



TESI DOCTORAL

LA PROTEÏNA TolC DE *Klebsiella oxytoca*

ANNA FENOSA BERNADÓ

Barcelona, Maig 2006



TESI DOCTORAL

LA PROTEÏNA TolC DE *Klebsiella oxytoca*

Memòria presentada per Anna Fenosa Bernadó
per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona



**DEPARTAMENT DE PATOLOGIA I TERAPÈUTICA
EXPERIMENTAL**

Facultat de Medicina

UNIVERSITAT DE BARCELONA

LA PROTEÏNA TolC DE *Klebsiella oxytoca*

Als meus pares i la meua germana.

A l'Albert.

AGRAÏMENTS

Amb aquestes paraules voldria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que han contribuït d'alguna forma en la realització d'aquet treball:

Al Dr. Miquel Viñas, director d'aquesta tesi, per acceptar-me en el seu grup de recerca i donar-me l'oportunitat de realitzar aquest treball d'investigació, per haver-me introduït en l'apassionant món de la microbiologia i sobretot per haver confiat en mi des del primer dia, pels seus consells i ajuda .

A la Dra. Neus Ruiz, per la codirecció d'aquet treball, sempre disposada a escolta'm i ajuda'm, per les seues ensenyances i amistat.

Agrair al Dr. Jordi Hernández la seva gran aportació en la realització d'estructures 3D de la proteïna TolC. Al Dr. Joan Blasi per la seua ajuda en la purificació de proteïnes. A la Dra. Carolina Seco i la Dra. Isabel Barcina per la col·laboració i les seues aportacions en la realització dels estudis proteòmics.

Als meus companys de laboratori, amb los que he compartit tantes hores de feina, la Blanca, el Cèsar, el Guillem, la Lúdia i més recentment la Dra. Tere Vinuesa, per la vostra amistat, ajuda i pels bons moments que hem passat junts i especialment a la Laura, per tot lo que hem viscut tant dins com fora del laboratori, pel teu recolzament personal i sobretot per la teua gran amistat.

A les meues amigues i estimades biòlogues, la Isa, la Noe, la Nuri i la Patri, per tot lo que hem compartit des de que fa 10 anys ens vam conèixer i lo que encara ens falta!! Perquè sempre hau estat al meu costat, tan en los bons moments com en los no tan bons. Moltes gràcies per ser com sou. També als "Xavis" i l'Albert.

A la meua família. Molt especialment als meus pares, per creure i confiar amb mi i donar-me suport en tot lo que he decidit fer, perquè sense el vostre recolzament i esforç perquè jo pogués realitzar els meus estudis lluny de casa tot això no hauria sigut possible. Per estar al meu costat tot i la distància i ajuda'm amb tot lo que he necessitat. I a la meua germana, per tots aquets anys de convivència.

A l'Albert, per estar sempre al meu costat, per confiar amb mi més que jo mateixa i fer-me somriure quan més ho he necessitat. Per la teua paciència, especialment en aquets últims mesos. Gràcies... per tot.

Aquest treball de doctorat ha estat finançat pel projecte SAF 2002-00698 del qual en va ser el investigador principal el Prof. Miquel Viñas. La Universitat de Barcelona va facilitar enormement la realització d'aquesta tesi en concedir-me una beca pre-doctoral durant els anys 2002-2005.

On s'aperçoit que le travail scientifique ne peut pas être réduit à son résultat final : la fécondité véritable réside dans l'activité par laquelle ce travail s'actualise, dans ses contradictions inhérents, ses impasses méritoires, ses degrés successifs d'élaboration.

Nicolas Leskov
(*Le vagabond ensorcelé*)

ÍNDEX

ÍNDEX

ABREVIATURES

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 El gènere <i>Klebsiella</i>	3
1.1.1 Generalitats	3
1.1.2 Taxonomia	5
1.1.3 Factors de patogenicitat	11
1.1.3.1 Antígens capsulars	11
1.1.3.2 <i>Pilis</i> o fimbries	12
1.1.3.3 Lipopolisacàrid	13
1.1.3.4 Sideròfors	13
1.1.4 Infeccions causades per <i>Klebsiella</i>	14
1.1.5 L'espècie <i>Klebsiella oxytoca</i>	16
1.2 Agents antimicrobians i resistència bacteriana	17
1.2.1 Quinolones	20
1.2.1.1 Classificació i estructura	20
1.2.1.2 Principals dianes i mecanismes d'acció de les quinolones	22
1.2.2 Resistència bacteriana als antibiòtics	23
1.2.2.1 Mecanismes de resistència als antibiòtics	25
1.2.2.2 Mecanismes de resistència a les quinolones	28
1.2.2.3 Resistència als antibiòtics en <i>Klebsiella</i> spp.	30
1.2.3 Sinergisme entre els mecanismes de resistència als antibiòtics	31
1.3 La membrana externa dels bacteris Gram negatius	33
1.3.1 Estructura de la membrana externa	34
1.3.2 Les porines	36
1.3.2.1 Estructura general de les porines	37
1.3.2.2 Les porines de <i>Klebsiella</i> spp.	38

1.3.3 El paper de la membrana externa dels bacteris Gram negatius en la resistència als antibiòtics	39
1.4 Els sistemes de reflux	42
1.4.1 Origen i classificació	43
1.4.1.1 Transportadors ABC	46
1.4.1.2 Transportadors secundaris de múltiples antibiòtics	46
1.4.2 Mecanismes d'acció de les bombes de reflux	50
1.4.3 Regulació dels sistemes de reflux RND	54
1.4.4 El paper de TolC en les bombes de reflux	58
2. OBJECTIUS	63
<hr/>	
3. MATERIAL I MÈTODES	67
<hr/>	
3.1 Soques bacterianes	69
3.2 Vectors plasmídics	70
3.3 Medis de cultiu	71
3.3.1 Brou de tristona i soja (TSB)	71
3.3.2 Agar de tristona i soja (TSA)	71
3.3.3 Luria broth (LB)	72
3.3.4 Müller-Hinton broth (MHB)	72
3.3.5 Agar Müller-Hinton (MHA)	72
3.3.6 Agar luria	73
3.3.7 Medi de conservació: TSB amb glicerol	73
3.4 Agents antimicrobians i altres substàncies utilitzades	74
3.4.1 Antibiòtics	74
3.4.2 Altres substàncies	74

3.5	Determinació de la susceptibilitat microbiana als antibiòtics	76
3.5.1	Antibiograma	76
3.5.2	Determinació de la concentració mínima inhibidora	77
3.5.3	Concentració mínima inhibidora amb CCCP	77
3.6	Experiments de reflux	78
3.6.1	Assaig de creixement de <i>Klebsiella</i>	78
3.6.1.1	Corba de creixement	78
3.6.1.2	Assaig d'inhibició del creixement	78
3.6.1.3	Efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement bacterià en presència i absència de CCCP	79
3.6.2	Experiments de fluorimetria	79
3.7	Anàlisi de proteïnes de membrana externa	81
3.7.1	Aïllament de proteïnes de membrana externa (OMP)	81
3.7.2	Visualització d'OMP per electroforesi en gels de poliacrilamida desnaturalitzants	82
3.8	Tècniques d'extracció de DNA	85
3.8.1	Aïllament i purificació de DNA cromosòmic de <i>Klebsiella</i>	85
3.8.2	Aïllament i purificació de DNA plasmídic	88
3.8.2.1	Extracció a petita escala	88
3.8.2.2	Extracció a gran escala	89
3.9	Tècniques de quantificació i visualització del DNA	91
3.9.1	Quantificació de DNA	91
3.9.2	Electroforesi de DNA en gels d'agarosa	91
3.9.3	Recuperació dels fragments de DNA a partir de gels d'agarosa	93
3.10	Tècniques de manipulació de DNA	94
3.10.1	Precipitació de DNA	94
3.10.2	Purificació de fragments de DNA	94
3.10.3	Purificació de productes de PCR	94

3.10.4	Digestió de DNA amb enzims de restricció	95
3.10.5	Desfosforilació de DNA	95
3.11	Amplificació d'un fragment de DNA per la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	95
3.11.1	Amplificació de TolC	98
3.11.2	Amplificació dels gens de les proteïnes AcrA i AcrB	98
3.11.3	Amplificació de la subunitat de la DNA-girasa	99
3.12	Seqüenciació de gens	99
3.13	Comparació i alineació de seqüències	101
3.14	Clonació en vectors plasmídics	102
3.14.1	Lligació de molècules de DNA	102
3.14.2	Transformació de cèl·lules bacterianes	103
3.14.2.1	Obtenció de cèl·lules competents	104
3.14.2.2	Electroporació	104
3.14.2.3	Selecció de transformants	105
3.14.3	Clonació de productes de PCR amb vector comercial	105
3.15	Sobreexpressió en <i>E. coli</i> i purificació de proteïnes	106
3.15.1	Transformació per xoc tèrmic	107
3.15.2	Sobreexpressió i solubilització de proteïnes recombinants	108
3.15.3	Purificació de proteïnes recombinants	108
3.16	Anàlisi proteòmic	109
3.17	Sensibilitat a bacteriocines	110
3.17.1	Producció i purificació de colicines	110
3.17.2	Assaig de sensibilitat	110

3.18 Experiments per mesurar la capacitat formadora de porus:	
<i>Black Lipid Bilayer Technique</i>	111
3.18.1 Mesura de la conductància de canals simples	111
3.18.2 Avaluació de la dependència de voltatge i estudis de selectivitat de canal	113
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	115
4.1 Susceptibilitat microbiana als antibiòtics en <i>Klebsiella</i> spp.	117
4.2 Anàlisi de les proteïnes de membrana externa de les soques clíniques en <i>Klebsiella</i> spp.	126
4.3 Determinació de les seqüències dels gens diana de les fluoroquinolones	128
4.4 Estimació de la implicació de reflux en la resistència a les quinolones	134
4.4.1 Susceptibilitat microbiana als antibiòtics en presència d'un inhibidor metabòlic	134
4.4.2 Assaig d'inhibició del creixement	138
4.4.3 Experiments de fluorimetria	141
4.5 Determinació de la presència de gens de bombes de reflux en soques resistents a fluoroquinolones	145
4.5.1 Presència dels gens de l'operó <i>acrAB</i>	145
4.5.2 Presència del gen de la proteïna TolC	148
4.6 Clonació i seqüenciació del gen <i>tolC</i> de <i>K. oxytoca</i> i estudi de la proteïna TolC	151
4.6.1 Clonació i seqüenciació del gen <i>tolC</i> de <i>Klebsiella oxytoca</i>	151
4.6.2 Estudi d'un model estructural de la proteïna TolC	157

4.7	Estudis fisiològics de la proteïna TolC de <i>K. oxytoca</i>	163
4.7.1	Anàlisi proteòmic	163
4.7.2	Participació de la proteïna TolC en el reflux de quinolones	165
4.7.2.1	Efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement bacterià en presència i absència de CCCP	165
4.7.2.2	Assaig d'inhibició del creixement	169
4.7.2.3	Experiments de fluorimetria	171
4.7.3	Purificació de la proteïna TolC de <i>K. oxytoca</i>	173
4.7.4	Paper de TolC com a receptor de bacteriocines	177
4.7.5	Experiments de conductància aplicant la tècnica aplicant la tècnica de <i>Black Lipid Bilayer</i>	180
4.7.5.1	Anàlisi de la conductància de canal produït per la porina TolC de <i>Klebsiella oxytoca</i>	181
4.7.5.2	Mesura del potencial de membrana a corrent zero	182
4.7.5.3	Avaluació de la dependència de la conductància en funció de concentració d'electròlits	183
5.	RESUM I CONCLUSIONS	185
6.	BIBLIOGRAFIA	189

ABREVIATURES

A	adenina
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ADP	Adenosina-5'-difosfat
ATP	Adenosina-5'-trifosfat
C	citosina
CCCP	Carbonil Cianida m-Clorofenilhidrazona
Da	Daltons
DME	<i>Drug-Metabolite Efflux</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTP	Dideoxinucleòtid
DO	Densitat òptica
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
<i>et al.</i>	i col·laboradors
G	guanina
IPTG	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranòsid
Kb	Quilobases (1Kb = 1000 pb)
kDa	QuiloDaltons (1 kDa = 1000 Daltons)
LPS	Lipopolisacàrid
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MDR	Bombes de reflux de resistència a múltiples antibiòtics (<i>Multi Drug Resistance</i>)
ME	Membrana externa
MFP	<i>Membrane Fusion Protein</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
NBD	<i>Nucleotide-Binding Domain</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
ORF	Pauta de lectura oberta (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	parells de bases
PBS	Solució salina amb fosfat (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR	Reacció en cadena de la DNA polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pI	Punt isoelèctric
Pi	Fosfat
q.s.q	quantitat suficient per

QRDR	Regió determinant de la resistència a les quinolones (<i>Quinolone Resistance Determining Region</i>)
RNA	Àcid ribonucleic
RNAr	RNA ribosòmic
RNAsa	Ribonucleasa
RNA _t	RNA transferència
RND	<i>Resistance-Nodulation-Cell Division</i>
rpm	revolucions per minut
SDS	Dodecil sulfat sòdic (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Gel acrilamida/bisacrilamida
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
SMT	<i>Secondary Multidrug Transporters</i>
subps.	Subespècie
T	timina
TAE	Tris-Acetata-EDTA
Tag	Polimerasa termoresistent de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampó Tris-EDTA
TMD	<i>Transmembrane Domain</i>
Tris	Trihidroximetilaminometà
u	Unitats
UCI	Unitat de Cures Intensives
UVI	Unitat de Vigilància Intensiva
v/v	Volum per volum
w/v	Pes per volum
X-Gal	5-bromo-4-clor-3-indolil- β -D-galactopiranosid

1. INTRODUCCIÓ

1.1 EL GÈNERE *Klebsiella*

1.1.1 GENERALITATS

La primera observació d'un microorganisme del gènere *Klebsiella* la va realitzar l'alemany Edwin Klebs l'any 1875 en mostres de secrecions bronquials de malalts que havien mort de pneumònia. No va ser fins uns anys més tard, en 1881, que fou descrit i identificat per Antoni von Frish, quan es referí a un bacil capsulat que havia observat en mostres de malalts amb rinoscleroma. Aquest microorganisme, va ser anomenat *Klebsiella* per Trevisan l'any 1885, en honor al microbiòleg que el va observar per primera vegada, Edwin Klebs (1834-1913). L'espècie tipus d'aquest gènere és *K. pneumoniae*, que va ser descrita per Schoroeter en 1886 i per Trevisan en 1887.

El gènere *Klebsiella* pertany a la família dels enterobacteris. Està constituït per bacils Gram negatius, amb una mida aproximada de 0.3-1 µm de diàmetre i 0.6-6.0 µm de llargada. Normalment es troben aïllats, però en algunes ocasions els podem trobar en parelles o formant petites cadenes de poca longitud, característica general de la família dels enterobacteris [1].

Estructuralment, al tractar-se de bacteris Gram negatius, presenten el citoplasma envoltat per una membrana citoplasmàtica o interna, el glicopèptid, l'espai periplasmàtic i una membrana externa. Algunes soques poden presentar fimbries o pilis, però no flagels, ja que són microorganismes immòbils.

Es tracta de microorganismes no esporulats, anaerobis facultatius amb un metabolisme facultatiu, fermenten la glucosa amb producció d'àcid i gas, i moltes soques produeixen 2,3-butanodiol com a producte principal [2]. Són oxidasa negatius i catalasa positius, poc exigents pel que fa la seva nutrició ja que poden utilitzar diferents substàncies com a font de carboni i d'energia. La temperatura òptima de creixement de *Klebsiella*, a l'igual que la resta d'enterobacteris, és troba entre 30-37°C, tot i que l'espècie *K. oxytoca* pot arribar a créixer a 10°C [3]. Moltes soques poden utilitzar el citrat i la glucosa com a única font de carboni, sintetitzen l'enzim lisina descarboxilasa però no l'enzim ornitina descarboxilasa i normalment són positius en la prova Voges-Proskauer [4, 5].

Els membres del gènere *Klebsiella* es caracteritzen per ser capsulats. La seva càpsula està constituïda per un complex d'àcids polisacàridics formant una estructura molt gruixuda que és la responsable de l'aparença mucosa de les colònies quan creixen en medi sòlid; les colònies tenen una mida d'uns 3-4 mm i són de color groguenc (figura 1.1.c) [6]. Tot i això, l'aspecte de les colònies és variable segons l'espècie i les condicions de creixement. Tot i ser fonamentalment d'origen clínic són soques fixadores de nitrogen. A la natura és molt comú que les soques fixadores de nitrogen es trobin associades a plantes, a les quals no provoquen malalties. S'ha suggerit que les plantes podrien ser reservoris de *Klebsiella* oportunistes en humans [7].

La figura 1.1. mostra diverses imatges de *Klebsiella* al microscopi òptic, microscopi electrònic i un cultiu en placa.

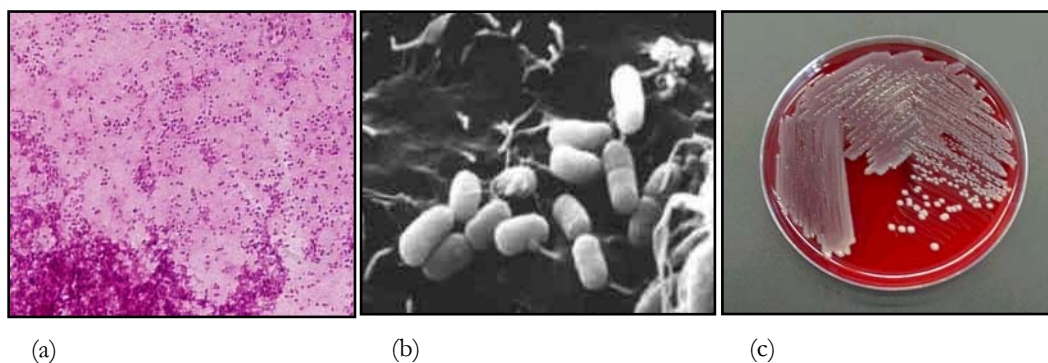


Fig. 1.1. (a) Imatge de *Klebsiella oxytoca* per microscòpia òptica després d'una tinció Gram. (b) Imatge de *Klebsiella pneumoniae* obtinguda mitjançant microscòpia electrònica de rastreig. (c) Imatge de colònies de *K. oxytoca* crescudes en agar sang.

Klebsiella spp. es troba a la natura en dos hàbitats diferents: al medi ambient, en aigües residuals i superficials, en els sòls i sobre vegetals; i colonitzant les superfícies de les mucoses dels animals mamífers [1]. En aquest aspecte *Klebsiella* és molt semblant a *Enterobacter* i *Citrobacter*, però diferent de *Shigella* spp. o *E. coli* els quals són comuns en les mucoses dels humans però és difícil trobar-los en el medi ambient. En humans, *Klebsiella* és present com a sapròfit a la nasofaringe, el tracte intestinal, el tracte urogenital i el tracte biliar [8, 9]. Podem trobar uns índex totals de *Klebsiella* entre el 5 i el 38% en femtes i entre 1 i un 6% en la nasofaringe. Aquests índex varien dràsticament quan ens centrem en

l'ambient hospitalari on els índex en femtes poden arribar al 77% i un 19% en la nasofaringe [1].

1.1.2 TAXONOMIA

L'ordenació de *Klebsiella* ha experimentat grans variacions en la nomenclatura al llarg dels anys. Històricament, les espècies de *Klebsiella*, com les de molts altres bacteris, s'establiren basant-se en la seva patologia o el seu origen. La primera classificació es realitzà tenint en compte la importància mèdica, el que va portar a dividir el gènere en tres espècies segons les malalties que causaven: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* i *K. rhinoscleromatis* [1, 7]. Aquesta taxonomia ha estat revisada moltes vegades degut, especialment, al desenvolupament de noves tecnologies i nous mètodes d'identificació com la taxonomia numèrica.

A principis dels anys 80 s'aïllà *Klebsiella* del medi ambient, la qual havia estat prèviament definida com a “*Klebsiella-like organisms*” per Gavini *et al.* el 1977, això va fer modificar la classificació ja existent, augmentant amb quatre noves espècies les acceptades fins aquell moment. Les noves espècies s'anomenaren: *K. terrigena* (Izard *et al.*, 1981), *K. ornithinolytica* (Sakazaki *et al.*, 1989), *K. planticola* (Bahley *et al.*, 1981) i *K. trevisanii* (Ferragut *et al.*, 1983). L'any 1986, Gavini i col·laboradors, gràcies a noves tècniques, van demostrar que les espècies *K. trevisanii* i *K. planticola* eren homòlogues en les seves seqüències de DNA i es van unir en una única espècie, *K. planticola*. Finalment, l'any 1999, Carter *et al.* van transferir *Calymmatobacterium granulomatis* dins el gènere *Klebsiella* responnent a estudis de les seqüències dels gens RNA 16S i *phoE* i va ser classificada com a *K. granulomatis* [1, 4].

En alguns textos, l'espècie *Enterobacter aerogenes* s'inclou com a membre del gènere *Klebsiella* i és anomenat *Klebsiella mobilis*. Però s'intenta evitar introduir aquesta espècie dins d'aquest gènere ja que es tracta d'una espècie mòbil i el gènere *Klebsiella* es caracteritza per ser immòbil [3, 10].

L'adopció d'una nomenclatura definitiva sembla complicada i molts països difereixen en aquest punt. La gran majoria de països europeus segueixen la classificació americana establerta per Ørskov en 1984 i que es troba en la última edició del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, on el gènere *Klebsiella* es divideix en cinc espècies: *K.*

pneumoniae, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola* i *K. ornithinolytica* i on l'espècie *K. pneumoniae* comprèn tres subespècies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozzaenae* i *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* [1, 4]. Les espècies del gènere *Klebsiella*, segons la classificació de Ørskov, s'identifiquen i es diferencien entre elles pels resultats obtinguts de proves bioquímiques, les quals estan representades en la taula 1.1.

La majoria d'espècies de *Klebsiella* poden ser identificades sense massa problemes amb proves microbiològiques estàndards, les espècies *K. terrigena* i *K. planticola* requereixen unes proves especials basades en reaccions no convencionals com la capacitat d'utilitzar m-hidroxi-l-prolina i de degradar el pectat, per poder ser diferenciades [1]. Aquesta classificació, basada en característiques fenotípiques i bioquímiques, divergeix molt dels resultats obtinguts en els últims anys amb tècniques d'hibridació DNA-DNA [4].

En els darrers anys, estudis d'investigació basats en les seqüències de RNAr 16S i del gen *rpoB* junt amb estudis d'hibridació DNA-DNA, han posat de manifest que *Klebsiella* és un gènere polifilètic, això ha obligat a reconstituir la filogènia d'aquest gènere [11].

Taula 1.1. Identificació bioquímica de les diferents espècies del gènere *Klebsiella* [2].

Característiques	<i>K. pneumoniae</i>			<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
	<i>pneumoniae</i>	<i>ozaenae</i>	<i>rhinoscleromatis</i>				
Indol	-	-	-	+	-	V	+
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-	+
Lisina descarboxilasa	+	V	-	+	+	+	+
Degradació pectat	-	-	-	+	-	-	-
Gas a partir de lactosa a 44.5°C	+	-	-	-	-	-	-
Creixement a 10°C	-	-	-	+	+	+	+
Formació d'àcid:							
D-Melezitosa	-	-	-	V	+	-	-
L-Sorbosa	V			+	+	+	
Utilització de:							
m-Hidroxibenzoat	-	-	-	+	+	-	-
Hidroxi-l-prolina	V			V	V	+	
Malonat	+	-	+	+	+	+	+
Roig de Metil	-	+	+	-	+	V	+
Voges-Proskauer	+	-	-	+	+	+	+

V (variable); + (el 90% o més de les soques són positives); - (el 90% o més de les soques són negatives)

Segons la nova classificació proposada per Drancourt *et al.* en 2001, el gènere *Klebsiella* consistiria en tres línies filètiques molt relacionades amb altres membres dels enterobacteris com *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia* i *Tatumella*. Dividirien el gènere en tres *clusters*. El *Cluster I* estaria constituït per les tres subespècies de *Klebsiella pneumoniae* (subsp. *pneumoniae*, *rhinoscleromatis* i *ozaenae*) i *K. granulomatis*; en el *Cluster II* s'inclourien les espècies *K. planticola*, *K. terrigena* i *K. ornithinolytica* i, finalment, el *Cluster III* contindria únicament l'espècie *K. oxytoca*. Només les espècies del *Cluster II* presenten la capacitat de créixer a baixes temperatures i amb presència de L-sorbose i histamina, són espècies característicament ambientals, ja que es troben de forma natural recobrint les plantes, en el sòl o en l'aigua, mentre que la resta es troben en les mucoses dels mamífers. Aquestes característiques ecològiques i fenotípiques junt amb tècniques filogenètiques basades en el gen *rpoB*, ha posat de manifest la separació al llarg de l'evolució del *Cluster II* respecte de la resta, el que ha portat a la transferència d'aquestes espècies a formar un nou gènere independent de *Klebsiella*, el gènere *Raoultella* [4, 11].

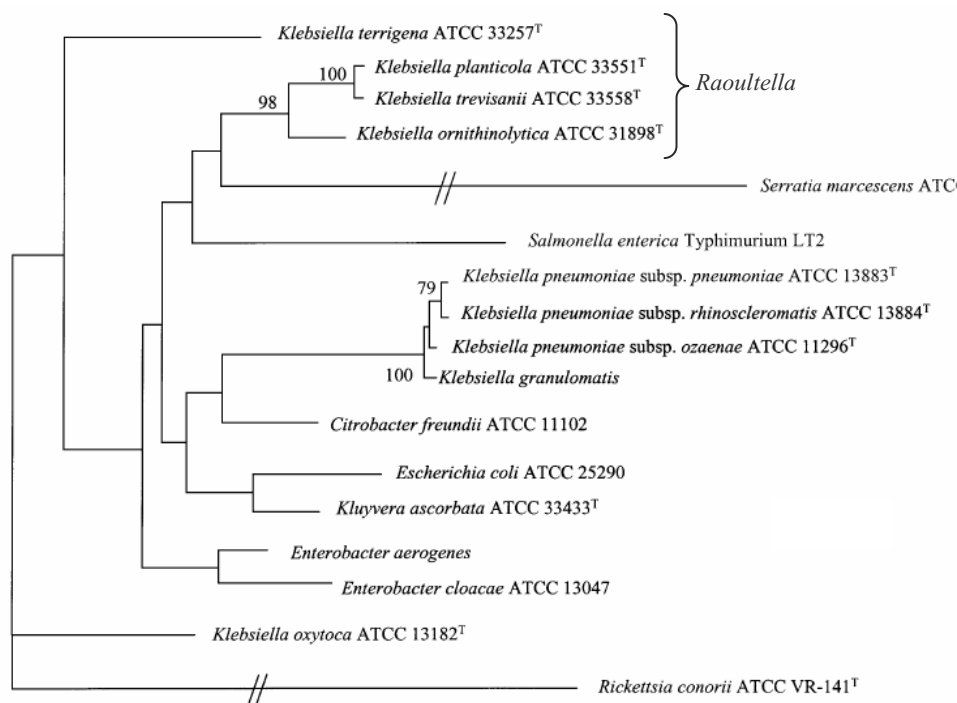


Figura 1.2. Arbre filogenètic derivat de la seqüenciació parcial del gen *rpoB* de membres de diversos gèneres de la família *Enterobacteriaceae* incloent nou espècies de *Klebsiella* (reproduït de [4]).

Estudis realitzats a principis del 2004, d'homologia DNA-DNA i comparació de seqüències de nucleòtids dels gens *rpoB*, *gyrA*, *infB*, *mdh* i *phoE* que codifiquen distintes funcions com enzims implicats en la replicació del DNA, enzims citoplàsmics com la malat deshidrogenasa, transportadors de membrana externa, etc. I que per tant, són representatius en certa forma del genoma del bacteri, entre d'altres, han permès identificar el que podria ser una nova espècie del gènere *Klebsiella*, la qual seria anomenada *K. variicola*. [3, 11]. En la taula 1.2. està representada la nova classificació del gènere *Klebsiella* proposada per Drancourt, incloent-hi la nova espècies descrita en l'últim any, comparada amb la classificació proposada per Ørskov.

Taula 1.2. Classificació de les espècies del gènere *Klebsiella* segons dos sistemes taxonòmics.

Ørskov (<i>Bergey's</i>)	Drancourt
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
subsp. <i>pneumoniae</i>	subsp. <i>pneumoniae</i>
subsp. <i>ozaenae</i>	subsp. <i>ozaenae</i>
subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. terrigena</i>	<i>K. terrigena</i> (<i>Raoultella terrigena</i>)
<i>K. planticola</i> (syn. <i>K. Trevisanii</i>)	<i>K. planticola</i> (syn. <i>K. Trevisanii</i>) (<i>Raoultella planticola</i>)
<i>K. ornithinolytica</i>	<i>K. ornithinolytica</i> (<i>Raoultella ornithinolytica</i>)
	<i>K. granulomatis</i> (<i>Calymmatobacterium granulomatis</i>)
	<i>K. variicola</i> (pendent acceptació)

Al novembre de 2004, Li *et al.*, van proposar una nova espècie dins aquest gènere, *Klebsiella singaporiensis*. La individualització d'aquest taxó respon a les diferències en la seqüència dels gens *rpoB* i de l'RNAr 16S, al valor del percentatge de G+C i als resultats obtinguts de la hibridació DNA-DNA [3]. Aquesta espècie de moment no ha estat acceptada pels comitès corresponents.

Des del punt de vista epidemiològic, sovint és necessari determinar i identificar les soques causants d'infeccions nosocomials endèmiques o epidèmiques amb l'objectiu de determinar el serotip causant del brot infecció. Hi ha una gran varietat de mètodes que poden ser utilitzats per tipificar les soques de *Klebsiella* causants de les infeccions[1, 9], els més importants són:

- **Biotipatge.** Mètode basat en proves i medis bioquímics. És el tipatge més utilitzat en laboratoris petits que no estan ben equipats per fer epidemiologia. Es basa en la utilització combinada de sistemes com l'API 20E amb proves en tub d'assaig.
- **Serotipatge.** Mètode més utilitzat en la tipificació de *Klebsiella*. Es basa en la variabilitat estructural dels polisacàrids capsulars (antigen K) i els lipopolisacàrids (antigen O). Fins al moment s'han descrit 85 antígens de superfície: 77 corresponents a l'antigen K i 8 a l'antigen O.
- **Tipatge mitjançant fags.** Mètode desenvolupat als anys 60, de fàcil lectura i reproducible. Tot i que no és molt eficaç es pot utilitzar en combinació amb la serologia.
- **Tipatge per bacteriocines.** Mètode utilitzat per realitzar anàlisis epidemiològics més precisos. Les bacteriocines són substàncies bacterianes, normalment proteïnes, que produeixen els bacteris per inhibir el creixement d'altres bacteris, generalment de la mateixa espècie o d'espècies properes. La limitació principal d'aquest mètode, és la inestabilitat de les bacteriocines en el laboratori.
- **Tipatge per mètodes moleculars.** Les primeres descripcions d'aquest mètode es basen en els plasmidis, els ribotips, l'anàlisi d'enzim multilocus (MLE) i la electroforesi en camp pulsant (*pulsed-field electrophoresis*). No hi ha una estandardització general d'aquests mètodes i cada laboratori té els seus propis procediments la qual cosa dificulta les comparacions i els estudis multicèntrics.

1.1.3 FACTORS DE PATOGENICITAT

K. pneumoniae i *K. oxytoca* són les dues espècies del gènere *Klebsiella* que més freqüentment causen infeccions en humans. Les infeccions que causen afecten majoritàriament el tracte respiratori i urinari. En tractar-se de llocs d'infecció que difereixen considerablement pel que respecta a la resposta immunològica, tot fa pensar que l'origen dels factors de virulència de les soques de *Klebsiella* causants de les infeccions urinàries són diferents dels observats en les soques aïllades en les infeccions del tracte respiratori de malalts amb pneumònia [1].

En la recerca que s'ha realitzat durant molts anys sobre els mecanismes de patogenicitat i virulència de *Klebsiella* s'ha identificat un gran nombre de factors bacterians que hi contribueixen [12]. L'acció conjunta de diversos d'aquests factors és el que dona la patogenicitat a *Klebsiella*, permeten que pugui entrar i multiplicar-se dins la cèl·lula hoste i al mateix temps resistir el sistema immunitari o simplement no estimular-lo.

1.1.3.1 Antígens capsulars

Els microorganismes del gènere *Klebsiella*, generalment, estan envoltats per una càpsula formada per àcids polisacàridics complexos. Es tracta de repeticions de subunitats formades per quatre o sis sucres i sovint, per àcids urònics. La càpsula és essencial per a la virulència de *Klebsiella* i ha permès classificar el gènere en 77 tipus serològics, molt utilitzats en investigacions epidemiològiques [5]. La càpsula forma unes envoltures gruixudes que protegeixen al bacteri de la fagocitosis evitant que sigui destruït pels factors serològics. Es creu que el mecanisme molecular consisteix en inhibir l'activació dels components del complement evitant la interacció entre les opsonines del complement i els receptors del complement de la cèl·lula fagocítica [1]. D'altra banda, la càpsula actua emmascarant les proteïnes de la superfície bacteriana que són reconegudes per la molècula C3 en la cascada del complement [13]. La inhibició sembla afectar tant la via clàssica com l'alternativa d'activació del complement. Es creu que aquest polisacàrid capsular també participa en les últimes etapes d'adhesió i colonització de la cèl·lula hoste [12].

Es considera que la càpsula és el major factor de virulència de *Klebsiella* ja que existeix una gran diferència en la virulència depenent del tipus de càpsula [6]. S'han realitzat estudis on es demostra una correlació entre el tipus de càpsula i la major o menor virulència de *Klebsiella*, les soques que expressen els antígens capsulars K1 i K2 són especialment virulents, essent K2 l'antigen més trobat en pacients amb infeccions del tracte urinari, pneumònia i bacterièmia. Mentre que els antígens K7 i K21 són considerats els menys patogènics. Hi ha antígens que són específics d'algunes subespècies com l'antigen K4, trobat exclusivament en *K. pneumoniae* subsp. *ozzaenae* [1, 14].

1.1.3.2 *Pilis* o *fimbries*

El primer pas, i el més crític en el procés d'infecció d'un microorganisme, és la capacitat d'unió a la superfície mucosa i mantenir-la mentre es produeix l'atac. Aquesta capacitat d'adherència és una propietat molt comú en els enterobacteris i generalment es produeix gràcies a la presència de diferents tipus de pilis, també coneguts com fimbries. Es tracta de projeccions filamentoses no flagel·lars que surten de la superfície bacteriana i permeten la unió a cèl·lules eucariotes a través de receptors específics [1]. Tenen una llargada aproximada de 10 µm i un diàmetre de 1-11 nm i estan formats per subunitats de proteïnes globulars amb un pes molecular de 15-26 kDa (pilines). Dels diversos tipus de *pili* descrits en les enterobacteris, *Klebsiella* en produeix bàsicament dos:

- ***Pili* Tipus 1:** La seva rellevància en la virulència bacteriana és la capacitat d'unir-se als trisacàrids de manosa de les glicoproteïnes de les cèl·lules epitelials i mucoses del tracte urogenital, respiratori i intestinal de l'hoste. Es creu que aquest *pili* està implicat en les infeccions causants de pielonefritis i pneumònia. El gen que codifica per aquest tipus de *pili*, *mrkD*, es troba de forma més freqüent en *Klebsiella* [15].
- ***Pili* Tipus 3:** Originàriament només es descriu la seva capacitat per adherir-se a arrels de plantes. Més endavant es demostrà la seva capacitat d'adhesió a cèl·lules humanes endotelials i epitelials del tracte respiratori i a cèl·lules uroepitelials. El paper d'aquest tipus de *pili* en el procés de patogenicitat encara és força desconegut. El gen que codifica per a la major subunitat d'aquesta fimbria (*mrkA*) es troba molt conservat en el gènere *Klebsiella* i en la gran majoria d'enterobacteris [15].

1.1.3.3 Lipopolisacàrid (LPS)

El lipopolisacàrid és una molècula glicolipídica situada a la part externa de la membrana externa de la majoria dels bacteris Gram negatius, està formada pel lípid A, una part central formada per lípids i sucres poc usuals anomenada nucli (*core*) i cadenes més o menys llargues d'oligosacàrids que es projecten cap a l'exterior (antigen O). En *Klebsiella*, fins al moment, s'han descrit diverses estructures d'antigen O que poden ser diferenciades per mètodes immunològics, donant lloc als nou serotips actuals: O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 i O12, essent l'antigen O1, el més trobat en aïllaments clínics [16].

Aquest factor de patogenicitat actua de dues formes. En primer lloc, el lípid A provoca una activació dels macròfags que indueix a una resposta inflamatòria donant lloc a un efecte pirogen. Per altra banda l'antigen O facilita el procés inicial d'adhesió i confereixen resistència al bacteri contra l'activitat bactericida del sèrum. Aquest últim aspecte, és possiblement, el més important [1]. Hi ha cadenes laterals O del LPS que no queden cobertes per la càpsula i són reconegudes pel component C3b del complement, aquest al unir-se bàsicament a les cadenes més llargues queda massa lluny de la membrana bacteriana i no podrà formar el complex d'atac a la membrana, impeding, en última instància, que es formi el porus que donaria lloc a la mort del bacteri.

1.1.3.4 Sideròfors

El creixement dels microorganismes dins l'hoste, no només està limitat pels mecanismes de defensa, sinó també per la capacitat que té el bacteri d'adquirir nutrients essencials pel seu creixement com el ferro. La quantitat de ferro lliure en l'hoste que pot ser utilitzat pels bacteris és molt baixa, ja que en gran part, està unit de manera estable a proteïnes com l'hemoglobina, la ferritina, l'hemosiderina i la mioglobina i extracel·lularment amb la lactoferrina i la transferrina. La majoria de bacteris patògens secreten uns captadors de ferro de baix pes molecular capaços de competir amb les proteïnes de la cèl·lula hoste, que es coneixen com a sideròfors [9].

En els enterobacteris s'han descrit dos grups químics diferents de sideròfors, els de tipus fenolat i els de tipus hidroxiamat. El més conegut en *Klebsiella* i el que produeixen gairebé totes les soques, és l'enterobactina, que pertany als sideròfors fenolat. Es tracta d'un trímer cíclic 2,3-dihidroxi-benzol-serina amb gran afinitat pel ferro, però no s'ha pogut demostrar clarament que tingui un paper essencial en les infeccions de *Klebsiella*. Un altre de ben conegut és l'aerobactina, sideròfor hidroxiamat, on la relació entre la seva presència i les infeccions ha estat ben demostrada. Tot i això, soques no sintetitzadores d'aerobactina són capaces d'utilitzar-la com a font de ferro ja que expressen receptors d'aquest sideròfor [1].

1.1.4 INFECCIONS CAUSADES PER *Klebsiella*

Klebsiella no havia estat considerada tradicionalment com un gènere especialment patògen per a l'home però, potser degut al increment de l'ús d'antibiòtics i a la utilització de processos diagnòstics més agressius, en els últims anys el seu paper com agent etiològic responsable de patologies ha anat augmentant, sobretot en l'ambient hospitalari.

En l'actualitat, *Klebsiella* es troba entre els cinc bacteris Gram negatius patògens més freqüent en les infeccions hospitalàries [10]. La gran majoria d'infeccions causades per *Klebsiella* estan associades a l'hospitalització, encara que en el continent asiàtic i africà persisteixen com a importants causants de diverses malalties adquirides en la comunitat [17]. Com a patògens oportunistes que són, les espècies del gènere *Klebsiella* infecten principalment a individus immunodeprimits que estan hospitalitzats i pateixen importants malalties subjacents com pot ser la *diabetes mellitus* o l'obstrucció pulmonar crònica. La gran majoria d'aquestes infeccions estan associades a la utilització de catèters i drenatges [8].

Els bacteris del gènere *Klebsiella* es troben cada vegada amb més freqüència associats a septicèmia, pneumònia i infeccions urinàries intrahospitalàries. S'estima que el 8% d'aquestes infeccions als Estats Units i Europa són causades per *Klebsiella*, principalment per les espècies *K. pneumoniae*, que representa el 75% de les soques aïllades i *K. oxytoca* el 25% restant. Aquestes dades fan que el gènere *Klebsiella* se situï entre els vuit patògens infecciosos més importants en hospitals, essent el causant del 3% dels brots epidèmics [1, 18].

Aquest microorganisme té la capacitat de colonitzar les mucoses dels mamífers i en humans es troba als epitelis de nas, faringe i tracte intestinal [7]. L'espècie *K. pneumoniae* és considerada una de les principals causants de la pneumònia bacteriana adquirida, produint necrosi, inflamació i hemorràgies en els teixits pulmonars [19]. Juntament amb *K. oxytoca*, aïllada en pacients hospitalitzats en menor grau que *K. pneumoniae*, són les causant d'altres tipus d'infeccions com infeccions urinàries, infeccions del tracte respiratori baix, infeccions biliars, infeccions hepàtiques, bacterièmies, septicèmies, meningitis, infeccions intra-abdominals, etc. També s'ha associat a artritis en humans, rinitis crònica atròfica i fins hi tot a diarrees hemorràgiques [9]. En la taula 1.3. estan enumerades les infeccions nosocomials més freqüents causades per aquest gènere.

Taula 1.3. Infeccions bacterianes adquirides en hospitals causades per *Klebsiella* spp.

Infeccions	% infecció causades per <i>Klebsiella</i>
Infecció del tracte urinari	6-17
Pneumònia	7-14
Septicèmia	4-15
Infeccions nosocomials (UCI i UVI)	4-17
Septicèmia neonatal	3-20
Infeccions en ferides	2-4

Els individus hospitalitzats portadors de sondes urinàries són els més propensos a patir infeccions del tracte urinari causades per *Klebsiella*, donant lloc a pielonefritis i cistitis, s'estima que el 6-17% d'aquest tipus d'infeccions són causades per aquest gènere. Els alcoholics i les persones amb una funció pulmonar alterada tenen un risc més gran de presentar pneumònia causada per *K. pneumoniae* degut a la incapacitat per eliminar del tracte respiratori inferior les secrecions orals aspirades, això fa que es produeixi una destrucció necròtica dels espais alveolars i la formació de cavitats. A més és el segon gènere amb importància en les septicèmies nosocomials causades per bacteris Gram negatius darrera d'*E. coli* i en les infeccions pediàtriques poden portar molts problemes especialment en nadons prematurs que es troben en unitats de cures intensives [1].

Els principals reservoris per a la transmissió de *Klebsiella* en els hospitals són el tracte gastrointestinal dels pacients i les mans del personal hospitalari. El percentatge d'aquests individus portadors de *Klebsiella* ha augmentat radicalment en l'ambient hospitalari els últims anys, i la colonització del pacient s'ha associat significativament a l'ús d'antibiòtics, el que ha portat a l'aparició de soques multiresistents (resistència a un gran nombre i varietat d'agents antimicrobians) [20]. Als anys setanta les soques multiresistents ho eren als aminoglicòsids, però a partir dels anys vuitanta van començar a aparèixer soques productores de β -lactamases d'ampli espectre (ESBLs), conferint fins i tot, resistència a les cefalosporines de tercera generació. Tot això ha portat a que hagi augmentat el interès en l'estudi més detallat de la virulència i la susceptibilitat als antimicrobians de *Klebsiella*.

1.1.5 L'ESPÈCIE *Klebsiella oxytoca*

L'estat taxonòmic de *Klebsiella oxytoca* ha estat motiu de debat durant tota la seva història. Aquest microorganisme va ser descrit per primera vegada per Flügge, l'any 1886 i durant molt temps s'havia considerat una subespècie de *K. pneumoniae*. Les tècniques d'hibridació de DNA van demostrar que eren dues espècies completament independents [21]. L'existència de *K. oxytoca* i el seu nivell en taxonomia és controvertit ja que estudis filogenètics han posat de manifest que aquest taxó forma un grup diferent a la vegada de *K. pneumoniae* i de les espècies del possible gènere *Raoultella*. Segons Drancourt *et al.* [4], *K. oxytoca* podria justificar la creació d'un nou gènere, però això encara requerirà la producció de més dades. L'espècie *K. oxytoca* és molt heterogènia i segons Granier *et al.* [22] s'hauria de dividir en tres grups genètics, en canvi Boye i Hansen [10], afirmen que s'hauria de dividir en deu subespècies a causa de l'heterogeneïtat que presenta.

Aquest microorganisme forma part de la flora intestinal normal però de forma general no es busca en coprocultius com a causant d'infeccions. Es troba en un 30-40% dels casos en la flora normal humana. Les seves característiques generals són idèntiques a *K. pneumoniae* exceptuant en la transformació del triptòfan a indol on, *K. oxytoca*, és positiu.

Klebsiella oxytoca és un patogen oportunista involucrat en diverses infeccions nosocomials causant, principalment, infeccions urinàries i septicèmies. També es creu que podria estar involucrat en la diarrea i dolor abdominal associada a tractaments antibiòtics donant un quadre clínic molt semblant al produït per la toxina A de *Clostridium difficile* [22]. És molt important en les bacterièmies en nadons, especialment els prematurs que es troben en la unitat de cures intensives, essent un dels quatre patògens principals causants d'infeccions neonatals i el segon bacteri Gram negatiu causant de bacterièmies neonatals. Les infeccions causades per *K. oxytoca* representen un 13-25% de les totals causades per aquest gènere. Tot i que en les infeccions hospitalàries s'ha observat en menor freqüència que *K. pneumoniae*, la qual causa el 75-86%, s'ha de tenir molt en compte en malats amb *diabetes mellitus*, problemes respiratoris crònics i en nadons prematurs, on la freqüència de les infeccions per aquest microorganisme augmenten [10, 23]. A més, les soques de *K. oxytoca* amb una hiperproducció de β -lactamasa A cromosòmica estan augmentant i actualment representen un 10-20% de les soques clíniques aïllades a Europa [21].

1.2 AGENTS ANTIMICROBIANS I RESISTÈNCIA BACTERIANA

El descobriment dels antibiòtics ha estat una de les revolucions més espectaculars en la medicina del segle XX. L'administració de substàncies químiques en el tractament de malalties infeccioses ja es realitzava al segle XVII, però no va ser fins a finals del segle XIX que Paul Ehrlich va començar a buscar substàncies químiques de síntesi que tinguessin toxicitat selectiva pels microorganismes. El gran avenç es va produir l'any 1940 quan dos científics britànics, H. W. Florey i E. B. Chain, demostraren que la penicil·lina, descoberta per Fleming l'any 1929, podia ser utilitzada com una substància quimioteràpica efectiva i fou el primer antibiòtic comercialitzat amb us clínic. Des d'aleshores s'han descobert i sintetitzat gran quantitat d'agents antimicrobians efectius en el tractament de malalties infeccioses i han permès, des de finals dels anys 40, vèncer infeccions que abans eren incurables com pneumònies, meningitis, tuberculosi, sífilis, etc.

Inicialment, es denominà antibiòtic a tota substància produïda per microorganismes amb capacitat d'inhibir el creixement d'altres microorganismes. Aquesta definició també inclouria substàncies com àcids, alcohols o peròxid d'hidrogen que en sentit estricte, no es poden considerar antibiòtics. Actualment, es denomina antibiòtic a tota substància natural, sintètica o semisintètica amb efecte antimicrobià, que actuï o exerceixi la seva acció a nivell molecular, en un procés metabòlic o en una estructura concreta d'un microorganisme [24]. En l'actualitat el terme antibiòtic va deixant pas al de “agents antimicrobians” més adient per la naturalesa de les substàncies que s'utilitzen com a tal.

La característica més important d'un antibiòtic és la seva toxicitat selectiva davant els microorganismes que originen les infeccions, essent innocu per a la cèl·lula hoste. La toxicitat selectiva s'aconsegueix gràcies a les diferències intrínseques existents entre l'hoste i l'organisme invasor. D'aquesta manera es poden crear antibiòtics contra els bacteris ja que aquests actuaran sobre estructures o processos bacterians que bé són diferents o no es troben en les cèl·lules eucariotes [25]. La figura 1.3. mostra de forma esquemàtica la classificació dels antibiòtics segons les estructures bacterianes on actuen.

D'acord amb el patró de sensibilitat o resistència natural dels microorganismes, els antibiòtics poden classificar-se en agents d'ampli espectre o agents d'espectre reduït. Els antibiòtics d'**espectre reduït**, tan sols afecten a un grup concret de microorganismes, actuen específicament sobre els microorganismes sensibles i no són actius davant la major part de la microbiota que protegeix el cos humà. En canvi, els antibiòtics d'**ampli espectre** són actius davant de microorganismes tan Gram positius com Gram negatius i poden alterar de forma significativa la flora bacteriana de l'home, permetent que altres microorganismes colonitzin i causin sobreinfecció [26].

Inhibició de la síntesi de peptideglicà:

- Inhibidors de la síntesi de precursors en el citoplasma: *Fosfomicina*
- Inhibidors del transport de precursors: *Bacitracina*
- Inhibidors de l'ensamblatge: *glicopèptids* (*Vancomicina*) i β -lactàmics (*Penicil·lins*, *Cefalosporines*, *Monobactames* i *Carbapenems*).

