN

Las colicinas son proteínas bactericidas producidas por cepas de *Escherichia coli* portadoras de plásmidos colicinogénicos. El origen y evolución de la colicinogenia permanece controversial. Dado que la producción de colicinas está codificada en plásmidos, se asume como una función dispensable y no esencial para la sobrevivencia de las bacterias coliformes. Sin embargo, la abundancia relativa de las cepas colicinogénicas entre los aislados de *E. coli* (30-50%), y la organización altamente conservada de la secuencia de los genes y sus proteínas, sugieren que podrían jugar un papel muy importante en la ecología de las bacterias coliformes. Las colicinas conferirían ventajas a las células productoras en la colonización y defensa de un nicho ecológico, sobre las células no colicinogénicas sensibles que compartan el mismo ambiente. La prevalencia de cepas colicinogénicas en el ecosistema gastrointestinal podría ser explicada sobre esta base, aún cuando no existan evidencias directas que la apoyen.

La síntesis de las colicinas es inducible por exposición a condiciones de estrés en el medio. Una vez que la colicina es producida en el interior celular, es transportada al exterior causando la lisis de la célula productora, y la muerte de las células sensibles que comparten el mismo nicho ecológico. De esta manera, la producción de colicinas representa una ventaja selectiva para el resto de la población colicinogénica que no llegó a secretar la colicina a la cual es inmune.

El peso molecular de las colicinas varía entre 29.000 y 75.000 Daltons. Hasta la fecha se han identificado 18 colicinas. En base a su modo de acción han sido clasificadas en dos grupos: Colicinas enzimáticas y Colicinas formadoras de canales. Las primeras matan a las células sensibles por degradación de su DNA ó inhibición de la síntesis proteica. Las segundas ejercen su efecto letal mediante la formación de canales iónicos voltaje-dependientes en la membrana citoplasmática de la célula sensible. En este último grupo se encuentran las Colicinas A, B, E1, Ia, Ib, K y N [\(Tabla 1\)](#). (3, 5, 6).

Para llevar a cabo el proceso de formación de poros o canales en la célula sensible, deben ocurrir los siguientes eventos secuenciales: 1) La colicina debe unirse a un receptor externo de membrana de la célula blanco; 2) debe ser translocada a través de la envoltura celular; y 3) debe insertarse en la membrana interna y formar el poro que conducirá a la muerte celular. Los receptores son proteínas integrales de membrana que normalmente son utilizados para la captación de nutrientes, como hierro, vitamina B12 y nucleósidos, entre otros. Para la translocación hacia la membrana interna utilizan ó bien el Sistema Ton ó el Sistema Tol. El Sistema Ton es utilizado para la translocación de nutrientes con consumo de energía. El Sistema Tol no es dependiente de energía y se ha sugerido que está involucrado en la integridad de la envoltura celular (3) [\(Tabla 1\)](#).

Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de varias de las colicinas formadoras de canales, y su análisis ha permitido asociar dominios de la cadena polipeptídica con cada uno de los eventos necesarios para su acción. El dominio N-terminal esta involucrado en la translocación a través de la membrana externa, la zona de unión al receptor se encuentra en la zona central de la proteína y el extremo C-terminal es el dominio formador del poro. En todas, éste último dominio funcional se encuentra altamente conservado, sugiriendo un mecanismo común de acción. El modelo propuesto para explicar este mecanismo sugiere que dos regiones hidrofóbicas en la región C-terminal de la proteína se insertan espontáneamente en la bicapa lipídica, provocando un replegamiento de la proteína con la subsiguiente apertura del canal (1, 2).

Hasta los momentos han sido reportados cuatro mecanismos utilizados por las bacterias para protegerse de la acción letal de las colicinas formadoras de canales. Ellos son: inmunidad, resistencia, tolerancia y el carácter PacB. Los tres primeros son conocidos desde hace mucho

tiempo y están bien caracterizados. El carácter PacB, descrito por primera vez en nuestro laboratorio, se encuentra actualmente en estudio.

INMUNIDAD, RESISTENCIA Y TOLERANCIA

Inmunidad, Resistencia y Tolerancia.

Una población de bacterias productoras de una determinada colicina se protege contra la misma por la acción de una proteína de inmunidad codificada en el mismo plásmido colicinogénico, la cual es expresada constitutivamente ([Tabla 1](#)). La protección es altamente específica, es decir, protege solo de la acción de la colicina codificada en el mismo plásmido. Las proteínas de inmunidad, en forma general, presentan poca homología en la región N-terminal, con una alta densidad de carga en la región central de la cadena polipeptídica y residuos hidrofóbicos en su región C-terminal (4). Sobre la base de esto se sugiere que la neutralización ocurre por interacciones altamente específicas entre la proteína de inmunidad con la región C-terminal de la colicina respectiva. La principal evidencia de la precisión del reconocimiento del sistema de inmunidad proviene de la construcción de colicinas híbridas, demostrándose que la proteína de inmunidad protege exclusivamente cuando la región C-terminal de la proteína híbrida está constituida por la colicina codificada en el mismo operón (4).

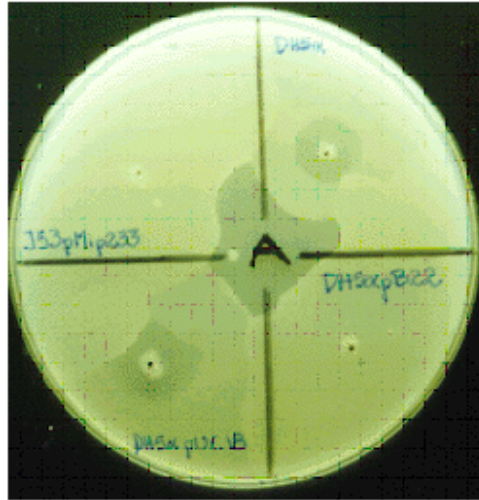
Otro mecanismo que protege a las células sensibles de la acción de las colicinas formadoras de canales es la resistencia. La resistencia involucra mutaciones en el gen cromosomal que codifica para el receptor, impidiéndose de este modo el reconocimiento por parte de la colicina. Los cambios en la secuencia de aminoácidos que producen resistencia son aquellos de las zonas del receptor que están expuestas al medio extracelular, involucradas en el reconocimiento específico de la colicina. Estos cambios pueden producir modificaciones en la conformación tridimensional del receptor, alterando la probabilidad de interacción con la colicina, produciendo así el fenotipo de resistencia (3,5). La resistencia puede ser contra varias colicinas, si utilizan el mismo receptor para internalizarse. Sin embargo, aunque su espectro de protección es más amplio que el sistema de inmunidad (que protege solo contra una colicina), es un mecanismo de protección restringido a solo algunas colicinas formadoras de canales.

Otro mecanismo utilizado por las células sensibles para protegerse de las colicinas es por mutaciones en el gen cromosomal que codifica para alguna de las proteínas del Sistema de Translocación utilizado para la internalización de estas moléculas ([Tabla 1](#)). Los estudios con las cepas tolerantes han contribuido al entendimiento de la organización de la envoltura celular de *E. coli*, y de los sistemas de translocación Ton y Tol, los cuales facilitan la incorporación de las colicinas. Aún cuando el Sistema Ton no ha sido involucrado en la translocación de nutrientes, sino en estabilidad de la envoltura celular, ambos sistemas muestran similitud funcional, y mutaciones en cualquiera de las proteínas de alguno de los sistemas impide la internalización de la colicina adsorbida, generando así el fenotipo de tolerancia. Las mutaciones en las proteínas accesorias de los mecanismos de traslocación pueden producir tolerancia hacia las colicinas incorporadas por la misma vía, pero no hacia las incorporadas por otra vía. (3,5,6). Así, la tolerancia es un tercer mecanismo de protección aunque, como en el caso de la resistencia, tiene una capacidad limitada ya que no protege contra todas las colicinas formadoras de canales, estando restringida a aquellas colicinas que compartan el mismo sistema de traslocación.