Inhibidors de la síntesi d'àcid nucleic:

- Inhibidors de la DNA girasa: *Quinolones* (*àcid nalidíxic*, *norfloxacina* o *ciprofloxacina*)
- Inhibidors de la RNA polimerasa: *Rifampicina*

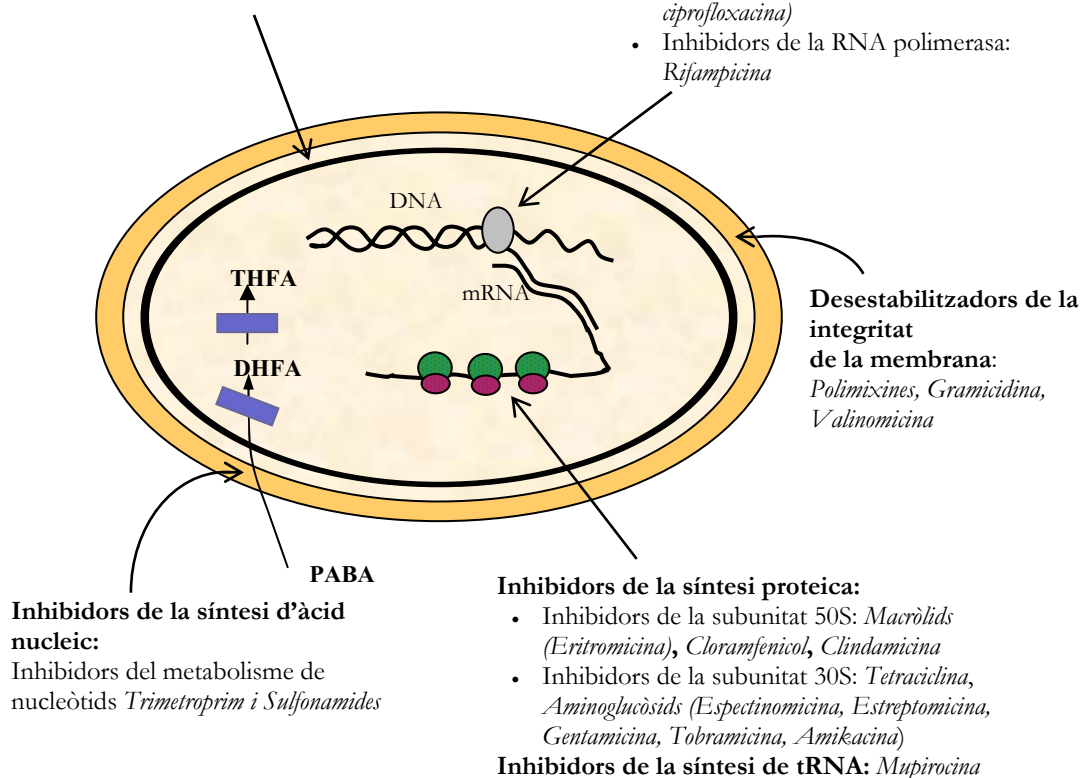


Figura 1.3. Esquema dels llocs d'acció dels diferents agents antimicrobians (PABA= àcid para-aminobenzoic, mRNA=RNA missatger, tRNA=RNA transferència, DHFA=àcid dihidrofòlic, THFA=àcid tetrahidrofòlic, substrat donador de carbonis en la síntesi de purines i pirimidines) [25].

Un altre tipus de classificació, basada en la capacitat de produir la mort bacteriana, divideix els antibiòtics en **bacteriostàtics**, aquells que inhibeixen el creixement bacterià, però no maten els bacteris i **bactericides**, és a dir, que produeixen la mort del bacteri. Tot i això, aquesta classificació no és absoluta, doncs la capacitat d'un agent antibacterià per inhibir o produir la mort dels bacteris depèn de la seva concentració. Distingir entre agent bacteriostàtic i bactericida a nivell clínic poques vegades té importància.

1.2.1 QUINOLONES

Les quinolones constitueixen un grup d'antibiòtics d'ampli i potent espectre d'acció, relativament nou. El primer agent antimicrobià desenvolupat d'aquesta família fou l'àcid nalidíxic, descobert per Leshner i col·laboradors el 1962, durant la síntesi de cloroquina i s'utilitzà pel tractament de les infeccions del tracte urinari [27, 28]. Es tracta d'agents antimicrobians de síntesi química, el seu mecanisme d'acció principal és la inhibició dels enzims DNA girasa i topoisomerasa IV. Dins d'aquest grup troben les fluoroquinolones, també anomenades 4-quinolonas o àcid carboxílic-quinolona, anàlegs de l'àcid nalidíxic. En comparació amb l'àcid nalidíxic, les noves fluoroquinolones han millorat les propietats farmacocinètiques, incloent una major absorció oral, un increment de la concentració màxima en el sèrum, concentracions més elevades en teixits i temps de vida mitja més llargs.

1.2.1.1 Classificació i estructura

Per analogia amb altres famílies d'antibiòtics, s'estableix un criteri de classificació de les quinolones per generacions. A la taula 1.4. es pot observar la classificació actual de les quinolones, on s'indica l'espectre antibacterià que presenta cada una d'elles i quines són les utilitats a nivell clínic en el tractament de malalties [29].

Les diferents quinolones comparteixen un esquelet comú format per un anell bicíclic que combina el nucli β -piridona, l'àcid carboxílic i un anell aromàtic [30]. Aquest esquelet comú determina la seva activitat antibacteriana, però aquesta està regulada, a més, pels substituents perifèrics i la seva relació espacial.

Taula 1.4. Classificació de les principals quinolones i activitat antibacteriana.

Classificació	Antibiòtics	Espectre antibacterià	Indicacions clíniques
Primera generació	Àcid nalidíxic Cinoxacina	Bacteris Gram negatius, exceptuant <i>Pseudomonas</i>	Infeccions del tracte urinari no complicades
Segona generació	Norfloxacina Ciprofloxacina Lemofloxacina Enoxacina Ofloxacina	Bacteris Gram negatius (incloent <i>Pseudomonas</i>), alguns bacteris Gram positius (no <i>S. pneumoniae</i>) i certs patògens atípics	Infeccions del tracte urinari, pielonefritis, malalties de transmissió sexual, infeccions de teixits suaus i pell
Tercera generació	Levofloxacina Esparfloxacina Gatifloxacina Moxifloxacina	Igual a la segona generació però amb un espectre antibacterià més gran davant bacteris Gram positius i patògens atípics	Bronquitis crònica, sinusitis aguda i pneumònia extrahospitalària
Quarta generació	Trovafloxacina	Mateix espectre antimicrobià que la tercera generació més activitat davant bacteris anaerobis	Infeccions del tracte urinari no complicades, bronquitis, sinusitis, infeccions abdominals i pèlviques i pneumònia extrahospitalària i nosocomial

Els grups carboxílic (C-3) i carbonil (C-4) són essencials per l'activitat bactericida, perquè estan implicats en el transport al interior del bacteri i són els llocs a través dels quals les quinolones s'uniran a les seves dianes [30]. L'addició d'un àtom de fluor a la posició C-6 sembla estar associada a una major potència antibacteriana respecte altres substituents com H, Cl, Br, COCH₃, CN o NO₂. Aquest àtom de fluor és el que ha donat lloc a l'aparició de les fluoroquinolones, a les quals se'ls atribueix un augment de la inhibició de la DNA girasa i una major penetració a la cèl·lula [30, 31]. Les quinolones amb substituents petits o lineals en la posició C-7, presenten moderada activitat biològica, mentre que les quinolones amb un anell heterocíclic en aquesta posició presenten una major activitat antibacteriana [32]. Recentment, s'ha observat que l'addició de radicals voluminosos en C-7 podria conferir protecció davant la resistència per bombes de reflux extern, possiblement a causa de l'augment d'hidrofobicitat de la molècula [30]. Per últim, s'ha demostrat que la potència

antibacteriana està enormement influïda pel substituent en la posició N-1 [32]. En la figura 1.4. està representada l'estructura central de les quinolones i els principals llocs on es produeixen les diverses substitucions dels diferents radicals.

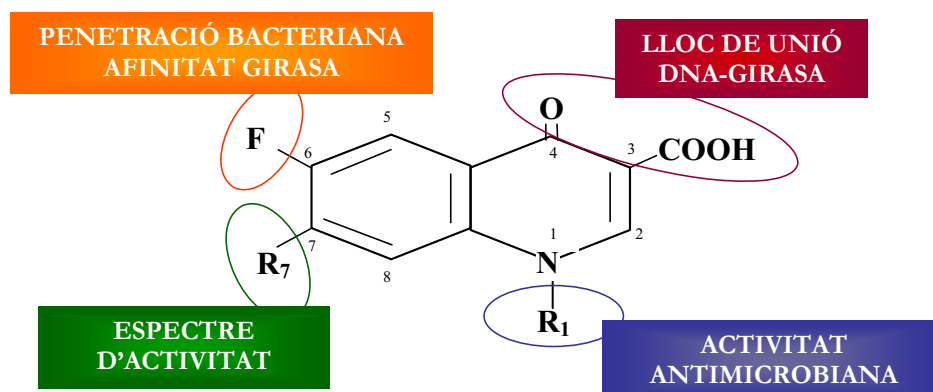


Fig. 1.4. Llocs que determinen la relació entre l'estructura química i l'activitat de les quinolones [32].

1.2.1.2 Principals dianes i mecanismes d'acció de les quinolones

Les quinolones interfereixen en el metabolisme bacterià del DNA per la inhibició de dues topoisomerases, la topoisomerasa II (DNA girasa) i la topoisomerasa IV. La DNA girasa és una proteïna tetramèrica, formada per dues subunitats A (GyrA) i dues subunitats B (GyrB). La seva funció és catalitzar el superenrotllament negatiu en doble hèlix del DNA bacterià utilitzant l'energia alliberada per la hidròlisi de l'ATP, portada a terme per la subunitat B [33]. La topoisomerasa IV està formada per dues subunitats homòlogues a les de la DNA girasa; ParC homòloga a GyrA i ParE homòloga a GyrB. La funció de la topoisomerasa IV es poc coneguda, però se sap que contribueix en la separació de les còpies de DNA abans de la divisió cel·lular, facilitant la transmissió a les cèl·lules filles [34].

Els mecanismes d'acció de les quinolones es poden dividir en quatre passos seqüencials, classificats com [35]:

1. Pas de les molècules a través de les envoltres cel·lulars fins arribar al citoplasma. Les quinolones hidrofíliques com la ciprofloxacina, enoxacina i norfloxacina travessen la membrana externa a través de les porines, mentre que les quinolones hidrofòbiques, com l'àcid nalidíxic entren per difusió passiva a través de la bicapa lipídica [36]. Una vegada al periplasma, per mecanismes de difusió passiva o per transport dependent d'energia travessen la membrana interna i arriben al citoplasma.
2. Inhibició de la diana DNA girasa, topoisomerasa IV o ambdues.
3. Inhibició de la síntesi replicativa del DNA. El complex format per la quinolona-DNA-DNA-girasa al llarg del cromosoma bloqueja la replicació i per tant la síntesi de DNA.
4. Inducció de la resposta SOS i altres efectes en l'estructura cel·lular i resposta bioquímica. El que porta a una no replicació del DNA danyat, la inhibició de la divisió cel·lular i la filamentació, fins provocar la mort del bacteri.

1.2.2 RESISTÈNCIA BACTERIANA ALS ANTIBIÒTICS

El coneixement científic i els microorganismes amb capacitat d'infectar evolucionen conjuntament, de manera que, si l'ésser humà va aprendre a defensar-se de les malalties infeccioses gràcies als antibiòtics, seixanta anys després, la ràpida adaptabilitat de les poblacions bacterianes ha dut a l'aparició de soques resistents a diferents antimicrobians. Les primeres notícies sobre soques resistents es remunten al segon any de l'aparició del primer antibiòtic, la penicil·lina G, quan els propis Fleming i Waksman s'adonaren de l'existència de les primeres soques d'estafilococs resistents. En els anys setanta, la indústria farmacèutica creia que els antibiòtics de què disposava eren suficients per combatre les malalties infeccioses i fer front als fenòmens de resistència, que aleshores es creia que estaven confinats en els hospitals [37]. A finals dels anys vuitanta, l'aparició de soques multiresistents i de resistències extrahospitalàries, va fer plantejar a la indústria farmacèutica que era necessari sintetitzar nous agents antimicrobians amb capacitat de resoldre els problemes de les resistències. Actualment, continuen els esforços per crear antibiòtics més eficaços, amb major espectre d'actuació i amb un nivell de toxicitat menor.

Els bacteris presenten una sèrie de característiques que poden influir de forma molt important en l'emergència, la persistència i la transmissió de gens que codifiquen per la resistència als agents antimicrobians. Entre aquests cal destacar les pròpies característiques intrínseques dels bacteris que els fan resistents als antibiòtics, la facilitat d'intercanvi de material genètic (transmissió genètica horitzontal), l'elevada capacitat de supervivència després d'haver modificat les condicions ambientals, la facilitat de colonització i infecció bacteriana i, molt especialment, la capacitat de créixer en una cinètica exponencial que els permet fixar característiques en les poblacions en un temps molt curt, és a dir la seva flexibilitat genètica [38]. Es creu que els gens de resistència presents en els bacteris patògens provenen directa o indirectament de microorganismes productors d'antibiòtics [39].

A més de les característiques bacterianes, trobem altres factors que afavoreixen l'expansió de microorganismes resistents. Un dels més importants és la pressió selectiva que s'exerceix per l'ús extensiu dels antibiòtics ja que, tractaments de llarga durada augmenten el risc d'aparició de soques resistents als antibiòtics de manera molt més notable que els tractaments curts [40]. Tot això, afavorit per l'ús abusiu dels antibiòtics, on cal esmentar, la utilització excessiva d'antibiòtics en situacions que no ho requereixen i a destacar, tant a nivell comunitari com hospitalari, la introducció d'agents antimicrobians d'ampli espectre que han exercit una pressió selectiva sobre una gran varietat de microorganismes, ja que els antibiòtics afecten a tots els microorganismes de la microbiota humana, no només als bacteris patògens [38]. En aquest sentit és molt important la colonització creuada que es dona a nivell hospitalari que ha portat a l'elevada freqüència de resistència a diversos tipus d'antibiòtic en les soques hospitalàries [26]. Un altre factor que contribueix de forma notòria a l'evolució dels bacteris cap a la multiresistència és l'ús d'antibiòtics en medicina veterinària i en alimentació d'animals pel consum humà. En ramaderia, els antibiòtics són utilitzats amb una finalitat profilàctica, terapèutica o com a promotors del creixement o AGPs (*Antibiotic Growth Promoters*). Alguns d'aquests AGPs estan relacionats estructuralment amb antibiòtics utilitzats en medicina humana, de manera que bacteris resistents trobats en animals poden fàcilment ser resistents a antibiòtics utilitzats en humans. És el que es coneix amb el nom de resistència creuada (*cross-resistance*). Aquests bacteris resistents poden constituir per ells mateixos una amenaça per la salut humana o poden transferir els gens de resistència a bacteris capaços de colonitzar l'home.

1.2.2.1 Mecanismes de resistència als antibiòtics

S'anomena resistència a la sensibilitat disminuïda o nul·la d'una soca bacteriana a un agent antimicrobià o dit d'una altra manera, quan el desenvolupament del bacteri només s'inhibeix a concentracions superiors a les que aquest antibiòtic pot aconseguir en el lloc d'infecció [41].

La resistència bacteriana als antibiòtics pot ser de dos tipus ja que és deguda a dues condicions, la resistència intrínseca i l'adquirida. La **resistència intrínseca o natural**, es produeix quan totes les soques d'una mateixa espècie són resistents a un antibiòtic, es tracta d'una resistència inherent a una determinada espècie bacteriana [42]. Aquesta resistència pot estar associada a diferents factors deguts a característiques pròpies del microorganisme. S'acostumen a expressar a través de gens cromosòmics, per tant, no pot ser transferida a altres bacteris, únicament als seus descendents. Un clar exemple és la membrana externa dels bacteris Gram negatius que actua com a barrera d'impermeabilitat davant alguns agents antimicrobians que no podran penetrar el bacteri.

La **resistència adquirida** és realment important des del punt de vista clínic i es produeix per una modificació genètica [37]. A partir de poblacions inicialment susceptibles emergeixen soques resistents ja que pateixen algun canvi genètic, com l'adquisició de resistència per mutació que es produeix de forma espontània durant la replicació del DNA amb una freqüència d'aproximadament de 10^{-9} - 10^{-10} mutacions per gen [42]. També es pot produir resistència per una adaptació dels bacteris a l'estrès bioquímic quan existeixen grans concentracions d'antibiòtic en el medi ambient, on les soques sensibles seran eliminades, mentre que les soques resistents persistiran i poden arribar a ser dominants.

L'adquisició de resistència a antibiòtics pot ser deguda, a més, al intercanvi de material genètic a través de mecanismes de transformació, transducció o conjugació o a una combinació dels processos [43]. El més freqüent és que es produeixi la transmissió de gens de resistència via plasmidis o transposons conjugatius. En els últims anys s'han descrit una sèrie de partícules implicades en la propagació de gens de resistència, es tracta dels integrons, que són sistemes de recombinació natural que faciliten l'adquisició i l'expressió de gens de resistència i que estan àmpliament distribuïts en bacteris Gram negatius [44].

Són importants en la disseminació de gens de resistència a les sulfamides i l'estreptomicina. En soques clíniques de *Klebsiella* s'han identificat integrons portant gens de resistència a gran varietat d'antibiòtics com gentamicina i estreptomicina [45, 46].

Els principals mecanismes moleculars i bioquímics que condueixen a la resistència d'antibiòtics poden distribuir-se en tres grups: inactivació enzimàtica de l'antibiòtic, modificació de la diana de l'antibiòtic i limitació d'accés de l'antibiòtic a la seva diana on s'inclou la disminució de la permeabilitat de la membrana externa dels bacteris Gram negatius i les bombes de reflux. (figura 1.5.).

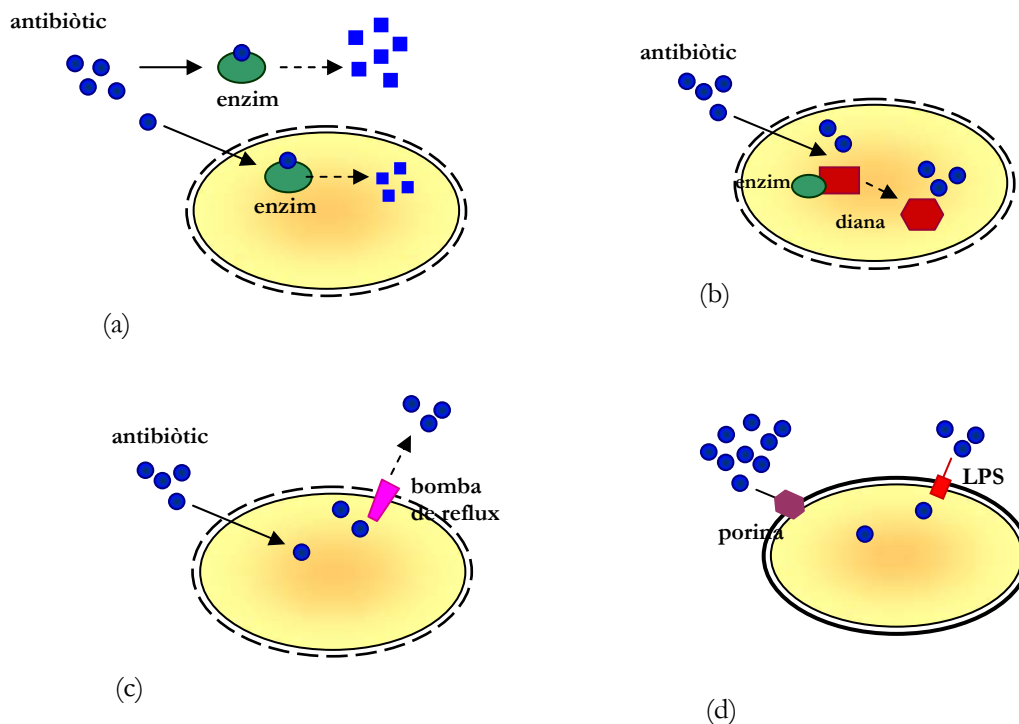


Figura 1.5. Mecanismes de resistència als antibiòtics. (a) Inactivació de l'antibiòtic per un enzim. (b) Modificació de la diana de l'antibiòtic. (c) Extrusió de l'antibiòtic per acció d'una bomba de reflux. (d) Disminució de la permeabilitat de la membrana externa.

- 1. Inactivació enzimàtica de l'antibiòtic.** La inactivació enzimàtica de l'antibiòtic es produeix per destrucció o per modificació d'aquest, gràcies a que els bacteris codifiquen un enzim que porta a terme aquestes accions. Probablement el mecanisme més conegut i estudiat és la destrucció dels antibiòtics β -lactàmics per part dels enzims β -lactàmics, els quals hidrolitzen l'antibiòtic evitant que s'uneixi a la seva diana. Aquest mecanisme està molt estès tant en bacteris Gram negatius com en els Gram positius. Una altra modificació és l'addició de grups químics a l'antibiòtic que fa disminuir la seva afinitat per la seva diana, com l'acetilació del cloramfenicol o la fosforilació dels aminoglicòsids.
- 2. Modificació de la diana de l'antibiòtic.** Mecanisme pel qual el bacteri altera la diana de l'antibiòtic, de manera que es redueix l'afinitat de l'antibiòtic per la diana. Aquesta alteració pot ser deguda tan a mutacions cromosòmiques, donant lloc a resistència a una gran varietat d'antibiòtics (estreptomicina, cloramfenicol, rifampicina, novobiocina) com a la presència de plasmidis, com la resistència a eritromicina en estafilococs i estreptococs.
- 3. Limitació d'accés de l'antibiòtic a la seva diana.** En el cas dels bacteris Gram negatius es pot produir per una disminució de la permeabilitat de la membrana externa (vegeu apartat 1.3.3). Existeixen microorganismes que han desenvolupat una sèrie de sistemes de transport a través de la membrana amb capacitat per bombejar l'antibiòtic que ha entrat dins la cèl·lula cap a l'exterior del bacteri reduint l'acumulació intracel·lular d'antibiòtic (bombes de reflux). En molts casos es dona un sinergisme entre la impermeabilitat de la membrana i una activació dels sistemes de reflux.

Els mecanismes de resistència que es basen en la destrucció de l'antibiòtic o l'alteració de la diana són específics per un antibiòtic o una classe d'antibiòtics, en canvi, la disminució de la permeabilitat de membrana i els sistemes de reflux, que eviten que l'antibiòtic arribi a la diana, són mecanismes més generals i que poden conferir resistència a antibiòtics molt diferents i no relacionats entre si [47].

En els últims anys, a nivell hospitalari estan apareixent gran nombre de soques bacterianes que són resistents a un gran nombre d'antibiòtics no relacionats entre ells, donant lloc al que es coneix com a soques multiresistents (MDR) [48]. Inicialment, aquesta multiresistència era associada a la presència de plasmidis amb un o més gens de resistència. També es creia que els gens MDRs eren induïts per l'estrès a causa d'una exposició continuada als antibiòtics tan en l'entorn natural com hospitalari [49]. Posteriorment, es va descriure que els fenotips dels bacteris multiresistents podrien estar associats al cromosoma, mitjançant l'activació del locus regulador *mar*. Actualment el terme multiresistència es utilitza per descriure mecanismes intrínsecs de resistència mitjançant gens que formen part del genoma normal de la cèl·lula [50].

1.2.2.2 Mecanismes de resistència a les quinolones

Els bacteris resistents a les quinolones apareixen a nivell clínic com a resultat de la teràpia amb aquests antibiòtics. En els últims 10 anys la incidència de resistència a quinolones en patògens nosocomials ha augmentant considerablement, els augments més importants s'han observat en les espècies de *Klebsiella* i de *Serratia* [51]. En principi, la resistència a les quinolones pot ser deguda a mutacions que afectin al nivell d'antibiòtic assolit al citoplasma i a les proteïnes DNA girasa i topoisomerasa IV i a la cooperació entre ambdós mecanismes. Així els mecanismes de resistència a les quinolones es poden agrupar en tres categories [52]:

1. Resistència de tipus cromosòmic donant lloc a mutacions en segments definits dels gens que codifiquen per la DNA girasa, especialment la subunitat A, i la topoisomerasa IV. Els llocs on es produeixen les mutacions més freqüents es situen en una regió inicial del gen *gyrA* anomenada QRDR (*Quinolone Resistance Determinig Region*) [53].
2. Resistències per alteracions en la membrana externa bacteriana que faria disminuir la penetració intracel·lular de l'antibiòtic, per modificacions en els gens que codifiquen pels canals de membrana externa.
3. Resistències basades en l'expulsió de l'antibiòtic des del citoplasma al medi extern per l'acció de transportadors endògens actius.

Els estudis inicials sobre resistència a quinolones, centrats en *E. coli* i altres bacteris Gram negatius, demostraren que la resistència es produïa, normalment, per mutacions en regions definides de les proteïnes GyrA o GyrB, en aquest últim en menor grau. Mentre que les mutacions en les regions equivalents, ParC i ParE, tindrien lloc després de les mutacions produïdes en la DNA girasa. Estudis realitzats en *S. aureus* i *S. pneumoniae*, han posat de manifest que aquest no és un comportament general. En aquests bacteris Gram positius la situació és diferent, ja que les primeres resistències apareixen per mutacions en la topoisomerasa IV [52]. En els enterobacteris el canvi més comú es produeix en la posició Ser83 i Asp87 de la DNA girasa A, i en la posició Ser80 i Glu84 de la subunitat ParC de la topoisomerasa IV. Les mutacions produïdes en *parC*, en bacteris Gram negatius, contribuiran a la resistència a les quinolones només quan hi hagi, a més, mutacions en *gyrA* [34, 53]. Resultats de diversos estudis han posat de manifest que mutacions en els gens *gyrB* i *parE* no tenen un paper important en l'adquisició de resistència a les quinolones [54].

Les mutacions en la regió QRDR no són els únics mecanismes desenvolupats pels bacteris davant l'acció de les quinolones. La resistència pot estar condicionada pels processos de transport a través de la membrana, una disminució del nombre de porines, confereixen resistència a quinolones a l'igual que altres tipus d'antibiòtics, indicant que aquests antibiòtics han d'entrar a la cèl·lula, en part, a través de canals de membrana [28, 55]. Més endavant es va demostrar la implicació de les bombes de reflux en la resistència a les quinolones. Les quinolones són substrat d'aquests transportadors que actuen expulsant l'antibiòtic del medi intracel·lular a l'extracel·lular evitant-ne l'acumulació [56]. Aquests processos d'expulsió és important ja que permet als bacteris sobreviure durant un curt període de temps durant el qual poden desenvolupar resistències via mutacions en els llocs claus del gens de les dianes de les quinolones.

Fins al moment no s'han descrit mecanismes de resistència a les quinolones degudes a l'acció d'enzims, tot i que s'ha observat algun cas en fongs. Recentment, s'ha identificat un plasmidi que confereix resistència a quinolones en soques clíniques de *Klebsiella pneumoniae*, és el primer cas de resistència a quinolones deguda a plasmidis descrita fins al moment [34].

1.2.2.3 Resistència als antibiòtics en *Klebsiella* spp.

El gènere *Klebsiella* és un important patogen oportunista, aïllat de forma habitual en infeccions del tracte urinari, pneumònia nosocomial, infeccions en ferides postoperatòries, etc. Les dues espècies de *Klebsiella* causants de les infeccions humanes són altament resistents a una gran varietat d'antibiòtics, degut fonamentalment a l'adquisició de plasmidis [9].

De forma general el gènere *Klebsiella* presenta β -lactamases cromosòmiques de classe A, a més és conegut des dels anys 70, que soques clíniques aïllades d'aquest microorganisme produeixen la β -lactamasa SHV-1 codificada per un gen plasmídic. Des de 1984, s'han descrit una gran quantitat de β -lactamases amb capacitat per hidrolitzar antibiòtics β -lactàmics de segona generació (cefalotina) i de tercera generació (cefotaxima i ceftazidime) [15, 24]. S'ha observat que *Klebsiella* spp. pot presentar gran quantitat de plasmidis, conferint resistència a la gran majoria d'antibiòtics β -lactàmics, especialment cefalosporines d'ampli espectre i carbapenems, gràcies a la síntesi d'un grup d'enzims anomenats SKLBs (*Extended spectrum beta-lactamases*). També s'han aïllat plasmidis contenint gens de resistència a aminoglicòsids [3]. Aquests mecanismes de resistència han fet que el tractament de les infeccions de *Klebsiella* spp. es realitzi amb fluoroquinolones, tot i que, estudis recents demostren un increment de les espècies de *Klebsiella* resistents a aquests antibiòtics [56, 57].

De forma natural *K. oxytoca* és resistent a les amino i carboxipenicil·lins com l'amoxicil·lina i la ticarcil·lina per la producció de β -lactamases cromosòmiques de classe A, que és inhibida per l'àcid clavulànic. Entre el 10 i el 20% de les soques de *K. oxytoca* són sobreproductores de β -lactamases [58]. La producció d'aquesta β -lactamasa no està regulada però les mutacions poden portar a una sobreproducció fins hi tot donant lloc a resistències a cefalosporines de tercera generació i al aztreonam. Fournier *et al.* el 1996, van determinar dos β -lactamases cromosòmiques en *K. oxytoca*, codificades pels gens *blaOXY-1* i *blaOXY-2* que presentaven una homologia, només del 87% i això va fer pensar que dins del taxó de *K. oxytoca* hi podria haver dos grups o subespècies diferents [22].

Fenotips de resistència a les quinolones degut a mutacions produïdes en la regió QRDR, han estat àmpliament demostrats en *Klebsiella*. S'ha observat mutacions produïdes en les posicions Ser83 i Asp87 de la DNA girasa A i la posició Ser80 i Glu84 de la subunitat ParC de la topoisomerasa IV. Recentment s'ha identificat una mutació en la posició 78 de *parC* que confereix resistència a quinolones [59]. A diferència d'*E. coli*, *Klebsiella* no sembla que requereixi la presència d'una doble mutació en *gyrA* i *parC* per obtenir alts nivells de resistència a les fluoroquinolones [56].

En aquestes dues espècies de *Klebsiella* no fa molts anys, es va demostrar que tenien sistemes de reflux i estudis recents han relacionat la sobreexpressió d'aquests sistemes de reflux amb altes resistències a les quinolones [60]. S'ha observat, a més, que la disminució en el nombre de porines OmpK35 està relacionada amb un augment de la resistència a les quinolones, en canvi OmpK36, no sembla tenir un paper tant important [61].

1.2.3 SINERGISME ENTRE ELS MECANISMES DE RESISTÈNCIA ALS ANTIBIÒTICS

El mecanisme pel qual un bacteri pot esdevenir resistent als agents antimicrobians pot ser molt divers; però en la gran majoria dels casos aquesta resistència no es deu exclusivament a un únic mecanisme sinó que es produeix un sinergisme entre diversos mecanismes de resistència, és a dir, que hi ha dos o més mecanismes que actuen alhora d'una forma complementària [62].

Els bacteris Gram negatius presenten una resistència intrínseca als antibiòtics gràcies a la barrera d'impermeabilitat que crea la membrana externa. Però aquesta baixa permeabilitat de la membrana externa per si sola no té la capacitat de produir els nivells de resistència tan alts com els que s'han trobat en moltes soques clíniques, i es creu que necessita l'ajuda d'un segon factor. A més, molts estudis demostren que bacteris amb una elevada expressió de porines o sistemes de reflux actius no aconsegueixen els nivells de resistència, a determinats tipus d'antibiòtics, observats a nivell clínic [47]. Per tant és la combinació de la lenta entrada de molts antibiòtics, a causa de la baixa permeabilitat de la membrana, amb una sobreexpressió de bombes de reflux que expulsen els antibiòtics que

entren al bacteri cap al medi extern, el que confereix la elevada resistència bacteriana. Un clar exemple és *Pseudomonas aeruginosa*, la qual presenta una membrana molt poc permeable, tot i això per si sol no podria explicar l'alta resistència d'aquest bacteri davant una gran varietat de compostos. S'ha observat que la sobreexpressió del sistema de reflux MexCD-OprJ unit a l'alta impermeabilitat de la membrana externa, confereix resistència a les quatre generacions de cefalosporines [63].

En *Klebsiella* spp. s'ha demostrat que una disminució o una deficiència en una de les dues porines majoritàries, OmpK35 i OmpK36, fa augmentar la resistència a antibiòtics, donat que la quantitat d'antibiòtic que entra dins del bacteri és molt inferior, però no seria suficient per aconseguir nivells de resistència tant alts. En moltes soques clíniques de *Klebsiella* altament resistents a antibiòtics com la tetraciclina, el cloramfenicol i les fluoroquinolones, s'ha observat que junt amb la disminució del nombre de porines hi ha una sobreexpressió de sistemes de reflux [20, 64].

Passa el mateix amb altres classes d'antibiòtics, un microorganisme productor de β -lactamases serà resistent a antibiòtics β -lactàmics, però si a més té una deficiència en porines aquesta resistència augmenta ja que entra menys antibiòtic i el poc que entra serà inactivat per les β -lactamases amb més eficiència [65]. En els últims anys també s'ha observat que les bombes de reflux podrien tenir la capacitat d'expulsar alguns antibiòtics β -lactàmics que no tenen la capacitat de travessar la membrana citoplasmàtica [66].

Els tres tipus de mecanismes de resistència a les quinolones, poden manifestar-se sols o en combinació, tot i que es creu que l'augment de resistència a les quinolones *in vivo* es deu a varis mecanismes simultanis o seqüencials. Pel que fa a la resistència a les quinolones, s'han aïllat soques de *Klebsiella* amb mutacions en els gens *gyrA* i/o *parC*. Aquestes mutacions disminueixen el grau de susceptibilitat del bacteri per les quinolones, però si aquestes soques a més tenen una disminució en el nombre de porines el seu grau de resistència augmenta [12, 64]. També s'ha observat que, tant l'activitat del sistema de reflux AcrAB-TolC com l'acumulació de mutacions en la regió QRDR, en *S. typhimurium*, són essencials per conferir alts nivells de resistència a les fluoroquinolones [67].

1.3 LA MEMBRANA EXTERNA DELS BACTERIS GRAM NEGATIUS

Escherichia coli ha estat adoptat com a organisme model per l'estudi funcional i estructural i per comprendre l'organització biofísica i bioquímica de les proteïnes de la membrana dels bacteris Gram negatius. Els embolcalls d'aquests bacteris estan compresos morfològicament per tres capes ben diferenciades. La capa interna, corresponent a la membrana citoplasmàtica, la qual regula el pas de metabòlits tan d'entrada com de sortida del citoplasma; una prima capa de peptideglicà o mureïna que dóna rigidesa mecànica a la cèl·lula i que es troba en tots els bacteris menys en els micoplasmes; i la capa més exterior, la membrana externa, que és una barrera addicional formada de lípids, polisacàrids i proteïnes, que confereix propietats diferents als bacteris Gram negatius i Gram positius, als quals els hi manca aquesta barrera addicional [68]. En la figura 1.6. es pot observar de forma esquemàtica quina és la disposició de les membranes en els bacteris Gram negatius.

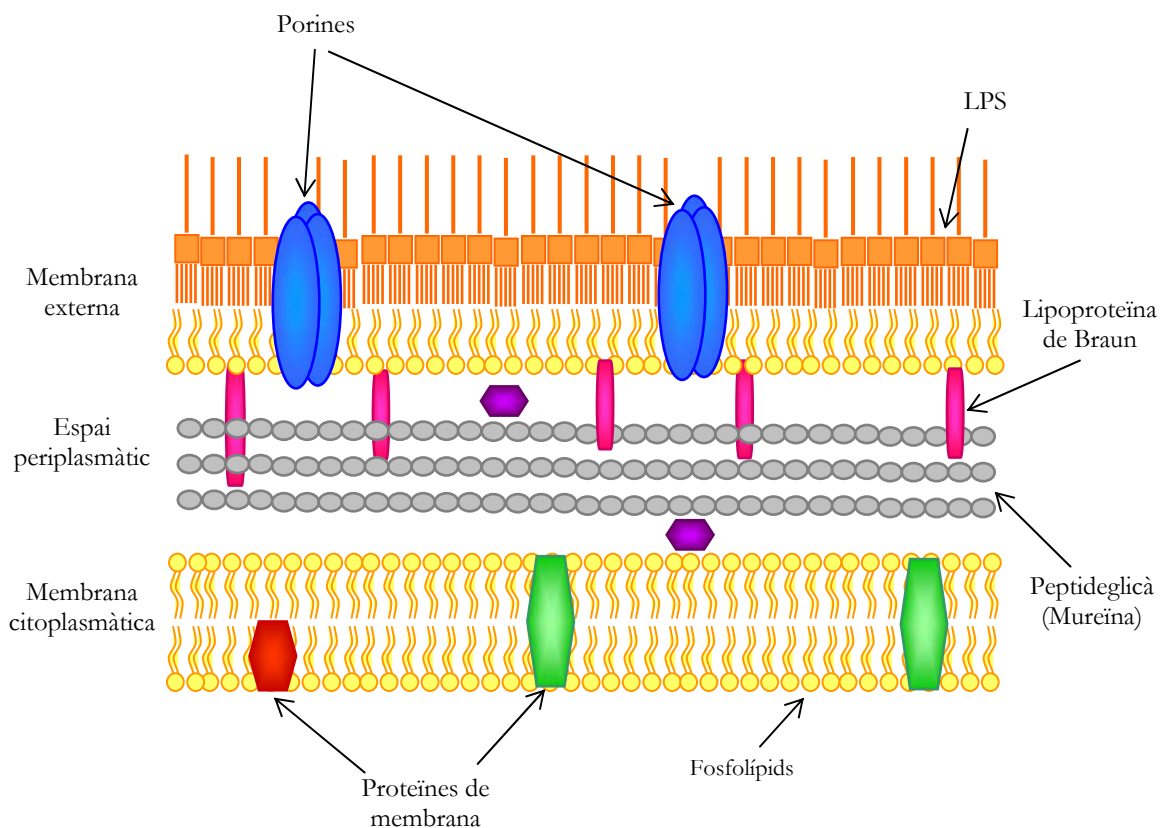


Figura 1.6. Model esquemàtic dels embolcalls dels bacteris Gram negatius.

1.3.1 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA EXTERNA

La membrana externa, de manera similar a la membrana citoplasmàtica, està formada per una doble capa lipídica que conté fosfolípids i proteïnes. Mentre que la membrana citoplasmàtica és una estructura simètrica composta, principalment, per fosfatidiletanolamina (70-80%), fosfatidilglicerol i cardiolipina, distribuïdes més o menys uniformement en la seva cara externa i interna, la membrana externa presenta una forta asimetria. La cara interna d'aquesta membrana té una composició lipídica i proteica similar a la membrana citoplasmàtica, amb un elevat enriquiment en fosfatidiletanolamina i una sèrie de proteïnes amb capacitat de formar porus que no es troben en la membrana citoplasmàtica [69]. A més la seva cara externa és completament diferent, ja que està constituïda exclusivament per un lípid únic i característic anomenat lipopolisacàrid (LPS), que substitueix als fosfolípids d'aquesta regió de la membrana, formant una capa molt poc permeable que dificulta el pas d'un gran nombre de substàncies [70, 71].

Gairebé el 50% de la massa de la membrana externa són proteïnes, ja siguin proteïnes integrals de membrana o lipoproteïnes unides a la membrana a través dels seus extrems N-terminals [69]. Moltes d'aquestes proteïnes es troben exclusivament a la membrana externa i algunes també es poden trobar en la membrana citoplasmàtica. Fins al moment s'han descrit un gran nombre de proteïnes que formen part de la membrana externa, dins les quals, les majoritàries són la lipoproteïna i les proteïnes formadores de canal. Les proteïnes formadores de canal es poden agrupar en porines (que seran tractades amb més detall en el següent apartat) i proteïnes de canal específiques de substrat, les quals permeten el influx de nutrients i en alguns casos l'extrusió de productes de rebuig [72]. Una petita quantitat d'aquestes proteïnes, com OmpA i les porines generals, s'expressen en alts nivells, en canvi, la gran majoria de proteïnes, com porines "específiques" (PhoE, LamB), receptors (FhuA, FepA) entre altres, requereixen estímuls per la seva síntesi [69].

La proteïna més abundant en els enterobacteris és la lipoproteïna de la mureïna o lipoproteïna de Braun. Es tracta d'una lipoproteïna petita d'uns 7200 Da que es troba en un gran nombre de còpies i que té fonamentalment una funció estructural [73]. Una altra proteïna comú és OmpA en *E. coli*, i els seus homòlegs en enterobacteris, com la proteïna de 32 kDa de *Klebsiella* anomenada OmpK34, molt semblant estructuralment a les porines i

implicada en el transport d'aminoàcids [74]. També troben proteïnes menys abundants implicades en el transport específic de substàncies per difusió facilitada, com LamB en *E. coli* i les proteïnes implicades en la exportació de toxines o colicines, com TolC a *E. coli* la qual forma part de les bombes de reflux pel transport d'antibiòtics fora de la cèl·lula [75]. Un tercer grup de molècules transportadores són aquelles implicades en el transport actiu de grans molècules com els complexos de quel·lat de ferro (Fe^{3+}) i la vitamina B12, es tracta d'uns sistemes de receptors proteics d'alta afinitat situats a la membrana externa i la proteïna TonB de la membrana interna que actua com a translocador associat a una sortida d'energia [76]. Altres proteïnes de membrana estan implicades en receptors d'alta afinitat pel transport de ferro com FepA i FhuA i d'àcids grassos (FadL). Algunes d'aquestes proteïnes són receptors de bacteriòfags i colicines [68].

A més del LPS, en la membrana externa dels bacteris Gram negatius hi ha altres components polisacàridics com, l'antigen comú dels enterobacteris (ECA), es tracta d'un àcid polisacàridic que estableix un enllaç covalent amb els fosfolípids. Una altre component són els polisacàrids capsulars, dels quals en els enterobacteris en trobem dos tipus diferents, un primer tipus, l'antigen M o àcid colànic, que solament es produeix sota determinades condicions fisiològiques com una elevada osmolaritat del medi, baixa temperatura o humitat i el segon tipus de polisacàrid capsular inclou l'antigen K, que forma part dels polisacàrids capsulars clàssics [77]. En el cas de *Klebsiella*, com ja ha estat comentat en l'apartat 1.1.3.1, la presència de càpsula és una característica principal i un factor de patogenicitat.

La membrana externa té un paper molt important en la fisiologia dels bacteris Gram negatius ja que els hi confereix resistència davant dels factors de defensa de l'hoste com el lisozim, β -lisina i diverses proteïnes leucocídiques que són extremadament tòxiques en bacteris Gram positius. En bacteris Gram negatius entèrics, que viuen en el tracte intestinal dels animals, la membrana externa s'ha desenvolupat com una barrera molt eficient que protegeix les cèl·lules de l'acció de les sals biliars i de la degradació per part dels enzims digestius [77]. A més, aquesta estructura actua com una barrera impermeable a molts antibiòtics com els macròlids, novobiocina, clindamicina, entre altres. Una altra funció important de la membrana externa és que dota als bacteris d'una elevada hidrofobicitat, important per evitar la fagocitosi, l'acció del complement i la capacitat per evitar atacs

específics del sistema immunitari de la cèl·lula hoste, alterant la constitució antigènica de la superfície [72].

1.3.2 LES PORINES

La primera proteïna formadora de canal no específica va ser descoberta l'any 1976 per Nakae quan treballava en el laboratori de Hiroshi Nikaido, el nom de "porina" va ser proposat específicament per aquest tipus de proteïna. Es tracta de proteïnes formadores de canal no específic [72]. Les primeres porines identificades foren OmpF i OmpC en *E. coli*, però anys més tard la identificació de porines s'ha estès a totes les espècies de bacteris Gram negatius i en alguns grups de bacteris Gram positius de parets particulars [78].

Les funcions de les porines són diverses i molt variades. Actuen com a canal i permeten el pas de substàncies hidrofíliques de mida inferior a 600 Da, ja que el porus pot presentar una obertura màxima de 10 Å. Són canals passius que permeten el transport en proporció a la concentració de gradient entre l'exterior i el interior bacterià, i no presenten una especificitat pel substrat [69, 79]. Juguen un paper molt important en la resistència als antibiòtics, són receptors de bacteriòfags o bacteriocines, diana d'anticossos del sistema immunitari i porines de diverses espècies bacterianes, com *S. typhimurium* i *K. pneumoniae*, tenen la capacitat d'activar el complement tant per la via clàssica com alterna, després de la unió de C1q. Les porines en alguns casos podrien actuar com a factors de patogenicitat com la porina OmpK36 de *Klebsiella* i la porina OmpC de *Rahnella aquatilis* que permet la unió del bacteri a les arrels o tubercles de les plantes [78].

Les porines s'inclouen dins del grup de proteïnes transportadores formadores de canal segons la classificació realitzada per M.H. Saier l'any 2000. Aquest grup, al mateix temps es pot dividir en cinc subclasses segons l'estructura, la funció i l'origen filogenètic de la porina [80]: canal tipus α , porines β -barril (al que pertanyen les porines bacterianes), porus formats per toxines, holines i canals sintetitzats no ribosòmicament. Les porines generalment es poden dividir en dos grups: aquelles porines no específiques que permeten el pas de petites molècules polars per difusió general, com OmpC i OmpF i les porines específiques com LamB, les quals permeten la difusió de substrats específics [81].

1.3.2.1 Estructura general de les porines

Les porines són proteïnes de membrana especials per dues raons: per la seva composició d'aminoàcids, que és molt més polar que la resta de proteïnes de membrana i per la seva estructura en làmines β en forma de barril o cilindre i l'absència d'estructures α -hèlix, característiques de proteïnes de membrana interna [82]. Les porines són homotrímers i cada subunitat conté de 250 a 450 aminoàcids formant 16 làmines β antiparal·leles que travessen la membrana externa i formen un cilindre amb llargs *loops* a la cara externa de la cèl·lula, donant lloc a tres canals, cada un format per una estructura β -barril [79]. Indubtablement el progrés més important en l'estudi de les porines ha estat la capacitat per crear estructures tridimensionals gràcies a tècniques de difracció electrònica, la cristal·lografia de raigs X i els models moleculars com es pot observar en la figura 1.7. [72].

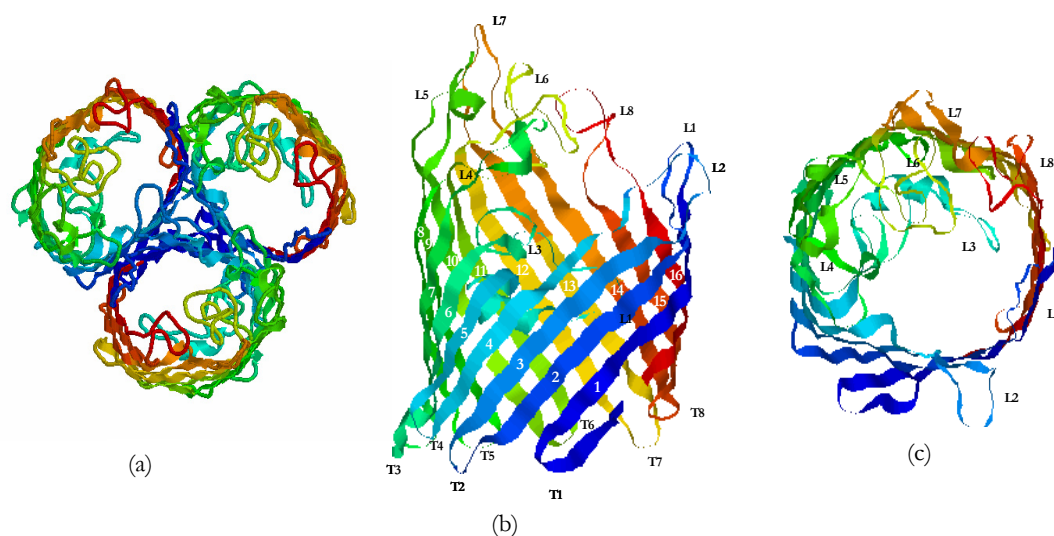


Figura 1.7. Estructura de la porina Omp1 de *Serratia marcescens*. (a) Associació trimèrica del canal d'Omp1. (b) Topologia del monòmer en visió lateral, es mostren les 16 estructures en fulla β , enrotllades en configuració de barril. (c) Topologia del monòmer en visió frontal, es pot observar que el *loop* 3 (L3) és l'únic que es projecta cap al interior del canal [83].

El contacte entre els monòmers s'estableix per interaccions hidrofòbiques i polars entre diversos *loops*, només determinades condicions dràstiques com podria ser l'acció de detergents, com el SDS a altes temperatures ($>70^{\circ}\text{C}$) poden dissociar aquesta unió [78]. A diferència de la resta de *loops*, el tercer *loop*, L3, no està exposat a la superfície de la cèl·lula, aquest es plega cap a al interior del barril, formant una zona de constricció a la meitat de l'alçada del porus, contribuint significativament a determinar les dimensions del canal, i les seves propietats de permeabilitat tals com el límit d'exclusió o la selectivitat de ions [69]. Depenent del bacteri i de les condicions ambientals en les que es trobi es pot produir un augment de l'expressió de les proteïnes de membrana externa, de forma que el seu nombre pot arribar a 10^4 - 10^6 còpies per cèl·lula [84].

1.3.2.2 Les porines de *Klebsiella* spp.

Comparat amb altres espècies relacionades com *E. coli*, es coneix poc de les proteïnes de membrana externa en *Klebsiella*; no obstant s'ha demostrat l'existència de proteïnes homòlogues a les porines PhoE, ScrY i Lamb d'*E. coli*. Així mateix les seves seqüències i la regulació de la seva expressió són molt semblant a les d'*E. coli* [85].