CARÁCTER PACB

Carácter PacB

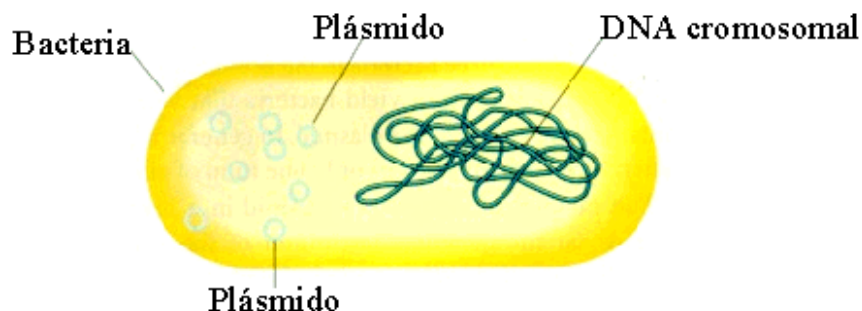
En 1980 reportamos un nuevo mecanismo de protección de células sensibles contra la acción de las colicinas formadoras de canales. Esta propiedad fue denominada PacB (Protection against colicin B) (9). Difiere de las ya descritas (excluyendo a la inmunidad, codificada por el plásmido colicinogénico), porque no es codificada por el cromosoma bacteriano. Los mecanismos de Resistencia y Tolerancia involucran mutaciones en genes cromosomales que codifican para receptores o proteínas de sistemas de translocación. El carácter PacB está codificado en plásmidos no colicinogénicos, restringido al Complejo de Incompatibilidad H (11).



Fenotipo PacB

Las cepas portadoras del plásmido Mip233 (IncHI3) crecen sin inhibición en presencia de las colicinas formadoras de canales (punción central). Las cepas controles presentan un halo de inhibición en presencia de las colicinas formadoras de canales.

En base a estudios de homología a nivel de DNA y a estudios de incompatibilidad, el Complejo de Incompatibilidad H ha sido dividido en dos Grupos: IncHI e IncHII. A su vez el grupo IncHI ha sido subdividido en tres subgrupos: IncHI1, IncHI2 e IncHI3. Todos los plásmidos pertenecientes al Complejo H son conjugativos y exhiben un mecanismo particular de transferencia termosensible, siendo mas eficiente el proceso a 25°C (8). Son los plásmidos de mayor tamaño reportado, oscilando entre 150 a mas de 200 Kpb, por lo cual su análisis físico y genético ha sido difícil de realizar (11).



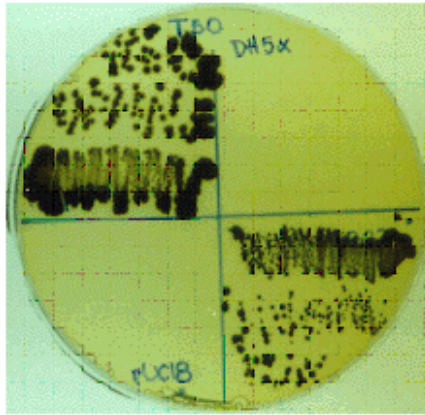
La sensibilidad bacteriana a la acción letal de las colicinas es detectada de rutina al medir el tamaño del halo de inhibición del crecimiento formado alrededor de una colonia colicinogénica. Utilizando esta metodología se estudió en nuestro laboratorio la sensibilidad a la Colicina B de cepas de

Escherichia coli K12 portadoras de plásmidos de diferentes grupos de Incompatibilidad. La cepa control y las cepas portadoras de plásmidos de varios grupos de incompatibilidad presentaron sensibilidad a la acción de las colicinas en estudio. Solamente las cepas portadoras de diferentes plásmidos del complejo IncH mostraron sensibilidad notablemente reducida a la acción de la Colicina B, manteniendo su susceptibilidad a otras colicinas con otros mecanismos de acción (9,10). Este fenotipo se encontró asociado a plásmidos del grupo IncHI (subgrupos HI2 y HI3) y al grupo IncHII, estando ausente de los plásmidos clasificados como IncHI1. La única excepción la representa el plásmido pR476b perteneciente al IncHI2, el cual no mostró asociado el fenotipo PacB. Mas tarde demostramos que este mecanismo no solo protege contra la colicina B, sino también contra las colicinas A, E1, Ia, Ib, K y N. El carácter PacB fue redefinido entonces el carácter PacB como una propiedad codificada en plásmidos del IncH que confiere protección contra todas las colicinas formadoras de canales (12).

PACB-TELURITO

PacB-Telurito

Trabajos posteriores nos permitieron establecer una asociación entre el carácter PacB, el fenotipo Phi (eficiencia reducida de formación de placas líticas por bacteriófagos como T1, T5, T7 y j 80) y la resistencia a oxianiones de telurito. Todas estas propiedades están asociadas a plásmidos del Complejo H, y se sugiere que los tres marcadores están ligados en forma física y genética. Dado que hasta la fecha no ha sido reportado ningún plásmido perteneciente al subgrupo IncHII ó a otros grupos de incompatibilidad que presenten el carácter PacB, éste ha sido utilizado como marcador para la identificación preliminar de plásmidos pertenecientes al Complejo H (13). De manera experimental representa una ventaja, ya que la capacidad de crecimiento en presencia de sales de telurito se debe a su reducción a telurio metálico, de color negro, lo cual se refleja como colonias bacterianas negras sobre placas de medio rico, y pueden ser fácilmente detectadas. Sin embargo, la prueba no permite discriminar a cual de los grupos o subgrupos del Complejo pertenece el plásmido a clasificar. El mecanismo de acción del carácter PacB no parece estar relacionado con aquellos determinados por los plásmidos colicinogénicos, los cuales confieren inmunidad en una forma altamente específica contra una molécula de colicina en particular. Llama poderosamente la atención la amplitud del mecanismo de protección de PacB, ya que confiere protección contra todas las colicinas formadoras de canales, aún cuando sean neutralizadas por proteínas de inmunidad específicas, ó utilicen diferentes receptores para adsorberse a la membrana externa ó sean translocadas hacia la membrana citoplasmática por sistemas de translocación diferentes. Aunque el mecanismo de acción de PacB no se conoce, es probable que esté muy relacionado con el mecanismo responsable de resistencia a telurito (13). Por lo tanto, las estrategias para dilucidar y explicar el modo de acción de PacB debe tomar en cuenta el ligamiento entre ambos fenotipos.



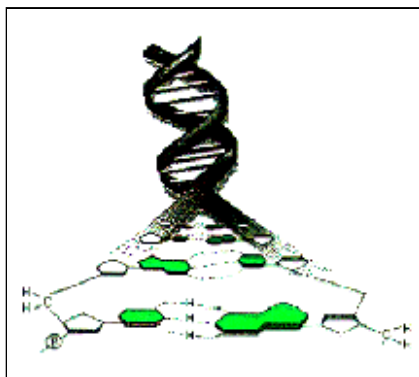
Fenotipo Te^r

Las cepas portadoras del plásmido Mip233 (IncHI3) crecen como colonias con coloración negra por la reducción de la sal de telurito. Las cepas controles no crecen en presencia de la sal de telurito.

Entre las *Enterobacteriaceae* la resistencia a telurito está asociada a la presencia de plásmidos, aún cuando recientemente se ha reportado la presencia de genes cromosomales crípticos que son capaces de conferir resistencia a telurito, pero solo cuando se encuentran en vectores multicopia. Los determinantes de resistencia a telurito (Te^r) de los plásmidos MER610 y R478 (ambos del IncHI2) han sido clonados y secuenciados (15). Estos dos determinantes, y el determinante cromosomal críptico no presentan homología entre si a nivel de secuencia peptídica. A pesar del clonamiento y de la secuenciación de estos determinantes plasmídicos de resistencia a telurito, se desconoce hasta el momento su mecanismo de acción y su probable relación con el carácter PacB.