Fa uns anys van ser caracteritzades dues proteïnes formadores de canal no específiques, anomenades 37 kDa i 39 kDa en *Enterobacter cloacae* que més endavant foren descrites en *K. pneumoniae*. Aquestes porines són probablement equivalents a altres dues porines descrites anteriorment per Albertí i Hernández-Allés: OmpK36 i OmpK35, les seqüències de les quals són homòlogues a les porines OmpC i OmpF d'*E. coli*, respectivament [86]. Es tracta de les dues porines de *Klebsiella* majoritàries que permeten la difusió d'una gran varietat de molècules, incloent nutrients bacterians i antibiòtics [81].

A partir d'estructures resoltes per cristal·lografia de raigs X de la porina OmpK36, s'evidencia la presència d'un *loop* extern que no és present en cap de les seves proteïnes homòlogues d'altres espècies, aquest correspondria al lloc d'unió de la proteïna del complement C1q, formant un complex que activaria la via clàssica de resposta del complement [85]. A més, OmpK36, en nombroses ocasions s'ha considerat un factor de virulència ja que s'ha observat que estaria implicada en el procés invasiu del bacteri [78].

Estudis realitzats per Doménech-Sánchez *et al.*, per a la caracterització de mutacions en l'expressió de les porines conegudes en *Klebsiella*, portà a la detecció de l'existència de tres fragments de DNA, això suggerí la presència d'un nou gen que codificava per una nova porina, a més de les ja conegudes OmpK36 i OmpK35, que va ser anomenada OmpK37. No es va trobar cap homologia amb porines descrites fins aquell moment. Recentment s'ha vist que OmpK37 presenta entre un 80 i un 88% d'identitat amb les porines OmpS2 de *Salmonella typhi* i OmpN d'*E. coli* [81]. OmpK37, al igual que OmpS2 i OmpN no s'expressa en condicions normals sinó que la seva expressió està regulada per unes condicions ambientals específiques, com podria ser sota una pressió d'antibiòtics. També s'ha descrit homologia entre la porina de *Klebsiella* OmpK34 i la porina OmpA d'*E. coli* [20].

En *Klebsiella oxytoca*, a més, s'han caracteritzat una sèrie de porines que permeten l'entrada de ciclodextrines com el cas de CymA, proteïna d'un pes aproximat de 38 kDa. Com la majoria de porines la seva estructura és en un 60% formada per làmines β antiparal·leles i les estructures α -hèlix representen menys d'un 10% de la porina. A diferència de la majoria de porines bacterianes, experiments realitzats per Pajatsh *et al.*, demostren que aquesta porina no presenta una estructura trimèrica [87].

1.3.3 EL PAPER DE LA MEMBRANA EXTERNA DELS BACTERIS GRAM NEGATIUS EN LA RESISTÈNCIA ALS ANTIBIÒTICS

Com ja s'ha comentat anteriorment, la membrana externa dels bacteris Gram negatius confereix resistència davant factors de defensa de l'hoste, evita l'atac immune específic i a més actua com a barrera selectiva, evitant l'entrada de moltes molècules nocives presents en el medi i afavorint el reflux de productes tòxics [88]. De forma natural els bacteris Gram negatius presenten resistència a certs antibiòtics ja que aquests no poden entrar al bacteri per causes naturals. Mentre antibiòtics de petit volum (β -lactàmics, tetraciclina, cloramfenicol i fluoroquinolones) utilitzen els canals formats per les porines per entrar dins el bacteri, els antibiòtics grans i lipofílics (macròlids, rifampicina, novobiocina, àcid fusídic) tenen dificultat per passar a través de les porines [72].

La membrana externa contribueix a la resistència intrínseca dels bacteris Gram negatius davant l'acció de molts antibiòtics que són efectius en altres bacteris, ja que confereix una baixa permeabilitat al pas de molècules hidrofòbiques, especialment en bacteris entèrics. Aquesta impermeabilitat queda demostrada en l'elevada resistència que presenten aquests tipus de bacteris als antibiòtics hidrofòbics (macròlids, novobiocina i rifampicina), als detergents (SDS, Tritó X-100), a les sals biliars i als colorants hidrofòbics (eosina, blau de metilè, verd brillant). S'han proposat una sèrie d'hipòtesis per explicar aquesta impermeabilitat de la membrana externa dels bacteris respecte la resta de bicapes lipídiques.

La principal barrera de permeabilitat és la pròpia estructura de la membrana externa en forma de bicapa lipídica. En els bacteris Gram positius la gruixuda capa de peptidoglicà no sembla oferir gran resistència de petites molècules com els antibiòtics, doncs és, de fet, una estructura hidrofílica. En canvi, els bacteris Gram negatius presenten una resistència intrínseca deguda a la barrera creada per la membrana externa, que com totes les bicapes lipídiques, forma un domini intern altament hidrofòbic [47].

A la baixa permeabilitat de la membrana externa s'hi ha d'afegir la presència del LPS a la cara externa d'aquesta membrana. La part externa de la membrana no presenta àcids grassos insaturats afavorint d'aquesta manera, la impermeabilitat. A més, el LPS conté 6 o 7 cadenes d'àcids grassos units covalentment evitant el pas d'antibiòtics més hidrofòbics, que, pel contrari, passarien sense problemes a través de la membrana citoplasmàtica. Una alteració en el LPS podria modificar la permeabilitat a aquests compostos [77].

Paral·lelament, els bacteris Gram negatius presenten un elevat nombre de canals hidrofílics en la membrana externa permeten tant l'entrada com la sortida d'antibiòtics. Un dels principals impediments de l'entrada d'antibiòtics és el diàmetre i la càrrega dels porus, essencials en la determinació del pas d'antibiòtics [78]. El diàmetre del porus (11 x 7 Å) format per la porina majoritària en *E. coli*, OmpF, permet l'entrada d'importants nutrients per la cèl·lula però no permet el pas de molts antibiòtics o el seu pas és molt lent, ja que aquests acostumen a ser molècules grans. Les propietats electrostàtiques i hidrofòbiques dels porus de les porines imposen restriccions al pas de molècules a través de les proteïnes de membrana. En el cas d'antibiòtics com les cefalosporines, un augment de càrregues

negatives en el porus faria que el seu pas fos molt més lent, mentre que una quantitat de càrregues negatives menor permetria un pas ràpid d'aquest antibiòtic. La presència de molècules d'aigua dins el porus, assegura que l'entrada d'antibiòtics lipofílics o amfifílics es produeixi molt lentament [62].

Independentment de la mida i la carrega dels canals de membrana, els bacteris poden evitar l'arribada de molts antibiòtics a l'espai periplasmàtic, per altres mecanismes que contribueixen a l'adaptació de les cèl·lules a unes condicions ambientals determinades per la presència d'antibiòtic. Els tres mecanismes bacterians documentats fins aquest moment que reduïrien l'entrada d'antibiòtic a través de les porines serien: (i) controlant els nivells de porines mitjançant una disminució de l'expressió dels gens que codifiquen per aquestes; (ii) controlant el tipus de porina seleccionant l'expressió de determinades porines i reprimint-ne d'altres; i (iii) expressant porines mutades amb activitat de canal restringida [84].

Una excepció és *P. aeruginosa*, que presenta una elevada resistència intrínseca en gran part degut a la baixa permeabilitat de la membrana externa donat que únicament presenta la porina inespecífica, OprF, la qual presenta una baixa eficiència en la difusió d'antibiòtics hidrofílics. Però la membrana externa d'aquest microorganisme, presenta una sèrie de canals especials que permeten la difusió de nutrients essencials [47].

En altres bacteris Gram negatius, com *Klebsiella* spp. i *Enterobacter* spp. s'han descrit mutacions que produeixen una disminució del nombre de porines en la membrana externa fent augmentar la resistència a antibiòtics hidrofílics, és el cas de moltes soques d'ambient hospitalari resistents a antibiòtics β -lactàmics i en menor grau a tetraciclins, cloramfenicol i aminoglicòsids [62]. En molts dels estudis realitzats ha estat difícil demostrar la contribució específica de l'alteració en l'expressió de porines en la resistència als antibiòtics perquè es troben altres mecanismes de resistència en aquelles soques que presenten una deficiència en porines [20].

S'han realitzat estudis que han demostrat una relació directa entre una modificació en la membrana externa de *Klebsiella* produint una disminució en el nombre de porines i un augment en la resistència als antibiòtics [89]. S'ha relacionat la pèrdua de la porina

OmpK36 amb un increment de resistència a cefalosporines en aquelles soques productores de β -lactamases, mentre que la pèrdua o mutació en la porina OmpK35 donaria lloc a resistència a cefalosporines i carbapenems. A més la pèrdua de les dues porines està clarament associada a un augment de resistència a cefalosporines de tercera generació i en menor grau a un augment de resistència a la tetraciclina i cloramfenicol [90]. Les dues porines permeten el pas de ciprofloxacina, per tant una disminució de les dues porines majoritàries en *Klebsiella* junt amb possibles mutacions en les topoisomereses, afavoririen un augment de resistència a aquest antibiòtic.

1.4 ELS SISTEMES DE REFLUX

Tant les cèl·lules eucariotes com procariotes tenen sistemes de transport de membrana involucrats en l'entrada de nutrients i ions essencials, l'excreció de productes tòxics fora del citoplasma i el manteniment de l'homeòstasi general. En els últims 15 anys, gràcies al desenvolupament de tècniques de clonació i seqüenciació, s'han identificat un gran nombre d'aquests sistemes de transport i s'ha pogut demostrar que molts d'aquests sistemes juguen un paper molt important en la resistència als compostos tòxics [91]. Entre aquests transportadors destaquen les bombes de reflux, sistemes proteics que bombegen l'antibiòtic a l'exterior cel·lular amb gran eficàcia, conferint resistència a un ampli nombre d'antibiòtics no relacionats estructuralment entre si, gràcies a que redueixen la concentració intracel·lular de components citotòxics fins aconseguir uns nivells subtòxics, pel que es podrien incloure dins dels MDR [92, 93].

Inicialment, la resistència a múltiples antibiòtics fou associada a la presència de plasmidis que contenien un o més gens de resistència, cada un dels quals codificava per la resistència a un antibiòtic. Posteriorment, George i Levy van descriure un sistema de resistència a múltiples antibiòtics (*mar*) associat al cromosoma per l'activació del locus regulador *mar* a *E. coli*, que conferia resistència a antibiòtics no relacionats estructuralment [94]. Més recentment, s'ha vist que també proporciona resistència a agents d'estrès oxidatiu i a dissolvents orgànics [95]. El desenvolupament de resistències a un gran nombre d'antibiòtics està donant lloc a un seriós problema mèdic.

1.4.1 ORIGEN I CLASSIFICACIÓ

Un possible origen de les bombes de reflux seria una funció natural en aquells microorganismes amb capacitat per produir antibiòtic i expulsar-los a l'exterior per eliminar els bacteris que competrien al seu voltant. Així per exemple s'han trobat bombes de reflux en bacteris productors d'antibiòtics, amb capacitat per expulsar l'antibiòtic produït, com és el cas de *Streptomyces* spp. amb capacitat de produir i expulsar tetraciclina [96]. S'ha especulat que els sistemes de reflux podrien tenir com a origen una funció de destoxificació, els microorganismes podrien fer front a certes situacions adverses utilitzant aquests transportadors per expulsar els agents antimicrobians o, en general tòxics pel propi bacteri fora del citoplasma.

Les bombes de resistència a múltiples antibiòtics, van ser descrites per primera vegada en cèl·lules eucariotes, on es va identificar una proteïna, la glicoproteïna P, que era capaç de conferir resistència a un ampli rang d'agents citotòxics mitjançant un mecanisme de transport actiu acoblat a la hidròlisis de l'ATP [93]. El primer mecanisme de reflux bacterià, es descobrí a principis dels anys 80, gràcies a estudis pioners realitzats per Stuart Levy, el qual identificà la proteïna citoplasmàtica que catalitzava el transport (depenent d'energia) de la tetraciclina fora de la cèl·lula, tant en bacteris Gram negatius on es trobaren els gens *tetA-tetG*, com en bacteris Gram positius amb els gens *tetK-tetL* [97]. Estudis més recents han demostrat que aquests sistemes estan àmpliament distribuïts tant en el món bacterià com en l'eucariota, en tots els casos es tracta de translocases de membrana amb habilitat per extreure fora de la cèl·lula una gran varietat de substàncies no relacionades entre sí [98].

Totes les bombes de reflux no semblen haver derivat d'una proteïna de reflux ancestral, ja que aquestes proteïnes han anat apareixent de forma independent moltes vegades al llarg de l'evolució. Sembla que aquestes MDR deriven de bombes d'extrusió específiques de bacteris productors d'antibiòtics, que han estat seleccionades per una mutació que permeti a un enzim o una translocasa reconèixer un nou substrat, generalment això porta a un espectre d'acció més ampli [99]. Els criteris que es segueixen per classificar els transportadors de membrana són bàsicament tres: el primer és la font d'energia

utilitzada, el segon es basa en la relació filogènia i per últim l'especificitat del substrat. La classificació més recent té en compte tant el mecanisme de transport com la font d'energia.

Estudis basats en l'anàlisi seqüencial i seguint criteris bioenergètics i estructurals, els transportadors d'antibiòtics es poden dividir en dos classes principals: els transportadors secundaris de múltiples antibiòtics (SMT, *Secondary Multidrug Transporters*) que utilitzen la força protó-motriu i els transportadors ABC (*ATP-Binding Cassette*) de múltiples antibiòtics que utilitzen la hidròlisi d'ATP [100]. Recentment, s'ha identificat una nova família de transportadors anomenada família d'extrusió de múltiples antibiòtics i de compostos tòxics (MATE, *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), de la qual encara es coneixen poques propietats. Dins de cada una d'aquestes classes de transportadors, gràcies a estudis filogenètics, s'han pogut fer divisions dels diferents membres en superfamílies, famílies i *clusters* [101]. En la taula 1.5. podem observar la classificació dels sistemes de reflux.

Degut, fonamentalment, a les diferències estructurals pel que fa a les envoltas de bacteris Gram positius i Gram negatius, aquests dos grups bacterians presenten una organització dels sistemes de reflux molt diferents. En els bacteris Gram positius les bombes de reflux presenten una organització més simple amb un únic component situat a la membrana citoplasmàtica, en canvi, en els bacteris Gram negatius els sistemes de reflux requereixen la funció addicional de dues proteïnes auxiliars a causa de la complexa envolta estructural, que permetrà el pas de les substàncies a través de les dues membranes en un únic pas [102].

Taula 1.5. Classificació dels transportadors de resistència a múltiples antibiòtics [96, 103].

Mecanisme de transport	Superfamília	Família	Distribució
Transportadors secundaris de múltiples antibiòtics (SMT)	SMR <i>Small Multidrug Resistance</i>		EmrE <i>E. coli</i> EbrA, EbrB <i>B. subtilis</i> Mmr <i>M. tuberculosis</i>
			AcrB, F <i>E. coli</i> MexB, D, F <i>P. aeruginosa</i> MtrD <i>N. gonorrhoeae</i> AmrB <i>B. pseudomali</i> Sme E, B <i>S. maltophilia</i>
	RND <i>Resistance Nodulation Division</i>	12 Segments transmembrana (12-TMS)	TetA, B, E <i>E. coli</i> TetC <i>P. aeruginosa</i> TetH <i>P. multocida</i> CmlA <i>P. aeruginosa</i> Bmr, Blt <i>B. subtilis</i> NorA <i>S. aureus</i>
			EmrB <i>E. coli</i> MdfA <i>E. coli</i> LfrA <i>M. smegmatis</i> QacA, Qac B <i>S. aureus</i> Smv A <i>S. typhimurium</i>
		14 Segments transmembrana (14-TMS)	
Transportadors actius primaris	ABC <i>ATP Binding Cassette</i>		Glicoproteïna-P Mamífers LmrA <i>L. lactis</i> Mdr1 <i>H. sapiens</i> Pdr5 <i>S. cerevisiae</i> CDR1 <i>C. albicans</i> EfrAB <i>E. faecalis</i> VcaM <i>V. cholerae</i>
			NorM <i>V. parahaemolyticus</i> YdhE <i>E. coli</i>
MATE <i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>			

1.4.1.1 Transportadors ABC (ATP-*Binding Cassette*)

Els transportadors ABC són el principal mecanisme de reflux en les cèl·lules eucariotes. Aquests tipus de transportadors, obtenen l'energia pel transport de substàncies de la hidròlisi de l'ATP. El membre d'aquesta família amb més importància a nivell clínic i el millor caracteritzat fins al moment, és la glicoproteïna P, que confereix resistència a les drogues anticanceroses i a un ampli grup de productes citotòxics. La glicoproteïna P està codificada per un únic gen humà i de rosegador *mdr1* [104]. Dins d'aquesta superfamília també trobem exportadors d'antibiòtics en fongs i paràsits, com la proteïna que confereix resistència als agents antimalària en *Plasmodium falciparum*. En el món bacterià també s'han trobat sistemes homòlegs com el transportador LmrA en *Lactococcus lactis* i MacM, transportador d'*E. coli* que està implicat en el reflux de macròlids [105]. (figura 1.8.a)

Aquests transportadors tenen la capacitat d'extreure de la cèl·lula gran quantitat de components com sucres, aminoàcids, ions, antibiòtics, vitamines, pèptids, etc. i estan formats per una proteïna de més de 1000 aminoàcids. Aquesta proteïna consta de dues parts: una amb 6 segments transmembrana α -hèlix, domini transmembrana hidrofòbic, anomenada TMD i un domini hidrofílic situat al citoplasma, anomenat NBD on es troba el domini de hidròlisi de l'ATP. Aquesta proteïna, normalment, es troba associada amb una altra proteïna igual formant un complex dimèric (TMB-NBD-TMB-NBD), en molts casos un únic gen codifica els quatre dominis [100, 106].

1.4.1.2 Transportadors secundaris de múltiples antibiòtics (SMT)

En organismes procariotes, l'extrusió d'antibiòtics i d'altres components tòxics es deu a l'acció de bombes que tenen el procés de reflux acoblat al influx d'un protó. Aquests transportadors estan involucrats en el transport de sucres, anions i antibiòtics i són conduïts pel gradient electroquímic, normalment per la força protó-motriu. Aquestes bombes també poden anomenar-se antitransportadores de protons. Els SMT són els transportadors més estudiats i més trobats en els organismes procariotes i especialment en estudis realitzats en *E. coli*, on s'han identificat fins al moment 29 transportadors secundaris (19 MFS, 7 RND i 3 SMR) mentre que només s'han descrit 7 transportadors primaris ABC [105].

Aquesta família de transportadors es pot dividir segons la mida i les similituds estructurals en: MFS, SMR, RND i DME (*drug/metabolite efflux family*), escassament descrita fins al moment.

MFS: *major facilitator superfamily*

Es tracta de transportadors implicats en el transport de diferents compostos com sucres, intermediaris del cicle de Krebs, esters fosfats, oligosacàrids i antibiòtics. Són proteïnes d'aproximadament 400 aminoàcids amb 12 segments transmembrana α -hèlix amb un llarg loop citoplasmàtic entre les hèlix sis i set. Un reduït nombre d'aquests transportadors presenten 14 segments transmembrana α -hèlix amb *loop* citoplasmàtic menor. Per tant, es podria afirmar que els transportadors MFS es poden dividir en dues subfamílies els transportadors 12-TMS i els transportadors 14-TMS [91, 100]. (figura 1.8.c)

NorA de *Staphylococcus aureus* fou la primera que es descobrí de la subfamília 12-TMS, en aïllats clínics resistents a quinolones i meticil·lina; l'estudi de la seqüència i la caracterització del gen *norA* va revelar que la proteïna NorA estava constituïda per 338 aminoàcids i conferia resistència a compostos hidrofílics i molt poca o nul·la resistència a antibiòtics hidrofòbics. Estructures i funcions homòlogues han estat descrites en altres microorganismes com *Bacillus subtilis* amb proteïna Blt i en *E. coli* amb proteïnes com TetA i Bcr, entre altres. La resistència a compostos antisèptics i desinfectants, incloent-hi compostos d'amoni quaternari i diamines, en *S. aureus* és gràcies a una proteïna 14-TMS codificada pel gen *qacA* [100]. Actualment la proteïna millor caracteritzada i més ben estudiada és la proteïna TetB d'*E. coli*, la qual confereix resistència a la tetraciclina [91].

SMR: *small multidrug resistance family*

En els bacteris Gram positius són importants les bombes pertanyents a aquesta família, una de les més conegudes i estudiades és la proteïna codificada pel gen de múltiple resistència de l'estafilococ *smr* (*staphylococcal multidrug resistance*). Aquestes bombes tenen la capacitat d'expulsar compostos molt variats com colorants aromàtics i amines quaternàries fora de la cèl·lula, a través d'una membrana simple, com és la membrana citoplasmàtica [48, 98]. En el cas dels bacteris Gram negatius, aquest tipus de bombes el que fan es

transportar els compostos del citoplasma cap a l'espai periplasmàtic; aquest mecanisme és ineficaç ja que de forma immediata el compost es tornat al citoplasma. Per aquest motiu en bacteris Gram negatius trobem aquestes bombes de reflux en poca quantitat i tenen menys importància clínica pel que fa a la resistència a antibiòtics [63].

Les proteïnes transportadores SMR són les que tenen una mida menor dins dels transportadors secundaris. Es tracta de petites proteïnes formades per uns 110 aminoàcids que travessen la membrana només en quatre ocasions (4-TMS). Les proteïnes més ben caracteritzades són les pertanyents al grup Smr de *S. aureus*, QacC i QacD. Un altre exemple és el gen *emrE* que en sobreproducció confereix resistència al bromur d'etidi, tetraciclina, eritromicina i sulfamides en *E. coli* i la proteïna QacE codificada per un integró situat en el plasmidi R751 en *Klebsiella aerogenes* [91]. En *M. tuberculosis* es va identificar el transportador Mmr, adquirint resistència a bromur d'etidi, eritromicina, acriflavina, etc. Recentment s'ha caracteritzat un transportador homòleg a EmrE en *P. aeruginosa* [100, 104]. (figura 1.8.b)

RND: *resistance-nodulation-cell division family*

L'últim grup de transportadors que utilitzen la força protó-motriu són els pertanyents a la superfamília RND. Es tracta de transportadors molt més llargs que els MFS, formats aproximadament per uns 1000 aminoàcids, encara que adopten una estructura similar als transportadors MFS amb 12 α -hèlix transmembrana, però en aquest cas es caracteritza per tenir dos llargs *loops* periplasmàtics o extracitoplasmàtics entre les hèlix 1 i 2 i les hèlix 7 i 8 [105]. Aquests inusuals dominis hidrofílics fan que la topologia de la membrana dels transportadors RND sigui més similar a un receptor que a un transportador [107].

La proteïna RND més important implicada en el reflux d'*E. coli* és AcrB codificada pel gen *acrB* amb capacitat per expulsar fora de la cèl·lula gran quantitat de compostos entre els que trobem detergents, gran varietat d'antibiòtics, agents quimioterapèutics i molècules relativament apolars que es troben situades a la membrana. En la determinació de la seqüència de diferents parts del genoma d'*E. coli* s'han trobat dos gens homòlegs a *acrB*, els gens *acrF* i *ybiV* (*orfB*) [98, 100]. Pel que fa a *P. aeruginosa*, patogen oportunista

clínicament molt important, s'ha identificat una proteïna transportadora d'uns 112 kDa anomenada MexB, i les seves proteïnes homòlogues, MexD i MexF, totes tres confereixen resistència un gran varietat d'antibiòtics [98]. En els últims estudis realitzats utilitzant quimeres dels transportadors, la especificitat del transport del substrat es creu que pot residir en els *loops* del periplasma, ja que contenen diversos llocs d'unió per compostos estructurals que no estan relacionats [105]. (figura 1.8.d)

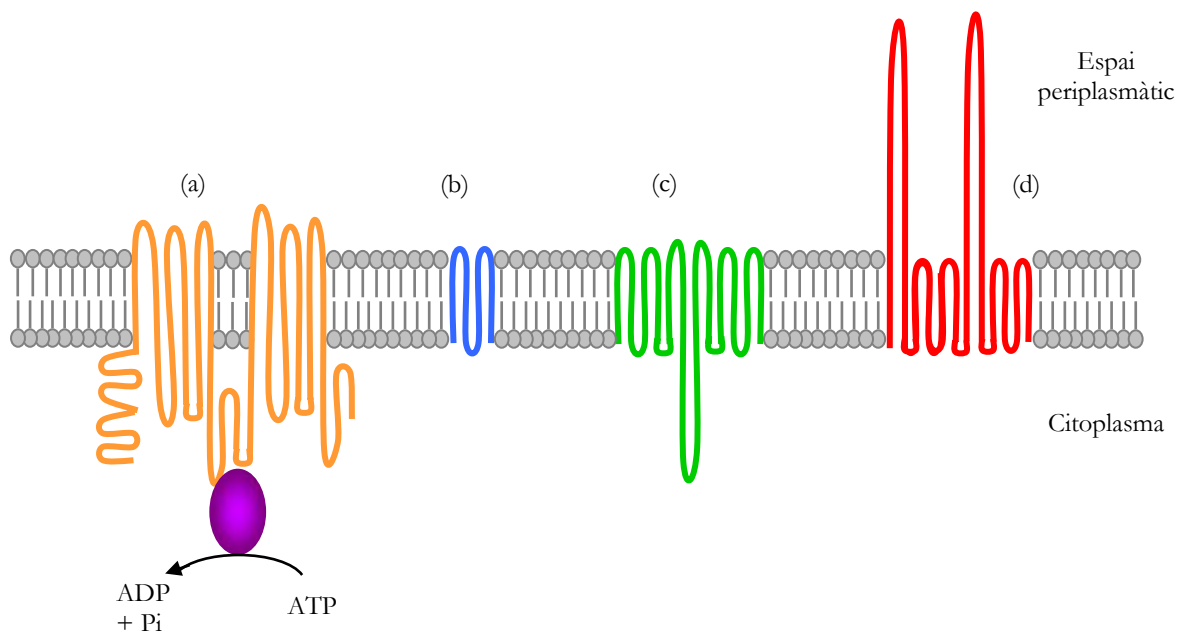


Figura 1.8. Representació topològica dels diferents sistemes de reflux existents en els microorganismes. (a) Transportadors de la superfamília ABC amb el domini NBD on es produeix la hidròlisi de l'ATP. (b) Transportadors de la família SMR amb només 4-TMS. (c) Transportadors MFS amb 12-TMS i un gran *loop* citoplasmàtic. (d) Transportadors de membrana de la família RND amb 12-TMS i dos grans *loops* periplasmàtics.

1.4.2 MECANISME D'ACCIÓ DE LES BOMBES DE REFLUX

Com s'ha comentat anteriorment, en bacteris Gram negatius sembla que tots els sistemes de reflux requereixen tres proteïnes. Un transportador de reflux situat a la membrana citoplasmàtica que pertany a una de les tres famílies de proteïnes esmentades anteriorment, com són els sistemes ABC, RND i MFS que es troben acoblats a dues proteïnes auxiliars: una proteïna transperiplasmàtica que és del tipus proteïna de fusió de membrana (MFP, *membrane fusion protein*) que possiblement, facilita el transport a través de l'espai periplasmàtic; i una proteïna anomenada factor de membrana externa (OMP, *outer membrane protein*), la qual forma un canal a la membrana externa [108]. Aquest model estructural format per tres proteïnes és el conegut com a sistema de reflux i permet el pas del substrats des del citoplasma o la membrana citoplasmàtica cap a l'exterior gràcies al porus format per la OMP i la unió d'aquesta amb el transportador mitjançant la MFP, com es pot veure esquematitzat en la figura 1.9. [109]. D'aquesta manera les bombes de reflux travessen la membrana citoplasmàtica i la membrana externa, facilitant el pas directe del substrat des del citoplasma o la membrana citoplasmàtica cap al medi exterior sense que es produeixi acumulació en el periplasma, a diferència d'altres mecanismes de secreció de substàncies que generen intermediaris periplasmàtics per poder realitzar la secreció [110].

Aquest tipus de complex format per tres proteïnes, va ser descrit per primera vegada per Wandersman i col·laboradors per evidències genètiques indirectes i per la identificació de les proteïnes que participaven en l'expulsió al medi extern de l'hemolisina per *E. coli* a través del complex HlyB-HlyD-TolC, les proteases en *Erwinia chrysanthemum* gràcies al complex PrtD-PrtE-PrtF i la ciclolisina en *Bordetella pertussis* pel complex format per CyaB-CyaD-CyaE. En aquests casos els transportadors són membres de la família ABC, en canvi, la gran majoria de bombes de reflux d'antibiòtics utilitzen la força protomotriu [109]. En el cas de bacteris Gram negatius, destaquen els transportadors AcrAB en *E. coli*, MexAB-OprM en *P. aeruginosa*, que han estat els més estudiats fins al moment i el sistema MtrCDE en *Neisseria gonorrhoeae*, entre altres. En la taula 1.6. estan descrits els tres components dels sistemes de reflux més coneguts en bacteris Gram negatius [98].

Taula 1.6. Sistemes de reflux en bacteris Gram negatius [93].

Transportadors		Proteïna MPF	Canal OMP	Microorganisme	Substrat ^a
RND	AcrB	AcrA	TolC	<i>E. coli</i>	TC, CP, FQ, β -lactàmics, Nov, EM, FuA, Rif, EB, AF, CV, SDS, DOC
	MexB	MexA	OprM	<i>P. aeruginosa</i>	TC, CP, FQ, β -lactàmics (excepte carbapenems), Nov, EM, FuA, Rif
	AcrF	AcrE	?	<i>E. coli</i>	AF, vancomicina
	MexD	MexC	OprJ	<i>P. aeruginosa</i>	TC, CP, FQ, 4a generació β -lactàmics
	MexF	MexE	OprN	<i>P. aeruginosa</i>	CP, FQ, carbapenems
	MtrD	MtrC	MtrE	<i>N. gonorrhoeae</i>	TC, CP, β -lactàmics, EM, FuA, Rif, EB, AF, CV, TX, DOC
MFS	EmrB	EmrA	TolC	<i>E. coli</i>	CCCP, NA, tiolactomicina
	FarB	FarA	MtrE	<i>N. gonorrhoeae</i>	Àcids grassos
	VceB	VceA	TolC	<i>V. cholerae</i>	CCCP, NA, FQ, EM, DOC
ABC	HllyB	HllyA	TolC	<i>E. coli</i>	Hemolisina
	AprD	AprE	AprF	<i>P. aeruginosa</i>	Proteasa alcalina
	PtrD	PtrE	PtrF	<i>E. chrysanthemi</i>	Proteases

^a Abreviacions: TC, tetraciclina; CP, cloramfenicol; FQ, fluoroquinolones; Nov, novobiocina; EM, eritromicina; FuA, àcid fusídic; Rif, rifampicina; EB, bromur d'etidi; NA, àcid nalidíxic; AF, acriflavina; CV, cristall violeta; SDS, sodi dodecil sulfat; DOC, deoxicolat; TX, tween X-100.

La resistència causada per les bombes de reflux als agents nocius va centrar l'atenció dels científics al voltant dels anys vuitanta, quan Stuart Levy i col·laboradors van demostrar que la resistència a tetraciclina que presentava *E. coli* era depenent d'energia, seguit poc després per la demostració que la resistència al cadmi en *S. aureus* es basava en mecanismes de reflux [47].

Al nostre laboratori s'ha evidenciat la presència d'una bomba de reflux, tipus *acrAB* a *S. marcescens* [111]. El loci *acr* confereix resistència davant colorants bàsics, detergents i antibiòtics hidrofòbics. Es creu que la funció biològica de l'operó *acrAB* és la de protegir al bacteri d'inhibidors hidrofòbics que es poden trobar a l'ambient natural, tals com els àcids biliars o el decanoat (àcid gras de 10 carbonis). Aquests agents inhibeixen el creixement de bacteris Gram positius i, en canvi, permeten el creixement de bacteris com *E. coli* gràcies al seu sistema de reflux. Aquesta hipòtesi ha estat confirmada a través de diverses observacions. En primer lloc, l'operó *acrAB* és induït a baixes concentracions de decanoat (5 mM); també es produeix un creixement del bacteri en presència de decanoat; i finalment, hi ha un augment de la seva resistència a la novobiocina i a l'eritromicina (substrats de la bomba de reflux) [112].

El mecanisme d'acció de les bombes de reflux bacterianes podria ser explicat pel funcionament dels sistemes de reflux en les cèl·lules de mamífer (MDR) que tenen la capacitat d'expulsar gran varietat d'estructures diferents, com els agents anticancerosos, principals responsables de la resistència múltiple dels tumors [63]. Segons aquest model, la bomba capturaria els seus substrats quan aquests encara són a la membrana plasmàtica, és a dir, abans que la travessin i entrin al citoplasma. El reconeixement de l'antibiòtic quan està a la membrana és recolzat per diverses observacions, com estudis de mutagènesi dirigida on s'han identificat llocs específics de reconeixement de substrat situats en la regió α -hèlix transmembrana (TMS) i estudis realitzats amb ésters acetoximetílics no fluorescents amb indicadors fluorescents que són expulsats fora de la cèl·lula abans de ser convertits en fluorescents per esterases no específiques del citoplasma [100]. (figura 1.9.).

Si el funcionament dels transportadors RND fos similar al de les cèl·lules de mamífer, permetria explicar tant la baixa especificitat de substrat com el reflux de compostos pels quals la membrana és poc permeable. A més, s'ha observat que el sistema *AcrAB* bombeja antibiòtics β -lactàmics només quan tenen substituents lipofílics, que es poden inserir parcialment a la membrana. Altres sistemes podrien capturar el substrat quan aquest és al interior de la bicapa lipídica o a la seva cara citoplasmàtica, fet que podria explicar les diferències d'especificitat [98].

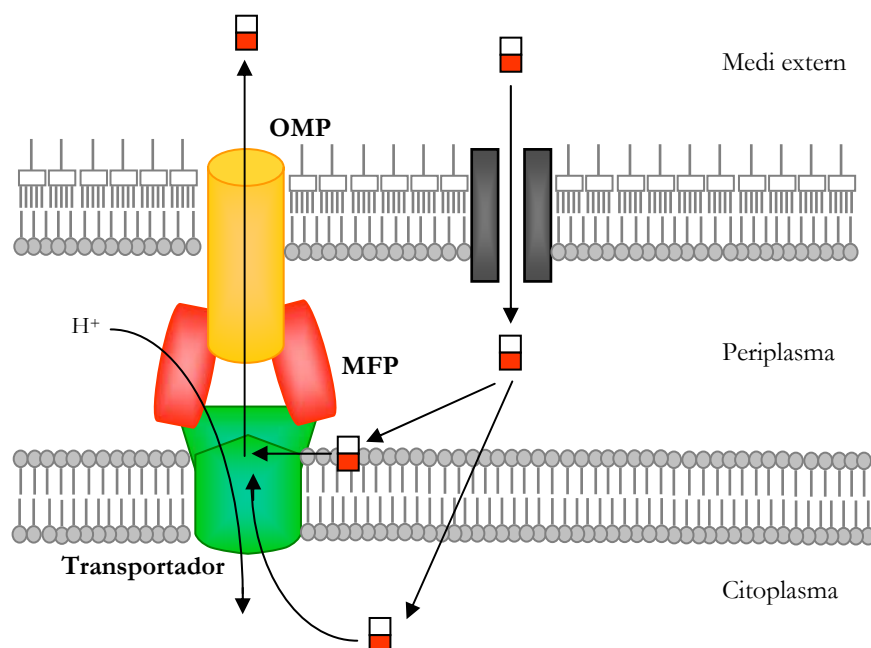


Figura 1.9. Esquema de la composició del sistema de reflux en bacteris Gram negatius amb el transportador i les proteïnes MFP i OMP i el mecanisme d'acció que produeix la sortida d'un antibiòtic a través d'una bomba de reflux [98].

El 1993, dos laboratoris de forma independent van clonar i determinar la seqüència de dos gens, *acrA* i *acrB* dins del mateix operó que codifiquen proteïnes de la família MFP i RND respectivament [113]. És ben conegut que el lloci cromosòmic *acrA* confereix resistència a l'acriflavina i altres colorants catiónics a més de detergents i antibiòtics. La proteïna de la membrana externa associada al sistema AcrAB encara no ha estat identificada amb certesa, però es més que probable que es tracti de la porina formadora de canal TolC, ja que estudis realitzats amb mutants deficients en *tolC* demostren increments de la susceptibilitat a diversos antimicrobians que de cert se saben substrats del sistema AcrAB [91, 102]. La proteïna AcrA està unida directament a la membrana interna però aquesta unió es més estable gràcies a la presència de la proteïna AcrB amb la qual interacciona. AcrB presenta un gran domini periplasmàtic que interactua directament amb la proteïna TolC sense l'ajuda de AcrA, però només amb la presència de la proteïna de fusió de membrana és possible el pas de substàncies cap a l'exterior.

Els tres components de les bombes de reflux en la gran majoria de microorganismes són codificats pel mateix *cluster* de gens formant part d'un operó, com la bomba de reflux de *P. aeruginosa* MexAB-OprM i la de *N. gonorrhoeae* MtrCDE. En canvi, algunes bombes com MexXY de *P. aeruginosa* i AcrAB d'*E. coli*, els hi manca el gen que codifica per la porina de membrana externa (OMP) que es transcriu de forma independent i es pot associar a més d'un sistema de bombeig. En soques clíniques de *K. pneumoniae* i *K. oxytoca* s'ha demostrat la presència de l'operó *acrAB*, molt semblant al descrit en les soques d'*E. coli* [114].

1.4.3 REGULACIÓ DELS SISTEMES DE REFLUX RND

La regulació de l'expressió dels sistemes de bombeig ha de ser molt precisa per evitar els possibles efectes negatius que una desregulació podria tenir sobre la fisiologia bacteriana, ja que si es produís una sobreexpressió d'aquest sistema podria donar lloc a un reflux de metabòlits essencials pel microorganisme. Per aquest motiu, a més d'estar sotmesos a una regulació local (activadora o repressora) per proteïnes codificades en gens adjacents als sistemes de bombeig, la seva expressió ha d'estar controlada per altres factors [93]. Cada vegada s'estan identificant més exemples de regulació de sistemes MDR mitjançant factors de transcripció globals. L'expressió d'AcrAB està subjecta a múltiples nivells de regulació, a un nivell més baix, a una regulació local mitjançant el repressor local AcrR i a nivell global, la seva expressió està modulada per les condicions d'estrès de l'ambient i per gens reguladors globals com *marA*, *soxS* i *rob* [115].

De forma local, l'expressió dels sistemes de reflux es troba reprimida pel producte d'un gen regulador situat en el mateix operó i davant dels gens de la bomba de reflux i que es transcriu en sentit oposat. En la majoria dels casos el producte del gen s'uneix a la regió intergènica reprimint la transcripció tant dels gens de l'operó com la seva pròpia. En ocasions aquesta repressió no és total sinó que permet una expressió basal del sistema de bombeig. Generalment, l'aparició de fenotips de multiresistència està associada a la presència de mutacions als gens reguladors locals o en les seves regions promotores [93]. Sota unes determinades condicions d'estrès incrementa la transcripció del gen repressor *acrR* amb la finalitat de prevenir la sobreexpressió incontrolada de la bomba AcrAB [98].

Aquests i altres resultats suggereixen que les condicions d'estrès tenen un paper molt important en la regulació transcripcional de *acrAB* mentre que el repressor local *acrR* té un paper modulador secundari específic que evita la sobreexpressió [113].

Els reguladors globals s'activen generalment en situacions d'estrès i indueixen l'expressió de nombrosos gens, entre ells, els que codifiquen per la síntesi de transportadors múltiples d'antibiòtics. En aquest sentit s'han descrit dos gens activadors: *marA* i *soxS* que són reguladors positius en presència d'antibiòtics i radicals superòxids, respectivament, incrementant el reflux de diferents components a través de la bomba AcrAB [93].

El locus regulador *mar* (*Multiple Antibiotic Resistance*) està format per dues unitats transcripcionals: *marC* i *marRAB*. El gen *marC* codifica per una proteïna de membrana de funció desconeguda i *marRAB* codifica per un repressor (MarR), un activador (MarA) i una petita proteïna (MarB) de funció que encara no ha estat determinada [116]. La regulació de l'operó respon a condicions d'estrès d'antibiòtics i la seva expressió s'indueix amb components com la tetraciclina, el cloramfenicol, el salicilat sòdic entre altres. En condicions normals s'expressa MarR i s'uneix a regions *marO* evitant la transcripció del gen *marRAB*. La expressió de MarA s'incrementa directament per la inactivació del gen *marR* o indirectament per compostos que entren a través de les porines o per difusió [95]. Alts nivells de MarA indueixen l'activació del gen *micF* que codifica per un antisentit d'OmpF evitant la formació d'aquesta porina de membrana externa fent disminuir la permeabilitat de la membrana i afavorint encara més la resistència bacteriana [94, 113]. Quan es produeix una sobreexpressió de MarA s'activa el sistema de reflux AcrAB/TolC, ja que disminueix l'expressió de *acrR* i a més per protegir el citoplasma augmenta l'expressió de diversos enzims citoprotectors [112, 116], com es pot observar de forma esquemàtica en la figura 1.10.

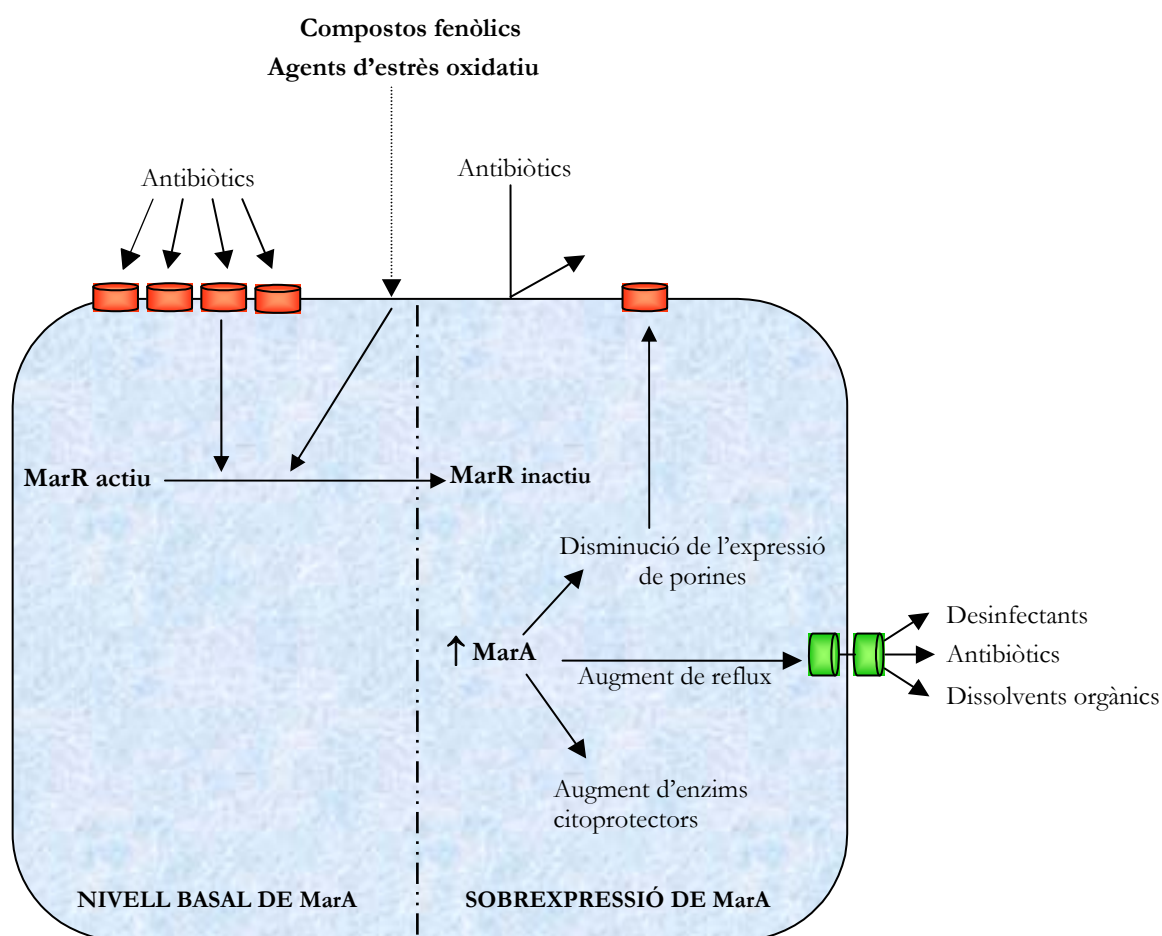


Figura 1.10. Esquema de la regulació del locus *mar* [95].

Soques d'*E. coli* amb mutacions en el gen *marR* presenten resistència a un ampli espectre d'agents antimicrobians entre els que destaquen la tetraciclina, cloramfenicol, rifampicina i les fluoroquinolones. La inserció de Tn5 en el locus de *marA* aboleix la resistència múltiple en *E. coli*, demostrant que MarA juga un paper essencial en els fenotips MDR [117].

El locus *saxRS* té la funció de protecció davant espècies reactives de l'oxigen com l'òxid nítric, el superòxid i el peròxid d'hidrogen i s'ha vist com mutacions en el gen *mar* donen lloc a resistència a agents oxidatius i viceversa, per tant, l'expressió de *saxS* juga un paper important en la resistència als antibiòtics [113, 118]. L'operó *saxRS* conté dos gens que es codifiquen de forma divergent, *saxS* codifica per una proteïna activadora i *saxR*. La

proteïna SoxR actua com a sensor de radicals superòxids que produeixen la seva oxidació, la qual indueix la transcripció de *soxS* que, al mateix temps, activa la transcripció de gens com l'endonucleasa que repara el DNA, el gen *micF* (inhibidor d'*ompF*) entre altres [50, 119]. Mutacions en *soxR* donarien lloc a una sobreexpressió de *soxS* induint en el bacteri resistència a diversos antibiòtics. També es creu que *soxS* podria afavorir la transcripció de *marA* [56].

Mitjançant tècniques d'hibridació DNA-DNA, s'han identificat sistemes de regulació comuns en altres espècies d'enterobacteris com *Klebsiella*, on s'ha identificat un gen homòleg a *marA* anomenat *ramA*, que codifica per la proteïna activadora RamA [118]. Aquest gen forma part d'un locus que a més inclou *romA* i *orf82*. Aquest darrer component, *orf82*, podria correspondre a un transportador catiónic, tot i que actualment encara no s'ha demostrat [117].

Els resultats d'estudis realitzats en soques de *Klebsiella* amb el gen *ramA* inactivat, per inserció d'un transposó, indiquen que aquest locus està implicat en la regulació gènica del sistema de reflux AcrAB produint un augment de la resistència a les fluoroquinolones en aquestes soques [120]. A més s'ha vist com aquest gen actua, de la mateixa manera que *marA*, afavorint la reducció de l'expressió de la porina OmpK35. En la figura 1.11. està esquematitzada l'organització dels operons de múltiple resistència.

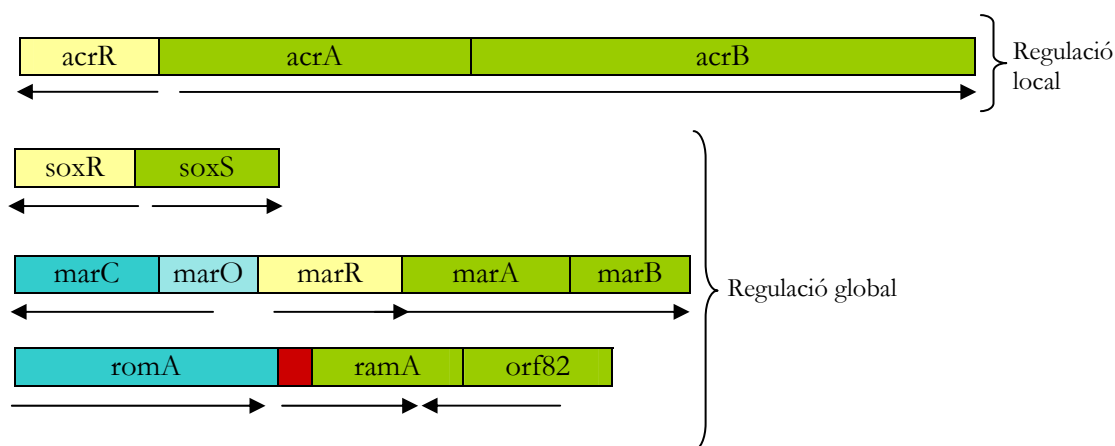


Figura 1.11. Organització molecular dels operons de múltiple resistència en bacteris Gram negatius [50].

1.4.4 EL PAPER DE TolC EN LES BOMBES DE REFLUX

La proteïna TolC (*Tolerance to Colicins*) va ser descoberta uns 30 anys enrere, quan s'observà que la seva pèrdua o alteració per mutació conferia resistència a la proteïna colicina E1 (ColE1), una substància produïda per *E. coli* i expulsada a l'exterior amb l'objectiu de inhibir els bacteris del voltant que no tenen capacitat de produir colicina per ells mateixos [121]. Mentre TolC era estudiada com a receptor cel·lular en l'entrada de colícines i fags, es descobrí que tenia un paper molt important en l'expulsió de molècules poc freqüents com grans proteïnes, incloent-hi certs tòxics i enzims i petites molècules nocives com els detergents. Ja més recentment s'ha demostrat la seva participació fonamental en l'expulsió d'antibiòtics fora del bacteri [122].