PACB: ESTUDIOS MOLECULARES

PacB: Estudios Moleculares



En nuestro laboratorio dirigimos esfuerzos con la finalidad de dilucidar el modo de acción del carácter PacB. Para ello se procedió a clonar una región del DNA del plásmido Mip233 (IncHI3), que codifica para ambos fenotipos (PacB y Te^r) (15). Se obtuvo el mapa de restricción del clon recombinante y se subclonó el menor fragmento capaz de conferir a la célula hospedera ambos fenotipos. El clon resultante, denominado pB22, contiene un inserto de 2.200 pb. Representa el menor segmento de DNA reportado hasta la fecha que es capaz de expresar resistencia a colicinas formadoras de canales y a oxianiones de telurito, con la

misma capacidad del plásmido parental Mip233. Nuestros resultados indican que PacB y Te^r están ligados no solo de forma genética sino también físicamente, y que ambos fenotipos son inducibles por exposición previa a niveles subtóxicos de telurito ó de colicinas. Por el análisis de la secuencia nucleotídica de los clones de pMER610 y R478, se han reportado hasta 7 marcos de lecturas (ORFs) como necesarios para la expresión de la resistencia a Telurito. Los resultados de nuestro laboratorio indican que no es necesaria la expresión de un gran número de proteínas.

Para producir su acción letal, tanto las colicinas como el telurito deben ser translocados de la membrana externa a la interna. Debido a esto, en el Laboratorio utilizamos cepas mutantes de *E. coli* con alteraciones bien en el Sistema Ton ó bien en el Sistema Tol. Nuestros resultados indican que para que ocurra una efectiva protección se necesita el producto intacto del gen *tolC*, ya que mutantes TolC⁻ portadoras del clon pB22 son incapaces de adquirir el fenotipo PacB-Te^r (14).

El análisis de la secuencia parcial de nucleótidos del clon pB22 ha revelado un marco de lectura abierto que presenta un alto grado de homología con la proteína O-acetil sulfidrilasa (CysK) de varios organismos. Esta enzima es la responsable de la síntesis de cisteína a partir de O-acetilserina y sulfuro de hidrógeno. Dada la similitud química y física entre el telurito y el azufre sugerimos que el producto proteico de pB22 sea el encargado de reducir la sal de telurito a telurio metálico, produciéndose de esta manera el fenotipo de Te^r.

Para complementar los estudios molecular realizamos análisis de Northern Blot, determinando que el clon pB22 produce un transcrito con un tamaño estimado de 1.200 bases.