Es tracta d'una proteïna ubicada en la membrana externa, implicada, com ja s'ha comentat, en una gran varietat de funcions del microorganisme, entre les que destaca formar part dels sistemes de reflux. La proteïna TolC té un paper essencial en l'extrusió d'un gran nombre d'agents antibacterians incloent antibiòtics i detergents. TolC interactua directament amb translocases o bombes de la membrana interna, entre les quals troben proteïnes de la família ABC formant el complex HlyB/HlyD/TolC, que permet l'extrusió de la α -hemolisina, però el més comú és trobar-la formant complex amb proteïnes de la família RND (AcrB/AcrA/TolC) o proteïnes de la família MFS (EmrB/EmrA/TolC) [123]. TolC, també participa en el influx de proteïnes antibacterianes i colicina E1, en la secreció de α -hemolisina i en la regulació dels nivells de porines. Hiraga *et al.* suggereixen que TolC podria estar involucrada en la partició del cromosoma i en el superenrotllament del DNA [124]. S'ha observat que fenotips mutants en TolC són altament pleiotròpics, donant lloc a una hipersensibilitat a agents hidrofòbics (detergents, colorants i antibiòtics hidrofòbics), defectes importants en la importació de colicina E1 i l'exportació d'hemolisina i colicina V, alteracions en la regulació de les porines i fins hi tot defectes en la partició del cromosoma. Això reflecteix la gran complexitat d'activitats que es duen a terme gràcies a aquesta proteïna [125, 126].

Des de 1992 moltes proteïnes de membrana externa, a més de TolC, han estat cristal·litzades, les porines OmpF i LamB, la proteïna OmpA i els transportadors sideròfors FhuA i FepA, observant l'estructura en forma de β -barril, característica en tots els casos. La primera observació de TolC ja indicà que podria presentar una estructura diferent a la resta de proteïnes de membrana externa [127]. La microscòpia electrònica en dues dimensions posà de manifest la presència d'un únic porus i un domini fora de la membrana. Més recentment, Koronakis *et al.* (2000), gràcies a la cristal·lografia de raigs X han revelat la curiosa estructura de TolC, completament diferent a les porines descrites fins al moment [128]. En la figura 1.12. es poden observar les diferències estructurals de TolC i la resta de proteïnes de membrana externa.

Tot i que l'estructura β -barril és comú en totes les proteïnes de membrana externa, el canal de TolC és diferent ja que el trímer forma un únic cilindre, mentre que la resta formen un porus per cada monòmer donant lloc a tres porus (OmpF, LamB) [127], tal com es pot observar en la figura 1.12.

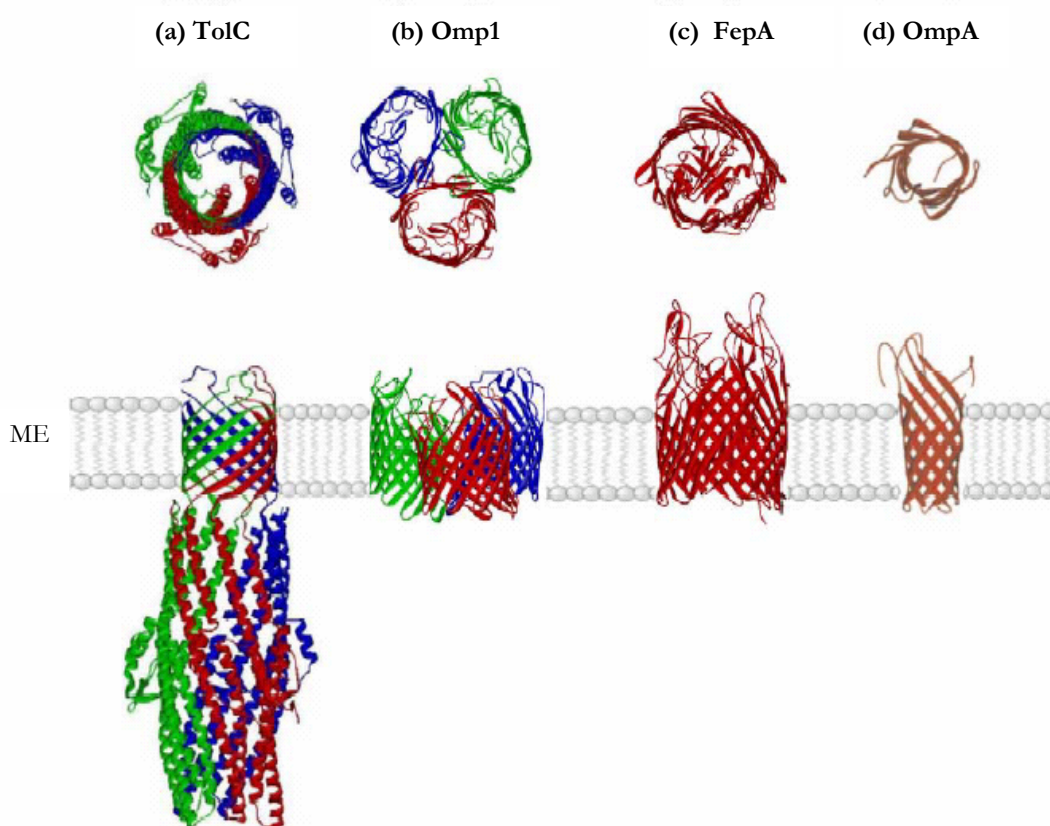


Figura 1.12. Diferents estructures de porines de membrana externa. (a) Proteïna TolC d'*E. coli*. (b) Porina Omp1 de *S. marcescens*. (c) Porina FepA d'*E. coli*. (d) Porina OmpA d'*E. coli* [122].

TolC, estructuralment, és un homotrímer que forma un cilindre estret i buit de 140 Å de llargada. Cada un dels monòmers de la proteïna TolC estan formats per quatre fulles β antiparal·leles, donant lloc a una estructura de barril o cilindre, formada per 12 làmines β situada a la membrana externa, aquest cilindre té una llargada de 40 Å i és anomenat domini de canal. Aquest domini de canal s'estén cap a l'espai periplasmàtic en forma de quatre fulles α antiparal·leles per cada monòmer (dues fulles llargues i contínues i dues més de curtes), formant una llarga estructura en α -hèlix de 100 Å, anomenada domini del túnel [123]. Cap a la part exterior del bacteri s'estenen dos petits *loops* que són el lloc d'unió de bacteriòfags i colicines però no presenta cap *loop* que tanqui l'entrada sinó que és una canal sempre obert a l'exterior de 19.8 Å. En canvi, el fons del túnel, virtualment, està tancat per una sèrie de α -hèlix superenrotllades amb una obertura d'aproximadament de 3 Å, per on només passen petits ions hidratats. Un tercer domini, format per una barreja d'estructures α i β , forma un cinturó al centre del domini del túnel que es conegut amb el nom de domini equatorial. Aquest últim domini juga un paper molt important en el procés d'exportació [127, 129]. (figura 1.13.).

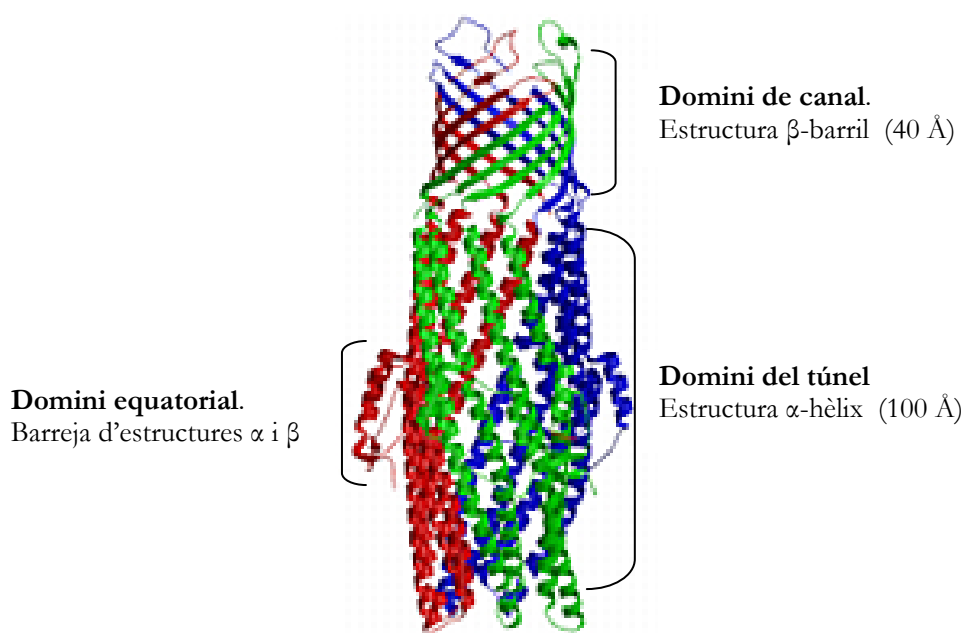
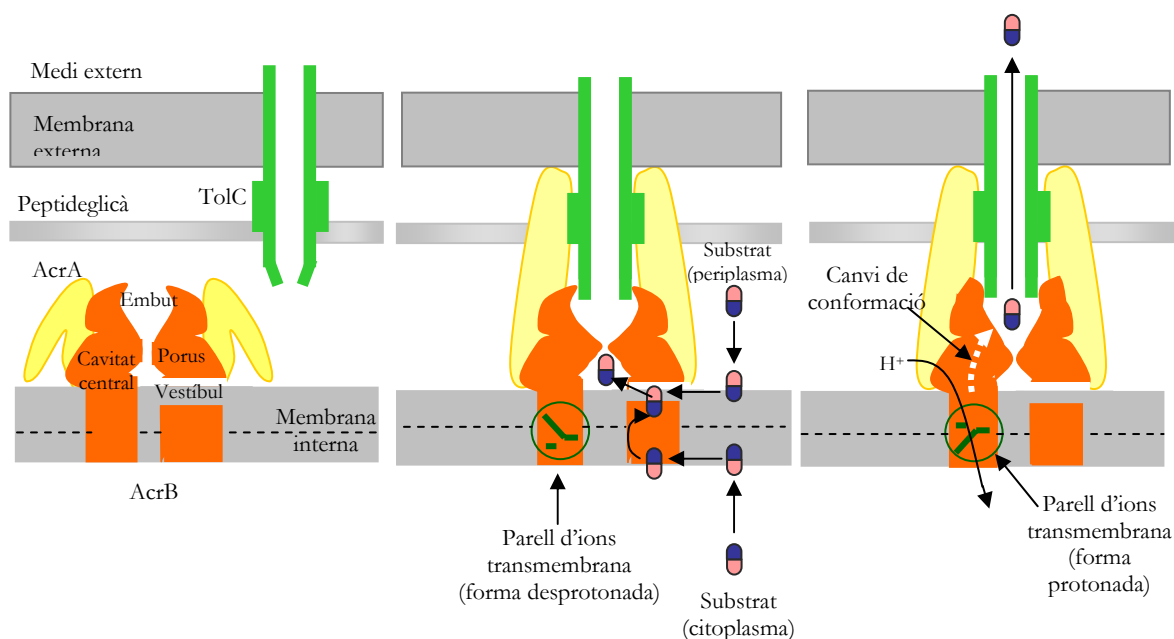


Figura 1.13. Estructura de la porina TolC [123].

TolC no presenta una estructura comú a la resta de porines com és un *loop* interior que obstrueix el diàmetre interior del β -barril, permetent a les petites molècules entrar al periplasma per difusió simple, en canvi, evitant l'entrada de molècules grans, com en PhoE que permet el transport de fosfat inorgànic a través de la membrana externa i les porines específiques, com les transportadores de sucres (maltosa i sucrosa), també presenten el porus obstruït per tres *loops* extracel·lulars [130]. Tot i això, TolC presenta una baixa conductància, presumiblement deguda al tancament que presenta en l'entrada al periplasma [131].

El diàmetre interior de TolC forma un porus de 19.8 Å, en la part del canal de membrana externa que s'estén cap a la major part del túnel. L'entrada al periplasma a través de TolC es troba bloquejada per un plegament en espiral, per tant per l'expulsió de proteïnes i altres compostos és necessari que s'obri aquesta entrada [132]. Normalment, TolC no està unida al complex proteïna de membrana externa/proteïna periplasmàtica, la seva unió al complex es produeix quan un antibiòtic o qualsevol altra substància ha ser expulsada, llavors entra en contacte amb la proteïna periplasmàtica. La proteïna periplasmàtica, que actua com un adaptador, interactua amb el domini equatorial de la proteïna TolC produint un canvi conformacional que fa que les estructures α -hèlix del domini del final del túnel es repleguin i adquireixin una conformació diferent fent que aquesta constricció s'obri permeten la sortida de l'antibiòtic [131]. En la figura 1.14. es pot observar de forma esquemàtica com es produeix l'acoblament entre la proteïna de membrana externa TolC i el sistema de reflux AcrAB en presència d'una substància al citoplasma que ha de ser expulsada fora del bacteri.

La utilització de desacobladors químics en transportadors que utilitzen l'ATP, inhibeixen el transport de molècules però no la unió dels tres components HlyB/HlyD/TolC [122]. El complex AcrAB-TolC es manté unit encara que la força protomotriu estigui inactivada amb carbonilcianida *m*-clorofenilhidrazona (CCCP), indicant que les tres proteïnes que formen part de la bomba es troben pròximes però no necessàriament indicaria una interacció entre elles [133].



1. Estat de repòs
AcrAB i TolC es troben separats.

2. Unió d'una substància
La substància es introduïda dins la cavitat central directament des de la cara externa de la membrana interna a través del vestíbul o a través de la cara interna per un moviment de *flip-flop*.

3. Acoblament energètic
Quan els ions transmembrana es protonen el porus s'obren i permeten la sortida de la substància a expulsar a través del canal de membrana externa.

Figura 1.14. Mecanisme proposat pel transport d'antibiòtics i altres substàncies a través del sistema de reflux AcrAB-TolC (reproduït de [134]).

La proteïna TolC ha estat molt estudiada especialment en *E. coli*, però també s'ha identificat en altres bacteris Gram negatius com *Enterobacter* spp. i *Salmonella* spp. [135]. El paper de TolC en la patogènesi de bacteris entèrics com *E. coli*, *V. cholerae* i *S. enterica*, s'ha demostrat en moltes ocasions, especialment pel que fa a les infeccions en soques patògens d'animals mamífers, però també hi ha estudis que demostren la seva presència en soques bacterianes patògens de plantes i s'ha arribat a demostrar el paper de TolC en la resistència a antimicrobians químics utilitzats en les plantes [136]. Tot i això encara no es coneix molt bé quin és el mecanisme pel qual TolC rep els substrats des de la membrana interna i els porta cap a l'exterior.

2. OBJECTIUS

En la introducció s'ha exposat que l'aparició de soques resistents als antibiòtics és un procés lent i complex però que en els últims anys s'ha vist afavorit pel seu ús inadequat i abusiu, tant pel que fa al consum humà com per l'alimentació animal. Els treballs que s'han realitzat fins al moment en aquest laboratori han seguit una trajectòria comú basada en l'estudi dels mecanismes de resistència als antibiòtics en soques d'origen clínic. S'ha treballat sobre diferents mecanismes resistència a antibiòtics en bacteris Gram negatius com *S. marcescens*, *H. influenzae* o *N. meningitidis*. Seguint la mateixa línia d'investigació, el microorganisme estudiat en aquest treball fou el gènere *Klebsiella*, patògen en l'àmbit hospitalari causant d'una gran varietat de quadres clínics entre els que destaquen pneumònies, infeccions urinàries, septicèmies, entre altres.

Com ja s'ha esmentat en la introducció, en els últims anys el gènere *Klebsiella* s'ha situat entre els vuit patògens hospitalaris més importants, degut fonamentalment a l'augment de resistència que ha presentat vers una gran varietat d'antibiòtics, com els antibiòtics β -lactàmics que eren els més utilitzats pel tractament d'infeccions causades per *Klebsiella*. Això ha portat a la utilització de nous agents antimicrobians entre els que destaquen les fluoroquinolones i en especial la ciprofloxacina donant lloc a l'aparició de soques resistents a aquests antibiòtics per diversos mecanismes.

Tenint en compte aquestes premisses, el propòsit del nostre treball va ser l'estudi dels mecanismes implicats en la resistència a les quinolones en soques clíniques tant de *K. pneumoniae* com de *K. oxytoca*. Posteriorment, l'objectiu de l'estudi es va centrar en els mecanisme de resistència a les quinolones per sistemes de reflux i aprofundir en l'estudi i la participació de la proteïna de membrana externa, TolC, en les bombes de reflux. A tal efecte es van plantejar els següents objectius parcials :

1. Estudiar el patró de susceptibilitat antimicrobiana de diverses soques de *Klebsiella pneumoniae* i de *Klebsiella oxytoca* d'origen clínic.
2. Analitzar el patró de proteïnes de membrana externa de les soques clíniques per poder determinar el seu paper en la resistència antimicrobiana.

3. Realitzar un estudi dels possibles mecanismes moleculars implicats en la resistència a les fluoroquinolones i en concret a la ciprofloxacina de les soques clíniques de *Klebsiella*. Pel que és necessari:
 - a. Analitzar les principals dianes de les fluoroquinolones, amb la finalitat de determinar mutacions en els gens on actuen aquests antibiòtics.
 - b. Relacionar els nivells de resistència a ciprofloxacina amb la presència de mutacions en els gens diana de l'antibiòtic.
 - c. Comprovar i avaluar l'acció d'un mecanisme actiu de reflux implicat en la resistència a les fluoroquinolones.
4. Clonar i determinar la seqüència de la proteïna de membrana externa TolC i establir un model de topologia de la seva estructura tridimensional a partir de la seqüència.
5. Determinar l'activitat de la proteïna TolC com a receptor de la bacteriocina colicina E1.
6. Aïllar la proteïna TolC a partir d'una soca de *E. coli* deficient en aquesta proteïna per tal de realitzar estudis fisicoquímics de la proteïna mitjançant la tècnica de *Lipid Planar Bilayer*.
7. Determinar la participació de la proteïna TolC en els sistemes de reflux mitjançant un estudi comparatiu.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 SOQUES BACTERIANES

Les soques bacterianes, junt amb les seves característiques més importants, utilitzades en la realització d'aquest treball s'exposen en les taules 3.1., 3.2. i 3.3.

Taula 3.1. Relació de les soques d'*Escherichia coli* utilitzades.

SOCA	CARACTERÍSTIQUES	ORIGEN
DH5a	Soca que conté el vector de clonatge Amp ^r amb elevat número de còpies	Stratagen
XL1-Blue	Soca deficient en recombinases utilitzada per al creixement i clonació de plasmidis amb una elevada eficiència de transformació	Stratagen
UH302	Soca mancada de les proteïnes de membrana externa: OmpA, OmpC i OmpF	Hiroshi Nikaido
C600 <i>tolC</i> ::Tn5	Soca <i>E. coli</i> amb inserció d'un <i>cassette</i> de kanamicina inactivant el gen <i>tolC</i>	Elisabeth Pradel
<i>E. coli</i> 2510	Soca <i>E. coli</i> productora de colicina E1 (colE1)	Richard Hull
<i>E. coli</i> 2511	Soca <i>E. coli</i> productora de colicina E2 (colE2)	Richard Hull
<i>E. coli</i> 2512	Soca <i>E. coli</i> productora de colicina E3 (colE3)	Richard Hull
UH302pTolC	Soca <i>E. coli</i> UH302 contenint el plasmidi recombinant pTolC que expressa la proteïna TolC	Aquest estudi
C600pTolC	Soca <i>E. coli</i> C600 <i>tolC</i> ::Tn5 que conté el plasmidi recombinant pTolC que expressa la proteïna TolC	Aquest estudi
DH5α-pET21TolC	Soca <i>E. coli</i> DH5α que conté el plasmidi recombinant pET21TolC que expressa la proteïna TolC	Aquest estudi

Taula 3.2. Relació de soques bacterianes utilitzades com a control en la realització dels assaigs.

SOCA	DENOMINACIÓ	ORIGEN
<i>Klebsiella. pneumoniae</i>	K7	Soca de col·lecció (CECT 434) ^(a)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	EA	Soca de col·lecció (CECT 684) ^(a)
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>	Soca de col·lecció (CECT 142) ^(a)

(a) Colección Española de Cultivos Tipo [137].

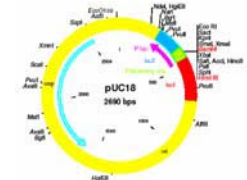
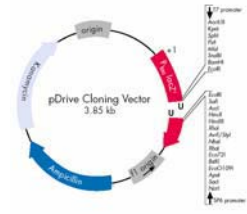
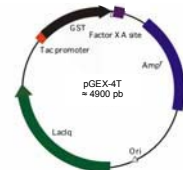
Taula 3.3. Relació de les soques d'origen clínic de *Klebsiella*.

SOCA	DENOMINACIÓ	ORIGEN
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 179905	K1	Urocultiu
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 183021	K2	Bilis
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 188221	K3	Sang
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 187899	K4	Sang
<i>Klebsiella. oxytoca</i> 170982	K5	Catèter arteria
<i>Klebsiella oxytoca</i> 179213	K6	Orina

3.2 VECTORS PLASMÍDICS

En taula 3.4. es descriuen els vectors utilitzats durant la realització d'aquest treball experimental. En tots els casos es tracta de vectors de tipus plasmídic.

Taula 3.4. Relació dels vectors utilitzats en aquest treball.

NOM	CARACTERÍSTIQUES	MAPA
<i>puC18</i>	Vector de clonació amb un gen de resistència a l'ampicil·lina. Els inserts clonats s'expressen sota el control del promotor <i>lac</i> , induïble per IPTG. Conté el gen <i>lacZ</i> que permet seleccionar per color, colònies recombinants en medi amb X-Gal i IPTG.	
<i>pDrive Cloning Vector</i>	Vector de clonació amb gens de resistència a kanamicina i ampicil·lina. Conté un únic lloc de restricció al costat del lloc de clonació, el qual té dos promotors T7 i SP6, permeten la transcripció <i>in vitro</i> dels productes de PCR clonats.	
<i>pGEX-4T</i>	Vector d'expressió amb un promotor <i>tac</i> induïble per IPTG. Conté un gen codificant per GST (Glutation-S-Transferasa) i una seqüència d'aminoàcids diana per la trombina.	

3.3 MEDIS DE CULTIU

3.3.1 BROU DE TRIPTONA I SOJA (TSB)

Medi líquid altament nutritiu utilitzat pel creixement dels microorganismes en general i també utilitzat en experiments de genètica molecular.

Composició en g/l:

Peptona caseïna	17.0
Peptona de soja	3.0
Clorur de sodi	5.0
Fosfat dipotàssic.....	2.5
Glucosa.....	2.5

Es dissolen 30 g del producte en 1 l d'aigua destil·lada, s'ajusta el pH a 7.3 ± 0.2 a 25°C i s'esterilitza a l'autoclau a 121°C durant 20 minuts.

3.3.2 AGAR DE TRIPTONA I SOJA (TSA)

Medi sòlid equivalent al TSB però sense glucosa ni fosfat, utilitzat pel creixement en medi sòlid de les soques bacterianes i per la seva conservació a curt termini.

Composició en g/l:

Peptona caseïna	15.0
Peptona de soja	5.0
NaCl.....	5.0
Agar.....	15.0

Es dissolen 40 g del producte en 1 l d'aigua destil·lada, s'ajusta el pH a 7.3 ± 0.2 a 25°C. Es fa bullir a fi de que l'agar quedi completament dissolt. S'esterilitza a l'autoclau a 121°C durant 20 minuts i es distribueix en plaques de Petri estèrils.

3.3.3 LURIA BROTH (LB)

Medi de cultiu pel creixement de microorganismes que no siguin exigents en els seus requeriments alimentaris. Utilitzat com a medi de creixement en l'estudi de l'expressió de les proteïnes de la membrana externa i pels assaigs de permeabilitat.

Composició en g/l:

Peptona tríptica de caseïna	10.0
NaCl.....	0.5
Extracte de llevat.....	5.0

Es dissolen 15 g del producte en 1 l d'aigua destil·lada, s'ajusta el pH a 7.2 ± 0.2 a 25°C, i s'esterilitza a l'autoclau a 121°C durant 20 minuts.

3.3.4 MÜLLER-HINTON BROTH (MHB)

Medi nutritiu utilitzat en els experiments de sensibilitat a agents antimicrobians pel mètode de dilució en líquid en plaques de *microtiter*.

Composició en g/l:

Peptona.....	17.5
Midó.....	1.5
Extracte de carn	4.0

Es dissolen 22.5 g del producte en 1 l d'aigua destil·lada, s'ajusta el pH a 7.3 a 25°C, i s'esterilitza a l'autoclau a 121°C durant 20 minuts.

3.3.5 AGAR DE MÜLLER-HINTON (MHA)

Medi nutritiu sòlid utilitzat en els experiments de sensibilitat a agents antimicrobians pel mètode de difusió en agar.

Composició en g/l:

Peptona.....	17.5
Midó.....	1.5
Extracte de carn	4.0
Agar.....	15.0

Es dissolen 22.5 g del producte en 1 l d'aigua destil·lada, s'ajusta el pH a 7.3 a 25°C. Es bull a fi de que l'agar quedi completament dissolt. S'esterilitza a l'autoclau a 121°C durant 20 minuts i es distribueix en plaques de Petri estèrils.

3.3.6 AGAR LURIA

Medi de cultiu utilitzat pel creixement i la selecció de microorganismes transformants d'*Escherichia coli*.

Composició en g/l:

Peptona tríptica de caseïna	10.0
Extracte de llevat.....	5.0

Es dissolen 15 g del producte en 1 l d'aigua destil·lada, s'ajusta el pH a 7.2 a 25°C. Es bull a fi de que l'agar quedi completament dissolt i s'esterilitza a l'autoclau a 121°C durant 20 minuts.

3.3.7 MEDI DE CONSERVACIÓ: TSB AMB GLICEROL

Medi utilitzat per la conservació a llarg termini mitjançant congelació de les soques bacterianes. La seva composició és TSB amb un 20% de glicerol. El medi es prepara dissolent 3 g de TSB en 80 ml d'aigua destil·lada i, posteriorment s'afegeixen 20 ml de glicerol. Es barreja bé i s'esterilitza a l'autoclau a 121°C durant 20 minuts. Per conservar les diferents soques utilitzades, es va seguir el següent procediment:

- Es realitzaren cultius en 5 ml de medi líquid TSB, incubats a 37°C durant aproximadament 18 hores.
- A continuació, es centrifugà 1 ml de cultiu en tubs *eppendorf* a 8000 x g durant 5 minuts a temperatura ambient.
- El sediment es va resuspendre en 1 ml de medi de conservació.
- Es guardaren els tubs *eppendorfs* a -80°C fins la seva utilització.

Si es parteix d'un cultiu en medi sòlid, el creixement de la placa es resuspèn en 1 ml de medi de conservació i es procedeix de la mateixa manera.

3.4 AGENTS ANTIMICROBIANS I ALTRES SUBSTÀNCIES UTILITZADES

3.4.1 ANTIBIÒTICS

Els antibiòtics utilitzats en la realització d'aquest treball per a la determinació de la susceptibilitat antimicrobiana a diversos agents antimicrobians, s'exposen a la taula 3.5.

3.4.2 ALTRES SUBSTÀNCIES

Colorants

- Acriflavina: Es preparà un *stock* en solució aquosa a un concentració de 100 mg/ml. Es mantingué a temperatura ambient protegida de la llum.
- Cristall violeta: Es preparà un *stock* en solució aquosa a una concentració 100 mg/ml. Es mantingué a temperatura ambient.
- Bromur d'etidi: Es preparà afegint 1 g de bromur d'etidi en 100 ml d'aigua destil·lada estèril. Es mantingué a temperatura ambient protegit de la llum.

Inhibidors metabòlics

- Carbonil Cianida M-Clorofenilhidrazona (CCCP): Es preparà un *stock* en solució alcohòlica de metanol a una concentració 10 mg/ml. Es mantingué a -20°C protegit de la llum.

Altres substàncies: Per la selecció de soques d'*Escherichia coli* XL1-Blue recombinants mitjançant el sistema de α -complementació [138], els medis de cultiu es suplementaren amb X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid) i IPTG (isopropil- β -tiogalactopiranosid).

- X-Gal: es preparà una solució concentrada de X-Gal 200 mg/ml en dimetilformamida. La concentració final d'ús va ser de 40 μ g/ml.
- IPTG: es preparà una solució concentrada de IPTG 100 mM en aigua bidestil·lada. S'esterilitzà per filtració. La concentració final d'ús va ser de 100 μ g/ml.

Taula 3.5. Stock d'antibiòtics utilitzats.

ANTIBIÒTIC	CONCENTRACIÓ	SOLVENT
QUINOLONES		
Ciprofloxacina	1 mg/ml	NaOH 0.5N (protegit de la llum)
Àcid nalidíxic	10 mg/ml	NaOH 0.5N
Norfloxacina	10 mg/ml	NaOH 0.5N
Ofloxacina	10 mg/ml	NaOH 0.5N
Enrofloxacina	10 mg/ml	NaOH 0.5N
β-LACTÀMICS		
Penicil·lina G	100 mg/ml	H ₂ O
Cefotaxima	10 mg/ml	H ₂ O
Cefalotina	10 mg/ml	H ₂ O
Ceftriaxona	10 mg/ml	H ₂ O
Meropenem	10 mg/ml	H ₂ O
Imipenem	10 mg/ml	H ₂ O
Ampicil·lina	50 mg/ml	NaOH
MACRÒLIDS		
Eritromicina	100 mg/ml	Etanol absolut
AMINOGLICÒSIDS		
Gentamicina	100 mg/ml	H ₂ O
Amikacina	100 mg/ml	H ₂ O
Kanamicina	100 mg/ml	H ₂ O
Estreptomina	100 mg/ml	H ₂ O
ALTRES ANTIBIÒTICS		
Cloramfenicol	100mg/ml	Etanol absolut
Tetraciclina	25mg/ml	H ₂ O:etanol (v/v)
Novobiocina	50mg/ml	H ₂ O
Rifampicina	100mg/ml	Etanol absolut

Tots els antibiòtics utilitzats es van esterilitzar per filtració mitjançant filtres estèrils amb un diàmetre de porus de 0.22 µm. Els antibiòtics una vegada dissolts i filtrats es van distribuir en alíquotes i es conservaren a -20°C fins a la seva utilització.

3.5 DETERMINACIÓ DE LA SUSCEPTIBILITAT MICROBIANA ALS ANTIBIÒTICS

La susceptibilitat dels bacteris als agents antimicrobians pot ser determinada *in vitro* per diversos mètodes. Per valorar la susceptibilitat de les soques clíniques de *Klebsiella* a diferents antibiòtics s'utilitzaren dos d'aquets mètodes. D'una banda es realitzaren antibiogrames emprant el mètode de difusió amb discs impregnats d'antibiòtics i d'altra banda es determinà la concentració mínima inhibidora pel mètode de dilució en medi líquid.

3.5.1 ANTIBIOGRAMA

Mètode basat en la utilització dels principis de difusió en agar. Aquest procediment és un dels més generalitzats, ja que és un mètode fàcil que es pot dur a terme com a rutina diària i ofereix resultats qualitius o semiquantitatius. Per aquest mètode s'estableixen tres categories: S (Sensible), I (Intermedi) i R (Resistent). El mètode utilitzat fou descrit per Barry i Thornberry el 1991.

- Es va partir d'un cultiu en placa del microorganisme, del qual es varen agafar diverses colònies que es resuspengueren en 2 ml de Müller-Hinton.
- Es va mullar extensament un isòtop estèril en el tub i sembrà el inòcul en plaques de Müller-Hinton agar. La sembra es realitzà fent lliscar el isòtop per tota la placa en tres direccions.
- Després de 10 minuts, assegurant-se que la placa fos seca, es depositaren els discs d'antibiòtic a la superfície de l'agar amb unes pinces estèrils.
- Les plaques s'incubaren a 37°C durant 18 hores.

La lectura es realitzà mesurant el diàmetre dels halos d'inhibició del creixement complets que es van produir al voltant dels discs, expressant els resultats en mil límetres. El diàmetre d'inhibició fou proporcional a la susceptibilitat del microorganisme a l'antibiòtic estudiat. Per conèixer la resistència o la susceptibilitat d'una soca als diversos antibiòtics estudiats, es transferir el diàmetres dels halos d'inhibició a les taules de referència

establertes i publicades pel *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) en el seu suplement *Disk diffusion supplemental Tables* [139].

3.5.2 DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ MÍNIMA INHIBITÒRIA

La determinació de la concentració mínima inhibidora (MIC) de cada antibiòtic es va realitzar pel mètode de dilució en el medi Brou de Müller-Hinton en plaques de *microtiter* [140]. El mètode seguit fou el següent:

- Es va partir de cultius cel·lulars obtinguts per sembra en medi líquid de Müller-Hinton i incubats durant 18 hores a 37°C.
- Els cultius es van diluir 100 vegades en brou fresc.
- Es van inocular 10 µl de la dilució del cultiu a cadascun dels pouets de la placa de *microtiter* que contenen dilucions seriades de l'antibiòtic.
- Les plaques de *microtiter* s'incubaren a 37°C durant 18 hores, després de les quals es realitzà la lectura dels resultats.
- Es va determinar la MIC de l'antibiòtic com la mínima concentració d'agent antimicrobià capaç d'inhibir el creixement bacterià.

Per tal de determinar, a partir del valor de la MIC obtinguda de cada soca estudiada, la seva resistència o sensibilitat a cada un dels antibiòtics assajats, els resultats es transferiren a les taules publicades per la NCCLS en el seu suplement *MIC Testing: Supplemental Tables* [141]; en el qual indica per a cada antibiòtic quin és el valor de resistència depenen del microorganisme estudiat.

3.5.3 CONCENTRACIÓ MÍNIMA INHIBITÒRIA AMB CCCP

El procediment seguit va ser el mateix que en l'apartat anterior però en aquest cas a cada tub es va afegir una concentració del inhibidor del metabolisme Carbonil Cianida m-Clorofenilhidrazona (CCCP). La concentració que es va afegir va ser la meitat de la MIC obtinguda per aquest inhibidor.

3.6 EXPERIMENTS DE REFLUX

3.6.1 ASSAIGS DE CREIXEMENT DE *Klebsiella*

3.6.1.1 Corba de creixement

Es determinà la corba de creixement per totes les soques clíniques de *Klebsiella* incloses en l'estudi. Es seguí el següent procediment:

- A partir de cultius en medi líquid, es realitzaren suspensions bacterianes en 100 ml de medi TSB, fins una densitat òptica a 550 nm al voltant de 0.2-0.3.
- Els cultius s'incubaren a 37°C amb agitació i es van anar realitzant mesures de densitat òptica a 550 nm, a intervals de temps d'una hora. Les diferents mesures de densitat òptica obtingudes es representaren gràficament enfront al temps.
- Paral·lelament, es sembraren plaques de TSA de les alíquotes preses en cada instant, prèvia dilució. Aquestes s'incubaren tota la nit a 37°C.
- El recompte del número de colònies crescudes en placa va permetre establir una correlació entre els valors de densitat òptica obtinguts i la concentració.

3.6.1.2 Assaig d'inhibició del creixement

Per a la realització d'aquest assaig es va seguir el protocol descrit per Beyer *et al.* [142].

- A partir de cultius en tubs amb medi TSB, es realitzaren suspensions bacterianes en 100 ml de medi TSB, fins una densitat òptica a 550 nm de aproximadament 0.2-0.3.
- A aquesta suspensió s'hi afegí una concentració de ciprofloxacina de $\frac{1}{4}$ la concentració mínima inhibidora (MIC).
- El cultiu es dividí en dos volums iguals, a un dels quals s'afegí el inhibidor metabòlic CCCP a una concentració final de 10 µg/ml.
- Ambdós cultius s'incubaren a 37°C i es varen anar realitzant mesures paral·leles de absorbància a 550 nm, a intervals de temps d'una hora.
- Les diferents mesures de densitat òptica es representaren front el temps.

3.6.1.3 Efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement bacterià, en presència i absència de CCCP

Per a la realització d'aquest assaig es va seguir el protocol descrit per Beyer *et al.* [142].

- A partir de cultius en tubs amb medi TSB, es realitzaren suspensions bacterianes en 100 ml de medi TSB, fins una densitat òptica a 550 nm d'aproximadament 0.2-0.3.
- Aquesta suspensió es repartí en 10 tubs amb volums iguals, als quals s'hi afegí concentracions creixents de ciprofloxacina. Es va agafar com a valor més elevat el corresponent a la MIC de la soca i es van realitzar dilucions a la meitat fins obtenir un número aproximat de vuit concentracions diferents. Es va deixar en tots els casos un tub sense afegir ciprofloxacina com a control positiu.
- De cada un d'aquests tubs es traspasaren 5 ml a tubs nous i s'hi afegí CCCP a una concentració final de 10 µg/ml.
- Tots els tubs s'incubaren a 37°C durant 7 hores. Passat aquest temps es realitzaren les corresponents mesures de densitat òptica a 550 nm.
- Els valors obtinguts es representaren gràficament.

3.6.2 EXPERIMENTS DE FLUORIMETRIA

L'acumulació de fluoroquinolones determinada per fluorimetria va ser realitzada segons el mètode fluorimètric descrit per Mortimer i Piddock [143], amb algunes modificacions. El protocol que es va seguir fou el següent:

- Es cultivà la soca bacteriana a assajar en medi TSB a 37°C fins que va arribar a una densitat òptica de 0.5-0.7 a una longitud d'ona de 600 nm.
- Les cèl·lules foren sedimentades per centrifugació a 8000 x g durant 15 minuts a temperatura ambient.
- El sediment fou resuspès amb PBS pH 7.5 i es centrifugà de nou en les mateixes condicions.
- El sediment resultant es va resuspendre amb PBS pH 7.5, concentrant-lo 10 vegades. Aquesta suspensió es mantingué a 4°C fins la seva utilització.

- Es va prendre una petita alíquota de la suspensió concentrada i es realitzà un banc de dilucions. Seguidament es sembraren 0.1 ml de cada dilució en plaques de TSA, amb la finalitat de determinar el número de unitats formadores de colònies en el moment de la realització dels experiments d'acumulació.
- Prèviament a la realització dels experiments d'acumulació, la suspensió es va equilibrar a 37°C durant 10 minuts. En alguns experiments el CCCP es va afegir durant aquesta fase, a una concentració final de 10 µg/ml.
- Les quinolones es van afegir a una concentració final de 10 µg/ml en tots els experiments. Els temps d'incubació amb l'antibiòtic van ser de 0, 0.5, 1.5, 3, 6, 8, 10 i 12 minuts.
- Transcorregut el temps d'incubació establert, es van prendre alíquotes de 1 ml i es centrifugà a 10000 x g a 4°C durant 1 minut.
- El sediment es rentà amb 1 ml de PBS pH 7.5 fred, per aconseguir un augment de retenció cel·lular de la quinolona. Es va tornar a centrifugar i el sediment es va resuspendre en 1 ml de tampó de glicina-HCl 0.1 M pH 3, per aconseguir la lisi cel·lular. Les mostres s'incubaren un període de temps no inferior a 2 hores a temperatura ambient i protegides de la llum.
- Transcorregut aquest temps, les mostres es centrifugaren a 11000 x g durant 10 minuts per eliminar les restes cel·lulars.
- Finalment, la concentració d'antibiòtic al sobrenedant es determinà per fluorimetria en un Fluorímetre Hitachi model F-2000.
- A partir dels valors de fluorescència obtinguts i de la corba de calibrat prèviament establerta per les condicions de treball, es determinà la concentració d'antibiòtic acumulada, expressada en ng de quinolona/10⁹ cèl·lules.

Tots els experiments es realitzaren per duplicat en almenys tres ocasions diferents. La longitud màxima d'excitació ($\lambda_{\text{excitació}}$) fou de 279 nm i la d'emissió ($\lambda_{\text{emissió}}$) fou de 447 nm, determinades en 0.1 M glicina-HCl pH 3.

Solució PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

Utilitzat com a solució amortidora de pH en el rentat i manteniment de les cèl·lules bacterianes. Es prepara com a solució *stock* a una concentració deu vegades a la d'utilització.

Composició de la solució x 10 en g/l:

NaCl.....	80.0
KH ₂ PO ₄	2.0
Na ₂ HPO ₄	11.44
KCl.....	11.0
Aigua destil·lada q.s.q	1 l

Solució Glicina-HCl pH 3

Solució utilitzada en els assaigs fluorimètrics per obtenir una lisi dels cultius bacterians.

Composició:

Glicina	0.1 M
HCl.....	24 mM

Es mesclen 50 ml de una solució 0.2 M de glicina, 12 ml d'una solució 0.2M de HCl i aigua destil·lada fins un volum final de 100 ml.

3.7 ANÀLISI DE PROTEÏNES DE MEMBRANA EXTERNA**3.7.1 AÏLLAMENT DE PROTEÏNES DE MEMBRANA EXTERNA (OMP)**

S'utilitzà el mètode descrit per Puig *et al.* [144] que es descriu breument a continuació.

- La soca bacteriana a estudiar, es va fer créixer en 200 ml de LB durant 18 hores.
- El medi de cultiu amb el creixement es centrifugà a 8000 x g durant 30 minuts a temperatura ambient i es resuspengué el sediment en 5 ml de solució amortidora Tris-HCl 10 mM pH 7.4.
- Es tornà a centrifugar la suspensió i es resuspengué en 2 ml de la mateixa solució.
- La suspensió cel·lular fou sonicada durant tres períodes de 10 minuts cadascun, amb intervals de 5 minuts i mantenint la mostra en un bany de gel.
- Amb l'objectiu de retirar les cèl·lules senceres, es centrifugà la mostra durant 20 minuts a 8000 x g a temperatura ambient.

- El sobrenedant obtingut fou centrifugat a 30000 rpm durant 1 hora a 20°C a fi de sedimentar les membranes totals.
- Per tal de solubilitzar la membrana interna, es va rentar el sediment amb 0.2 ml de SDS 2 % en solució amortidora Tris-HCl 10 mM pH 7.4 i es deixà reposar la suspensió durant 30 minuts a temperatura ambient.
- Un cop transcorregut aquest temps, es sedimentà la membrana externa per centrifugació a 30000 rpm durant 45 minuts a temperatura ambient.
- El sediment fou resuspès en 50 µl de solució amortidora Tris-HCl 10 mM pH 7.4.

3.7.2 VISUALITZACIÓ D'OMP PER ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA DESNATURALITZANTS

Per poder visualitzar les proteïnes de membrana externa es realitzaren gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants. L'electroforesi SDS-PAGE separa les proteïnes en funció del seu pes molecular. Es van dur a terme en un aparell Mini-Protean II (Bio-Rad). La mida dels gels fou de 100 mm d'amplada, 80 mm de llargada i 1mm de gruix. La composició proteica de la membrana externa s'analitzà per electroforesis amb un gel separador al 12% d'acrilamida/bisacrilamida i un gel iniciador amb un 4% d'acrilamida/bisacrilamida.

Preparació del gel de poliacrilamida

- Primerament es va preparar el gel separador al 12% d'acrilamida i es va introduir dins del recipient. Per tal d'evitar que el gel separador estès en contacte amb l'aire i per afavorir així la seva polimerització, per sobre d'aquest es va posar una fina capa d'isobutanol.
- Una vegada polimeritzat (aproximadament al cap de 30 minuts) es va treure l'isobutanol i es va rentar tres o quatre vegades amb aigua destil·lada per acabar de treure els residus de l'isobutanol.
- Seguidament es va posar el gel iniciador al 4% de poliacrilamida damunt del gel separador i s'afegí la pinta.

- Una vegada polimeritzat (uns 45 minuts), es fan bullir 5 µl de la mostra a analitzar amb 10 µl de *Loading Buffer* durant 10 minuts i es procedí a carregar les mostres.

Gel separador (12 % acrilamida)

Aigua destil·lada	1.68 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 8.8	1.25 ml
SDS 10% (w/v)	50 µl
Solució acrilamida/bisacrilamida (*)	2 ml

Aquesta solució es desgasà al buit durant 15 minuts ja que l'oxigen és un potent inhibidor de la polimerització. A continuació s'hi afegí els components següents:

Persulfat amònic 10 % (APS)	25 µl
TEMED (N,N,N',N',-tetrametiletildiamina)	2.5 µl

Persulfat amònic 10% (APS): S'ha d'utilitzar immediatament després d'haver-se preparat o bé distribuir-lo en alíquotes i conservar-lo a -20°C.

(*) **Solució d'acrilamida:** La solució d'acrilamida està formada per un *stock* al 30% de acrilamida/bisacrilamida i es prepara de la següent manera:

Acrilamida	29.2 g
N'N'-bis-metilenacrilamida	0.8 g
Aigua destil·lada	100 ml

Aquesta solució es filtra i es guarda a 4°C protegida de la llum. El temps màxim d'utilització és de 30 dies.

Gel iniciador (4% acrilamida)

Aigua destil·lada	3.05 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 8.8	1.25 ml
SDS 10% (w/v)	50 µl
Solució acrilamida/bisacrilamida	0.65 ml

Aquesta solució també es desgasà al buit durant 15 minuts i a continuació s'afegiren els components següents:

Persulfat amònic 10 % (APS)	25 µl
TEMED (N,N,N',N',-tetrametiletildiamina)	5 µl

Loading Buffer

Aigua destil·lada	4 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS 10% (w/v)	1.6 ml
2- β -mercaptoetanol	0.4 ml
Blau de Bromofenol 0.05% (w/v)	0.2 ml

Recorregut de les mostres

El recorregut electroforètic en solució amortidora de pH o solució de recorregut, es va realitzar a voltatge variable de 70 V al gel iniciador i de 110 V al gel separador.

Solució de recorregut (x5)

Tris Base	15.0 g/l
Glicina	72.0 g/l
SDS	5.0 g/l
Equilibrat a un pH de 8.3.	

Tenyiment de les mostres

- Primerament es van tenyir els gels amb la **solució I** de blau de Coomassie (450 ml metanol + 50 ml àcid acètic + 1 g de Blau de Coomassie + 450 ml d'aigua) i es va deixar 1 hora en agitació constant.
- Posteriorment, es decantà la solució I i s'afegí la **solució II** (Metanol : àcid acètic : aigua destil·lada en proporció 5:1:5), solució de fixació, deixant-lo durant aproximadament 1 hora amb dos o tres canvis de solució nova.
- Per acabar, es va decantar la solució II i es va afegir la **solució III** (Metanol : àcid acètic : aigua destil·lada en proporció 1:1:18), solució de rehidratació. El gel es pot mantenir en aquesta solució durant força temps.

3.8 TÈCNIQUES D'EXTRACCIÓ DE DNA

3.8.1 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE DNA CROMOSÒMIC DE *Klebsiella*

El mètode utilitzat fou una modificació del mètode de Marmur (1961) realitzat per Leranoz *et al.* [145], tal com es descriu a continuació:

- Primerament, s'inoculà la soca de *Klebsiella* en 5 ml de TSB i s'incubà a 37°C durant 18 hores.
- A partir del subcultiu s'inoculà 1 ml del creixement bacterià en 500 ml de TSB i s'incubà durant 18 hores a 37°C en agitació.
- Es recolliren les cèl·lules per centrifugació a 10000 x g durant 10 minuts a 4°C i es resuspengueren amb 50 ml d'una solució de NaCl 0.15 M i EDTA 0.01 M pH 8.0. Posteriorment, s'afegí a aquesta solució 1 ml de lisozim al 1% en 0.25 M Tris-HCl pH 8.0 i s'incubà la mescla en gel durant 10 minuts.
- S'afegiren 10 µl d'una solució de proteïnasa K a una concentració 10 mg/ml i s'agità suaument la mescla.
- Les cèl·lules es trencaren afegint 2.63 ml de SDS al 20% (fins aconseguir una concentració final del 1%) deixant la mescla en un bany a 78-85°C (el interval de temperatura està dins del marge del 10% a la T_m de *Klebsiella*) durant 10-15 minuts. Un canvi bruscat en la viscositat fou indicatiu de la lisi cel·lular.
- Es deixà refredar la mescla a temperatura ambient. A continuació s'afegiren 13.16 ml de NaClO₄ 5 M, de manera que la concentració final del perclorat sòdic fos de 1 M i s'agità. Una elevada concentració de sals ajuda a dissociar les proteïnes dels àcids nucleics.
- Després d'agitar, s'afegiren 32.9 ml (0.5 volums) d'una mescla de cloroform:isoamílic, en proporció 24:1, i s'agità vigorosament durant 30 minuts en un agitador recíproc fins aconseguir una emulsió lletosa.
- Es centrifugà a 17000 x g durant 10 minuts a 4°C, per separar la fase orgànica i la fase aquosa. Es recollí la fase superior aquosa procurant no prendre res de la interfase blanca. Aquesta matèria blanca està composta de restes cel·lulars.
- Es repetí l'extracció amb cloroform:isoamílic 24:1 i es recolliren totes les fases aquoses en un vas de precipitats de vidre estèril.

- Es precipità el DNA cromosòmic afegint 2 volums d'etanol al 95% fred i es recollí simultàniament enrotllant-lo en una vareta de vidre estèril.
- Seguidament el DNA es dissolgué en 15 ml de solució amortidora de pH SSC x 0.1. Un cop resuspès, s'ajustà la concentració de SSC fins a x1 afegint 0.85 ml de SSC x20.
- El RNA present en la suspensió fou eliminat amb un tractament de RNAsa a una concentració final de 50 µg/ml i s'incubà durant 30 minuts a 37°C.
- Després del tractament amb RNAsa, es transferí la solució a tubs de polipropilè i s'afegí el mateix volum d'una solució de fenol:cloroform. Es mesclà i es centrifugà a 10000 x g durant 10 minuts.
- La fase aquosa fou recollida i es tornà a repetir l'extracció amb fenol:cloroform fins que hi hagué una total absència d'interfase de proteïnes cel·lulars.
- Finalment, s'afegí a la mostra igual volum de cloroform:isoamílic. S'agità i es centrifugà. Aquesta extracció permet eliminar les restes de fenol que poguessin haver quedat en la fase aquosa.
- El DNA solubilitzat en la fase aquosa es precipità afegint 0.125 volums d'acetat sòdic 3 M i 0.625 volums d'isopropanol. La solució es deixà a -20°C durant 2 hores i es sedimentà el DNA per centrifugació a 10000 x g a 4°C durant 10 minuts.
- Es rentà el sediment amb etanol 70% fred, sense resuspendre, i es repetí la centrifugació, decantant el sobrenedant i secant les restes d'etanol al buit.
- Finalment, el DNA cromosòmic fou resuspès, un cop sec, en 1 ml d'aigua destil·lada estèril o solució tampó TE.
- Es determinà la concentració de DNA espectrofotomètricament (veure apartat 3.9.1).

Proteïnasa K

Proteïnasa K	20 mg
H2O miliQ	1 ml

S'addiciona cada un dels components en l'ordre senyalat i s'agita fins la completa dissolució.

Es reparteixen alíquotes de 50 µl en *eppendorfs* i s'emmagatzemen a -20°C.

RNAasa (10 mg/ml)

RNAasa A	0.010 g
Tris-HCl 1M pH 7.5	10 µl
NaCl 5 M	3 µl
H ₂ O miliQ	987 µl

Es dissolen tots els components i s'escalfa a 100°C durant 15 minuts. Es deixa refredar en gel i es reparteixen alíquotes de 20 µl en *eppendorf*. S'emmagatzema a -20°C.

Solució de fenol: Fenol bidestil·lat equilibrat a pH 7.8.

A 250 ml de fenol s'hi afegí 0.25 g de 8-hidroxiquinoleïna que actua com antioxidant i proporciona una coloració groguenca que permet distingir la fase fenòlica de l'aquosa.

Es barrejà amb un excés de solució amortidora de pH, Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 i es va deixar reposar fins que les dues fases se separaren. S'eliminà el tampó, reemplaçant-lo per un tampó nou. Aquest procediment es repetí fins que el pH de la fase aquosa es situà al voltant de 7.8, donant-se per finalitzat l'equilibri. El fenol es conservà a 4°C i protegit de la llum.

Solució de fenol:cloroform (1:1)

Es barreja, en una proporció del 50% la solució de fenol i la solució de cloroform:isoamílic.

Solució SSC x 20

Citrat disòdic pH 7.0	0.015 M
NaCl	0.15 M

S'ajusta el pH a 7.0 amb NaOH 10 N. S'esterilitza a l'autoclau 15 minuts a 121°C.

Solució de cloroform:isoamílic (24:1)

Es barregen, 24 volums de cloroform i 1 volum d'alcohol isoamílic.

Solució tampó TE

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA 0.5 M pH 8.0	1 mM

Es barreja bé i s'ajusta el pH a 8.0. S'esterilitza a l'autoclau 15 minuts a 121°C.

3.8.2 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE DNA PLASMÍDIC

S'utilitzaren, indistintament, dues metodologies per l'extracció de DNA plasmídic de les soques d'*E. coli*, una a gran escala (*maxipreps*) i una altra a petita escala (*minipreps*).

3.8.2.1 Extracció a petita escala

Per a l'aïllament de DNA plasmídic a petita escala es va seguir una modificació del protocol descrit per Brinboim i Doly el 1979 i Ish-Horowics i Burke el 1981, basat en la lisi alcalina [138]. Aquest mètode es àmpliament utilitzat en el treball rutinari de clonatge.

- Es va fer créixer el bacteri durant 18 hores a 37°C en medi 2 ml TSB amb l'antibiòtic o antibiòtics adient/s.
- Seguidament, es va sedimentar el cultiu bacterià per centrifugació a 8000 x g durant 30 segons a 4°C i es va descartar el sobrenedant.
- Per tal de rentar el sediment, es va resuspendre el sediment amb 100 µl de Solució I freda i es va agitar vigorosament.
- Es va afegir a la mescla 200 µl de Solució II i es va homogeneïtzar la mostra agitant diverses vegades per inversió.
- Posteriorment, s'incubà 5 minuts en gel per tal de permetre la lisi cel·lular i, transcorregut aquest temps, s'afegiren 150 µl de Solució III freda. La mescla es va agitar vigorosament per inversió i s'incubà en gel durant 3-5 minuts.
- El lisat cel·lular fou centrifugat a 12000 x g a 4°C durant 5 minuts i el sobrenedant resultant es transferí a un nou tub estèril, procurant no prendre gens de sediment.
- El DNA plasmídic fou precipitat afegint 2 volums d'etanol a temperatura ambient, es va barrejar i es deixà incubar 2 minuts a temperatura ambient.
- Es sedimentà per centrifugació a 12000 x g durant 5 minuts a 4°C. Es retirà el sobrenedant per aspiració.
- S'afegí 1 ml d'etanol al 70% fred, es centrifugà i es tornà a aspirar el sobrenedant.
- Per tal d'eliminar el RNA de la mostra, el sediment es dissolgué en 50 µl de TE pH 8 que contenia una concentració de RNAsa de 20 µg/ml. Es va agitar suaument i es guardà a -20°C.

3.8.2.2 Extracció a gran escala

Aquesta tècnica s'utilitza quan es requereixen grans quantitats de DNA. Es sol partir d'un litre de cultiu bacterià i el rendiment és de l'ordre de 0.5-5 mg de DNA plasmídic.

- Primerament, s'inoculà la soca bacteriana en 10 ml de TSB amb l'antibiòtic adient i s'incubà a 37°C durant 18 hores.
- A partir del subcultiu s'inoculà 1 ml del creixement bacterià en 1 l de TSB i s'incubà durant 18 hores a 37°C en agitació.
- Seguidament, es va sedimentar el cultiu bacterià per centrifugació a 8000 x g durant 10 minuts a temperatura ambient i es va descartar el sobrenedant.
- Per tal de rentar les cèl·lules, es va resuspendre el sediment amb 2 ml de solució amortidora STE freda i es va centrifugar de nou a 4°C durant 5 minuts.
- Es va aspirar el sobrenedant i les cèl·lules van ser resuspeses amb 4 ml de Solució I freda, s'agità al vòrtex fins una homogeneïtzació completa.
- Es va afegir a la mescla 8 ml de Solució II i es va homogeneïtzar la mostra agitant diverses vegades per inversió.
- Posteriorment, s'incubà 5 minuts en gel per tal de permetre la lisi cel·lular i, transcorregut aquest temps, s'afegiren 6 ml de Solució III. La mescla es va agitar vigorosament per inversió i s'incubà en gel durant 10 minuts.
- El lisat cel·lular fou centrifugat a 10000 x g a 4°C durant 10 minuts i el sobrenedant resultant fou transferit a un nou tub estèril, procurant no prendre gens de sediment.
- El DNA plasmídic es precipità afegint 0.6 volums de 2-propanol i es va deixar 15 minuts a temperatura ambient.
- La mescla es centrifugà a 8000 x g durant 10 minuts a 20°C. S'eliminà el sobrenedant per decantació i es va deixar assecar el sediment a temperatura ambient durant 30 minuts, fins la completa evaporació de les restes d'isopropanol.
- Per tal d'eliminar el RNA de la mostra, s'incubà el sediment en presència de 1 ml de solució amortidora amb una concentració de RNAsa de 10 mg/ml i s'incubà 30 minuts a 37°C.

- Seguidament, es va tornar a precipitar el DNA plasmídic afegint 3 ml d'isopropanol al 88% i acetat potàssic 0.2 M. Es va incubar 10 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, es centrifugà a 10000 x g durant 5 minuts i s'assecà el sediment. Es va resuspendre amb un volum adequat d'aigua destil·lada estèril.

STE

NaCl	0.1 M
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

Es mescla i s'ajusta a pH 8.0 utilitzant HCl diluït o NaOH segons convingui.

Solució I

Glucosa	0.9 g
Tris-HCl pH 8.0	25 mM
EDTA pH 8.0	10 mM

Es mescla i s'esterilitza a l'autoclau a 110°C i mitja atmosfera, 20 minuts. Es conserva a 4°C.

Solució II

NaOH	0.2 M
SDS	1%

Es prepara just abans del seu ús. Es manté a temperatura ambient per evitar la precipitació del SDS (com a màxim 15 dies).

Solució III

Acetat potàssic	4 M
Àcid acètic	2 M

S'ajusta el pH a 4.8 amb HCl.

3.9 TÈCNIQUES DE QUANTIFICACIÓ I VISUALITZACIÓ DEL DNA

3.9.1 QUANTIFICACIÓ DE DNA

La concentració i la puresa del DNA extret, es determinà mitjançant un espectrofotòmetre, model *UV/Vis Spectrometer UV2* ATI UNICAM. Per determinar la concentració de DNA es va mesurar la densitat òptica del DNA (o d'una dilució d'aquest en aigua) a 260 nm i a 280 nm, amb una cubeta de quars. Com a blanc per la medicció s'utilitzà aigua miliQ. Es va estimar el valor de la concentració considerant que un valor de densitat òptica igual a 1, a 260nm, equival a 50 µg/ml de DNA. Així mateix, es determinà el grau de puresa del DNA, tenint en compte la relació entre les dues densitats òptiques a 260 nm i 280 nm. Els càlculs realitzats van ser els següents:

$$\text{Concentració estimada de DNA } (\mu\text{g/ml}) = 50 \times \text{DO (260 nm)} \times \text{factor de dilució}$$

$$\text{Puresa del DNA} = \text{DO (260 nm)} / \text{DO (280 nm)}, \text{ valor acceptable entre 1.8 i 1.9}^{(*)}$$

(*) Coeficient > 2.2, significa que hi ha proteïna lliure en la mostra

3.9.2 ELECTROFORESIS DE DNA EN GELS D'AGAROSA

Aquesta és una tècnica bàsicament analítica, ja que s'utilitza per separar, visualitzar i identificar fragments de DNA, però també es pot realitzar una electroforesi preparativa que permet l'aïllament d'un determinat fragment a partir d'una mescla heterogènia. De manera rutinària s'utilitzà el mètode d'electroforesi en gels d'agarosa, segons el procediment descrit per Sambrock *et al.* [138].

L'electroforesi es basa en la càrrega negativa que presenta el DNA a pH neutre que condiona la seva migració cap al pol positiu quan està sotmès a un camp elèctric. Forçant aquest desplaçament a través d'una matriu porosa, s'aconsegueix una separació de diferents variants de DNA presents en una mescla heterogènia en funció de la seva mida o conformació. La velocitat de migració és inversament proporcional al logaritme del pes molecular, el que ens permet valorar la grandària de diferents fragments de DNA d'igual

conformació davant un patró de mides adequat. També existeix una relació entre el logaritme de la mobilitat electroforètica i la porositat del gel. Variant la concentració d'agarosa podem determinar una bona resolució depenen del rang de grandàries que vulguem determinar. S'utilitzaren concentracions d'agarosa del 0.7% per la visualització de fragments de DNA de 20 a 1 Kb i del 1% per la visualització de fragments de 6-0.4 Kb.

- Es pesà la quantitat d'agarosa en pols i s'afegí el volum de tampó d'electroforesi TAE x1. L'agarosa utilitzada fou del tipus de baixa densitat de càrrega, per evitar la distorsió de la migració del DNA.
- S'escalfà fins que l'agarosa es va fondre, evitant que arribés a ebullició.
- Es deixà refredar la solució a 50°C aproximadament i s'afegí el bromur d'etidi a una concentració final de 0.5 mg/ml.
- Es va abocar la solució al suport amb els extrems segellats i es col·locà la pinta.
- Una vegada solidificat es va treure la pinta i es va col·locar el suport a la cubeta d'electroforesi plena de tampó TAE x1.
- Es carregaren les mostres de DNA, preparades barrejades en proporció 1:5 (v/v) amb solució transportadora x 6.
- S'aplicà un voltatge constant entre 50 i 100 volts. El temps d'electroforesi dependrà de la mida dels fragments de DNA i del voltatge aplicat.
- El gel s'observà amb un transil·luminador de llum ultravioleta (302 nm).

Solució TAE x50		Solució transportadora x6	
Tris	242 g	Blau de bromofenol	0.25%
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 ml	Xylen-cyanol	0.25%
Àcid acètic glacial	57.1 ml	Glicerol o Ficoll 400	30%
Aigua destil·lada q.s.q	1 l		

Com a marcadors de mida molecular s'utilitzà la mescla de fragments resultants de la digestió de DNA del bacteriòfag lambda amb *Hind*III que cobreix un rang entre 23 y 0.5 Kb i per valorar fragments més petits, el marcador *Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder* que cobreix un rang entre 10 a 0.25 Kb (Figura 3.1.).

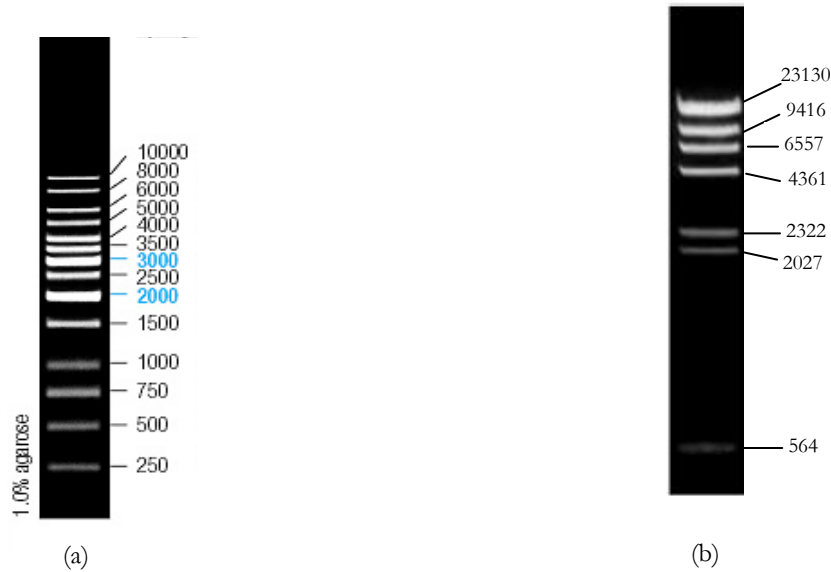


Figura 3.1. Patrons utilitzats en la identificació de la mida dels fragments de DNA, (a) marcador *Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder*, que marca des de 10000 pb fins a 250 pb; (b) marcador λ *Hind III*, que marca des de 23130 pb fins a 564 pb.

3.9.3 RECUPERACIÓ DELS FRAGMENTES DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA

Els fragments de DNA resultats electroforèticament en gels d'agarosa poden ser recuperats i purificats a partir del gel, per poder ser utilitzats en aplicacions posteriors. Un cop separats els fragments, es retalla la banda o bandes a recuperar amb una fulla estèril de bisturí, sota il·luminació ultraviolada de baixa energia. La peça d'agarosa es disposa dins un tub *ependorf* prèviament tarat, es pesa a la balança i es procedeix a purificar-ne el DNA contingut. Per aquest fi, s'utilitzarà el *MiniElute Gel Extraction Kit* de QUIAGEN.

Es preparà el gel d'agarosa de baix punt de fusió al 1%, tal i com s'ha descrit a la apartat 3.9.2. Es retallà la banda DNA desitjada intentant prendre la menor quantitat d'agarosa que no contingui DNA, i es va posar en un *ependorf*. El protocol seguit fou el subministrat pel fabricant indicat per l'extracció i purificació de DNA de 70 parells de bases a 4 Kb.

3.10 TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE DNA

3.10.1 PRECIPITACIÓ DE DNA

Es va seguir el protocol descrit per Sambrook *et al.* [138], amb alguna modificació:

- S'afegí 0.1 volums d'acetat de sodi 3 M a pH 4.8 i 2 volums d'etanol absolut fred al volum de mostra de DNA.
- Es deixà a -20°C durant 2 hores ó a -80°C durant 30 minuts.
- Posteriorment, es centrifugà a 10000 x g durant 30 minuts i es rentà el sediment amb etanol al 70% fred, sense resuspendre.
- Finalment, s'assecà en una estufa a 37°C i es va resuspendre en un volum adequat d'aigua destil·lada estèril o en solució tampó TE.

3.10.2 PURIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA

Els fragments de DNA digerits amb enzims de restricció, es purificaren abans de ser utilitzats en posterior reaccions enzimàtiques. Per realitzar aquesta purificació, s'utilitza el *kit* de QIAGEN, *MinElute Reaction Cleanup*. Aquesta purificació es realitzà per assegurar l'eficiència de lligació d'aquests productes. El procediment seguit va ser el subministrat amb el *kit*.

3.10.3 PURIFICACIÓ DE PRODUCTES DE PCR

Per netejar els productes d'amplificació obtinguts per PCR de sals, nucleòtids i altres components indesitjables, s'utilitzà el *kit* QIAGEN, *MinElute PCR Purification Kit*, basat amb l'ús de columnes amb un polímer que reté el DNA en determinades condicions i que es pot adaptar a la microcentrífuga. Aquest sistema permet purificar fragments amplificats de DNA entre 70 pb i 4 Kb de grandària obtenint fragments de DNA altament concentrats. S'han seguit les indicacions del fabricant, eluint finalment el DNA en un volum de 10 μl de tampó Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 o H_2O destil·lada estèril per tal d'obtenir la major concentració possible.

3.10.4 DIGESTIÓ DE DNA AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ

Els enzims de restricció i els seus respectius tampons utilitzats van ser subministrats per *Fermentas* i per *New England Biolabs* i s'utilitzaren seguint les indicacions del fabricant. El contingut total de cada digestió fou de 50 µl i va incloure:

• Enzim de restricció (aproximadament 10 unitats)	1 µl
• Tampó recomanat pel fabricant	0 µl
• Producte de PCR purificat	25 µl
• Aigua MiliQ estèril fins	50 µl

Les digestions s'incubaren tota la nit a 37°C. Finalment, els enzims s'inactivaren a 65°C durant 10 minuts.

3.10.5 DESFOSFORILACIÓ DE DNA

Amb la finalitat d'eliminar els grups fosfat de l'extrem 5' dels vectors linealitzats per evitar d'aquesta manera el relligament espontani dels vectors utilitzats en els experiments de clonació, es va procedí a l'eliminació dels grups fosfats terminals mitjançant el tractament amb l'enzim CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*). Tant l'enzim com el tampó necessari per la reacció van ser subministrats per *Fermentas*. El protocol seguit fou descrit per Sambrook *et al.* [138]. Al final es va inactivar la fosfatasa a 65°C durant 15 minuts.

3.11 AMPLIFICACIÓ D'UN FRAGMENT DE DNA PER LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa s'utilitza per amplificar de forma exponencial *in vitro* un fragment específic de DNA que està localitzat entre dues regions de seqüència coneguda. A més d'obtenir grans quantitats de DNA a partir d'un àcid nucleic motllo fa possible la introducció de modificacions específiques, com dianes de restricció als extrems del DNA, mutagènesis dirigides, etc.

Per a l'amplificació de diversos fragments de DNA corresponents a diferents gens de les soques clíniques de *Klebsiella* s'utilitzà el mètode de la reacció en cadena de la polimerasa. Els oligonucleòtids o cebadors utilitzats per amplificar aquests gens es mostren a la taula 3.6. El disseny dels oligonucleòtids es portà a terme intentant escollir les parelles de primers que oferissin unes llargàries i temperatura d'hibridació (T_H) semblants, per tal d'obtenir unes condicions d'amplificació òptimes.

Les condicions d'amplificació depenen en gran part del fragment de DNA que es vol amplificar, així com de les característiques intrínseques dels cebadors d'elecció. Les condicions dels cicles de la PCR utilitzades s'indiquen en els apartats següents. La temperatura d'hibridació DNA/cebador es determinà segons la següent fórmula:

$$\text{Temperatura de fusió} = [2 \times (A+T)] + [(G+C) \times 4]$$

$$\text{Temperatura d'hibridació o anellament} = \text{Temperatura de fusió} - 5^\circ\text{C}$$

Totes les reaccions de PCR es prepararen amb una barreja d'amplificació en un volum final de 50 μl , en les concentracions que s'indiquen a continuació:

- 1 μl de DNA 50 ng/ml (50 ng finals)
- 0.25 μl de Taq polimerasa 5 u/ μl (1.25 u/reacció)
- μl de tampó x10 (concentració final x1)
- μl de dNTPs 2000 μM (concentració final 200 μM)
- μl de MgCl_2 25 mM (concentració final 1 μM)
- Aigua MiliQ estèril fins a 50 μl

Les diverses reaccions de PCR es realitzaren en un termociclador *Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600*.

Taula 3.6. Oligonucleòtids utilitzats en aquest estudi.

Gen amplificat	Nom del cebador	Cebador
<i>tolC</i> ^a	TolC-D	5'- AGCACATCTAGATCACGCACC -3'
	TolC-R	5'- TCGGCGTTCTGATCTAGAAGAA -3'
<i>acrA</i> ^b	AcrA-D	5'-GACTCTAGAGGGTTTGTGGTTG-3'
	AcrA-R	5'-ATTAGGCATGTCTAGACGGCTC-3'
<i>acrB</i> ^c	AcrB-D	5'-GACTCTAGATCCTCAAATTGCCG
	AcrB-R	5'-CCTGATGGCTGTGCTCTAGATCT-3'
<i>acrR</i> ^d	AcrR-D	5'-CCGGTGTAATTCTCTCGCAAG-3'
	AcrR-R	5'-GCGAACGATTCGGATCGTC-3'
<i>gyrA</i> ^e	GyrAKo-D	5'-CGGCTTCGAATTGGCGATTTCAGC-3'
	GyrAKo-R	5'-CCGGTGTAATTCTCTCGCAAG-3'
<i>parC</i> ^f	ParCKo-D	5'-CTGAATGCCAGCGCCAAATTT-3'
	ParCKo-R	5'-GCGAACGATTCGGATCGTC-3'
<i>gyrA</i> ^g	GyrAKp-D	5'-CGGCTTCGAATTGGCGATTTCAGC-3'
	GyrAKp-R	5'-CTTGCGAGAGAAAATTACACCG-3'
<i>parC</i> ^h	ParCKp-D	5'-ACTACTCCATGTAGCTGATCAT-3'
	ParCKp-R	5'-CCGTTTCAGCAGGATGTTC-3'
<i>tolC</i> ⁱ	TolC- <i>Bam</i> HI	5'-GGATCCATGCAAATGAAGAACTCTTTCC-3'
	TolC- <i>Xho</i> I	5'-CTCGAGCTGGCGGAACGGTTGCT-3'

^a Cebador utilitzats per amplificar el gen *tolC* en *Klebsiella*

^b Cebador utilitzats per amplificar el gen *acrA* en *Klebsiella*

^c Cebador utilitzats per amplificar el gen *acrB* en *Klebsiella*

^d Cebador utilitzats per amplificar el gen regulador *acrR* en *Klebsiella*

^e Cebador utilitzats per amplificar un fragment de 600 pb del gen *gyrA* en *Klebsiella oxytoca*

^f Cebador utilitzats per amplificar un fragment de 400 pb del gen *parC* en *Klebsiella oxytoca*

^g Cebador utilitzats per amplificar un fragment de 600 pb del gen *gyrA* en *Klebsiella pneumoniae*

^h Cebador utilitzats per amplificar un fragment de 400 pb del gen *parC* en *Klebsiella pneumoniae*

ⁱ Cebador utilitzats per amplificar el gen *tolC* de *K. oxytoca* de 1400 pb inserit en el plasmidi recombinant

3.11.1 AMPLIFICACIÓ DE TolC

Es realitzaren extraccions de DNA, tal i com s'ha descrit en l'apartat 3.8.1, de totes les soques clíniques de *Klebsiella*, de la soca d'*Enterobacter aerogenes* que serví de control positiu i d'*Escherichia coli* que s'utilitzà com a control negatiu. Es dissenyaren les seqüències d'oligonucleòtids, indicades anteriorment, a partir de la seqüència de la proteïna TolC d'*E. aerogenes* publicada en la base de dades GenBank amb número d'accés AJ306390. El producte de reacció és gen d'unes 2200 parells de bases. Les condicions d'amplificació foren:

Desnaturalització	94°C	5 minuts
25 cicles	{	94°C 1 minut (fase de desnaturalització)
		51°C 1 minut (fase hibridació)
		72°C 4 minuts (fase elongació, 1Kb≈1 minut)
Extensió	72°C	10 minuts (fase extensió final)
Conservació	4°C	∞

3.11.2 AMPLIFICACIÓ DELS GENS DE LES PROTEÏNES AcrA i AcrB

Es realitzaren extraccions de DNA, tal i com s'ha descrit en l'apartat 3.8.1, de les soques clíniques de *Klebsiella* K2 i K6 i de la soca d'*Escherichia coli* que s'utilitzà com a control negatiu. Es dissenyaren els cebadors, indicats anteriorment, a partir de la seqüència de les proteïnes AcrA i AcrB de *Klebsiella pneumoniae*, publicada en la base de dades GenBank amb número d'accés AJ318073. Els productes de reacció són dos gens, un corresponent al gen *acrA* d'unes 1196 parells de bases i un altre del gen *acrB* d'unes 3146 parells de bases. Les condicions d'amplificació foren:

Desnaturalització	94°C	4 minuts
25 cicles	{	94°C 1 minut (fase de desnaturalització)
		60°C 1 minut (fase hibridació)
		72°C 1 minuts (fase elongació, 1Kb≈1 minut)
Extensió	72°C	10 minuts (fase extensió final)
Conservació	4°C	∞

3.11.3 AMPLIFICACIÓ DE LA SUBUNITAT A DE LA DNA-GIRASA

Es realitzaren extraccions de DNA de les soques clíniques *K. oxytoca* K6 i *K. pneumoniae* K2 i d'una soca d'*E. coli* que s'utilitzà com a control negatiu. Utilitzant els oligonucleòtids *gyrA* i *parC* citats anteriorment i extrets de les seqüències conegudes d'aquests dos gens i publicades en la base de dades GenBank amb número d'accés AF052257, pel gen *gyrA* i el número AJ133197, pel gen *parC* de *K. oxytoca* i els números d'accés AF052258, pel gen *gyrA* i AY034616, pel gen *parC* de *K. pneumoniae*. El producte de reacció és un fragment d'uns 600 parells de bases per a *gyrA* i de 400 parells de bases per *parC*, que es situa en la regió QRDR. Les condicions d'amplificació foren:

Desnaturalització	94°C	4 minuts
35 cicles	}	94°C 1 minut (fase de desnaturalització)
		56°C 1 minut (fase hibridació)
		72°C 2 minuts (fase elongació, 1Kb≈1 minut)
Extensió	72°C	10 minuts (fase extensió final)
Conservació	4°C	∞

3.12 SEQÜENCIACIÓ DE GENS

Amb la finalitat d'obtenir la seqüència dels gens i fragments de DNA a estudiar s'utilitzà el mètode basat en la síntesi i terminació amb dideoxinucleòtids. En tots els casos es seqüenciaren les dues cadenes de DNA complementàries analitzades.

Es va utilitzar el *kit* de fluorescència de seqüenciació automàtica BigDye® Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems. El *kit* conté una mescla on està inclosa la polimerasa, aquesta mescla és anomenada Terminator Ready reaction Mix i també conté l'aigua desionitzada.

La mescla de reacció per la PCR de seqüenciació fou:

• Terminator Reaction Mix	4.0 µl
• Producte PCR (10-30 ng/µl)	1 µ
• Cebador (<i>primer</i>)	3.2 pmol
• H ₂ O miliQ estèril	20 µl

Les condicions d'amplificació foren:

Desnaturalització	96°C	2 minuts
25 cicles	}	96°C 30 segons (fase de desnaturalització)
		50°C 15 segons (fase hibridació)
		60°C 4 minuts (fase elongació, 1Kb ≈ 1 minut)
Conservació	4°C	∞

Acabada la reacció de seqüenciació es realitzà un pols en la centrífuga i es precipità el DNA seguint el següent procediment:

- S'afegiren 63 µl d'etanol al 95% als 20 µl de la reacció de seqüenciació i es portà la mostra a un volum final de 100 µl .
- Es barrejà bé i es va deixar precipitar durant 15 minuts a temperatura ambient.
- Es centrifugà a 14000 rpm durant 20 minuts.
- El sediment obtingut es rentà dues vegades amb etanol 70% i es deixà assecar.
- Una vegada sec es guardà a -20°C fins que la mostra fou portada a seqüenciar.

La seqüència de DNA va ser determinada al Servei de Seqüenciació dels Serveis Científic-Tècnic de la Universitat de Barcelona en un seqüenciador de DNA per a electroforesi capil·lar *ABI PRISM(R) 3700 DNA Analyzer Applied-Biosystems*. El cromatograma es visualitzà a través del programa Chromas (version 1.4).

3.13 COMPARACIÓ I ALINEACIÓ DE SEQÜÈNCIES

Actualment existeixen varis mètodes o algorismes per a realitzar la recerca de seqüències, els quals els podem resumir en dos grups fonamentals: els mètodes formals i els mètodes aproximatius. Els mètodes formals possibiliten la realització de cerques complexes que permeten determinar coincidències exactes, multiplicitats, insercions i delecions, però requereixen un temps més llarg en la seva realització a menys que s'utilitzi maquinària especialitzada o es busqui en una base de dades petita. Per altra banda, els mètodes aproximats també permeten el mateix tipus de determinacions, però no garanteixen trobar les millors comparacions i poden perdre algunes similituds significatives. Els seus resultats requereixen una interpretació més detallada abans d'acceptar-los, però són molt més ràpids i sovint proporcionen resultats satisfactoris. Els més utilitzats són el FASTA i BLAST, ambdós basats en la realització d'anàlisis comparatius entre seqüències. Aquests dos algorismes, utilitzen diferents punts de vista estadístics al moment de comparar seqüències i les seves diferències destacades són la velocitat i la precisió.

Per a les comparacions i la recerca de seqüències homòlogues per a la realització d'aquest treball s'ha utilitzat els programes bioinformàtics nombrats en la taula 3.7.

Taula 3.7. Programes informàtics utilitzats en l'anàlisi bioinformàtic dels resultats.

NOM	PÀGINA WEB
BLAST, BLASTN, FASTA, TBLASTN, TFASTA	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
COILS	Institute Suisse de Recherche Experimentale sur le Cancer, Lausanne, Switzerland (http://www.ch.embnet.org)
Prosite	Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland (http://www.expasy.org)
CLUSTALW v1.8	European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK (http://www.ebi.ac.uk/clustalw)

3.14 CLONACIÓ EN VECTORS PLASMÍDICS

La clonació es basa en la inserció d'una barreja de fragments amplificats dins d'un vector. Per poder clonar fragments de DNA dins de vectors plasmídics, s'han d'utilitzar les tècniques estàndards de biologia molecular.

Els fragments de DNA a clonar (insert) s'obtenen digerint-los amb enzims de restricció (vegeu apartat 3.10.4) creant-se extrems idèntics als extrems del plasmidi receptor o vector que ha estat linealitzat amb els mateixos enzims de restricció. Els extrems que són compatibles són desfosforilats (apartat 3.10.5), per evitar la seva recircularització. Un cop lligat l'insert al vector es transforma en bacteris competents per tal d'obtenir colònies que continguin el plasmidi recombinant, tal com s'explica els següents apartats. El microorganisme que s'utilitza principalment en els experiments de clonació i transformació és *E. coli*, ja que es tracta d'un microorganisme molt versàtil a l'hora d'acceptar plasmidis exògens, el que permet utilitzar-lo coma model en diverses tècniques de biologia molecular.

3.14.1 LLIGACIÓ DE MOLÈCULES DE DNA

Aquets procediment té com a objectiu aconseguir molècules recombinants de DNA. Les diferents reaccions de lligació es realitzen entre un vector plasmídic linealitzat i un fragment de DNA, es barrejaren les dues molècules en una relació molar determinada, tenint en compte la concentració de DNA estimada i la mida de les molècules. Els fragments de DNA que es lligaren (productes de PCR digerits i purificats), s'afegiren a la mescla de lligació en proporcions iguals. Per calcular les quantitats de vector i insert s'utilitzà la següent fórmula:

$$\text{ng insert} = [(\text{ng vector} \times \text{Kb insert}) / \text{Kb vector}] \times \text{relació insert} / \text{vector}$$

S'utilitzà l'enzim lligasa T4 DNA lligasa (*Fermentas*), capaç de catalitzar la formació d'unions fosfodiéster entre extrems terminals 5'-fosfat i 3'-hidroxil en DNA de doble cadena. Se seguiren les instruccions recomanades pel fabricant.

La barreja dels diferents components per la lligació va ser:

• <i>Ligation Buffer T4 DNA ligase</i>	2.5 µl
• Vector plasmídic	0.5 µl
• Fragment a lligar	100 ng
• T4 DNA lligasa	1 µl
• H2O milliQ fins un volum	50 µl

Les lligacions es realitzaren a 16°C durant tota la nit. A continuació es procedí a transformar el producte de la lligació en cèl·lules competents d'*E. coli*.

Es realitzaren diferents controls, en un s'incubà el plasmidi sense digerir en presència de lligasa, un altre control amb el plasmidi linealitzat i desfosforilat en presència de lligasa i tampó per comprovar la correcta desfosforilació del plasmidi i finalment, un control amb el plasmidi linealitzat sense desfosforilar per comprovar l'activitat de la lligasa.

3.14.2 TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES BACTERIANES

Les transformacions es realitzaren pel mètode d'electroporació. L'electroporació és la transferència de molècules de DNA al interior de la cèl·lula procariota basat en la utilització de descàrregues elèctriques que produeixen canvis fisicoquímics, els quals despolaritzen la membrana cel·lular de manera que es formen porus transitòriament, a través dels quals pot entrar el DNA a la cèl·lula [146].

S'utilitzà un electroporador *Pharmacia LKB ECPS 3000/150* i cubetes de petit volum (*Invitrogen*), útils pel seu ús en un electroporador connectat a una font d'alimentació d'alt voltatge. En aquesta tècnica és important evitar al màxim el contingut de sals de les cèl·lules, per aquest motiu, prèviament a l'electroporació s'han de preparar les cèl·lules competents i el DNA ha d'estar net.

3.14.2.1 Obtenció de cèl·lules competents

- S'incubaren 5 ml de cultiu bacterià en TSB a 37°C durant 18 h.
- Es va inocular 1 ml del creixement bacterià en un matrau amb 50 ml de medi ric TSB i s'incubà en agitació a 37°C fins que va arribar a una absorbància a 600 nm de 0.6.
- El cultiu bacterià fou centrifugat a 10000 x g durant 15 minuts a 4°C.
- Es va rentar el sediment amb aigua destil·lada estèril freda quatre cops.
- Després dels rentats, es van resuspendre les cèl·lules amb 9 ml d'aigua destil·lada estèril freda i es van distribuir en tubs *eppendorfs* a raó de 1 ml/*eppendorf*.
- Es centrifugà de nou i el sediment fou resuspès amb 70 µl d'aigua destil·lada amb glicerol al 10% estèril i freda.
- Les cèl·lules es conservaren a -20°C fins a la seva utilització.

3.14.2.2 Electroporació

- Es van refredar les cubetes d'electroporació prèviament a la utilització en un bany de gel. També es van mantenir en gel, durant tot el procés, el DNA i les cèl·lules.
- Es seleccionà a l'electroporador, una capacitància de 150 µF i s'aplicà a les cèl·lules un voltatge de 1400 V.
- En les cubetes es va introduir 70 µl de les cèl·lules barrejades amb 1 µl del DNA a transferir.
- S'aplicà un pols i immediatament, es van recollir les cèl·lules de la cubeta amb 500 µl de medi LB i es van transferir a un tub *eppendorf*. Es va tornar a afegir 500 µl de LB a la cubeta per acabar de recollir les cèl·lules i es va ajuntar amb les d'abans.

3.14.2.3 Selecció de transformants

Després de la electroporació i d'afegir 1 ml de LB als tubs amb les cèl·lules transformades, es barrejà per inversió i s'incubà la suspensió a 37°C durant 1 hora, amb l'objectiu de que les cèl·lules transformades expressessin la resistència. Es realitzaren al·lquotes de 100 µl i es sembraren amb plaques de LB amb l'antibiòtic adient al plasmidi utilitzat. Per poder diferenciar els transformants que havien incorporat el plasmidi amb l'insert dels que ho havien fet sense insert, a les plaques de LB també s'afegí 100 µl de

IPTG 100 mM i 50 µl de X-Gal 40 mg/ml. Les plaques s'incubaren durant 24 hores a 37°C. Els transformant amb el plasmidi intacte formaren colònies de color blau, mentre que els que havien incorporat el plasmidi recombinant apareixien de color blanc.

3.14.3 CLONACIÓ DE PRODUCTES DE PCR AMB VECTOR COMERCIAL

Algunes polimerases termostables com la *Taq* presenten la característica d'afegir adenosines protuberants als extrems 3' terminals de la cadena amplificada anomenada activitat adenosina transferasa 3' terminal. Aquesta característica s'aprofita en una sèrie de vectors comercials els quals presenten una desoxitimidina terminal a cada un dels seus extrems 3', de manera que aquests extrems són compatibles amb productes de la PCR a clonar, incrementant l'eficiència de lligació.

S'ha utilitzat el *kit PCR Cloning Kit* (QUIAGEN). Es parteix de productes de PCR purificats, si el fragment a clonar prové d'una PCR on s'han generat altres productes no desitjats la purificació es realitzarà a partir de gel d'agarosa (apartat 3.9.3), en cas que el producte de PCR sigui únic, el DNA de la reacció es pot purificar directament del tub sense haver de separar-ne electroforèticament els seus components utilitzant un *kit* comercial (apartat 3.10.3).

La preparació de la reacció de clonació es va constituir seguint les instruccions facilitades per la casa comercial, amb un volum final de 10 µl:

- | | |
|---|----------|
| • <i>pDrive Cloning Vector</i> (50 ng/µl) | 1 µl |
| • Producte de PCR purificat | 1-4 µl |
| • <i>Ligation Master Mix</i> , 2x | 5 µl (*) |
| • H2O milliQ fins un volum de | 10 µl |

(*) es recomana afegir el *Ligation Master Mix* al final

La preparació es barrejà bé i s'incubà 2 hores a 4-16°C. Es guardà la lligació a -20°C fins a la seva transformació en cèl·lules competents (apartat 3.14.2).

3.15 SOBREEXPRESSION I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES

La sobreexpressió de proteïnes en *E. coli* és una eina de gran utilitat per a la purificació, localització i anàlisi funcional de les proteïnes. La tècnica d'expressió es basa en la inserció d'un promotor fort i una seqüència d'unió al ribosoma molt eficaç davant l'ORF del gen a estudiar.

Els vectors d'expressió del tipus pGEX contenen un gen codificant per la GST (Glutation-S-Transferasa) de *Schistosoma japonicum* que es troba controlat pel promotor *tac* induïble per IPTG. També conté una seqüència amb múltiples llocs de tall per enzims de restricció a continuació del gen GST que facilita el clonatge unidireccional dels productes d'interès. L'expressió de GST facilita la purificació de les proteïnes expressades mitjançant una cromatografia d'afinitat. A més aquests vectors tenen un lloc de reconeixement per una proteasa que permet tallar entre el GST i la proteïna desitjada una vegada s'ha obtingut la proteïna de fusió, permeten separar la proteïna clonada del pèptid senyal (GST).

Per a la realització d'aquest treball es va utilitzar el vector pGEX-4T. Aquest vector es presenta en tres formes diferents: 1, 2 i 3, per poder optar a les tres pautes de lectura possibles en la traducció de qualsevol proteïna. Es va elegir la forma 2, que deixava la seqüència del gen a estudiar en fase de lectura oberta. Els gens clonats en aquest tipus de vectors es troben sota el control transcripcional del promotor *tac* que permet una alta expressió de forma controlada químicament per IPTG. Mitjançant la tècnica d'expressió heteròloga del gen s'obtenen elevades quantitats de proteïna exògena a l'organisme hoste en el mínim temps possible, per aquest motiu, s'utilitza principalment com a organisme hoste *E. coli*.

Una vegada formada la molècula de DNA recombinant, és a dir, que el fragment de DNA exogen ha estat lligat amb el vector tal com s'indica en l'apartat 3.14.3, aquest es van introduir mitjançant transformació en la cèl·lula hoste competent, per després poder realitzar una sobreexpressió de la proteïna i fer-ne la purificació.

3.15.1 Transformació per xoc tèrmic

Per a la transformació del vector recombinant construït s'utilitzà un mètode menys agressiu que l'electroporació, la transformació per xoc tèrmic. Abans de realitzar la transformació es prepararen les cèl·lules competents pel mètode de clorur de calci. El protocol seguit va ser una variació del descrit per Cohen *et al.* (1972):

- Es van sembrar 10 ml de medi LB de la soca receptora durant 18 hores a 37°C.
- El cultiu es va diluir 20 vegades en medi LB fresc pre-escalfat a 37°C. S'incubà durant 90 minuts a 37°C amb agitació.
- La mostra es centrifugà 8000 rpm durant 10 minuts.
- Les cèl·lules es rentaren amb 0.5 volums de CaCl₂ 10 mM en solució MOPS (àcid 3-(*N*-morfolino)propanesulfònic) 10 mM pH 6.5 freda.
- Es tronà a centrifugar en les mateixes condicions.
- El sediment es va resuspendre amb 2 ml de CaCl₂ 75 mM i glucosa 0.5% en solució MOPS 10 mM pH 6.5 freda, per cada 40 ml de cultiu original.
- Es transferiren 200 µl de les cèl·lules receptores en tubs *ependorfs* estèrils i s'afegí el DNA (no més de 50 ng en un volum de 10 µl), es barrejà suaument i es va deixar 45 minuts en gel.
- Tot seguit la transformació es va mantenir a 42°C durant 10 minuts. Passat aquest temps es deixà en gel 2 minuts.
- Es va afegir 0.5 ml de medi LB fresc en cada tub i es va incubar a 37°C durant 2 hores en agitació, per permetre l'expressió de la resistència a l'antibiòtic codificada pel plasmidi.
- Es van sembrar 100 µl de la mostra transformada en plaques de LB contenint l'antibiòtic adequat per a la selecció de transformants.

3.15.2 Sobreexpressió de proteïnes recombinants

Per a la sobreexpressió s'estimulà la producció de la proteïna en qüestió gràcies a la inducció del gen amb IPTG. El procediment següent fou el següent:

- S'inoculà una colònia de les cèl·lules transformades en pGEX-4T en 5 ml de LB amb ampicil·lina i s'incubà en agitació a 37°C durant tota la nit.
- Es va fer una dilució 1/100 del cultiu inicial en LB i es deixà incubant 3 hores a 37°C.
- Passat aquest temps s'afegir 1 mM de IPTG per tal d'induir l'expressió del gen i s'incubà 3 hores a 37°C en agitació.
- Una vegada acabada la inducció es va refredar el cultiu en gel durant 15 minuts i després es centrifugà a 9000 rpm durant 10 minuts a 4°C. El sediment es resuspengué en PBS.
- Les cèl·lules es lisaren per sonicació i la mostra es centrifugà 10000 rpm durant 10 minuts a 4°C i el sobrenedant es guardà a 4°C per a la purificació de la proteïna.

3.15.3 Purificació de proteïnes recombinants

La purificació es va realitzar capturant les proteïnes per cromatografia d'afinitat, utilitzant una minicolumna que conté una resina a la qual s'han unit molècules de glutatió-sefarosa que actuaran com a lligands i que permeten la unió específica de la GST. La purificació es va realitzar a partir del sobrenedant obtingut de la sobreexpressió de proteïnes seguint les instruccions del fabricant.

Una vegada la proteïna fou purificada es va procedir a separar i eliminar el pèptid senyal (GST) de la proteïna recombinant. Entre la seqüència del DNA del pèptid senyal i el DNA insertat una seqüència de vuit aminoàcids codificats en l'extrem C-terminal de la GST i que són diana de la proteasa trombina, el que ens permet obtenir la proteïna desitjada. Una vegada digerida la proteïna amb la trombina, aquesta es separà del pèptid senyal passant la mostra a través de la columna que s'havia utilitzat prèviament per purificar la proteïna de fusió completa. D'aquesta manera el pèptid senyal va quedar retingut en la resina de la columna i l'eluent contenia la proteïna recombinant.

3.16 ANÀLISI PROTEÒMIC

El proteoma o perfil proteic és una imatge de totes les proteïnes expressades per un organisme en un moment donat i sota unes condicions precises, constituint el mapa d'expressió proteica del microorganisme.

La tècnica més utilitzada per l'obtenció d'aquests proteomes és la denominada 2D-PAGE o electroforesi bidimensional. Aquesta tècnica va ser descrita per primera vegada per O'Farrel l'any 1975. La primera dimensió separa les proteïnes en funció de la seva càrrega en un gradient de pH fins aconseguir la posició en la que la seva càrrega neta és zero. Aquest pH, en el que la proteïna té càrrega neta zero, es denomina punt isoelèctric (pI). En la segona dimensió, les proteïnes són separades segons la seva mida, per electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de dodecil sulfat sòdic (SDS). Aquest detergent s'uneix a les proteïnes conferint a totes la mateixa densitat de càrrega i mobilitat electroforètica, el que permet que la seva separació en el gel de poliacrilamida es degui únicament al seu pes molecular [148]. La principal aplicació de l'anàlisi bidimensional és l'estudi dels perfils d'expressió proteica, permetent la comparació tant qualitativa com quantitativa.

La separació electroforètica de les proteïnes segons el seu punt isoelèctric es realitza mitjançant isoelectroenfocament en tires de gel de gradient de pH lineal immobilitzat. Les proteïnes atrapades en les tires de isoelectroenfocament es separen en funció del seu pes molecular utilitzant gels prefabricats que presenten un gradient de poliacrilamida del 12-14%, apropiat per separa proteïnes compreses en un rang de 5 a 210 kDa. La tinció de gels pot realitzar-se amb diferents tipus de tincions: plata, Coomassie, marcatge radioactiu, marcatge fluorescent, etc. depenent de la sensibilitat que es desitgi.

3.17 SENSIBILITAT A BACTERIOCINES

Hi ha molts problemes associats a la purificació de bacteriocines degut a la naturalesa química extremadament heterogènia que presenten aquests pèptids antimicrobians, pel que s'ha requerit una àmplia gamma de metodologies per a la purificació d'aquestes molècules [147].

3.17.1 Producció i purificació de colicines

Per a la purificació de bacteriocines és necessari comptar amb grans quantitats de cultiu bacterià abans d'iniciar la purificació. Hi ha moltes condicions que influeixen directament en la producció de bacteriocines com la temperatura, pH, temps d'incubació, composició del medi de cultiu, etc.

- A partir d'un cultiu bacterià en medi LB, es realitzaren suspensions bacterianes en 500 ml de LB i s'incubà a 37°C en agitació fins una densitat òptica a 600 nm de 0.9.
- En aquest punt s'induí la producció de colicina afegint 0.2 u de mitomicina C per cada ml de cultiu.
- Després de 3 hores d'incubació es centrifugà durant 15 minuts a 10000 rpm. El sobrenedant obtingut contenint la colicina es guardà a 4°C fins la seva utilització.

3.17.2 Assaig de sensibilitat

Per determinar l'espectre d'acció de les colicines es realitzaren experiments d'inhibició del creixement en superfície en plaques d'agar.

- Es va partir d'un cultiu en placa del microorganisme, del qual es varen agafar diverses colònies que es van resuspendre en 2 ml de LB.
- Es va mullar extensament un isòtop estèril en el tub i es sembrà el inòcul en plaques de LB agar. La sembra es realitzà fent lliscar el isòtop per tota la placa en tres direccions.
- Després de 10 minuts, assegurant-se que la placa fos seca, es diposità una gota de colicina purificada sobre la superfície de l'agar.
- Les plaques s'incubaren a 37°C durant 18 hores.

La lectura es realitzà observant la producció d'halos d'inhibició del creixement en el lloc on es diposità la gota de bacteriocina.

3.18 EXPERIMENTS PER MESURAR LA CAPACITAT FORMADORA DE PORUS: *BLACK LIPID BILAYER TECHNIQUE*

3.18.1 MESURA DE LA CONDUCTÀNCIA DE CANALS SIMPLES

Hi ha diferents estratègies per mesurar la capacitat formadora de porus en membranes lipídiques. Entre aquestes tècniques trobem el mètode posat a punt pel laboratori del professor Roland Benz i que fou l'utilitzat per la realització d'aquest treball. Aquest mètode es basa en la mesura de la conductància, en diverses condicions, de porines que són afegides a una cambra de tefló separada en dos compartiments per un envà també de tefló que deixa en el centre un petit orifici amb una superfície d'aproximadament 0.5 mm² (figura 3.2.). Al voltant d'aquest forat es formarà una bicapa lipídica, que amb l'ajut d'un telescopi observaren negre (quan els lípids es disposen en forma de bicapa, el gruix d'aquesta és tan petit que no reflecteixen la llum i visualment és negre).