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS

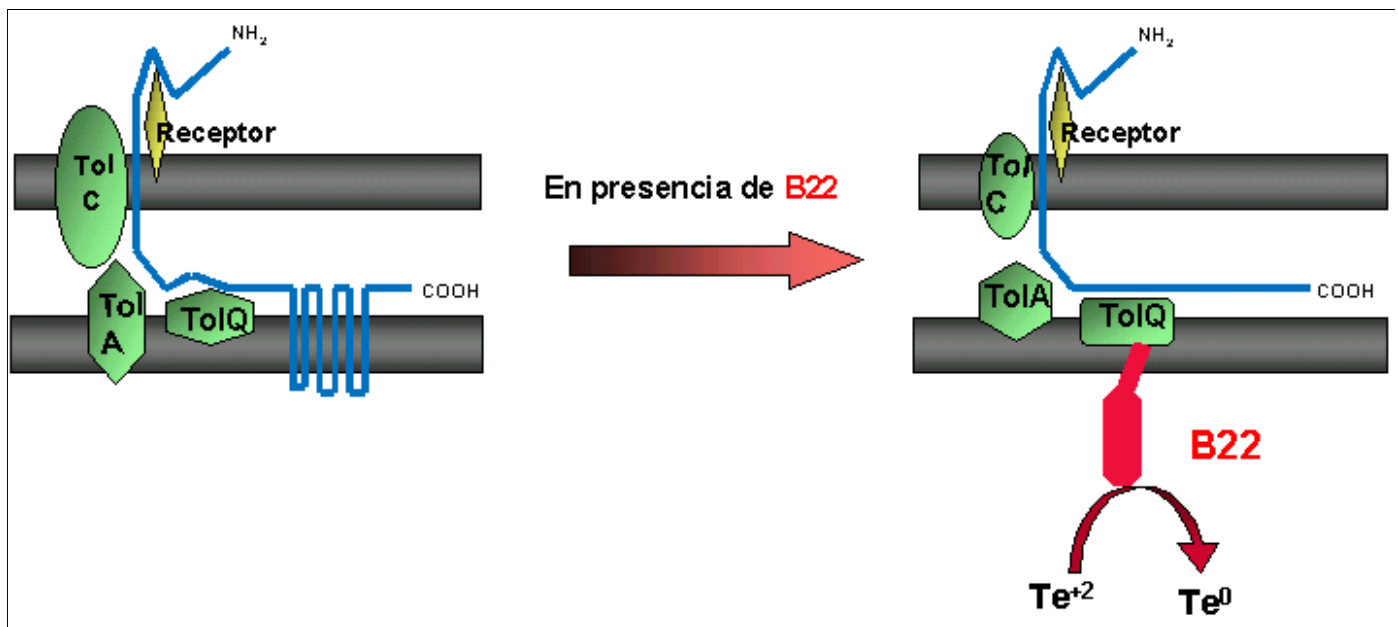
Estudios Fisiológicos

Dadas las controversias existentes en la literatura sobre una posible inducibilidad del sistema por parte del telurito ó de las colicinas, realizamos estudios fisiológicos a fin de cuantificar si realmente se produce un efecto estimulatorio. En estudios de control de viabilidad celular, nuestros resultados indican que precrecimientos en exceso de cisteína ó azufre favorecen un posterior crecimiento con telurito en altas concentraciones, no siendo el caso cuando los precrecimientos se efectúan en presencia de telurito ó de colicinas. Esta información fue complementada con estudios de estimulación de la transcripción, donde encontramos que la cisteína, la serina, las colicinas formadoras de canales y en menor grado las sales de telurito, son capaces de inducir un aumento en la transcripción del RNA codificado por el clon pB22, observándose un incremento del transcrito de 1.200 bases.

MODO DE ACCIÓN

Modo de Acción

Aunque todavía no se conoce con exactitud el (ó los) mecanismo(s) de resistencia tanto a colicinas formadoras de canales como a telurito, hemos propuesto un modelo de acción en base a nuestros resultados con el clon pB22.



De acuerdo a este modelo el producto genético responsable del fenotipo PacB-Te, con actividad tipo reductasa, similar a CysK, reduce el telurito, actuando nivel de membrana, interaccionando con las proteínas del Sistema Tol, alterando la estructura natural de la envoltura celular (14). La interacción del producto proteico de pB22 con algún ó algunos de los componentes de este sistema podría provocar un cambio en la conformación del mismo y/o de la envoltura celular, evitándose de esta forma la inserción de la colicina ó la apertura del canal. Este mecanismo involucra una protección contra el mecanismo de acción de las colicinas, común a todas las colicinas de este grupo, explicando de esta forma porque protege contra todo un grupo completo de moléculas que solo comparten entre si el modo de acción. La presencia de colicinas ó de telurito en el medio ambiente externo debe estimular la transcripción y traducción del producto proteico a fin de evitar la muerte celular. Igualmente se podría especular que la función natural del producto codificado por pB22 pudiera estar relacionada con la reducción del azufre y su metabolización intracelular, y por esta razón cisteína y serina, que serían los sustratos naturales, estimulan su transcripción.

Para sobrevivir en ambientes naturales, donde son secretados en una alta proporción una gran variedad de productos tóxicos, las poblaciones de bacterias sensibles de *E. coli* deben desarrollar mecanismos para protegerse de estos agentes. De lo contrario, las bacterias no colicinogénicas estarían en fuerte desventaja con respecto de aquellas portadoras de estos determinantes. Las mutaciones espontáneas de genes cromosomales que modifiquen las proteínas receptoras (resistencia) ó los sistemas de translocación (tolerancia) pueden, de forma natural, proteger a las bacterias solo contra una ó dos colicinas, pero simultáneamente pueden ocasionarle a la célula problemas de captación de nutrientes. La adquisición, permanencia y diseminación de plásmidos del IncH le confiere amplias ventajas selectivas a las Enterobacterias portadoras. Además de conferirles protección contra todas las colicinas formadoras de canales, les permite sobrevivir en presencia de telurito y otros metales tóxicos contaminantes, y usualmente presentan multiresistencia a antibióticos. Estos plásmidos son transferibles entre diferentes géneros de bacterias, y el amplio rango de ventajas fisiológicas que le pueden conferir a las bacterias portadoras explica su prevalencia y diseminación entre las *Enterobacteriaceae*. Esta idea es apoyada por resultados recientes de nuestro laboratorio (7), en los cuales se demuestra la presencia de plásmidos del IncH en aislados de diferentes géneros de bacterias Gram-negativas de pacientes internos en diferentes Servicios del Hospital Clínico Universitario de Caracas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por :