El mètode de preparació consisteix en omplir les bandes de la cubeta amb una solució salina que contingui el ió que es vol estudiar i formar la bicapa lipídica en el petit forat central. Les solucions salines aquoses (Grau analític, *Merck*, Alemanya) foren utilitzades sense solució amortidora i a un pH 6. La temperatura fou mantinguda durant tots els experiments a 20°C. Les membranes es van formar a partir d'una solució de difitanoil fosfatidilcolina (DiPhPC) al 1% (w/v) (*Avanti Polar Lipids*, Alabaster, AL) en *n*-decà que es van depositar en aquesta cambra de tefló. Una vegada es va formar la bicapa lipídica, aquesta és relativament estable, de manera que es poden anar provant condicions diferents.

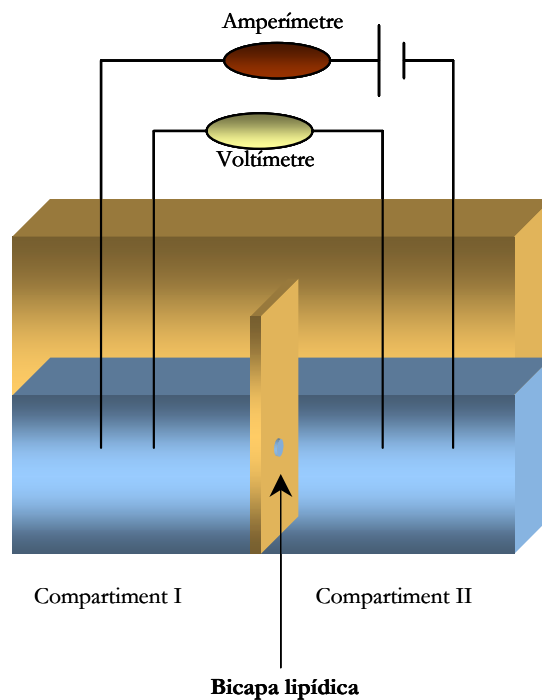


Figura 3.2. Esquema del sistema utilitzat per la tècnica *Lipid Planar Bilayer*.

Les mesures de canal simple es van realitzar amb un parell d'elèctrodes de Ag/AgCl connectats en sèrie a una font d'alimentació i a un amplificador de corrent (Keithley 427). El senyal d'amplificació va ser monitoritzat amb un oscil·loscopi i un registrador. Quan la membrana va estar ben estabilitzada, és a dir, era òpticament negra a la llum reflectida, es va addicionar a un dels compartiments o als dos, la solució mare que contenia la proteïna a analitzar pura (aproximadament 100 ng/ml). A un potencial de membrana de 20 mV es van enregistrar les pertorbacions de la membrana, que posteriorment van servir per calcular la conductivitat (G).

3.18.2 AVALUACIÓ DE LA DEPENDÈNCIA DE VOLTATGE I ESTUDIS DE LA SELECTIVITAT DEL CANAL

Per analitzar si la conducció de la membrana provocada per la proteïna depenia del voltatge aplicat, es va dissenyar l'experiment següent. Es van formar membranes en una solució de 100 mM de KCl i es va anar afegint proteïna fins a una conductància de almenys 0.1 nS, que corresponia a la inserció d'un nombre suficient de canals. Seguidament es va portar el voltatge a zero (el valor potencial de membrana en aquest punt es designà per V_m) i es va establir un gradient de KCl, cinc vegades major, afegint una solució de 3 M KCl a un costat de la membrana, en agitació. El voltatge de membrana de corrent zero va arribar al seu valor en 2-5 minuts després de l'addició de la solució de KCl.

Amb el valor V_m i coneixement les concentracions iòniques en els dos compartiments de la cambra de tefló (100 mM i 500 mM de KCl) es pot calcular el coeficient de permeabilitat catió/anió (P_c/P_a) utilitzant l'equació de *Goldman-Hodgikin-Katz*:

$$V_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \left[\frac{P_c \cdot c_{II} + P_a \cdot c_I}{P_c \cdot c_I + P_a \cdot c_{II}} \right]$$

R és la constant de gasos

T és la temperatura absoluta

F és la constant de Faraday

c_I és la conscentració més diluïda

c_{II} és la concentració més alta

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 SUSCEPTIBILITAT MICROBIANA ALS ANTIBIÒTICS EN SOQUES CLÍNIQUES DE *Klebsiella* spp.

La sensibilitat dels bacteris als antibiòtics varia a conseqüència de l'aparició de gens de resistència i la posterior selecció de les soques que els expressen. Aquesta resistència pot ser originada per diversos factors, com són la incapacitat de l'antibiòtic de travessar l'envolta cel·lular, la capacitat del microorganismes per expulsar l'antibiòtic, l'alteració de la diana específica de l'antibiòtic o la producció, per part del microorganisme, d'un enzim que inactivi l'antibiòtic.

Tot i que es disposa de nombrosos agents antimicrobians amb molta diversitat de mecanismes d'acció, la selecció d'un antimicrobià amb una bona eficàcia clínica no és senzill. A més, la diversitat d'organismes causants d'infeccions i l'emergència de soques d'interès clínic resistents als antibiòtics compliquen la selecció de l'antibiòtic. Per aquest motiu es requereix el desenvolupament de nous procediments profilàctics i terapèutics per donar solució als problemes imposats per l'emergència de la resistència bacteriana [149].

En els últims anys, els aïllaments de soques del gènere *Klebsiella* han augmentat en l'ambient hospitalari, s'ha aïllat principalment com agent etiològic causant d'infeccions com pneumònia, bacterièmies i infeccions del tracte urinari [9]. La gran utilització i l'abús dels agents antimicrobians ha fet augmentar el grau de resistència d'aquesta espècie vers els antibiòtics.

Amb l'objectiu d'establir quins eren els patrons de susceptibilitat antimicrobiana en les sis soques clíniques de *Klebsiella*, es realitzaren proves d'antibiograma en agar Müller-Hinton i es determinà la concentració mínima inhibidòria en medi líquid utilitzant diferents antibiòtics.

Les proves d'antibiograma en MHA es van dur a terme seguint el protocol descrit en l'apartat 3.5.1 de material i mètodes per determinar les resistències a diferents tipus d'antibiòtics, de les soques clíniques de *K. pneumoniae* i *K. oxytoca* d'una forma qualitativa. Després, amb la finalitat d'ajustar el resultats obtinguts en l'antibiograma, es determinaren les concentracions mínimes inhibidòries pel mètode descrit en l'apartat 3.5.2 de material i

mètodes. Amb l'objectiu d'establir un patró de sensibilitat de les soques objecte d'aquest estudi, es van escollir antibiòtics de diferents famílies d'antimicrobians i amb diferent espectre d'acció: inhibidors de la síntesi proteica (cloramfenicol i tetraciclina), inhibidors de la síntesi del peptidoglicà (penicil·lines) i inhibidors de la síntesi d'àcids nucleics (fluoroquinolones).

Per a la realització dels estudis de sensibilitat als antibiòtics, es va agafar una soca control, *Klebsiella pneumoniae* K7 que és una soca de la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus que no ha estat sotmesa a cap pressió selectiva per part dels antibiòtics i que, per tant, presenta un patró de sensibilitat destacat. En els assaigs realitzats per determinar la concentració mínima inhibidora, els valors de les MICs en K7 permeten confirmar la seva sensibilitat als diferents antibiòtics a més de servir com a control en la determinació de les MICs en altres soques.

En la figura 4.1. es mostra una fotografia d'una placa d'agar Müller-Hinton on es realitzà una prova d'antibiograma a la soca *K. oxytoca* K5, es pot observar clarament la sensibilitat d'aquesta soca davant dels antibiòtics que contenen els discs introduïts a la placa.



Figura 4.1. Determinació de la sensibilitat als antibiòtics en una soca de *K. oxytoca* pel mètode d'antibiograma en plaques de Müller-Hinton. On es pot observar un halos d'inhibició al voltant dels discs d'antibiòtic.

El *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), estableix per cada microorganisme uns criteris de sensibilitat o resistència davant un determinat antibiòtic [140]. Els punts que s'han agafat com a referència per determinar la sensibilitat o resistència de cada soca són els punts de tall establerts pel NCCLS, tant pels assaig realitzats mitjançant antibiograma [139], on s'estableix un patró de resistència o sensibilitat depenen de la mida de l'halo d'inhibició, com els realitzats per mètodes de dilució en medi líquid [141], i en concret els que fan referència al grup bacterià dels enterobacteris (*MIC Interpretative Standards (µg/ml) for Enterobacteriaceae*).

En la taula 4.1. es mostren els resultats obtinguts davant 31 antibiòtics de les sis soques clíniques de *Klebsiella*, obtinguts de la realització d'antibiogrames per les soques clíniques. En la taula 4.2. es mostren els patrons de resistència davant diferents antibiòtics obtinguts pel mètode de concentració mínima inhibidora en plaques de *microtiter*.

Taula 4.1. Patró de resistència davant de 31 antibiòtics (S: soca sensible, R: soca resistent, I: soca de resistència intermèdia).

	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Amoxicil·lina	R	R	R	R	R	R
Amoxi-Clav.	R	S	R	S	R	R
Penicil·lina G	R	R	R	R	R	R
Ampicil·lina	R	R	R	R	R	R
Piper-Taz.	R	S	R	S	R	R
Ticarcil·lina	R	R	R	R	R	R
Cefazolina	ND	R	R	S	R	ND
Cefonicid	R	S	R	S	R	R
Cefuroxina	R	S	R	S	R	R
Cefotaxima	ND	S	S	S	S	ND
Ceftazidima	R	S	S	S	S	S
Cefepime	S	S	S	S	S	S
Fosfomicina	R	ND	ND	ND	ND	I
Imipenem	S	S	S	S	S	S
Meropenem	S	S	S	S	S	S
Aztreonam	I	S	S	S	S	R
Àcid pipemídic	S	ND	ND	ND	ND	R
Ciprofloxacina	S	R	S	S	S	R
Norfloxacina	S	I	S	S	S	R
Ofloxacina	S	I	S	S	S	R
Amikacina	R	S	S	S	S	R
Gentamicina	R	S	S	S	S	R
Kanamicina	R	R	S	S	S	R
Trobamicina	S	I	I	S	S	R
Novobiocina	R	R	R	R	R	R
Cloramfenicol	R	R	S	S	S	I
Clindamicina	S	R	S	S	I	R
Eritromicina	R	R	R	R	R	R
Metronidazole	R	R	R	R	R	R
Sulfametoxazole	R	R	R	R	R	R
Trim-Sulf.	R	R	S	S	S	R

ND: no determinat; Amoxi-Clav: Amoxicilina-Clavulàmic; Piper-Taz: Piperacil·lina-Tazobactam; Trim-Sulf: Trimetropim- Sulfametoxazole

Taula 4.2. Concentracions mínimes inhibidores de les soques de *Klebsiella*, determinades pel mètode de dilució en placa de *microtiter*.

ANTIBIÒTICS	MIC (µg / ml)						
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7
β-lactàmics							
Penicil·lina	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND
Ampicil·lina	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND
Cefalotina	256	32	256	8	64	256	4
Ceftriaxona	4	1	1	0,48	2	32	0,48
Cefotaxima	8	1	0,24	0,24	1	2	0,24
Imipenem	0,24	2	1	1	2	4	0,5
Meropenem	1	4	0,5	1	0,5	4	1
Aminoglicòsids							
Gentamicina	32	4	0,5	1	0,25	64	0,25
Estreptomina	128	64	4	64	64	128	1
Amikacina	64	16	0,5	1	0,25	128	0,12
Kanamicina	64	64	2	6	2	128	1
Macròlids							
Eritromicina	64	64	32	32	16	128	1
Altres antibiòtics							
Tetraciclina	128	64	32	32	8	128	2
Novobiocina	32	128	32	32	64	64	4
Rifampicina	16	8	16	32	32	64	0,5
Cloramfenicol	64	32	8	8	2	16	1
Quinolones							
Àcid Nalidíxic	32	64	64	32	32	128	4
Ciprofloxacina	1	8	0,5	0,12	0,12	64	0,12
Norfloxacina	0,5	8	4	0,24	0,24	32	0,24
Ofloxacina	2	4	0,24	4	0,5	32	1
Enrofloxacina	1	16	0,12	0,24	0,5	32	0,5
Colorants							
Acriflavina	64	64	64	128	128	128	1
Cristall Violeta	64	32	32	128	32	128	1

MIC: Concentració Mínima Inhibidora (*Minimal Inhibitory Concentration*); ND: no determinat

De forma natural les espècies de *Klebsiella* presenten una elevada resistència als antibiòtics β -lactàmics per la producció de β -lactamases cromosòmiques (SHV), actualment el 40% de les soques aïllades presenten un plasmidi que codifica per la β -lactamasa SHV-5 que confereix resistència a la gran majoria d'antibiòtics β -lactàmics [3]. *Klebsiella* de forma natural és susceptible a les cefalosporines, tot i que en els últims anys s'han aïllat soques resistents que estan emergint de forma molt ràpida a causa de la transmissió de gens de resistència en plasmidis [19]. Aquesta espècie també acostuma a ser sensible a altres antibiòtics com les quinolones, aminoglicòsids i substàncies com la colicina, tot i que en els últims anys estan apareixen soques de *Klebsiella*, especialment a nivell clínic, resistents a gran nombre i varietat d'antibiòtics [3].

El patró de sensibilitat dels aïllats clínics fou clarament diferent al que presentà la soca K7. Pels antibiòtics β -lactàmics de primera generació, penicil·lina, ampicil·lina i amoxicil·lina, a l'igual que la gran majoria d'enterobacteris, totes les soques clíniques de *Klebsiella* foren resistents, gràcies a la presència de la β -lactamasa SHV-1, però que no és activa davant la majoria de cefalosporines de segona i tercera generació [150]. Pel que fa les cefalosporines, totes les soques exceptuant K4 presentaren patrons de resistència a les de primera generació com cefalotina i cefazolina. Pel que fa les cefalosporines de segona generació cefonocid i cefuroxima, van donar patrons de resistència en totes les soques de *Klebsiella* exceptuant la soca K2 i K4, que ja era sensible a les de primera generació. Les cefalosporines de tercera generació estudiades (cefotaxima, ceftazidima i ceftriaxona), actuaren sobre totes les soques, exceptuant alguns casos concrets com la soca K6, resistent a ceftriaxona, una cefalosporina d'ampli espectre de tercera generació, i la soca K1 que presentà patrons de resistència davant l'antibiòtic ceftazidima. En canvi, cefepime, una cefalosporina de quarta generació, va actuar sobre totes les soques clíniques de *Klebsiella*.

El meropenem i l'imipenem són antibiòtics del grup dels β -lactàmics, que es diferencien dels anteriors per la presència d'un nucli carbapenem que li confereix una elevada resistència a la hidròlisi enzimàtica per part de les β -lactamases plasmídiques o cromosòmiques. Totes les soques clíniques de *Klebsiella* foren sensibles a aquests agents antimicrobians.

L'àcid clavulàmic és una substància que presenta una lleugera acció antibiòtica i una estructura β -lactàmica que és capaç d'unir-se irreversiblement a una β -lactamasa i inactivar-la. Aquest antibiòtic és altament efectiu davant penicil·lines tipus TEM-1 i la seva combinació amb un antibiòtic β -lactàmic apropiat, el protegeix de la hidròlisi, augmentant la seva eficàcia [151]. Tot i això, molts enterobacteris produeixen β -lactamases cromosòmiques que no es bloquegen per l'àcid clavulàmic. Els resultats de la taula 4.1., ens mostren que només dues soques, K2 i K4, són sensibles a la combinació d'amoxicil·lina i àcid clavulàmic.

Les sulfamides són inhibidors metabòlics que interfereixen en una de les primeres etapes de la síntesi d'àcid fòlic. La resistència a aquests agents es desenvolupa molt ràpidament i, tal com podem observar totes les soques foren resistents al sulfametoxazole. Es creu que els bacils Gram negatius resistents a aquests antibiòtics sintetitzen un enzim dihidropteroat sintetasa addicional que no és afectat per l'antibiòtic. La combinació de diversos compostos sulfonamides, en canvi, sí aconsegueix augmentar el nombre de soques susceptibles. Possiblement, això sigui degut a una major variabilitat i quantitat de compostos sulfamides, o a una diferent acció sobre la diana. La combinació de sulfametoxazole i una part de trimetoprim, s'utilitza bastant en el tractament d'infeccions causades per bacteris Gram negatius. Com podem observar en la taula de resultats, tres de les sis soques que eren resistents al sulfametoxazole passen a ser sensibles quan aquest es combina amb trimetoprim.

Pel que fa als aminoglicòsids, *Klebsiella* és força sensible a aquests antimicrobians que actuen a nivell ribosomal, inhibint la síntesi proteica. El primer antimicrobià descobert d'aquesta família fou l'estreptomina l'any 1940, seguit de la kanamicina. Aquests antimicrobians s'uneixen a una sola diana, la proteïna ribosomal 12S de la subunitat 30S, i inhibeixen la síntesi proteica. El fet de presentar un únic punt d'acció facilita l'aparició ràpida de soques resistents, ja que es requereix una única mutació per aconseguir aquesta resistència. La meitat de les soques de *Klebsiella* presentaren resistència davant aquest antimicrobià. La gentamicina i la tobramicina poden unir-se a dues dianes, tant en la subunitat 30S com en la 50S, presentant d'aquesta manera un major espectre d'actuació i proporcionant un menor grau de resistència. Perquè es produeixi resistència a aquest antibiòtic s'han de donar dues mutacions i la probabilitat que això passi és molt baixa [151].

Només dues soques, K1 i K6, foren resistents a la gentamicina i només K6 també ho fou a la trobamicina, en canvi, aquests dos antibiòtics actuaren sobre la resta de soques.

Els macròlids, com l'eritromicina, es fixen a un receptor (RNAr 23S) de la subunitat 50S del ribosoma bacterià i inhibeix la síntesi proteica, mitjançant la interferència en les reaccions de translocació i formació de complexos d'inactivació. La resistència a l'eritromicina pot resultar de l'alteració per metilació del receptor RNAr i es pot transmetre a través d'un plasmidi. En general aquests antibiòtics tenien interès per la seva acció sobre estafilococs i, actualment, sobre micoplasmes i legionel·les. En canvi, no és activa davant la majoria de bacteris Gram negatius, tal com demostra el fet que totes les soques clíniques de *Klebsiella* estudiades foren resistents. Pel que fa a la clindamicina, la lincomicina més utilitzada, té un mecanisme d'acció semblant a l'eritromicina, ja que actua sobre la subunitat 50S del ribosoma bacterià. Totes les soques foren sensibles a aquest antibiòtic exceptuant la soca K6, que podria presentar una modificació post-transcripcional del RNAr 23S per una metilació d'adenina, que li conferiria la resistència.

El cloramfenicol és un altre antibiòtic que actua a nivell ribosomal, interferint en l'acció de la peptidiltransferasa i bloquejant, per tant, la unió dels aminoàcids a la cadena peptídica present a la subunitat 50S. Presenta un ampli espectre d'acció, poden actuar tant sobre bacteris aerobis com anaerobis, però a causa de la seva elevada toxicitat només s'utilitza en tractaments d'infeccions severes. De les sis soques estudiades només dues, K1 i K2 presentaren resistència al cloramfenicol, mentre K6 presentà una resistència intermèdia. La resistència davant aquest antimicrobià es deu a la inactivació del mateix per part d'un enzim, el cloramfenicol acetil transferasa (CAT), codificat plasmídicament [150].

La tetraciclina és un agent bacteriostàtic que inhibeix la síntesi proteica, en concret, inhibeix l'enllaç de l'aminoacil RNAt a la subunitat ribosomal 30S del bacteri. En general, la resistència a la tetraciclina s'atribueix a una permeabilitat reduïda o a la inactivació de l'antibiòtic al interior de la cèl·lula. Totes les soques estudiades presentaren patrons de resistència a aquests antibiòtic, exceptuant la soca K5 que presentà una sensibilitat intermèdia.

La rifampicina és un antibiòtic relativament nou que inhibeix la transcripció unint-se a la RNA polimerasa. És actiu sobre Gram positius i alguns Gram negatius. La resistència a la rifampicina és comú en els enterobacteris, en les soques estudiades, s'observa que totes eren resistents. De la mateixa manera, la funció principal de la novobiocina consisteix en la inhibició de la síntesi de DNA i RNA. El grau de resistència a les soques estudiades fou del 100%, corroborant que aquest antibiòtic és actiu contra organismes Gram positius però no contra bacils Gram negatius.

Finalment, l'activitat de les quinolones va ser variable en funció de la generació de la quinolona. Aquesta classe d'antibiòtics són capaços d'unir-se a diferents dianes, actuen inhibint la síntesi del DNA degut a un bloqueig de la DNA girasa i/o de la DNA topoisomerasa IV. Com a conseqüència d'aquest bloqueig s'indueix la resposta SOS i provoca altres efectes pleiotròpics com la filamentació que condueix a la mort cel·lular. L'àcid nalidíxic, fou el primer antibiòtic d'aquesta classe en aparèixer i únicament pot unir-se a una de les subunitats de la girasa. L'aparició de resistència és molt probable, tal com ho demostra el fet que totes les soques estudiades presenta resistència enfront aquest agent. Amb l'aparició de noves quinolones de segona i tercera generació, amb capacitat d'unir-se a diverses dianes de les subunitats, es dificultà l'aparició de soques resistents. Es va trobar que totes les soques estudiades eren sensibles a les quinolones de segona generació, ciprofloxacina i ofloxacina, exceptuant les soques K2 i K6. Aquestes dues soques, a més presentaren resistència a l'enrofloxacina, però només la soca K6 presentà també resistència a la norfloxacina, essent l'única soca resistent a totes les quinolones estudiades. A més, cal destacar l'elevada resistència a la ciprofloxacina i ofloxacina de la soca K6, amb valors de MICs superiors a 32 µg/ml.

4.2 ANÀLISI DE LES PROTEÏNES DE MEMBRANA EXTERNA DE LES SOQUES CLÍNQUES DE *Klebsiella* spp.

Per tal de complementar els estudis de susceptibilitat antimicrobiana i determinar quin era el paper de la membrana externa en la resistència als antibiòtics, es realitzà un anàlisi dels perfils de proteïnes de membrana externa de les sis soques clíniques de *Klebsiella* estudiades, en gels desnaturalitzants de poliacrilamida.

Alteracions en la membrana externa han estat relacionades amb la resistència als antibiòtics en *E. coli* i altres enterobacteris, incloent el gènere *Klebsiella*. En molts estudis s'ha demostrat que la contribució a la resistència per part de la membrana externa es deu a una alteració en l'expressió de les porines. Aquesta alteració pot ser deguda a una modificació en l'estructura de la proteïna que canviaria la seva conformació, o a una disminució en el nombre de porines o per la seva absència, en tots els casos disminueix o s'evita l'entrada de substàncies. Les dues porines majoritàries en *Klebsiella* són OmpK35 i OmpK36 homòlogues a les porines OmpF i OmpC d'*E. coli*, respectivament. La seva absència o disminució en nombre produeix un augment directe en la resistència a un gran nombre d'antibiòtics i varietat de substàncies. També s'ha descrit una porina anomenada OmpK34 homòloga a la porina OmpA d'*E. coli* i més recentment una porina d'un pes molecular aproximat de 39 kDa anomenada OmpK37, la qual només s'expressa sota unes determinades condicions i no en condicions normals en el laboratori [20, 81]. En els últims anys s'ha posat de manifest que una disminució de la permeabilitat de la membrana a causa d'una disminució del nombre de porines en membres del gènere *Klebsiella* està associada a una augment en els valors de les MICs a cefalosporines i quinolones [126].

Amb aquest estudi es va voler determinar si una alteració en l'expressió de les porines podria ser la causa de la resistència a antibiòtics hidrofílics d'algunes de les soques clíniques estudiades.

Els antibiòtics, per arribar a la seva diana intracel·lular han de superar la barrera que suposa la membrana externa. Pel que fa les quinolones s'han proposat tres rutes per travessar les envoltres cel·lulars: una via hidrofílica, a través de les proteïnes formadores de canal; una via hidrofòbica, a través de la bicapa de fosfolípids i una via *self promoted*, en la

que hi ha un desplaçament dels cations divalents que uneixen les molècules adjacents de lipopolisacàrid, de manera que altera l'estructura de la membrana externa. La majoria de quinolones, exceptuant l'àcid nalidíxic, són antibiòtics hidrofílics, per tant, utilitzen les porines per arribar al interior del bacteri. Una alteració en el nombre o l'estructura de les porines podria contribuir a la resistència de les soques de *Klebsiella* a aquests i altres antibiòtics hidrofílics.

La figura 4.2. mostra els perfils electroforètics de les proteïnes de la membrana externa (OMP) de les sis soques clíniques de *Klebsiella* estudiades. Les cèl·lules foren crescudes en medi LB, medi deficient en alguns determinants alimentaris, que afavoreix l'expressió de proteïnes de membrana externa, entre elles les porines. L'extracció de proteïnes de membrana externa fou obtinguda segons la metodologia descrita en l'apartat 3.7.1 i visualitzada per electroforesi en gels desnaturalitzats d'acrilamida, tal com es descriu en l'apartat 3.7.2 de material i mètodes.

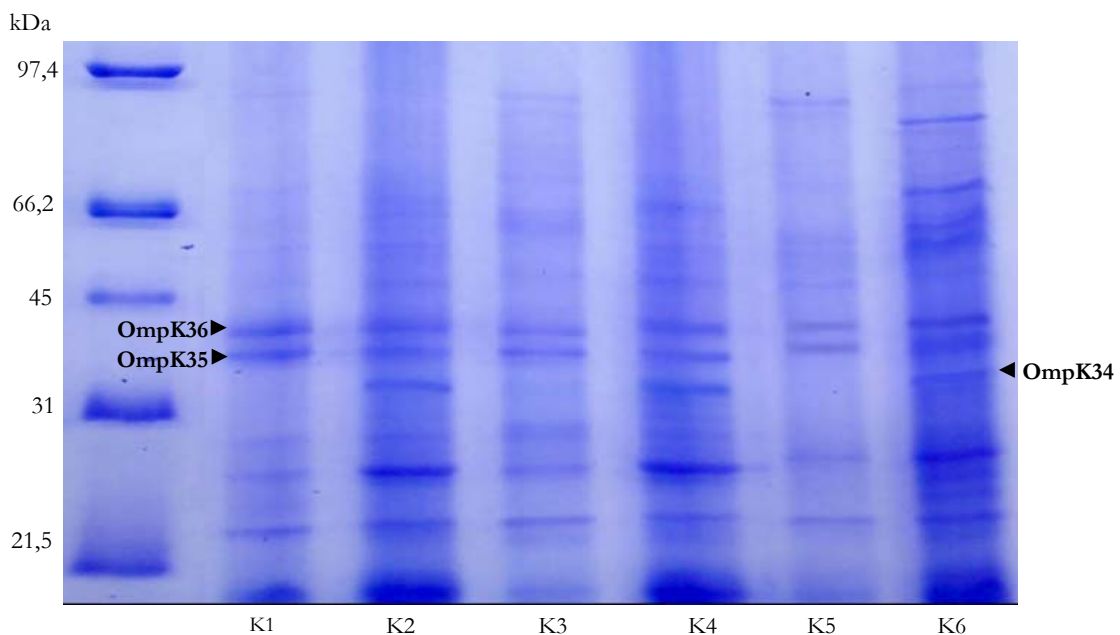


Figura 4.2. Perfils electroforètics en SDS-PAGE, de les proteïnes de membrana externa de les sis soques clíniques de *Klebsiella*.

Aparentment, com es pot veure en la figura 4.2., no s'observa cap diferència significativa en els perfils electroforètics de proteïnes de membrana externa. En tots els perfils proteics podem observar dues bandes majoritàries al voltant dels 40 kDa. Totes les soques clíniques de *K. pneumoniae* i de *K. oxytoca*, presenten dues bandes de 38 i 37 kDa, corresponents a les porines majoritàries de *Klebsiella* OmpK36 i OmpK35, respectivament, per la qual cosa sembla que no hi ha alteració de la membrana externa. Pel que fa les soques K2, K4 i K6 presenten a més una banda al voltant del 33 kDa que correspon a la porina OmpK34, proteïna homòloga a OmpA d'*E. coli*. Com es pot observar en la figura cap de les soques estudiades presenta una banda de 40 kDa corresponent a la porina OmpK37, aquesta porina només s'expressa sota determinades condicions, com pot ser una pressió selectiva d'antibiòtics.

Per tant, podríem afirmar que la resistència que presenten les soques clíniques a les quinolones i altres antibiòtics poc hidrofílics no és deguda aparentment a l'alteració de les proteïnes de la membrana externa.

4.3 DETERMINACIÓ DE LES SEQÜÈNCIES DELS GENS DIANA DE LES FLUOROQUINOLONES

L'estudi de sensibilitat microbiana de les soques clíniques de *Klebsiella* a diferents antibiòtics, realitzat en l'apartat 4.1, va permetre observar un nivell elevat de resistència a les quinolones, la qual cosa és preocupant, ja que fins al moment era la principal alternativa al tractament de les infeccions de *Klebsiella* amb antibiòtics β -lactàmics. Aquesta resistència a les quinolones la presentaven fonamentalment dues de les soques clíniques: *K. pneumoniae* K2 i *K. oxytoca* K6. Els resultats obtinguts en els diversos assaigs realitzats no indiquen que aquestes soques presentin, aparentment, cap tipus d'alteració en les proteïnes de membrana externa, pel que l'entrada d'antibiòtics es produiria de forma normal.

Per tant, el següent objectiu plantejat va ser profunditzar en l'estudi dels mecanismes de resistència de les soques K2 i K6 a les fluoroquinolones, ja que aquestes foren les que presentaren resistència a la gran majoria de les quinolones assajades, i amb els experiments realitzats fins la moment no s'ha observat cap tipus d'alteració que afavoreixi la seva resistència.

El principal mecanisme molecular de resistència a les quinolones en *Klebsiella*, a l'igual que la gran majoria d'enterobacteris, es deu a alteracions en una petita regió anomenada QRDRs (*Quinolone Resistance Determining Region*) situada al inici del gen *gyrA*. Mutacions en el gen *parC* sembla tenir un paper complementari en l'augment de la resistència a les quinolones i es creu que les mutacions en aquest gen es produiria només si prèviament s'han produït mutacions en els gens de la DNA girasa, per tant el seu paper en la resistència a quinolones no és tant important [52, 59].

Es va analitzar la seqüència de la regió QRDR de K2 i K6 amb l'objectiu de determinar les possibles mutacions en els gens diana de les fluoroquinolones que expliquessin la resistència a aquests tipus d'antibiòtics que presentaren les dues soques clíniques. Per això, es va realitzar un estudi comparatiu entre les regions QRDR d'aquestes dues soques, resistent a quinolones, i les corresponents a una soca sensible de referència.

Es realitzaren extraccions de DNA de les soques K2 i K6 i s'amplificaren per PCR les regions dels gens diana de les quinolones, en concret s'analitzaren els gens *gyrA* i *parC*. Les seqüències d'oligonucleòtids utilitzades en l'amplificació per PCR dels diferents gens implicats en la resistència a quinolones i les condicions per la realització d'aquest estudi es mostren en l'apartat 3.11 de material i mètodes.

Una vegada recuperats i purificats els productes amplificats per PCR, es determinaren les seqüències de DNA i es deduíren les seqüències d'aminoàcids corresponents dels gens *gyrA* i *parC*. En les figures 4.3., 4.4. i 4.5. es mostren els resultats obtinguts per aquestes seqüències.

Les seqüències es van alinear i comparar amb les corresponents a una soca sensible de *K. oxytoca* i *K. pneumoniae* de referència. Per la seqüència de *gyrA* es va prendre com a referència la soca amb número d'accés en el GenBank AF052257 per a *K. oxytoca* i AF052258 per a *K. pneumoniae*. Per la seqüència de *parC* es va prendre com a referència la soca amb número d'accés en el GenBank AJ133197 per a *K. oxytoca* i AF303641 per a *K. pneumoniae*. Cal destacar que només s'han anotat aquelles mutacions que han portat a un canvi d'aminoàcid respecte la soca de referència. La seqüència corresponent al gen *parC* de *K. pneumoniae* no s'ha mostrat, ja que no es va detectar cap mutació.

GyrA *K. pneumoniae*

Kp.2 gtc att gtt ggc cgt gcg ctg ccg gat gta cga gat ggc ttg aag ccg gta cac cgt
Kp.r gtc att gtt ggc cgt gcg ctg ccg gat gtc cga gat ggc ctg aag ccg gta cac cgt
Kp.r V I V G R A L P D V R D G L K P V H R

53

Kp.2 cgc gta ctt tac gcc atg **gac** gta ttg ggc aat gac tgg aac aaa gcc tac aaa aaa
Kp.r cgc gta ctt tac gcc atg **aac** gta ttg ggc aat gac tgg aac aaa gcc tat aaa aaa
Kp.r R V L Y A M **N** V L G N D W N K A Y K K
D

83

Kp.2 tca gcc cgt gtc gtt ggt gac gta att ggt aaa tac cac ccg cac ggc gac **ttc** gcg
Kp.r tca gcc cgt gtc gtt ggt gac gta atc ggt aaa tac cac ccg cac ggc gac **ttc** gcg
Kp.r S A R V V G D V I G K Y H P H G D **S** A
F

87

Kp.2 gta tac **ggc** acc atc gtg cgt atg gcg cag ccg ttc tcg ctg cgt tac atg ctg gtg
Kp.r gta tac **gac** acc atc gtg cgt atg gcg cag ccg ttc tcg ctg cgt tac atg ctg gtg
Kp.r V Y **D** T I V R M A Q P F S L R Y M L V
G

Kp.2 gac ggc cag ggt aac ttt ggt tcc atc gac ggc gac tcc gcc gcg gcg atg cgt tat
Kp.r gac ggc cag ggt aac ttt ggt tcc atc gac ggc gac tcc gcc gcg gcg atg cgt tat
Kp.r D G Q G N F G S I D G D S A A A M R Y

Kp.2 acc gaa att cgt ctg gcg aaa att gct cat gag ctg atg gcc gat ctt gaa aaa gag
Kp.r acc gaa att cgt ctg gcg aaa atc gct cat gag ctg atg gcc gat ctt gaa aaa gag
Kp.r T E I R L A K I A H E L M A D L E K E

156

Kp.2 acg gtc gat ttc gtc gac aac tat gac ggt acg gag cgt att **gcg** gac gtc atg ccg
Kp.r acg gtc gat ttc gtc gac aac tat gac ggt acg gag cgt att **ccg** gac gtc atg ccg
Kp.r T V D F V D N Y D G T E R I **P** D V M P
A

Kp.2 acc aaa att cct aac ctg ctg gtt aac ggc gcc tcc ggg atc gcc gta ggg atg gcc
Kp.r acc aaa att cct aac ctg ctg gtg aac ggc gcc tcc ggg atc gcc gta ggg atg gcc
Kp.r T K I P N L L V N G A S G I A V G M A

Kp.2 acc aac ata ccg cca cat aac ctg acg gaa gtg att aac ggc tgt ctg gcg tat gtt
Kp.r acc aac ata ccg cca cat aac ctg acg gaa gtg att aac ggc tgt ctg gcg tat gtt
Kp.r T N I P P H N L T E V I N G C L A Y V

Figura 4.3. Seqüència de nucleòtids de la regió QRDR del gen *gyrA* de *K. pneumoniae* estudiada i comparada amb la soca de referència AF052258. Es destaca en verd el canvi de nucleòtid que dona lloc a un canvi d'aminoàcid, en vermell.

on es produí una substitució de la serina (TCC) per una fenilalanina (TTC), i en la posició 87, un canvi de l'àcid aspàrtic (GAC) per una glicina (GGC). En alguns enterobacteris, com *S. marcescens*, s'ha observat que un canvi d'aminoàcid en la posició 81 (Gly→Cys) també està implicat en la resistència a quinolones [53], en el cas de la soca K2 aquesta posició no es troba alterada. En la seqüència de nucleòtids del gen *parC* no es detectà cap mutació que portés a una canvi d'aminoàcid, per la qual cosa els resultats no s'han mostrat.

La soca *K. oxytoca* K6, presentava la resistència més elevada a ciprofloxacina, amb un valor de concentració mínima inhibidora de 64 µg/ml. També presentava alts nivells de resistència a norfloxacina, ofloxacina i enrofloxacina (32 µg/ml).

Com pot veure's en la seqüència de *gyrA* (figura 4.4.), hi ha una sèrie de mutacions subratllades amb gris en les seqüències de nucleòtids les quals comporten un canvi d'aminoàcid, però aquest canvi no afecta a la resistència a les quinolones. És el cas del canvi en la posició 43 on es produí una substitució d'una prolina per una alanina, i en les posicions 165 Asn → Lys i 166 Leu→Arg. Com en el cas anterior, les mutacions en les seqüències de nucleòtids que no han portat a un canvi d'aminoàcid no han estat anotades en les figures. En la posició 83 de *gyrA* en K6, es produí una substitució d'una treonina per una isoleucina. Fa uns anys es pensava que tots els enterobacteris en la posició 83 de les soques sensibles a quinolones s'hi troba una serina seguint com a model *E. coli*, però estudis realitzats per Weigel *et al.* [53] van demostrar que alguns enterobacteris, entre ells *K. oxytoca* i *E. aerogenes* sensibles a quinolones, en la posició 83 presentaven una treonina. La mutació més freqüent que es dona en aquesta posició és la substitució per una isoleucina, fenilalanina o tirosina. En moltes soques d'enterobacteris resistent a quinolones també es troba mutació que té lloc en la posició 87 on es dona un canvi de l'àcid aspàrtic per una glicina o una asparagina [54], en el cas de K6 no hi ha cap mutació en aquesta posició, però si es s'observa la mutació en la posició 83 implicada en la resistència a les quinolones.

En el gen *parC*, s'observen una sèrie de mutacions que donen lloc a un canvi d'aminoàcid, són els canvis produïts en les posicions 21 His→Asn, 48 Gly→Tyr i 102 Met→Leu. Cap d'aquestes mutacions s'ha produït en posicions implicades en la resistència a quinolones. En els enterobacteris els canvis d'aminoàcids que donen lloc a resistència a quinolones es produeixen en la posició 80 on es substitueix una serina per una isoleucina i

en la posició 84, on té lloc la substitució de l'àcid glutàmic per una lisina [57]. La figura 4.5. mostra que en aquestes posicions no hi ha cap mutació.

Tenint en compte els resultats obtinguts en la soca K2, la qual presenta dues mutacions en *gyrA* i no presenta canvis en *parC*, aquestes mutacions podrien explicar els nivells de resistència d'aquesta soca davant les quinolones com la ciprofloxacina i l'enrofloxacina, ja que la resistència no és molt elevada. En canvi, pel que fa la soca K6, que només presentà una mutació en *gyrA*, aquesta única mutació no explicaria els elevats nivells de resistència que aquesta soca presenta davant les quinolones. Per tant, podríem afirmar que la resistència d'aquesta soca a les quinolones es podria deure a un altre mecanisme de resistència com pot ser l'acció d'una o més bombes de reflux.

4.4 ESTIMACIÓ DE LA IMPLICACIÓ DEL REFLUX EN LA RESISTÈNCIA A LES QUINOLONES

4.4.1 SUSCEPTIBILITAT MICROBIANA ALS ANTIBIÒTICS EN PRESENCIA D'UN INHIBIDOR METABÒLIC

Com s'ha vist en l'apartat anterior les soques estudiades presenten una sèrie de mutacions en els gens diana de les quinolones que explicaria, en el cas de la soca K2, la seva resistència a aquests tipus d'antibiòtics, ja que els nivells de resistència que presenta no són massa elevats. En el cas de K6, els valors de resistència obtinguts en l'apartat 4.1 són molt elevats per ser explicats per un únic mecanisme de resistència. Per tant, el següent objectiu plantejat va ser profunditzar en l'estudi d'altres possibles mecanismes de resistència a les quinolones en aquestes dues soques clíniques de *Klebsiella*.

Recentment, s'ha descrit un mecanisme addicional de resistència a les quinolones, els sistemes de reflux actius, formats per proteïnes amb capacitat per transportar compostos estructuralment molt diferents fora del bacteri, incloent antibiòtics com les fluoroquinolones i cations tòxics com el bromur d'etidi, prevenint la seva acumulació intracel·lular. En principi, el reflux pot permetre la supervivència bacteriana en un breu període de temps que després portarà al bacteri a una adaptació de la resistència a

fluoroquinolones, a través de mutacions en les dianes de l'antibiòtic [142]. Les activitats de moltes d'aquestes bombes poden ser inhibides per diferents substàncies com l'alcaloide reserpina i el carbonil cianida M-clorofenilhidrazona (CCCP), compostos que desgraciadament no poden ser utilitzats en la pràctica clínica degut a la seva alta toxicitat.

En els darrers anys ha estat demostrada la presència de sistemes de reflux en soques clíniques de *Klebsiella* per la presència de l'operó *acrAB* que codifica per la proteïna de membrana interna (AcrB) que forma part de la bomba de reflux de la família RND i la proteïna periplasmàtica (AcrA), que serveix de nexa d'unió entre les proteïnes de membrana interna i de membrana externa. La sobreexpressió d'aquest transportador augmenta la resistència a diversos compostos[114, 135].

Amb l'objectiu de determinar si l'elevada resistència a les quinolones que presentaven les soques *K. oxytoca* K6 i *K. pneumoniae* K2 podia ser atribuïda a l'acció d'una bomba de reflux, es determinà la concentració mínima inhibidora de diferents quinolones, en presència i en absència del inhibidor metabòlic CCCP. Al mateix temps, es determinà el valor de la concentració mínima inhibidora de diversos compostos reconeguts com a substrats de les bombes de reflux: tetraciclina, cloramfenicol, novobiocina i acriflavina, també en presència i en absència de CCCP.

Els resultats de les concentracions mínimes inhibidores a diferents antimicrobians en les dues soques clíniques de *Klebsiella* amb elevada resistència a les quinolones, en presència i en absència del inhibidor metabòlic CCCP, es presenten en les taules 4.3. i 4.4. La concentració de CCCP utilitzada en tots els casos va ser de 10 µg/ml, molt per sota del valor de la MIC d'aquest compost en les dues soques estudiades. Aquest és el valor utilitzat generalment en aquest tipus d'assaigs [142].

Taula 4.3. Concentracions mínimes inhibidores de quinolones en presència i absència de CCCP, expressades en µg/ml i determinades pel mètode de dilució en medi líquid en plaques de *microtiter*.

SOCA	ANTIBIÒTIC / MIC (µg/ml)							
	CIP	CIP+ CCCP	NOR	NOR+ CCCP	ENR	ENR+ CCCP	OFX	OFX+ CCCP
K2	8	2	8	4	16	2	4	2
K6	64	4	32	4	32	8	32	2
K7	0.06	0.06	0.25	0.25	0.5	0.5	1	0.5

CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; ENR, enrofloxacina; OFX, ofloxacina; CCCP, carbonil cianida M-clorofenilhidrazona (10 µg/ml)

Taula 4.4. Concentracions mínimes inhibidores de compostos substrat de bombes de reflux en presència i absència de CCCP, expressades en µg/ml i determinades pel mètode de dilució en medi líquid en plaques de *microtiter*.

SOCA	ANTIBIÒTIC / MIC (µg/ml)							
	TET	TET+ CCCP	CHL	CHL+ CCCP	ACR	ACR+ CCCP	NOV	NOV+ CCCP
K2	64	32	32	16	64	4	128	16
K6	128	16	16	8	128	4	64	8
K7	2	1	0.5	0.5	1	0.25	1	0.5

TET, tetraciclina; CHL, cloramfenicol; ACR, acriflavina; NOV, novobiocina; CCCP, carbonil cianida M-clorofenilhidrazona (10 µg/ml)

Per poder avaluar la importància de les diferències entre els valors de les concentracions mínimes inhibidores en presència i en absència de CCCP, es va calcular la diferència entre els dos logaritmes en base 2 de les dues parelles de valors (amb i sense CCCP). Els valors obtinguts es mostren en la taula 4.5. Una diferència de 3 indicarà un diferència de tres ordres de dilució entre un valor i l'altre, de la mateixa forma, una diferència de 0 indicarà que els valors de les MICs del compost antimicrobià, en presència i absència de CCCP, són iguals. S'ha de tenir en compte que es va considerar que una diferència de 2 o superior en la resistència a quinolones era indicativa de la presència d'un sistema de reflux actiu.

Taula 4.5. Diferències en els logaritmes en base 2 de les MICs a diferents productes amb i sense CCCP en les soques de *Klebsiella* estudiades.

SOCA	ANTIBIÒTIC							
	CIP	NOR	ENR	OFX	TET	CHL	ACR	NOV
K2	2	1	3	1	1	1	4	3
K6	4	3	2	4	3	1	5	3
K7	0	0	0	1	1	0	2	1

CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; ENR, enrofloxacina; OFX, ofloxacina; TET, tetraciclina; CHL, cloramfenicol; ACR, acriflavina; NOV, novobiocina

Les diferències més destacades dels valors de les MICs en presència i en absència de CCCP es troben en la soca de *K. oxytoca* K6, que en els resultats anteriors era l'única soca que presentava resistència a totes les fluoroquinolones assajades i amb uns valors de resistència molt elevats. Pel que fa *K. pneumoniae* K2, que presentava elevada resistència a l'enrofloxacina però una resistència menor a la ciprofloxacina i les altres fluoroquinolones estudiades, les diferències dels valors de les MICs en presència i absència de CCCP, no van ser tant destacades.

En K6, les diferències foren especialment importants pel que fa a la ciprofloxacina i l'ofloxacina, on el descens del valor de la MIC en presència de CCCP va ser de 4 dilucions. També va ser important el descens de 3 dilucions obtingut per la norfloxacina en aquesta mateixa soca clínica. Aquest resultat ens van portar a pensar en l'existència i la participació d'una bomba de reflux en la resistència de la soca K6 a les quinolones. En canvi, en K2 el descens de valors de les MICs no fou tant accentuat com en el cas de la soca K6, tot i això s'obtingueren disminucions de 2 i 3 dilucions en dues de les quinolones estudiades, ciprofloxacina i enrofloxacina, fet que posaria de manifest la presència d'un possible sistema actiu de reflux.

En general, els resultats obtinguts indiquen que la combinació d'una fluoroquinolona com la ciprofloxacina amb un inhibidor del reflux, en la majoria dels casos milloraria substancialment l'eficàcia clínica d'aquesta classe d'antibiòtics davant infeccions causades pel gènere *Klebsiella*.

Per altra banda, les MICs amb les diferents substàncies assajades, substrat de les bombes de reflux i especialment pel que fa la novobiocina i l'acriflavina, tant en presència com en absència de CCCP, reafirmen que aquests compostos són substrat d'algun sistema de reflux inhibible per CCCP. És més, en el cas del colorant acriflavina, la presència del inhibidor fa disminuir considerablement el valor de la MIC, tan en la soca K2 com en la K6, obtenint-se valors de 4 i de 5, respectivament, en la diferència de logaritmes (taula 4.5.). En el cas de la tetraciclina i el cloramfenicol, les diferències no són destacables, a excepció de la disminució de la MIC de tetraciclina en presència de CCCP en la soca K6.

4.4.2 ASSAIGS D'INHIBICIÓ DEL CREIXEMENT

Amb la finalitat de verificar i contrastar la informació que ens va proporcionar la determinació de les concentracions mínimes inhibidores amb presència i absència d'un inhibidor metabòlic en l'apartat anterior, es procedí a l'aplicació d'una altra metodologia, per determinar l'acció d'un possible sistema de reflux en la resistència de les dues soques de *Klebsiella* K2 i K6. Concretament, es desenvolupà una assaig basat en l'estudi de L.R. Peterson *et al.* [142], on es mesurà l'efecte del CCCP en presència de ciprofloxacina. Les concentracions de ciprofloxacina utilitzades en aquest assaig van ser quatre vegades inferiors al valor de la MIC per cada soca.

La ciprofloxacina va ser l'antibiòtic elegit per aquest i els següents estudis, per ser la fluoroquinolona més utilitzada des de 1987 i la que ha exercit més pressió selectiva en les soques clíniques. Per altra banda, aquest antibiòtic proporciona un marcador valuós d'avaluació de l'actual i potencial emergència de la resistència a fluoroquinolones.

Els assaigs d'inhibició del creixement utilitzant CCCP conjuntament amb l'agent antimicrobià es realitzaren per detectar l'actuació d'un sistema de reflux susceptible al CCCP. Els resultats obtinguts en aquest assaig, per les soques clíniques K2 i K6 i la soca control K7, segons el mètode descrit en l'apartat 3.6.1.2 de material i mètodes, es mostren a la taula 4.6.

Taula 4.6. Efecte del CCCP en el creixement de les soques K2, K6 i K7, en presència de ciprofloxacina a $\frac{1}{4}$ del valor de la MIC.

TEMPS (hores)	DO (550 nm)					
	K2		K6		K7	
	- CPPP	+ CPPP	- CCCP	+ CCCP	- CCCP	+ CCCP
0	0,261	0,261	0,295	0,295	0,270	0,270
1	0,443	0,347	0,484	0,361	0,339	0,361
2	0,769	0,463	0,737	0,417	0,578	0,417
3	1,005	0,518	0,970	0,451	0,731	0,587
4	1,119	0,524	1,124	0,455	0,814	0,679
5	1,310	0,548	1,301	0,462	0,857	0,805
6	1,443	0,556	1,423	0,475	0,899	0,889
7	1,560	0,569	1,560	0,484	0,923	0,901
8	1,780	0,589	1,610	0,497	0,975	0,932

DO, densitat òptica; CCCP, carbonil cianida M-clorofenilhidrazona (10 $\mu\text{g/ml}$)

Les figures 4.6. i 4.7. mostren les representacions gràfiques dels valors obtinguts.

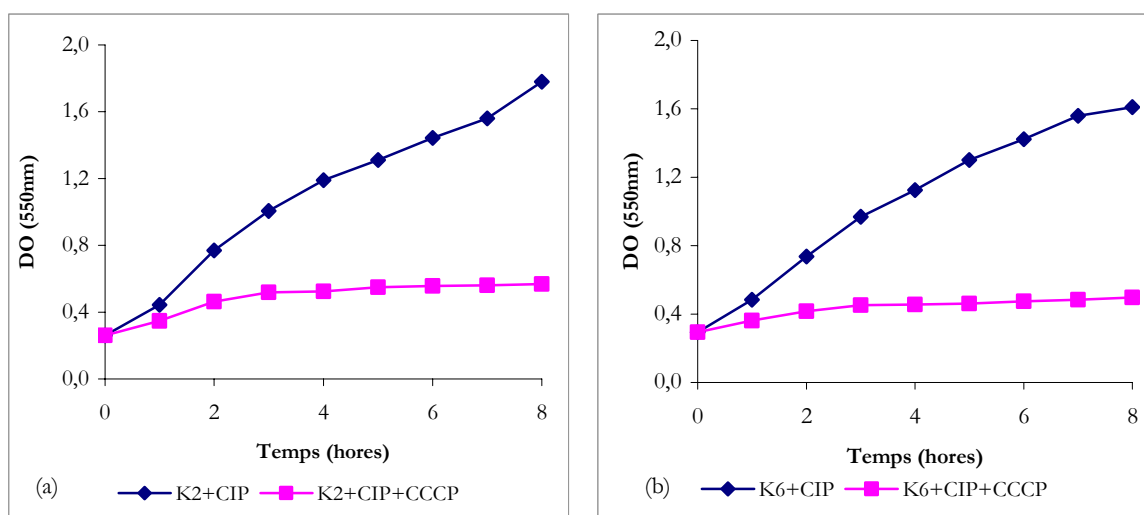


Figura 4.6. Representació de les corbes d'inhibició del creixement de les soques de *Klebsiella* a una concentració $\frac{1}{4}$ de la MIC de ciprofloxacina, en presència i en absència de CCCP. (a) *K. pneumoniae* K2. (b) *K. oxytoca* K6.

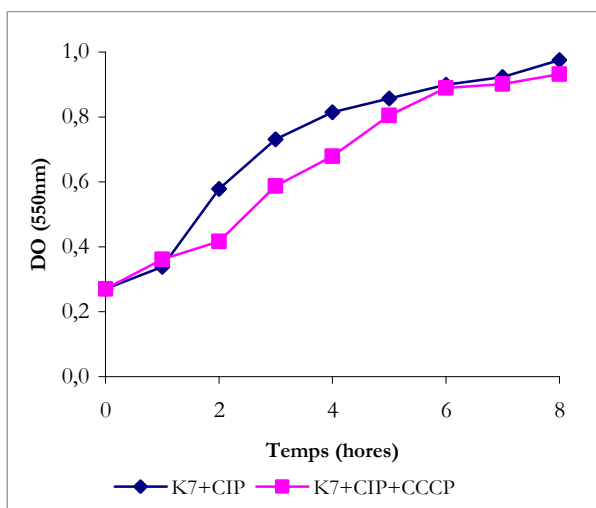


Figura 4.7. Representació de la corba d'inhibició del creixement de *K. pneumoniae* K7 a una concentració $\frac{1}{4}$ de la MIC de ciprofloxacina, en presència i en absència de CCCP.

Com es pot apreciar en els resultats de la taula 4.6. i en les representacions gràfiques mostrades en la figura 4.6., el comportament de les dues soques clíniques de *Klebsiella* resistents a les quinolones, K2 i K6 va ser molt semblant. El seu creixement en presència de concentracions subletals de ciprofloxacina es va donar de forma normal, en canvi a l'afegir CCCP al cultiu, no es va detectar creixement. Aquest fet s'explicaria per l'efecte del CCCP, que evitaria l'expulsió de ciprofloxacina per una inhibició de bomba de reflux, fent que l'antibiòtic s'acumulés al seu interior evitant-ne el seu creixement, la qual cosa indicaria l'acció d'una bomba de reflux.

Observant la representació gràfica mostrada en la figura 4.7., es veu que K7, a diferència de les altres dues soques, no presentà gaires variacions en el creixement amb presència de l'antibiòtic i el seu creixement amb l'antibiòtic i el inhibidor metabòlic. Això es degut a que es tracta d'una soca sensible a la ciprofloxacina, que no té cap mecanisme de reflux. Per tant, l'efecte del CCCP tampoc es va observar.

4.4.3 EXPERIMENTS DE FLUORIMETRIA

Seguidament es va voler avaluar la contribució a la resistència a ciprofloxacina per part d'una eventual bomba de reflux de manera quantitativa, mitjançant l'aplicació d'un mètode fluorimètric. Aquest mètode consisteix en la determinació de la concentració de ciprofloxacina acumulada al interior cel·lular, segons Mortimer i Piddock [143]. La concentració de fluoroquinolona acumulada es determinà tant en presència com en absència del inhibidor CCCP. L'objectiu principal d'aquest estudi va ser caracteritzar els mecanismes de resistència a ciprofloxacina en soques clíniques de *Klebsiella* amb elevats valors de MICs a les quinolones, agafant com a control negatiu la soca de laboratori *K. pneumoniae* K7.

Els assaigs d'acumulació de ciprofloxacina es portaren a terme mitjançant una presa de mostra en curts intervals de temps durant un total de 30 minuts. Les lectures de fluorescència per cada una de les soques estudiades en els assaigs de fluorimetria van posar de manifest que el valor d'acumulació màxima de l'antibiòtic es produïa entre el minut 10 i 12, de manera que l'últim temps de presa de mostra fou al cap de 12 minuts d'haver iniciat l'experiment. El mètode seguit va ser el descrit en l'apartat 3.6.2 de material i mètodes.

En la figura 4.8. es mostren les corbes d'acumulació de ciprofloxacina de les dues soques clíniques de *Klebsiella* K2 i K6, que presentaren alts nivells de resistència a les quinolones i la corba d'acumulació de ciprofloxacina de la soca de laboratori K7 utilitzada com a control.

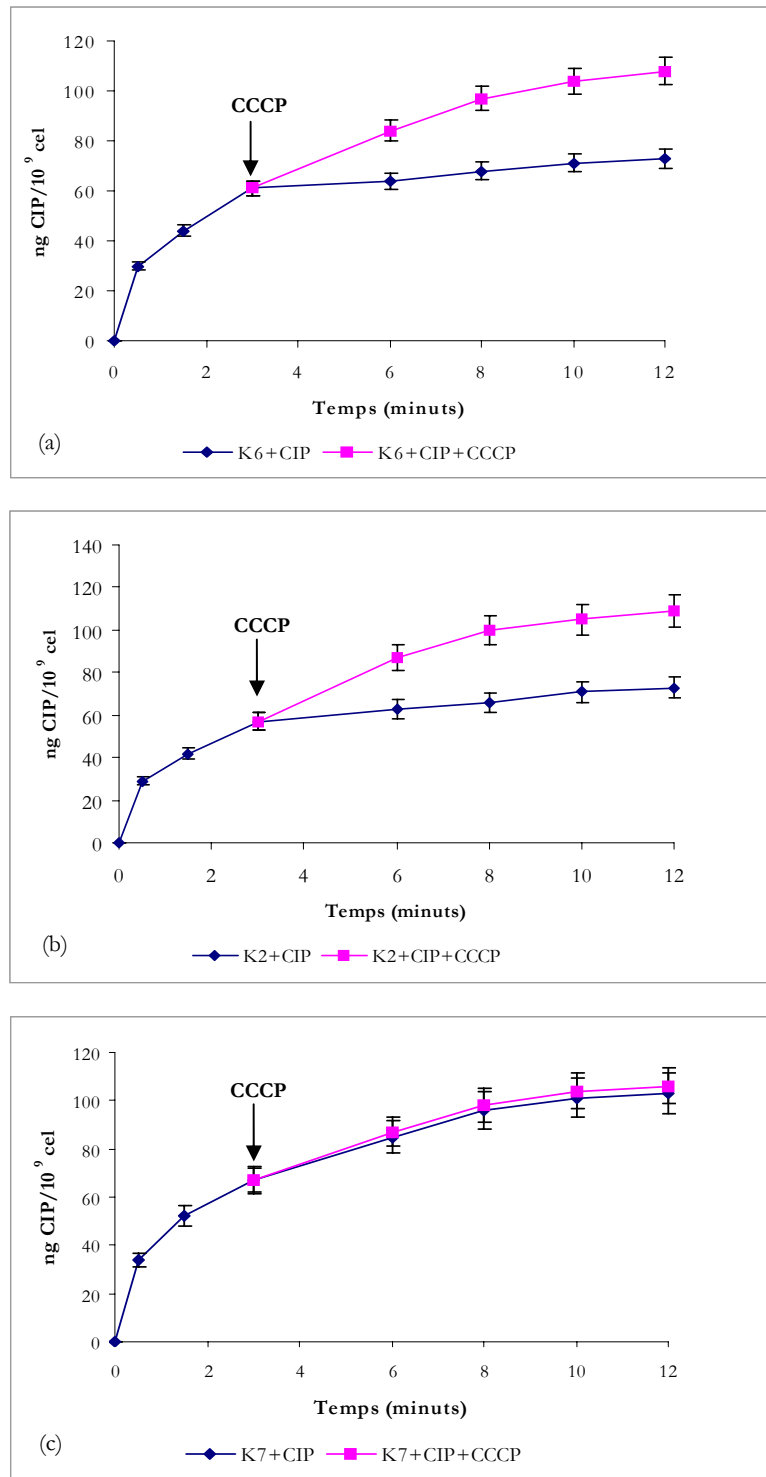


Figura 4.8. Assaig fluorimètric d'acumulació de ciprofloxacina (CIP) sense i amb inhibidor CCCP en tres soques de *Klebsiella*. (a) Acumulació de ciprofloxacina en *K. oxytoca* K6. (b) Acumulació de ciprofloxacina en *K. pneumoniae* K2. (c) Acumulació de ciprofloxacina en *K. pneumoniae* K7.

També es determinaren els valors mitjos de la quantitat de ciprofloxacina acumulada en cada soca, a partir dels resultats obtinguts en tots els experiments realitzats, que està representat en la figura 4.9.

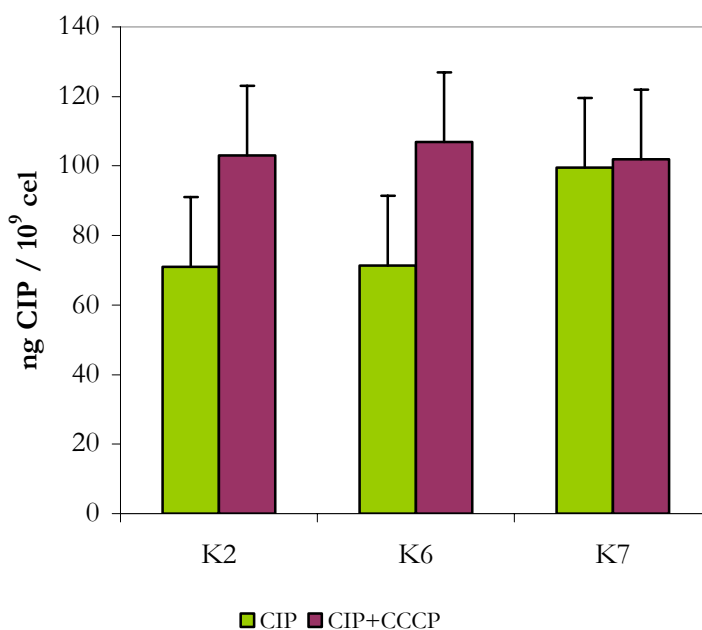


Figura 4.9. Valors promig d'acumulació de ciprofloxacina en les soques de *Klebsiella*, en presència i en absència de CCCP.

A partir dels resultats que es mostren en les figures 4.8. i 4.9., es realitzaren diferents anàlisis. En primer lloc, es va comparar l'acumulació de ciprofloxacina entre les tres soques estudiades. Les barres en verd, de la figura 4.9., mostren el nivell d'acumulació de ciprofloxacina en condicions normals. Aquest valor és molt semblant per a les dues soques clíniques de *Klebsiella* estudiades, en canvi en K7, tot i que la diferència no és molt gran, s'hi acumula més quantitat de ciprofloxacina. Aquests resultats posen de manifest que les dues soques clíniques podrien presentar algun tipus d'alteració que evitaria l'acumulació d'antibiòtic, en aquest cas ciprofloxacina, dins la cèl·lula. Si ens fixem en les barres en morat, l'acumulació de ciprofloxacina en les dues soques clíniques de *Klebsiella* augmenta respecte els resultats mostrats en les barres en verd, això podria ser degut a la presència del inhibidor metabòlic CCCP, que inhibiria el sistema de reflux evitant l'expulsió de

l'antibiòtic fora del bacteri i afavorint-ne l'acumulació al seu interior. Aquest valors d'acumulació en presència de CCCP són molt semblants als obtinguts en la soca K7 tant en presència com en absència d'inhibidor el que indicaria l'acció d'un sistema de reflux en les dues soques clíniques.

En segon lloc, es varen avaluar les diferències individuals entre l'acumulació de ciprofloxacina en presència i en absència de CCCP. Els valors d'acumulació de l'antibiòtic en presència del inhibidor, van ser superiors als corresponents valors en absència de CCCP, en les dues soques clíniques de *Klebsiella* que havien presentat resistència a les quinolones. Segons els resultats representats en les figures anteriors, existiren diferències entre els valors d'acumulació amb i sense CCCP en K2 i K6, essent l'acumulació d'antibiòtic en presència del inhibidor una mica superior. En canvi, en K7 els valors d'acumulació es van mantenir iguals en presència i en absència de CCCP, tal com es pot observar en la figura 4.8.(c). En el cas de les soques clíniques, el CCCP inhibiria una possible bomba de reflux, evitant el bombeig de l'antibiòtic cap a l'exterior i per tant augmentant la concentració intracel·lular de ciprofloxacina. Les diferències en l'acumulació de ciprofloxacina en presència i absència de CCCP en les dues soques clíniques es pot observar clarament en la figura 4.8.(a) i 4.8.(b), indicant la possible participació d'un sistema de reflux actiu en la resistència a les quinolones.

4.5 DETERMINACIÓ DE LA PRESENCIA DE GENS DE BOMBES DE REFLUX EN SOQUES RESISTENTS A FLUOROQUINOLONES

4.5.1 PRESENCIA DELS GENS DE L'OPERÓ *acrAB*

Els assaigs realitzats en l'apartat anterior, per demostrar la implicació de les bombes de reflux en els mecanismes de resistència a les quinolones, i més concretament, a la ciprofloxacina, posaren de manifest que les soques K2 i K6 resistents a quinolones, podrien presentar algun tipus de sistema de reflux que evitaria l'acumulació de substàncies al interior de la cèl·lula, conferint al bacteri la capacitat de créixer en presència de l'antibiòtic.

Per tant, una vegada confirmada la possible presència de sistemes de reflux, el següent pas fou identificar quin dels diferents tipus de bomba era el implicat en el reflux de substàncies en les soques clíniques de *K. pneumoniae* (K2) i *K. oxytoca* (K6).

Fins al moment s'han descrit gran quantitat de sistemes de reflux implicats en la resistència a diversos antibiòtics. En bacteris Gram negatius sembla que tots els sistemes de reflux requereixen de tres proteïnes: un transportador de reflux situat a la membrana citoplasmàtica, una proteïna de canal de membrana externa que expulsa a l'exterior l'antibiòtic i una proteïna de fusió de membrana que actua de nexa d'unió entre la proteïna de membrana interna i la de membrana externa [63, 98]. En el cas dels enterobacteris, i més concretament, d'*E. coli*, la bomba de reflux més important implicada en l'expulsió d'antibiòtics i especialment de quinolones, està codificada per l'operó *acrAB*, tot i que no codifica per cap proteïna de membrana externa, es creu que la proteïna TolC podria actuar com a canal de membrana externa per aquesta bomba [108].

En *Klebsiella*, fins al moment, hi ha descrites diversos tipus de bombes de reflux, on destaca de forma important la bomba AcrAB implicada en el reflux d'antibiòtics del grup de les quinolones, entre altres compostos [114, 135].

L'objectiu plantejat va ser en primer lloc, la detecció, identificació i l'anàlisi dels gens *acrA* i *acrB* que codifiquen per les proteïnes de la bomba de reflux AcrAB, en les soques clíniques que presentaren alts nivells de resistència a les quinolones i que estudis preliminars indicaven la possible presència de sistemes de reflux, amb la finalitat d'identificar la bomba de reflux present en aquestes soques.

Es construïren els cebadors a partir de les seqüències conegudes dels gens *acrA* i *acrB* de l'operó *acrAB* de *K. pneumoniae* que han estat publicades en la base de dades GenBank amb número d'accés AJ318073, descrites en l'apartat 3.11 de material i mètodes; al mateix temps es realitzaren extraccions de DNA de les dues soques clíniques resistents a quinolones K2 i K6. Mitjançant la tècnica de PCR s'amplificaren els fragments corresponents als gens d'aquestes dues proteïnes, sota les condicions que es descriuen en l'apartat 3.11.2, de material i mètodes.

Els fragments que s'obtingueren de l'amplificació per PCR dels gens de la bomba de reflux AcrAB, es mostren en la figura 4.10., en el cas de K6 i en la figura 4.11., pel que fa K2.

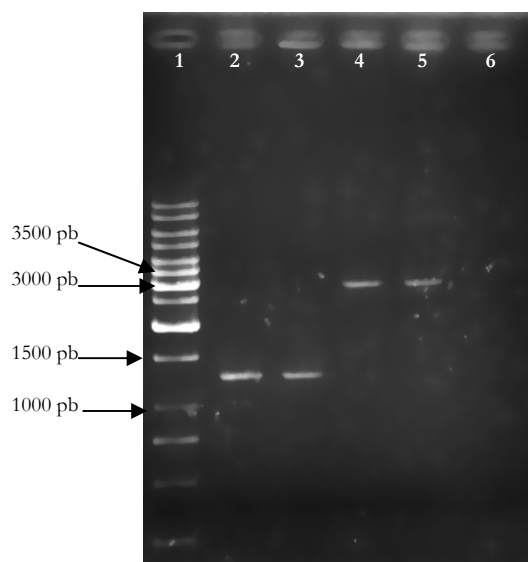


Figura 4.10. Fragments corresponent a l'amplificació de l'operó *acrAB* en *K. oxytoca* K6. (1) marcador λ Hind III; (2,3) fragment amplificat de 1,2 Kb corresponent al gen *acrA*; (4,5) fragment amplificat de 3,15 Kb corresponent al gen *acrB*. (6) control negatiu *E. coli*.

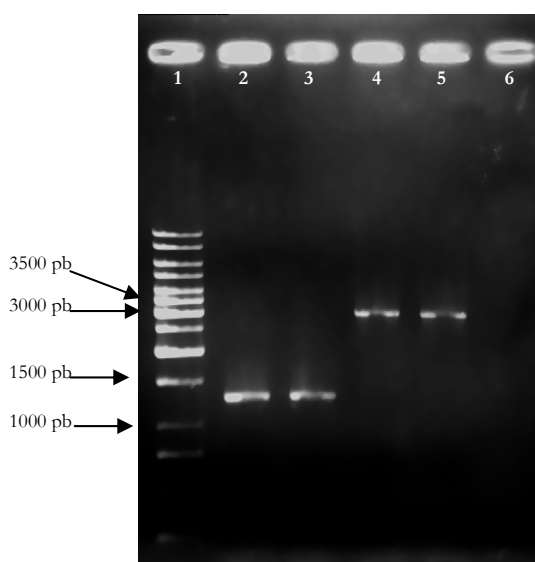


Figura 4.11. Fragments corresponents a l'amplificació de l'operó *acrAB* en *K. pneumoniae* K2. (1) marcador λ Hind III; (2,3) fragment amplificat de 1,2 Kb corresponent al gen *acrA*; (4,5) fragment amplificat de 3,15 Kb corresponent al gen *acrB*. (6) control negatiu *E. coli*.

En les figures 4.10. i 4.11. es pot observar que les dues soques estudiades amplifiquen els fragments corresponents als gens que codifiquen per les proteïnes que formen part de la bomba de reflux AcrAB. En el DNA cromosòmic de les dues soques s'ha amplificat una banda d'uns 3150 parells de bases corresponent a la proteïna de membrana interna AcrB i una altra banda d'uns 1200 parells de bases que correspondria a la proteïna de fusió de membrana AcrA. Aquests resultats demostren que, les dues soques clíniques de *Klebsiella* resistents a les quinolones presenten els gens de la bomba de reflux AcrAB, tot i que això no implica que K2 i K6 expressin aquesta bomba de reflux. La presència d'aquest sistema de reflux faria que el bacteri tingués la capacitat d'expulsar els antibiòtics del grup de les quinolones fora de la cèl·lula conferint-los alts nivells de resistència a aquests i a altres antibiòtics com la novobiocina i la tetraciclina i colorants com l'acriflavina, també substrats de les bombes de reflux.

4.5.2 PRESENCIA DEL GEN DE LA PROTEÏNA TolC

Una vegada demostrada la implicació d'un sistema reflux en la resistència a les quinolones en les dues soques clíniques de *Klebsiella* i confirmada la presència dels gens de les proteïnes que formen part de la bomba de reflux AcrAB, el següent propòsit fou determinar i estudiar detalladament la proteïna de membrana externa (OMP) associada a aquesta bomba de reflux i implicada en l'expulsió de les substàncies.

En el cas d'*E. coli* i altres enterobacteris ha estat demostrada la participació de la proteïna TolC formadora de canal de membrana externa en l'expulsió de compostos a l'exterior de la cèl·lula gràcies a la seva associació amb la bomba AcrAB, i altres tipus de sistemes de reflux amb capacitat per expulsar gran varietat de substàncies [122, 123]. En soques clíniques de *Klebsiella* resistents a quinolones ha estat demostrada la presència i la participació en la resistència de la bomba de reflux AcrAB però, fins al moment, el canal de membrana externa associat a aquesta bomba de reflux en *Klebsiella* no ha estat descrit. Per tant, l'objectiu plantejat, va ser determinar si la proteïna formadora de canal associada a la bomba de reflux AcrAB detectada en les soques clíniques resistents a quinolones, era la proteïna TolC, proteïna ja descrita en diverses espècies bacterianes d'enterobacteris.

El interès de la proteïna TolC radica en la seva participació en l'expulsió fora del bacteri d'una gran varietat de substàncies entre les que es troben una gran quantitat d'antibiòtics, gràcies a la interacció amb translocases de membrana interna o amb bombes de reflux com pot ser la bomba AcrAB [122]. La proteïna TolC es situa a la membrana externa dels bacteris formant un porus que permet tant l'entrada com la sortida de substàncies. Quan aquesta proteïna es troba associada a un sistema de reflux el que fa és permetre la sortida cap a l'exterior del bacteri de l'antibiòtic o substància capturada per la proteïna AcrB en la membrana interna. Tot i això, aquesta proteïna es descobrí per la seva funció com a receptor de colicina E1, gràcies a que mutacions en el seu gen produïa resistència a aquesta proteïna. A partir d'aquí es van anar descobrint altres funcions en les quals la proteïna TolC estava implicada, com la partició del cromosoma i el superenrotllament del DNA [126].

Per aquests motius es va creure important aprofundir en l'estudi tant molecular (clonatge i seqüenciació) com fisiològic de la proteïna TolC.

Primerament, es construïren les seqüències d'oligonucleòtids utilitzades per a l'amplificació del gen de *tolC*, a partir de la seqüència coneguda d'aquest gen d'*Enterobacter aerogenes* publicada en la base de dades GenBank amb número d'accés AJ306390 descrita en l'apartat 3.11 de material i mètodes. A partir del DNA de les dues soques clíniques resistents a quinolones K2 i K6, i el de les soques d'*E. aerogenes* i *E. coli*, s'amplificà mitjançant la tècnica de PCR, sota les condicions que es descriuen en l'apartat 3.11.1 de material i mètodes, el gen de la proteïna TolC d'aquestes soques.

Els fragments que s'obtingueren de l'amplificació per PCR per aquestes soques es mostren en la figura 4.12., com a control positiu s'utilitzà una soca d'*E. aerogenes*, espècie a partir de la qual es construïren les seqüències d'oligonucleòtids, i com a control negatiu una soca d'*E. coli*.

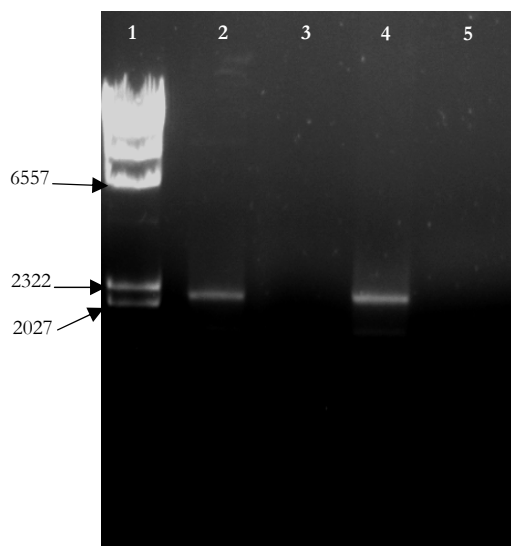


Figura 4.12. Fragments corresponents a l'amplificació del gen *tolC*. (1) marcador λ Hind III (2) *K. oxytoca* K6 (3) *K. pneumoniae* K2. (4) Amplificació gen *tolC* en *E. aerogenes*, control positiu. (5) Control negatiu *E. coli*.

Com es pot observar en la figura 4.12., en el cas de *K. oxytoca* K6, s'amplificà un fragment d'aproximadament 2200 parells de bases, que donà una banda molt semblant a l'obtinguda en la soca d'*E. aerogenes* que s'utilitzà com a control positiu. Tot i que podem confirmar que la soca K6 presenta el gen de la proteïna de membrana externa TolC que és la que s'associa a la bomba de reflux AcrAB permetent la sortida d'antibiòtics i afavorint la resistència d'aquesta soca a les quinolones i altres substàncies, no podem afirmar que aquesta proteïna s'expressi.

En canvi, pel que fa *K. pneumoniae* K2 resistent a quinolones, no s'amplificà cap banda corresponent al gen de la proteïna TolC. Tot i aquest resultat, això no és indicatiu de que aquesta soca no tingui o no expressi la proteïna TolC, només ens indica que les condicions utilitzades per a la realització de la PCR o els cebadors utilitzats no eren els indicats per a la detecció d'aquesta proteïna.

Per tant la soca K6, que presentà uns alts nivells de resistència a les quinolones, presenta mutacions en els gens diana *gyrA* i *parC*, descrits en l'apartat 4.2, a més s'ha confirmat la presència dels gens que formen part del sistema de reflux AcrAB i de la proteïna de membrana externa que s'associa a aquesta bomba, TolC. Aquests resultats junt amb els obtinguts en l'apartat 4.4, on s'han realitzat estudis de reflux que demostren que aquest bacteri presenta algun tipus de sistema de reflux, ens porten a pensar que la soca clínica *K. oxytoca* K6 presenta el sistema actiu de reflux, AcrAB-TolC, que impediria l'acumulació de l'antibiòtic dins la cèl·lula. Aquests dos sistemes de resistència podrien actuar conjuntament, la qual cosa explicaria els elevats valors de resistència que presentà aquesta soca davant les quinolones.

4.6 CLONACIÓ I SEQÜENCIACIÓ DEL GEN *tolC* DE *K. oxytoca* I ESTUDI DE LA PROTEÏNA TolC

4.6.1 CLONACIÓ I SEQÜENCIACIÓ DEL GEN *tolC* DE *Klebsiella oxytoca*

Una vegada comprovat que una de les soques resistents a les quinolones, K6, presentava el gen de la proteïna TolC, el següent pas fou clonar aquest gen en un vector plasmídic per transformar-lo en una soca d'*E. coli* XL1-Blue, amb la finalitat d'inserir-lo posteriorment, en una soca d'*E. coli* deficient en aquesta proteïna (C600-) i en una soca, també d'*E. coli*, deficient en porines (UH302) amb l'objectiu primer de determinar-ne la seva seqüència i poder realitzar, seguidament, estudis que demostrassin la seva participació en el sistema de reflux descrit anteriorment.

Per a la clonació del gen de la proteïna TolC, es va utilitzar la tècnica de PCR. Es van dissenyar dos cebadors que portaven al seu extrem la diana de restricció *Xba*I (TCTAGA) a partir de la seqüència coneguda de la proteïna TolC del bacteri *Enterobacter aerogenes*. Gràcies a la diana de restricció es va poder clonar el fragment de 2.2 Kb, corresponents al gen *tolC* de *Klebsiella oxytoca*, dins del plasmidi pUC18 que també presenta aquesta diana de restricció al lloc de clonatge múltiple. El plasmidi obtingut va ser anomenat pTolC, tal com s'indica en la figura 4.13.

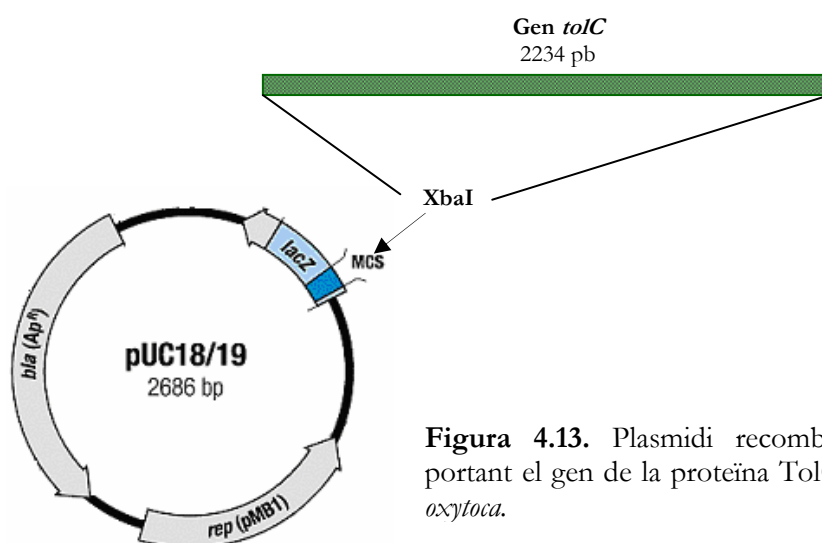


Figura 4.13. Plasmidi recombinant pTolC portant el gen de la proteïna TolC de *Klebsiella oxytoca*.

La detecció dels possibles plasmidis recombinants es va fer per α -complementació. El vector pUC18 porta un segment de DNA derivat de l'operó *lac* d'*E. coli* que codifica pel fragment amino-terminal de la β -galactosidasa. La síntesi d'aquest fragment pot ser induïda per IPTG i pot ser complementada per una fragment de β -galactosidasa defectiu de la soca receptora (com ara el present a la soca d'*E. coli* XL1Blue). Els bacteris que creixen en presència d'IPTG sintetitzen ambdues parts i formen colònies blaves quan es sembren en medi amb substrat cromogènic X-Gal. Tanmateix, la inserció d'un fragment forani de DNA al lloc de clonatge múltiple, inactiva el fragment amino-terminal de la β -galactosidasa i impedeix la α -complementació. Com a resultat, els bacteris portadors de plasmidis recombinants formen colònies blanques [138].

A partir de les colònies transformats es realitzà l'amplificació del gen corresponent a la proteïna TolC de *K. oxytoca* utilitzant els cebadors i les condicions descrites en l'apartat 3.11 de material i mètodes. Seguidament, es procedí a determinar la seqüència del fragment amplificat de 2.2 Kb corresponent al gen *tolC*, seguint el mètode basat en la síntesi i terminació amb dideoxinucleòtids, descrit en l'apartat 3.12 de material i mètodes.

La seqüència corresponent al fragment amplificat i clonat en un vector plasmídic es mostra en la figura 4.14. La seqüència d'aquest plasmidi recombinant és el fragment corresponents al gen *tolC* de *K. oxytoca*. En la figura 4.15. es mostra la seqüència d'aminoàcids de la proteïna TolC.

1	GAGGACAGAT	GCTGCGTGAC	GCGCTCAAAA	TTTCGCGGGT	CACCTCGCCG
51	CTCATCTCAC	CGAAACCCTT	TCCGGGGCGG	AAACGATATA	AATCGAGCGA
101	AAAAAAACCC	CTATAGAGCG	TTTCGCGTGC	AATAATTTCT	ACATCGTTTT
151	TAGAGAAGGT	AATCTCCTGC	TGATTGACAT	TACTCATTGT	CGATATCCTG
201	TAGATATGAA	GTTATGAATT	TATAGACGGG	GTGGCTACCG	TTTTATGGCG
251	CGTATGTTAG	ATTGGTGCAA	ATTACCGCCC	CATGGCACAT	AACGCCAACT
301	TTTTACGGTA	ACAGACTCTA	TACAATCAGC	GATTATTTTT	AGAATTTGAG
351	TAGCGCTAAA	TGCTTCACAA	GGAGGAATGC	AAATGAAGAA	ACTCTTTCCC
401	ATCCTTATCG	GCCTGGGCCT	GACTGGCTTC	AGCGCCATGA	GCCAGGCAGA
451	AAACCTGCTG	CAGGTTTATC	AGCAGGCGCG	TATCAGTAAC	CCTGATCTGC
501	GTAATCAGC	AGCCGATCGT	GATGCCGCAT	TCGAGAAGAT	CAACGAAGCG
551	CGTAGCCCAT	TACTGCCGCA	GCTCGGTCTG	GGTGCGGACT	ATACCTATAC
601	CAGCGGCTTC	CGTGATTATA	AAGACCAGAA	CTCTAACGTT	ACCAGCGGCT

```

651  CGCTACAGCT  CACGCAGGTC  CTGTTTCGATA  TGTCGAAGTG  GCGCGCGCTG
701  ACGCTGCAGG  AAAAAACAAGC  CGGTATTCAG  GACGTCACCT  ACCAGACGGA
751  CCAGCAAACG  CTGATCCTCA  ATACCGCAAC  CGCCTATTTT  AAAGGGCTGG
801  CCGCGATCGA  TACGCTCTCC  TATACCGAAG  CGCAGAAACA  GGCGATTTAT
851  CGTCAGTTAG  ATCAGACCAC  CCAGCGCTTT  AACGTTGGCC  TGGGTGCCAT
901  CCCTGACGTA  CAAAACGCCC  GCTCGCAGTA  CGATGCTGTG  CTGGCGAACG
951  AAGTGACCGC  GCGCAACGAT  CTCGATAACG  CCCCTCAAAA  ACTGCGCCAG
1001 GGGACCGGCA  ACTACTATCC  AGAACTGGGG  TCCCCGAACG  GGAAGGGTTT
1051 CAAAACCAAC  AAACCGCAGG  CGGTGAACGC  GCTGCTGAAG  GAAGCGGAAA
1101 GCCGTAACCT  GTCGCTGCTG  CAGGCGCGTT  TGAGCCAGGA  TCTGGCGCGC
1151 GAGCAGATTC  CCCAGGCGCA  GGATGGGCAT  CTGCCGACCC  TGAATTTGAA
1201 CGCATCCAGC  GGAGTATCTA  ATAACCGCTA  CAGCGGCTCT  AAGAGCATTT
1251 CACAGGACGC  TGACGTAGGG  CAGAACAAAA  TCGGCCTTAG  CTTCTCCCTG
1301 CCGTTGTATC  AGGGCGGAAT  GGTGAACTCT  CAGGTAAAC  AGGCGCAGTA
1351 CAACTTTGTC  GGCGCCAGCG  AACAGCTGGA  AAGCGCCAC  CGTAGCGTGG
1401 TGCAGACCGT  TCGTTCATCT  TTTAACAACG  TGAACGCGTC  TATCAGCAGC
1451 ATTAATGCCT  ACAAACAGGC  CGTGGTTTCC  GCGCAAAGTT  CCCTGGATGC
1501 TATGGAAGCG  GGTATTTCGG  TAGGTACGCG  TACCATCGTC  GATGTCCTGG
1551 ACGCGACCAC  TACGCTGTAT  AACGCAAAAC  AGCAACTGTC  CAACGCGCGT
1601 TATAACTACC  TGATTAACGA  GCTGAACATC  AAATCCGCAC  TCGGTACGCT
1651 GAACGAGCAG  GATCTGGTTG  CGCTGAACAA  TACGCTGGGC  AAGTCTATTC
1701 CGACTTCACC  GGATAGCGTC  GCGCCGAAA  ATCCTCAGCA  GGATGCCAGC
1751 GCCGACGGCT  ACAGCAACAC  CGCCGCGGCA  AAACCAGCAT  CAGCCCCTAC
1801 GACGCAGACC  AGCGGCAGCA  ACCCGTTCCG  CCAGTAGTCC  GCTTGCGTGG
1851 TCCCGCTTCG  CTTACCCACC  GGGTAAGGCG  AAGCGTTAAA  CGTAAGGCAA
1901 CGTAAAGATC  TCCCGCTTTC  CGCCCTATT  CGCTTCATTT  TCCACCACTC
1951 ATCCTCTATC  CTGAGCGTTA  ACAAACGCA  TACCCTGGG  TCCAGGAAGA
2001 CAATCATGAA  ACAAGGCAAA  AAATATTAAT  CACGCCTCCT  TTCGCAAAAC
2051 CCTTATAAAG  GGCCCCATTT  AACTCCCGTT  GCGCTTGCCG  TTACGGCCGT
2101 GTTTATGCTC  GCCGGTAAAC  AAGATTC

```

Figura 4.14. Seqüència de 2127 nucleòtids del gen *tolC* de la soca *K. oxytoca* insertada dins la soca recombinant XL1-Blue-pTolC. La metionina o codó d'inici, ATG, està en la posició 377 i la seqüència TAG, codó stop, es troba en la posició 1834 (marcats en vermell), pel que el gen codifica per una proteïna de 485 aminoàcids.

```

1   MQMKKLPIL IGLGLTGFSA MSQAENLLQV YQQARISNPD LRKSAADRDA
51  AFEKINEARS PLLPQLGLGA DYTYSVSGFRD YKDQNSNVTS GSLQLTQVLF
101 DMSKWRALTL QEKQAGIQDV TYQTDQQTLLI LNTATAYFKG LAAIDTLSYT
151 EAQKQAIYRQ LDQTTQRFNV GLGAIIDVQN ARSQYDAVLA NEVTARNDLD
201 NAPQKLRQGT GNYYPELGSP NGKGFKTNKP QAVNALLKEA ESRNLSLLQA
251 RLSQDLAREQ IPQAQDGHLV TLNLNASSGV SMNRYSGSKS ISQDADVQGN
301 KIGLSFSLPL YQGGMVNSQV KQAQYNFVGA SEQLESAHRS VVQTVRSSFN
351 NVNASISSIN AYKQAVVSAQ SSDLAMEAGY SVGTRTIVLV LDATTTLYNA
401 KQQLSNARYN YLINELNIKS ALGTLNEQDL VALNNTLGKS IPTSPDSVAP
451 ENPQQDASAD GYSNTAAAKP ASARTTQTSG SNPFRQ

```

Figura 4.15. Seqüència d'aminoàcids de la proteïna TolC de *K. oxytoca*.

Com es pot observar en la figura 4.14. el fragment amplificat està format per 2127 nucleòtids. El codó d'inici es troba en la posició 377 i la seqüència stop està situada en la posició 1834, per tant el fragment amplificat codifica per un gen de 1457 parells de bases que dona lloc a una proteïna formada per 485 aminoàcids, dades molt semblants a la resta de proteïnes TolC identificades en altres enterobacteris.

El gen *tolC* presenta una sèrie de característiques d'altres proteïnes de membrana externa, entre les que destaquen els promotors bacterians, es tracta d'una sèrie de seqüències de DNA específiques i necessàries perquè el lloc d'inici de la transcripció sigui reconegut. En primer lloc, el gen presenta dues regions promotores *consensus*, una situada aproximadament, en la posició -10 que presenta la seqüència 5'-TACCAAT-3', que és l'anomenada Caixa de Pribnow (*Pribnow box*), i la segona es troba en la posició -35 i presenta la seqüència 5'-TTGACAT -3' (figura 4.14. subratllades en groc).

Una segona seqüència característica que presenta el gen *tolC* és la seqüència de *Shine-Dalgarno* (SD) o punt d'unió al ribosoma, que en la seqüència de nucleòtids de la proteïna TolC mostrada en la figura 4.14. en un requadre blau. La seqüència *Shine-Dalgarno* en el cas del gen de *tolC* és 5'-GGAGG-3', i és complementaria als cinc nucleòtids de l'extrem 3' del RNA ribosomal 16S (CCUCC), important per a la formació del complex d'iniciació de la traducció. Normalment, les seqüències SD s'acostumen a trobar entre 2-11 nucleòtids per sobre del codó d'iniciació (ATG).

Finalment, també s'han identificat els llocs de terminació de la transcripció. Es tracta d'una seqüència palindròmica rica en GC que forma una forquilla de terminació seguida d'una regió rica en AT.

L'anàlisi de la seqüència de proteïnes mostra que, a diferència de la gran majoria de porines, la proteïna TolC no presenta la regió conservada PEFGGD que presenten la gran majoria de porines que és la que dóna lloc a la formació del tercer *loop* extern de la porina responsable de la constricció del porus. TolC, no forma aquest tercer *loop* extern, sinó que presenta un canal obert sense cap tipus de constricció que permet el pas de gran quantitat de molècules. Tot i això, estudis recents en *Planar Lipid Bilayer*, han posat de manifest la possibilitat que es produeixi una petita constricció en l'entrada de la proteïna en la membrana externa gràcies a la conservació de sis residus d'àcid aspàrtic D371 i D374, de cada un dels tres monòmers que formen el domini de canal de l'estructura β -barril [123]. Aquests residus que podrien formar la constricció de l'entrada es poden observar en la figura 4.15. marcats en verd. D'altra banda, com es pot observar, es conserven les seqüències d'aminoàcids situats entre els residus 40 i 75 i els residus 250 i 290 que són els que formen els dos *loops* exteriors utilitzats pels bacteriòfags i les colícines com a receptors per entrar dins del bacteri.

La constricció més important que presenta TolC, que controla el pas de molècules i evita la lliure entrada dels diversos compostos es troba situada al final del túnel que s'expandeix cap a l'espai periplasmàtic. Aquest tancament del túnel es produeix gràcies a tres unions que es produeixen entre dues hèlix, la cadena llarga α -hèlix H7 i la cadena curta α -hèlix H8. Entre aquestes dues cadenes tenen lloc tres unions que es produeixen entre una sèrie d'aminoàcids que es troben molt conservats gràcies a la formació de ponts d'hidrogen [123]. Les unions I i II es produeixen entre els aminoàcids Asp¹⁵³ i Tyr³⁶² i els aminoàcids Gln¹³⁶ i Glu³⁵⁹, respectivament mitjançant ponts d'hidrogen. El tercer *link* uneix Arg³⁶⁷ amb Asp¹⁵³ mitjançant un pont salí i el mateix aminoàcid entra en contacte amb Thr¹⁵² per un pont d'hidrogen; aquests aminoàcids que s'uneixen per formar la constricció del túnel estan marcats en la seqüència de la proteïna amb color vermell. Tots aquests aminoàcids essencials pel control de l'entrada de substàncies a través de TolC es mantenen en la seqüència descrita d'aquesta proteïna en *K. oxytoca*, com es mostra en la figura 4.15., on s'indiquen aquests aminoàcids en vermell.

La seqüència de la proteïna TolC de *K. oxytoca* fou comparada i alineada amb altres proteïnes homòlogues d'altres enterobacteris tal i com es mostra en la figura 4.16. Les seqüències utilitzades foren: *E. aerogenes* GenBank AJ306390, *E. coli* GenBank X54049, *S. enterica* GenBank AL627278. El programa BLAST va ser l'utilitzat per obtenir els percentatges d'identitat entre les seqüències de la proteïna.

K.o	MQMKKLFPIILIGLGLTGFSAEQENLLQVYQQARISNPDLRKSAAADRDAAFEKINEARS	60
E.a	MQMKKLFPIILIGLGLTGFSAEQENLLQVYQQARISNPDLRKSAAADRDAAFEKINEARS	60
S.e	MQMKKLFPIILIGLGLTGFSAEQENLLQVYQQARISNPDLRKSAAADRDAAFEKINEARS	60
E.c	MQMKKLFPIILIGLGLTGFSAEQENLLQVYQQARISNPDLRKSAAADRDAAFEKINEARS	60
K.o	PLLPQLGLGADYTYTSGFRDYKDNQNSNVTSGSLQLTQVLFDMKWRALTLQEKAGIQDV	120
E.a	PLLPQLGLGADYTYTSGFRDYKDNQNSNVTSGSLQLTQVLFDMKWRALTLQEKAGIQDV	120
S.e	PLLPQLGLGADYTYTSGFRDYKDNQNSNVTSGSLQLTQVLFDMKWRALTLQEKAGIQDV	120
E.c	PLLPQLGLGADYTYTSGFRDYKDNQNSNVTSGSLQLTQVLFDMKWRALTLQEKAGIQDV	120
K.o	TYQTDQQTLLILNTATAYFKVLAIDTSLSYTEAQKQAIYRQLDQTTQRFNVGLVAITDVQN	180
E.a	TYQTDQQTLLILNTATAYFKVLAIDTSLSYTEAQKQAIYRQLDQTTQRFNVGLVAITDVQN	180
S.e	TYQTDQQTLLILNTATAYFKVLAIDVLSYTAQKEAIYRQLDQTTQRFNVGLVAITDVQN	180
E.c	TYQTDQQTLLILNTATAYFKVLAIDVLSYTAQKEAIYRQLDQTTQRFNVGLVAITDVQN	180
K.o	ARSQYDAVLANEVTARNLDLNAEQLRQVTGNYPPELGSVNGKGFKTNKPQAVNALLKEA	240
E.a	ARSQYDAVLANEVTARNLDLNAEQLRQVTGNYPPELGSVNGKGFKTNKPQAVNALLKEA	240
S.e	ARAQYDVLAVNEVTARNLDLNAEQLRQVTGNYPPELGSVNGKGFKTNKPQAVNALLKEA	240
E.c	ARAQYDVLAVNEVTARNLDLNAEQLRQVTGNYPPELGSVNGKGFKTNKPQAVNALLKEA	240
K.o	ENRNLSELLQARLSQDLAREQIRQAQDGHLPPTLNLNASSGVSNRYSGSKNIS-----QD	294
E.a	ENRNLSELLQARLSQDLAREQIRQAQDGHLPPTLNLNASSGVSNRYSGSKNIS-----QD	294
S.e	ENRNLSELLQARLSQDLAREQIRQAQDGHLPPTLNLNASSGVSNRYSGSKNIS-----QD	297
E.c	EKRNLSELLQARLSQDLAREQIRQAQDGHLPPTLNLNASSGVSNRYSGSKNIS-----QD	300
K.o	ADVGQNKVGLSFSPLPLYQGGMVNSQVKQAQYNFVGASEQLESAHRSVVQTVRSSFNNVNA	354
E.a	ADVGQNKVGLSFSPLPLYQGGMVNSQVKQAQYNFVGASEQLESAHRSVVQTVRSSFNNVNA	354
S.e	SNMGQNKVGLSFSPLPLYQGGMVNSQVKQAQYNFVGASEQLESAHRSVVQTVRSSFNNVNA	357
E.c	SNMGQNKVGLSFSPLPLYQGGMVNSQVKQAQYNFVGASEQLESAHRSVVQTVRSSFNNVNA	360
K.o	SISSINAYKQAVVSAQSSLDAMEAGYSVGTRTIVDVLDATTTLYNAKQQLSNARYNYLIN	414
E.a	SISSINAYKQAVVSAQSSLDAMEAGYSVGTRTIVDVLDATTTLYNAKQQLSNARYNYLIN	414
S.e	SISSINAYKQAVVSAQSSLDAMEAGYSVGTRTIVDVLDATTTLYNAKQQLSNARYNYLIN	417
E.c	SISSINAYKQAVVSAQSSLDAMEAGYSVGTRTIVDVLDATTTLYNAKQQLSNARYNYLIN	420
K.o	ELNIKSALGTLNEQDLALNNTLGKSIPTSPDSVAPENPQQDASADGYNTAAA---KPA	471
E.a	ELNIKSALGTLNEQDLALNNTLGKSIPTSPDSVAPENPQQDASADGYNTAAA---KPA	471
S.e	QLNIKVALGTLNEQDLALNNTLGKSIPTSPDSVAPENPQQDASADGYNTAAA---KPA	480
E.c	QLNIKVALGTLNEQDLALNNTLGKSIPTSPDSVAPENPQQDASADGYNTAAA---KPA	480
K.o	SARTTQTSGSNPFR	485
E.a	AARTTKTSGSNPFS	485
S.e	AARANSNNGNPFR	490
E.c	SARTTTSNGNPFR	494

Figura 4.16. Comparació de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna TolC de *K. oxytoca* amb altres proteïnes TolC de diferents membres d'enterobacteris. K.o, *Klebsiella oxytoca*; E.a, *Enterobacter aerogenes*; S.e, *Salmonella enterica*; E.c, *Escherichia coli*.