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) N° SI-96001306 y LAB 97000677.
- Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) N° 03-33-4000-97, para GA, y CDCH 03-33-3999-97 para VRL.

REFERENCIAS

1. Benedetti, H.; Frenette, M.; Baty, D.; Knibiehler, M.; Pattus, F. and Lazdunski, C. (1991). Individual domains of colicins confer specificity in colicin uptake, in pore-forming and in immunity requirement. *J. Mol. Biol.* 217: 429-439
2. Benedetti, H.; Lloubes, R.; Lazdunski, C. and Letellier, L.(1992). Colicin A unfolds during its translocation in *Escherichia coli* cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. *EMBO J.* 11(2): 441-447.
3. Braun, V.; Pilsel, H. and Grob, P. (1994). Colicins: structure, modes of action, transfer through membranes and evolution. *Arch. Microbiol.* 161: 199-206.
4. Espeset, D.; Piet, P.; Lazdunski, C. and Geli, V. (1994). Immunity proteins to pore-forming colicins: structure-function relationships. *Mol. Microbiol.* 13(6):1111-1120.
5. Gomes C. (1997). Análisis transcripcional del clon pB22 (PacB⁺-Te^r), derivado de pMip233 (InchI3). Tesis de Grado. Fac. Ciencias. UCV.
6. Lakey, J.H.; Van Der Goot, G.F. and Pattus, F. (1994). All in the family: the toxic activity of pore-forming colicins. *Toxicology.* 87:85-108.
7. 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. and Pattus, F. (1988). The membrane channel-forming colicin A: synthesis, secretion, structure, action and immunity. *Biochem. Biophys. Acta.* 947: 445-464.
8. Pedroza R., Ramírez A., Alonso G. and Rodríguez Lemoine V. (1997). Plasmid-encoded resistance to arsenic compounds in Gram-negative bacteria isolated from a hospital environment in Venezuela. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 8: 97-102.
9. Rodríguez Lemoine V., Jacob A.E., Hedges R.W. and Datta N. (1975). Thermosensitivity production of their transfer system by group S plasmids. *J. Gen. Microbiology.* 86:111-114.
10. Rodríguez Lemoine, V. (1980). Reducción de la sensibilidad a la colicina B en cepas de *E. coli* K12 portadoras de plásmidos del grupo de incompatibilidad S. *Acta Cient. Venez.* 31: 561-565.
11. Rodríguez Lemoine, V. (1982). A simple method for detection of conjugative plasmids of the incompatibility group H. *Microbios Letters.* 21: 35-45.
12. Rodríguez Lemoine V. (1992a). The incompatibility complex of H plasmids. *Rev. Latinoamer. Microbiol.* 34:115-127.
13. Rodríguez Lemoine, V. (1992b). PacB, a plasmid-encoded property which confers to *E. coli* K12 resistance to channel-forming-colicins. *Zentralblatt für Bakteriologie* 276:374-379.
14. Rodríguez Lemoine, V. and Guevara Guzmán M. (1992c). Inducible tellurium resistance and the PacB character as traits for the identification of plasmids InchI2 in *Serratia marcescens*. *Biomedical Letters.* 47: 71-77.

15. Vilchez, G., Alonso, G. and Rodríguez Lemoine, V. (1997). Cloning of the PacB-Ter region from plasmid Mip233 (IncHI3), and their expression in *E. coli* Ton, Tol mutants. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 286:1-8.
16. Whelan, K.F., Colleran, E. and Taylor, D.E. (1995). Phage inhibition, colicin resistance and tellurite resistance are encoded by a single cluster of genes on the IncHI2 plasmid R478. *J. Bacteriol.* 177(17):5016-5027.