De la comparació de seqüències que es mostra en la figura 4.16., s'observa, tal i com era d'esperar, que la seqüència TolC de *K. oxytoca* presenta una elevada homologia amb la seqüència TolC d'*E. aerogenes*. La proteïna TolC entre aquestes dues espècies bacterianes presenta un 92% d'identitat. També és elevada l'homologia que presenta amb la proteïna TolC de *S. enterica* que es troba al voltant del 81%, i amb la mateixa proteïna en *E. coli* on la identitat és del 79%. En canvi el percentatge d'identitat comença a disminuir quan es compara amb altres gèneres d'enterobacteris com poden ser, *Shigella*, *Serratia*, *Yersinia* i *Erwinia* on l'homologia amb la proteïna TolC de *K. oxytoca* es troba al voltant del 70% (resultats no mostrats).

Les diferències més importants entre TolC de *K. oxytoca* i *E. aerogenes* respecte les seqüències d'*E. coli* i *S. enterica* es troben entre els aminoàcids 280 i 290 on les dues primeres presenten una pèrdua de 6 aminoàcids. Aquesta seqüència d'aminoàcids està implicada en la formació d'un dels *loops* que s'exposen a l'exterior del bacteri i que intervenen en el reconeixement de bacteriòfags i colícines, el que podria implicar una modificació en alguna d'aquestes funcions.

4.6.2 ESTUDI D'UN MODEL ESTRUCTURAL DE LA PROTEÏNA TolC

Com s'ha comentat anteriorment, la proteïna TolC està implicada en una gran complexitat d'accions com participar en l'expulsió de substàncies fora el bacteri, ser el punt d'entrada de la colicina E1, etc. A més, la importància d'aquesta proteïna, també es deu a la seva curiosa estructura en forma de β - barril i la inclusió que presenta cap a l'espai periplasmàtic, completament diferent a la resta de porines descrites fins al moment que presenten una estructura en α -hèlix i es limiten a la membrana externa [128].

Els mètodes de predicció estructural de proteïnes a partir de la seva seqüència d'aminoàcids són, actualment, objecte de gran interès. Dades experimentals han demostrat que la informació necessària pel plegament d'una proteïna es troba continguda en la seva pròpia seqüència. Els científics anomenen a aquest fet "la segona part del codi genètic". Es podria pensar que la conformació espacial que adopta una proteïna correspon a un mínim de l'energia lliure de l'espai de les conformacions possibles. Aquesta idea permetria que, mitjançant mètodes teòrics de minimització d'energia, es pogués calcular l'estructura que

adopta qualsevol seqüència d'aminoàcids. A la pràctica hi ha massa configuracions possibles per a una determinada seqüència i s'utilitzen programes que dedueixen la conformació a partir de diferents conjunts de dades, com ara: modelització per homologia o *threading* (treballar a partir d'estructures de proteïnes ja conegudes i que siguin homòlogues a la que s'estudia); algorismes cinètics (realitzen estudis estadístics per predir elements d'estructura secundària amb una optimització de tipus cinètic); modelitzacions *de novo* (quan es coneixen algunes característiques d'estructura i es disposa de dades addicionals de baixa resolució com és la membrana externa).

Donat que disposàvem de la seqüència de la proteïna TolC de *K. oxytoca*, ens varem plantejar realitzar una aproximació a l'estructura de la proteïna. Es va treballar amb una modelització a partir de la seva seqüència.

Per establir un model de l'estructura de la proteïna TolC es va treballar amb el programa de modelització de proteïnes *Protein Explorer*. Aquest programa realitza una extrapolació d'una estructura de nova proteïna a partir de les estructures ja conegudes d'altres membres que pertanyin a la mateixa família. En el nostre cas TolC de *K. oxytoca* fou comparada amb la proteïna TolC d'*Escherichia coli*. La figura 4.17. mostra l'alineament de les dues seqüències d'aminoàcids.

L'objectiu de la modelització "teòrica", realitzada a partir de la seqüència d'aminoàcids d'una proteïna, no és el de confirmar una estructura obtinguda a través de tècniques d'alta resolució sinó més aviat la de suggerir, és a dir, la d'aportar informació sobre la distribució a l'espai de diferents aminoàcids pel disseny posterior d'experiments com la mutagènesi dirigida.


```

      10           30           50
      |           |           |
Ko-TolC MQMKKLFPIILIGLGLTGFSAMSAENLLQVYQQARISNPDLRKSAAADRDAAFEKINEARS
Ec-TolC MQMKKLLPILIGLSLSGFSSLSQAENLMQVYQQARLSNPDLRKSAAADRDAAFEKINEARS

      70           90           110
      |           |           |
Ko-TolC PLLPQLGLGADYTYTSGFRDYKDQNSNVTSGLQLTQVLFDMKWRALTLQEKQAGIQDV
Ec-TolC PLLPQLGLGADYTYSNGYRDANGINSNATSASLQLTQSIQVLFDMKWRALTLQEKAAAGIQDV

      130          150          170
      |           |           |
Ko-TolC TYQTDQQTLLILNTATAYFKGLAAIDTLSYTEAQKQAIYRQLDQTTQRFNVGLGAI TDVQN
Ec-TolC TYQTDQQTLLILNTATAYFNVLNAIDVLSYTAQKEAIYRQLDQTTQRFNVGLVAI TDVQN

      190          210          230
      |           |           |
Ko-TolC ARSQYDAVLANEVTARNLDLNDAPQKLRQGTGNYPPELGSPPNGKGFKNKPKQAVNALLKEA
Ec-TolC ARAQYDTVLANEVTARNNLDNAVEQLRQITGNYPPELAALNVENFKTKDKPQPVNALLKEA

      250          270          290
      |           |           |
Ko-TolC ESRNLSLLQARLSQDLAREQIPQAQDGHLP TLNLNASSGVSNNRYSKSKSIS-----QD
Ec-TolC EKRNLSLLQARLSQDLAREQIRQAQDGHLP TLDLTASSGISDTSYSGSKTRGAAGTQYDD

      310          330          350
      |           |           |
Ko-TolC ADVGQNKIGLSFSLPLYQGGMVNSQVKQAQYNFVGASEQLESAHRSVVQTVRSSFNNVNA
Ec-TolC SNMGQNKVGLSFSPLPIYQGGMVNSQVKQAQYNFVGASEQLESAHRSVVQTVRSSFNNINA

      370          390          410
      |           |           |
Ko-TolC SISSINAYKQAVVSAQSSLDAMEAGYSVGTRTIVDVL DATTTLYNKQQLSNARYNYLIN
Ec-TolC SISSINAYKQAVVSAQSSLDAMEAGYSVGTRTIVDVL DATTTLYNKQELANARYNYLIN

      430          450          470
      |           |           |
Ko-TolC ELNIKSALGTLNEQDLVALNNTLGKSIPTSPD SVAPENPQQDASADGYSNTAAA---KPA
Ec-TolC QLNISALGTLNEQDLLALNNALS KPVSTNPENVAPQTPEQNAIADGYAPDSPAPVVQQT

      494
      |
Ko-TolC SARTTQTSGSNPFR
Ec-TolC SARTTTSNGHNPFR

```

Figura 4.17. Alineament de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna TolC de *K. oxytoca* (Ko-TolC) i la de TolC d'*E. coli* (Ec-TolC).

Un cop establert un model preliminar de l'estructura de la proteïna, es va realitzar un refinament del model, amb l'objectiu de corregir les transicions entre els *loops* i les regions adjacents utilitzant una minimització d'energia. Amb un procés de minimització es va construir una nova conformació de les regions de solapament dels *loops*. Després es va observar que tot fos correcte. La resta de l'estructura fou fixada. Finalment, es van fixar els àtoms de la cadena principal de la proteïna total i es va realitzar una minimització dels residus de les cadenes laterals. Això va canviar lleugerament les posicions de les cadenes laterals en funció dels residus veïns. Les figures 4.18. i 4.19 mostren les imatges obtingudes seguint aquesta metodologia.

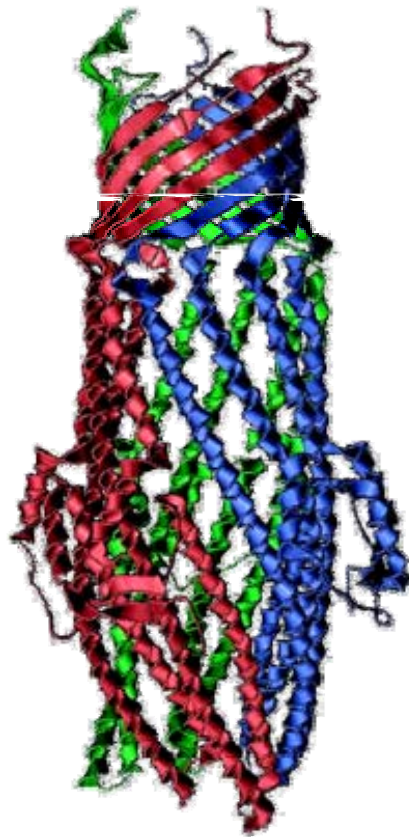


Figura 4.18. Topologia de la proteïna TolC visualitzada amb el programa *Protein Explorer*, en visió lateral. Cada monòmer que dona lloc a l'estructura final de la proteïna es mostra en un color diferent. En el domini de la membrana externa cada monòmer forma 4 fulles β , donant lloc al porus de 12 fulles β transmembrana. El llarg domini format per 12 cadenes α antiparal·leles superenrotllades es projecta a través de l'espai periplasmàtic.

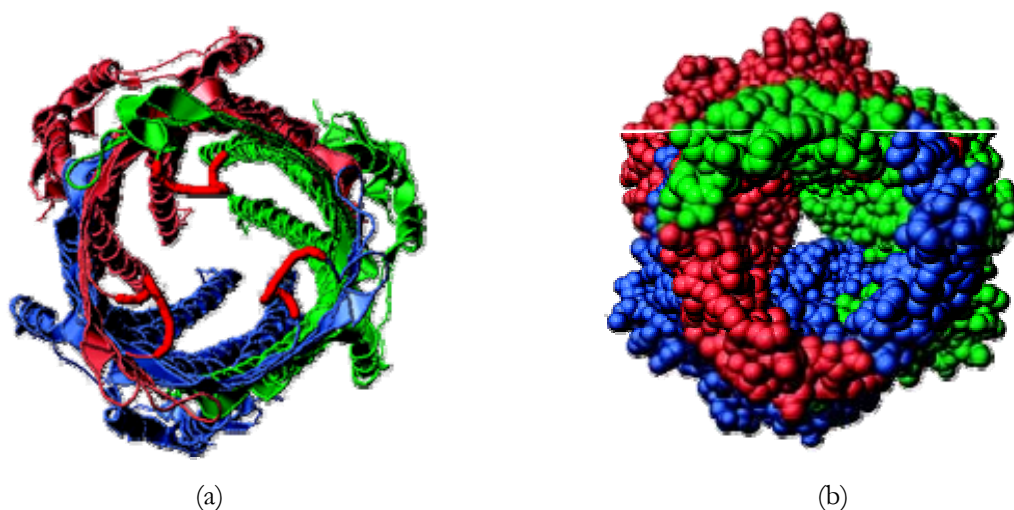


Figura 4.19. Model estructural de la topologia de l'entrada del porus de la proteïna TolC en visió frontal. (a) S'observa tres plegaments en espiral de les cadenes α de cada monòmer cap al interior del canal produint una petita constricció. (b) Mida del porus que forma la proina a l'entrada de la membrana externa

La proteïna TolC està formada per tres monòmers que donen lloc a la formació d'un únic canal, aquesta és una de les principals diferències que presenta la proteïna TolC respecte la gran majoria de porines de membrana externa, les quals formen tres canals, un per cada monòmer. En TolC cada monòmer està format per 4 fulles β - antiparal·leles donant lloc a una estructura final en forma de barril amb un total de 12 fulles β . També presenta uns petits bucles que s'estenen cap a l'exterior cel·lular que són els receptors de bacteriòfags i bacteriocines, entre altres compostos. En la figura 4.18. es pot observar com aquests *loops* extracel·lulars, en la cas de la proteïna TolC de *K. oxytoca*, presenten una longitud inferior als que s'han observat fins al moment en la proteïna TolC de *E. coli*. Aquest fet ja es va observar en l'alineació de les seqüències de la proteïna TolC de diferents espècies bacterianes (apartat 4.6.1), on s'observava una pèrdua de 6 aminoàcid en la proteïna TolC de *K. oxytoca* respecte la mateixa proteïna en *E. coli*. Per tant, el model estructural confirma la menor longitud dels *loops* extracel·lulars de la proteïna TolC de *K. oxytoca* si la comparem amb la d'altres enterobacteris, el que podria implicar una modificació en alguna de les funcions d'aquests *loops* com el reconeixement de bacteriòfags o colicines.

D'altra banda, a partir de la topologia de la proteïna TolC també observem, una llarga estructura de cadenes α -hèlix superenrotllades que són les que s'introdueixen cap al periplasma (quatre cadenes α per a cada monòmer) formant un canal conegut amb el nom de domini del túnel. A més en la part central d'aquest domini del túnel s'observa una barreja d'estructures α i β que es coneix amb el nom de domini de equatorial, estructura molt semblant a la descrita fins al moment en *E. coli*, i que és el lloc d'anclatge entre aquesta proteïna i la proteïna AcrA en el moment de l'expulsió de l'entibiòtic.

Es coneix que l'entrada de la proteïna TolC d' *E. coli* en la membrana externa es troba virtualment oberta, i no sembla haver-hi cap constricció per tancar el porus i controlar el pas de molècules per evitar la lliure entrada de compostos. A l'igual que en altres enterobacteris no s'observa cap tipus de constricció que tanqui l'entrada del canal en la membrana externa, sinó que és un canal obert a l'exterior. La figura 4.19.(a) mostra el model estructural d'aquesta part de la proteïna TolC de *K. oxytoca* on es pot observar com les estructures superenrotllades α es troben plegades i s'introdueixen cap al interior del canal donant lloc a un petit tancament del canal. Tot i això aquest tancament no és tant important com en la majoria de porines estudiades fins al moment on hi ha un *loop* que obstrueix completament el porus evitant l'entrada de molècules. En la figura 4.19.(b) es pot veure la mida real del porus que forma el canal en la membrana externa i que estudis realitzats en TolC d'*E. coli* han establert que té un diàmetre de 19.8 Å. Tot i això, estudis recents en *Planar Lipid Bilayer*, han posat de manifest la possibilitat que es produeixi una petita constricció en l'entrada de la proteïna en la membrana externa per uns residus d'àcid aspàrtic que es troben molt conservats. Encara que el canal es trobi obert a l'exterior cel·lular, TolC presenta una baixa conductància, presumiblement degut al tancament que presenta a l'entrada la periplasma gràcies a la formació de tres ponts d'hidrogen i un pont salí entre aminoàcids de les cadenes α .

4.7 ESTUDIS FISIOLÒGICS DE LA PROTEÏNA TolC DE *K. oxytoca*

Una vegada coneguda la seqüència de la proteïna TolC de *K. oxytoca*, comparar-la amb les proteïnes homòlogues d'altres espècies d'enterobacteris i després d'haver realitzat el model estructural d'aquesta proteïna, comprovant que era molt semblant a les conegudes fins ara, el següent objectiu que ens varem plantejar fou el de realitzar diversos estudis de la proteïna TolC de *K. oxytoca*, des del punt de vista fisiològic.

4.7.1 ANÀLISI PROTEÒMIC

Per tal de realitzar estudis de la proteïna TolC de *K. oxytoca*, el plasmidi recombinant amb el gen *tolC* de *K. oxytoca* es va transformar en una soca d'*E. coli* C600 deficient en aquesta proteïna (C600-), per inactivació del gen *tolC* per un *cassette* de kanamicina, obtenint la soca d'*E. coli* portadora del gen *tolC* de *K. oxytoca* C600pTolC. Per comprovar que el plasmidi recombinant tenia inserit el gen *tolC* de *K. oxytoca* i que el podia expressar en determinades condicions, es va realitzar un anàlisi proteòmic amb la finalitat d'obtenir un patró general de les proteïnes de membrana externa del bacteri. Es va escollir aquesta metodologia ja que la proteïna TolC és difícilment observable en gels de poliacrilamida d'una dimensió.

Es va realitzar l'anàlisi proteòmic de la soca bacteriana d'*E. coli* C600pTolC, portant del plasmidi amb el gen *tolC* de *Klebsiella* i de la soca *E. coli* C600- deficient en la proteïna TolC. Els proteomes obtinguts es mostren en les figures 4.20. i 4.21.

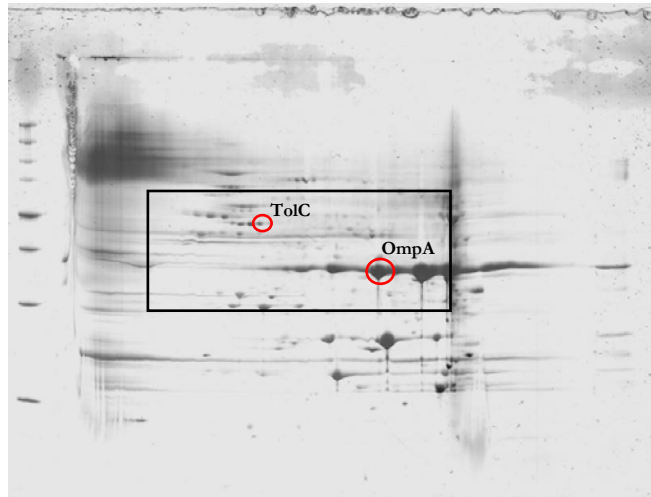


Figura 4.20. Gel patró de proteïnes de membrana externa d'*E. coli* C600pTolC.

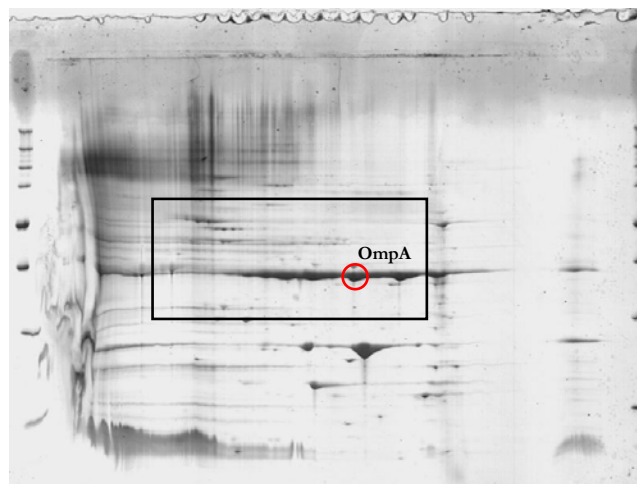


Figura 4.21. Gel patró de proteïnes de membrana externa d'*E. coli* C600-.

Com s'aprecia en els proteomes mostrats en les figures anteriors, les dues soques presenten la proteïna de membrana externa d'*E. coli* OmpA. En el cas del proteoma de la soca *E. coli* C600pTolC es pot observar com s'expressa la proteïna TolC de *K. oxytoca*, mentre que la soca C600- no expressa aquesta proteïna.

A partir d'aquests resultats que confirmen que la soca C600 expressa el gen *tolC* de *K. oxytoca*, es procediren a fer estudis amb aquestes soques per determinar la participació d'aquesta proteïna en el reflux d'antibiòtics.

4.7.2 PARTICIPACIÓ DE LA PROTEÏNA TolC EN EL REFLUX DE QUINOLONES

El primer que varem comprovar va ser si la proteïna TolC de *K. oxytoca*, participava en l'expulsió de quinolones fora del bacteri formant part del sistema de reflux AcrAB, per aquest motiu es van realitzar estudis d'acumulació de ciprofloxacina utilitzant el mètode fluorimètric i també es realitzaren assaig d'inhibició i l'efecte de la ciprofloxacina sobre el creixement de les soques bacterianes, descrits en els apartats 3.6 de material i mètodes.

Per a la realització d'aquests experiments es va treballar amb soca d'*E. coli* C600 deficient en la proteïna TolC per la inactivació del gen mitjançant un *cassette* de kanamicina, soca anomenada C600-, i la soca recombinant d'*E. coli* que expressa la proteïna TolC de *K. oxytoca*, anomenada C600pTolC.

4.7.2.1 Efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement bacterià en presència i absència de CCCP

Es realitzà aquest assaig amb la finalitat d'avaluar l'efecte de la concentració de ciprofloxacina, en presència i absència de CCCP, en el creixement de la soca de *K. oxytoca* K6, amb elevada resistència a les fluoroquinolones i les soques d'*E. coli* C600pTolC i *E. coli* C600-, per tal de demostrar la participació de la proteïna TolC de *Klebsiella* en l'expulsió de substàncies a través de les bombes de reflux. La ciprofloxacina va ser l'antibiòtic elegit per aquest i els següents estudis.

Els resultats dels experiments realitzats amb les soques K6, C600pTolC i C600- es mostren en les taules 4.7., 4.8. i 4.9., respectivament, on es representen els valor de densitat òptica a 550 nm dels cultius crescuts a diferents concentracions de ciprofloxacina, en presència i en absència de CCCP, a 10 µg/ml de concentració final.

Taula 4.7. Efecte de la concentració de ciprofloxacina en presència i absència de CCCP en la cinètica de mort de *Klebsiella* K6.

[CIP] (µg/ml)	DO ₅₅₀ K6	
	Sense CCCP	Amb CCCP
0.00	1,524	1,414
0.25	1,496	1,299
0.5	1,514	1,267
1.0	1,489	1,258
2.0	1,422	1,262
4.0	1,345	1,256
8.0	1,298	1,239
16.0	1,253	1,218
32.0	1,217	1,220
64.0	1,207	1,210

DO₅₅₀, densitat òptica a 550 nm; CIP, ciprofloxacina; CCCP, carbonil cianida M-clorofenilhidrazona

Taula 4.8. Efecte de la concentració de ciprofloxacina en presència i absència de CCCP en la cinètica de mort d'*E. coli* C600-.

[CIP] (µg/ml)	DO ₅₅₀ C600-	
	Sense CCCP	Amb CCCP
0.00	1,080	1,068
0,01	1,076	1,042
0,02	1,049	1,027
0,03	1,024	1,018
0,07	1,013	0,985
0,15	0,983	0,957
0,3	0,966	0,942
0,6	0,938	0,934
1,2	0,927	0,923

DO₅₅₀, densitat òptica a 550 nm; CIP, ciprofloxacina; CCCP, carbonil cianida M-clorofenilhidrazona

Taula 4.9. Efecte de la concentració de ciprofloxacina en presència i absència de CCCP en la cinètica de mort de la soca recombinant C600pTolC.

[CIP] ($\mu\text{g/ml}$)	DO ₅₅₀ C600pTolC	
	Sense CCCP	Amb CCCP
0,00	1,097	1,038
0,06	1,086	0,987
0,12	1,089	0,979
0,25	1,055	0,972
0,50	1,031	0,949
1,0	0,997	0,950
2,0	0,966	0,932
4,0	0,941	0,928
8,0	0,927	0,924

DO₅₅₀, densitat òptica a 550 nm; CIP, ciprofloxacina; CCCP, carbonil cianida M-clorofenilhidrazona

Les representacions gràfiques corresponents als resultats que es mostren en les taules anteriors corresponen a les figures 4.22., 4.23. i 4.24., en les quals es pot apreciar els valors de densitat òptica en el creixement de les soques a diferents concentracions de ciprofloxacina, en presència i en absència del inhibidor CCCP.

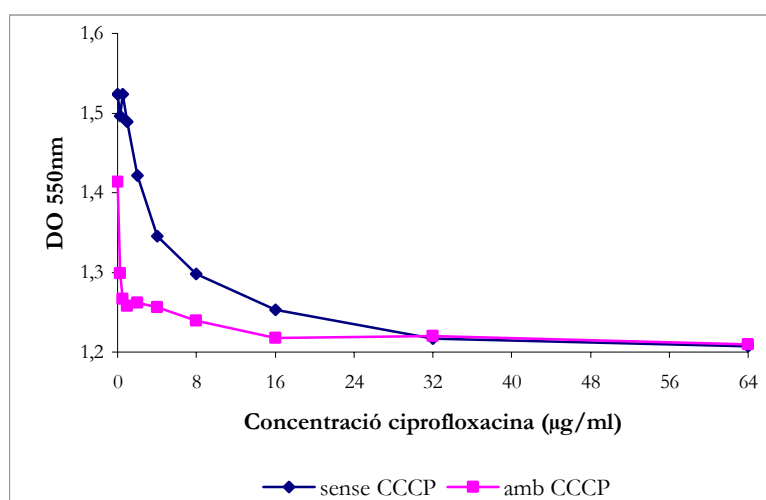


Figura 4.22. Efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement de *K. oxytoca* K6, en presència i absència de CCCP.

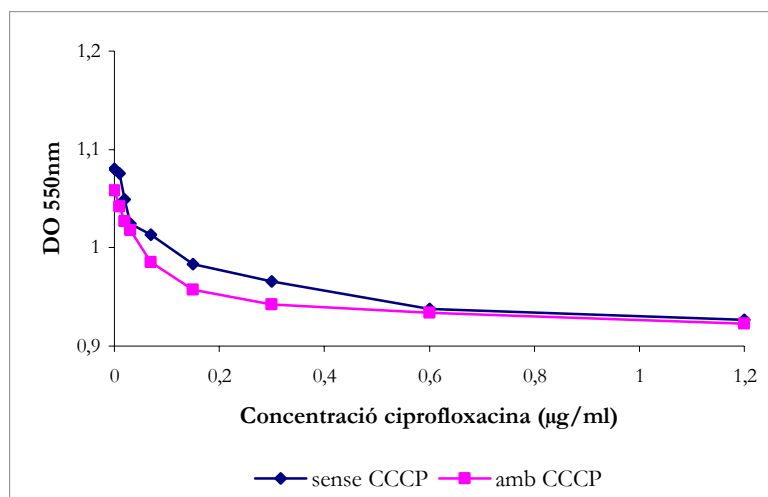


Figura 4.23. Efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement d'*E. coli* C600- deficient en la proteïna TolC, en presència i absència de CCCP.

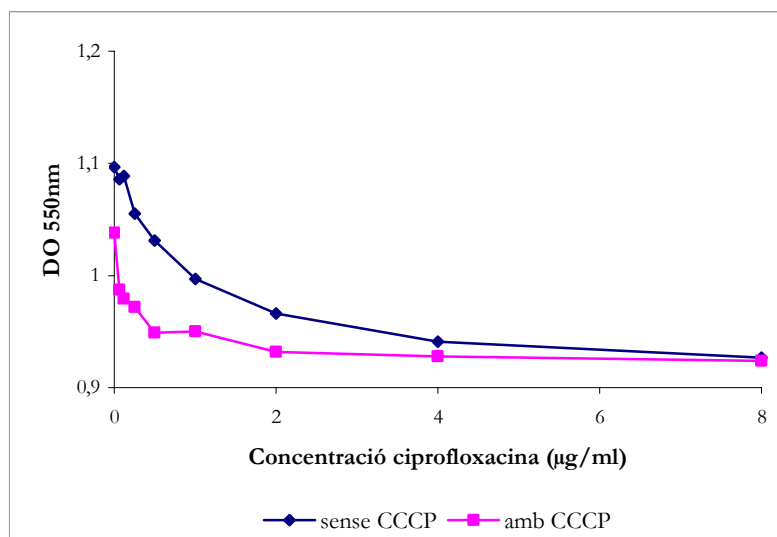


Figura 4.24. Efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement d'*E. coli* C600pTolC, en presència i absència de CCCP.

En les gràfiques podem observar com en els tres casos els valors de densitat òptica que s'obtenen en el creixement sense CCCP són superiors als obtinguts quan les soques creixen amb CCCP. Si ens fixem en la soca *E. coli* C600- podem comprovar que no s'observa cap efecte del inhibidor CCCP ja que presenta una corba de creixement molt semblant en presència i en absència de CCCP; això s'explica perquè la soca C600- té inactivat el gen de la proteïna TolC pel que el seu sistema de reflux no és actiu, per tant el inhibidor metabòlic no té cap efecte sobre el seu creixement.

En canvi, si ens fixem en les gràfiques corresponents a les soques K6 i C600pTolC podem observar que com menor és la concentració de ciprofloxacina més gran és la diferència entre les dues condicions estudiades. En general, es produeix una clara disminució en el creixement dels bacteris en presència de CCCP, si ho comparem amb els resultats obtinguts quan aquests creixen sense el inhibidor, podríem confirmar la presència d'un sistema de reflux en aquestes soques en el qual hi participa de forma directa la proteïna TolC.

4.7.2.2 Assaigs d'inhibició del creixement

Amb la finalitat d'ampliar els resultats obtinguts en els experiments d'efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement bacterià i amb l'objectiu de demostrar la participació de la proteïna TolC en el sistema de reflux d'antibiòtics i més concretament de quinolones, es va desenvolupar un assaig on es mesurà l'efecte del CCCP en presència de ciprofloxacina. Les concentracions de ciprofloxacina utilitzades en aquest assaig van ser quatre vegades inferiors al valor de la MIC per cada soca estudiada.

L'assaig d'inhibició del creixement es realitzà per les soques C600pTolC, soca portadora del plasmidi amb la proteïna TolC de *Klebsiella* K6 i la soca control C600-, amb el gen *tolC* inactivat per un *cassette* de kanamicina.

Els resultats obtinguts en la realització d'aquest assaig es mostren en la taula 4.10. on també s'ha afegit els resultats obtinguts per aquests assaig per la soca K6 realitzats en l'apartat 4.4.2. Les representacions gràfiques corresponents als resultats mostrats en la taula 4.10. es mostren en la figura 4.25.

Taula 4.10. Efecte del CCCP en el creixement de C600pTolC, K6 i C600-, en presència de ciprofloxacina a $\frac{1}{4}$ del valor de la MIC.

TEMPS (hores)	DO (550 nm)					
	C600pTolC		K6		C600-	
	- CPPP	+ CPPP	- CCCP	+ CCCP	- CCCP	+ CCCP
0	0,208	0,208	0,295	0,295	0,270	0,270
1	0,306	0,221	0,484	0,361	0,339	0,361
2	0,434	0,290	0,737	0,417	0,578	0,417
3	0,498	0,315	0,970	0,451	0,731	0,587
4	0,603	0,320	1,124	0,455	0,814	0,679
5	0,688	0,345	1,301	0,462	0,857	0,805
6	0,755	0,349	1,423	0,475	0,899	0,889
7	0,828	0,352	1,560	0,484	0,923	0,901
8	0,917	0,350	1,610	0,497	0,975	0,932

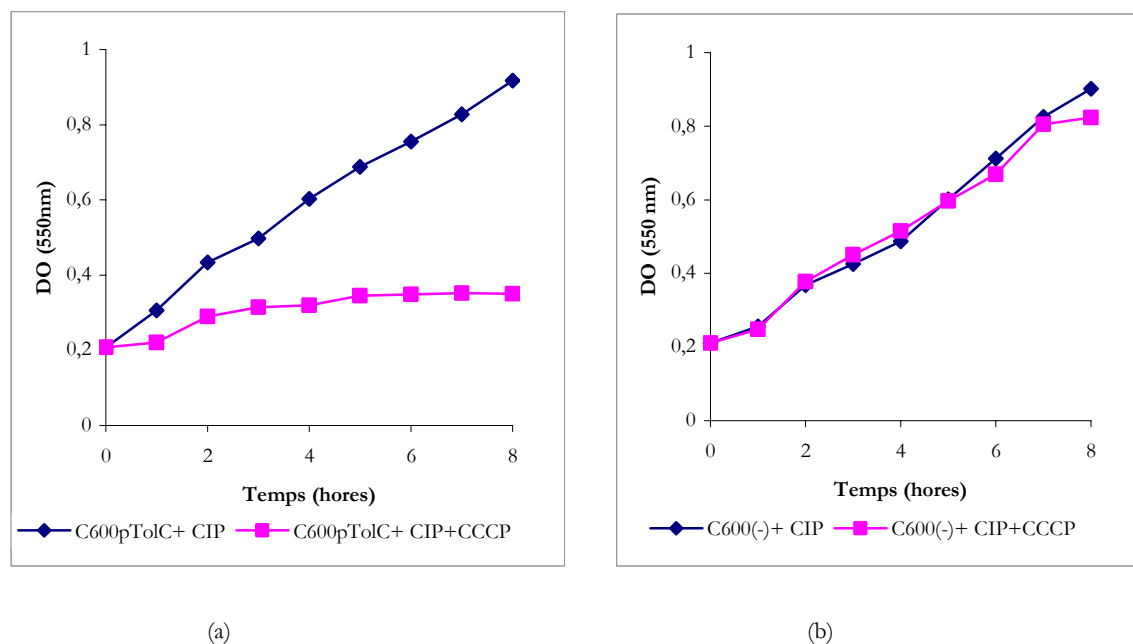


Figura 4.25. Representació gràfica de les corbes d'inhibició del creixement a una concentració de $\frac{1}{4}$ el valor de la MIC de ciprofloxacina, en presència i absència de CCCP. (a) *E. coli* recombinant C600pTolC. (b) *E. coli* C600 deficient en la proteïna TolC.

Com es pot apreciar en les representacions gràfiques, el comportament de la soca recombinant d'*E. coli* C600pTolC i la soca originària C600- fou molt diferent. El creixement en el cas de C600pTolC en presència únicament d'antibiòtic es va donar de forma normal, en canvi, a l'afegir el CCCP en el cultiu, la soca va ser incapaç de créixer. Si ens fixem en els valors de la taula 4.10. veurem que aquests resultats són molts semblants als obtinguts per K6 en els experiments realitzats en l'apartat 4.4.2 (figura 4.3.b). En canvi C600- que té inactivat el gen de la proteïna TolC, per tant no pot expressar-la, no presenta grans diferències en el creixement a concentracions subletals de l'antibiòtic en presència i en absència de CCCP.

Aquests resultats posen de manifest la participació de la proteïna TolC en l'expulsió d'antibiòtics fora del citoplasma dels bacteris, gràcies a l'acoblament que es produeix amb la bomba de reflux.

4.7.2.3 Experiments de fluorimetria

Seguidament, per tal de complementar els estudis realitzats en els dos apartats anteriors amb l'objectiu de demostrar la participació de la proteïna TolC en el reflux de quinolones, es realitzaren estudis d'acumulació pel mètode fluorimètric, per tal d'obtenir resultats quantitius complementaris als obtinguts anteriorment.

Aquests assaigs es van realitzar amb la soca recombinant d'*E. coli* C600pTolC i es van comparar els resultats obtinguts amb la soca *E. coli* C600- deficient en la proteïna TolC. En aquest cas no s'utilitzà la soca *K. oxytoca* K6 ja que es disposava dels resultats obtinguts en els experiments de fluorimetria realitzats en l'apartat 4.3.3.

Els assaigs d'acumulació de ciprofloxacina, a l'igual que en l'apartat 4.4.3, es portaren a terme mitjançant una presa de mostra en curts intervals de temps durant un total de 30 minuts, el valor d'acumulació màxima de l'antibiòtic es produïa entre el minut 10 i 12, de manera que l'últim temps de presa de mostra fou al cap de 12 minuts d'haver iniciat l'experiment.

En la figura 4.26. es mostren les corbes d'acumulació de ciprofloxacina de les dues soques assajades, la soca recombinant C600pTolC i la soca C600-.

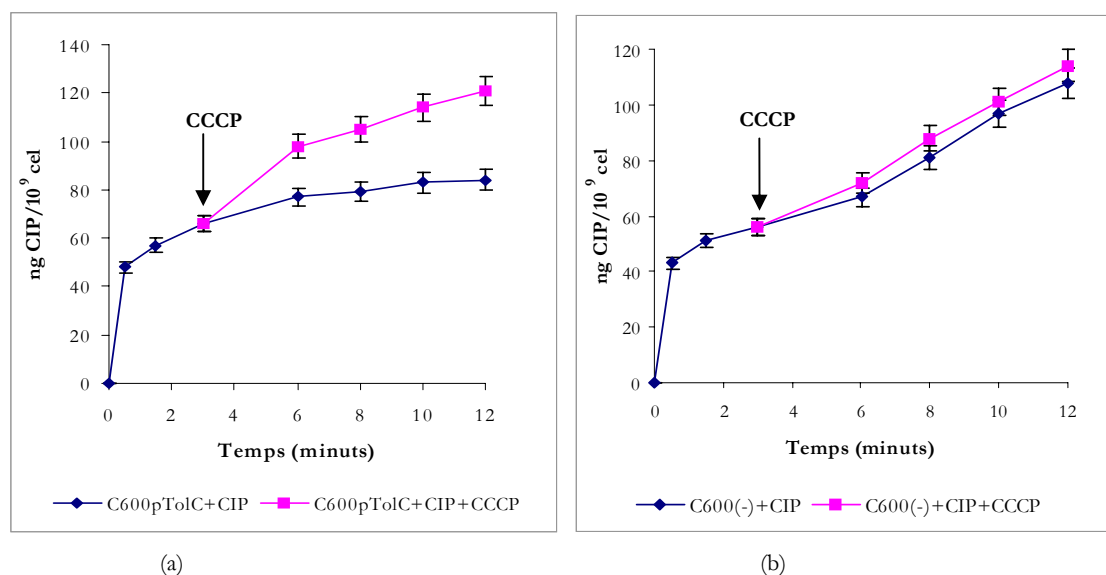


Figura 4.26. Assaig fluorimètric d'acumulació de ciprofloxacina (CIP) sense i amb inhibidor CCCP en dues soques d'*E. coli*. (a) Acumulació de ciprofloxacina en C600pTolC. (b) Acumulació de ciprofloxacina en C600-.

Com s'observa en les representacions gràfiques, l'acumulació de ciprofloxacina en la soca C600pTolC és molt diferent quan aquesta creix amb concentracions subletals de ciprofloxacina sola a quan ho fa junt amb el inhibidor metabòlic CCCP. En condicions normals els nivells d'acumulació de ciprofloxacina no arriben als 80 ng de ciprofloxacina per 10^9 cèl·lules, en canvi a l'afegir el CCCP els nivells de ciprofloxacina arriben a 120 ng d'aquest antibiòtic per 10^9 cèl·lules. Aquest fet ens demostra la presència d'un sistema de reflux en aquesta soca, que queda bloquejada pel inhibidor CCCP, i la participació de la proteïna TolC en l'expulsió d'aquest antibiòtic fora de la cèl·lula, ja que si comparem aquests resultats amb els obtinguts amb la soca C600-, deficient en la proteïna TolC, els quals es mostren en la figura 4.13.(b), podem observar clarament com la quantitat de ciprofloxacina acumulada en presència i en absència de CCCP és molt semblant i es troba al voltant dels 120 ng d'antibiòtic per 10^9 de cèl·lules.

Si ens fixem amb els resultats obtinguts per la soca K6 en l'apartat 4.5.3, podem comprovar com l'acumulació de ciprofloxacina amb presència i absència de CCCP en K6 i en C600pTolC presenta uns patrons molt semblants, el que ens porta a concloure i afirmar el paper essencial de la proteïna TolC en l'expulsió d'antibiòtics fora del bacteri evitant-ne la seva acumulació, afavorint d'aquesta manera la supervivència bacteriana en concentracions elevades d'antibiòtic en el medi.

4.7.3 PURIFICACIÓ DE LA PORINA TolC DE *K. oxytoca*

Una vegada comprovat que la proteïna TolC de *K. oxytoca* participava en l'expulsió d'antibiòtics fora del bacteri, el següent objectiu va ser estudiar el porus que formava la proteïna TolC en la membrana externa del bacteri i el seu paper com a receptor de bacteriocines.

El primer pas per poder realitzar aquests estudis era obtenir la proteïna pura per poder utilitzar-la en els diversos experiments. La gran majoria de porines es purifiquen després de realitzar un aïllament de proteïnes de membrana externa i de ser visualitzades en gels de poliacrilamida. El principal problema que presenta TolC és que és molt difícil la seva visualització en gels de poliacrilamida pel que es va buscar una alternativa per poder purificar aquesta porina. El sistema seleccionat per a la purificació de la proteïna TolC fou un sistema d'expressió heteròleg. Aquest sistema basat en els vectors pGEX, produeix la proteïna recombinant fusionada al gen de la glutatión-S-transferasa (GST), necessari per la seva posterior purificació.

Per a l'expressió del gen *tolC* en *E. coli* es va elegir el vector d'expressió pGEX-4T, i dins d'aquest es va elegir el pGEX-4T-2 que per la disposició dels seus nucleòtids, era el que permetia inserir la seqüència del gen que s'ha d'expressar i incorporar el gen GST, sense trencar la pauta de lectura del gen. D'aquesta manera es realitzà un acoblament traduccional entre la pauta de lectura del gen i la seqüència de DNA de la GST.

Primerament es van dissenyar els cebadors per poder amplificar el gen *tolC* de *K. oxytoca*. Les seqüències d'oligonucleòtids es dissenyaren a partir de la seqüència establerta en l'apartat 4.6.1 de la proteïna TolC de *K. oxytoca*. En els cebadors es van incloure seqüències de restricció dels enzims *BamHI* (extrem N-terminal) i *XhoI* (extrem C-terminal), amb la finalitat de digerir l'insert en el procés de clonació, els cebadors utilitzats es descriuen en l'apartat 3.11 de material i mètodes. Els enzims de restricció elegits no tallaven en cap punt de la seqüència del gen.

El producte de PCR es va inserir en el vector *pDrive Cloning Vector* obtenint plasmidis recombinants, els quals es van transformar en la soca *E. coli* XL1-Blue. Els plasmidis es tractaren amb els enzims de restricció *BamHI/XhoI*, per extreure el gen i subclonar-lo en el vector pGEX-4T-2, digerit amb els mateixos enzims de restricció i obtenint d'aquesta manera el plasmidi pGEX-TolC. El triplet origen de traducció de la proteïna TolC (ATG) forma part de la diana *BamHI* de l'oligonucleotid TolC-*BamHI* el que ens permet que el marc de lectura de TolC estigui obert. El gen de GST es troba just abans de la diana de restricció *BamHI* i és el que ens facilita la purificació de la proteïna per columnes d'afinitat on quedarà retinguda pel glutatió-sefarosa. La seqüència d'aminoàcids Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser es troba immediatament després de la regió codificant de GST en el vector pGEX-4T i serveix d'unió entre *tolC* i GST. Aquest hexapéptid és reconegut per la proteasa trombina, que trenca la unió Arg-Gly permeten l'alliberació de les proteïnes TolC del pèptid senyal GST. En la figura 4.27. es mostra de forma esquemàtica l'estratègia seguida per la clonació del gen *tolC*.

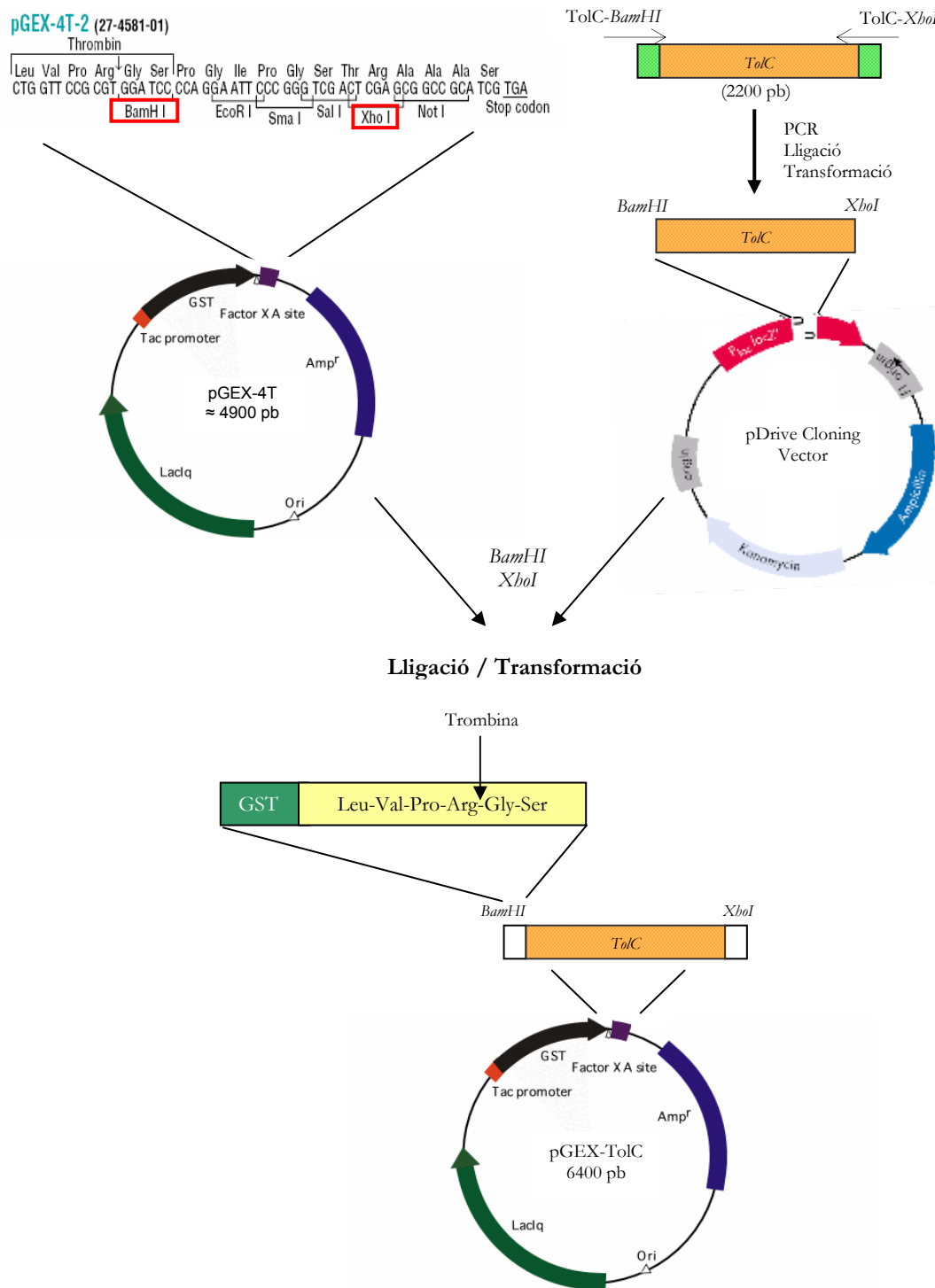


Figura 4.27. Estratègia seguida per la clonació del gen *tolC* en el vector d'expressió pGEX-4T-2, incloent el gen GST i una diana per la proteasa trombina. D'aquesta manera es va obtenir el plasmidi recombinant pGEX-TolC.

El plasmidi pGEX-TolC es va transformar en *E. coli* DH5- α per poder realitzar la sobreexpressió i la purificació d'aquesta proteïna. Per comprovar la presència de l'insert es va realitzar una extracció del plasmidi recombinant (apartat 3.8.2.1) i aquest es digerí amb els enzims de restricció *Bam*HI i *Xho*I (apartat 3.10.4). El fragment amplificat corresponent al gen de la proteïna TolC de *K. oxytoca* es portà a seqüenciar. En la figura 4.28. es mostra el plasmidi digerit amb els dos enzims de restricció, es veu un fragment gran corresponent al plasmidi utilitzat d'aproximadament 5000 pb i un fragment més petit que correspon al gen *tolC* de *K. oxytoca* (1500 pb).

Quan vam haver comprovat que el gen en qüestió corresponia a la proteïna TolC de *K. oxytoca*, es procedí a la sobreexpressió i purificació d'aquesta proteïna, tal com es descriu en l'apartat 3.15 de material i mètodes. Una vegada purificada la proteïna TolC de *Klebsiella oxytoca*, es va procedir a la realització dels estudis.

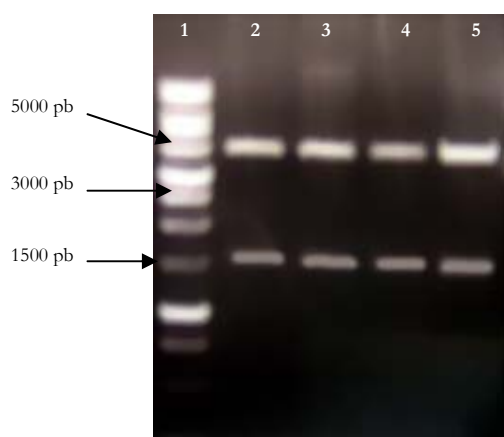


Figura 4.28. Plasmidi recombinant pGEX-TolC digerit amb *Bam*HI i *Xho*I. Donant lloc a un fragment de 4800 Kba corresponent al plasmidi pGEX i un de 1500 pb corresponent al gen *tolC* de *K. oxytoca*

4.7.4 PAPER DE TolC COM A RECEPTOR DE BACTERIOCINES

Les bacteriocines són proteïnes biològicament actives contra membres de la mateixa espècie o espècies molt relacionades amb la soca productora. En bacteris Gram negatius s'han descrit diferents tipus de bacteriocines, essent les més estudiades les colicines i les microcines. El grup de gens que codifiquen per les bacteriocines generalment es localitzen en plasmidis encara que també s'han descrit bacteriocines codificades en el cromosoma. Els gens que codifiquen colicines estan compostos per un gen de la colicina, el qual codifica la toxina; un gen d'immunitat, codificant una proteïna que confereix immunitat específica al bacteri productor mitjançant la unió i inactivació de la toxina; i un gen de lisi, que codifica una proteïna involucrada en l'alliberació de la colicina mitjançant la lisi de la cèl·lula productora [147]. La producció de colicina està regulat per la resposta del sistema SOS i per aquesta raó es produeix principalment en condicions d'estrès. Es creu que actuarien com antagonistes que limiten la invasió d'una soca dins una comunitat microbiana establerta, quan els nutrients són limitats les cèl·lules productores lisen les cèl·lules sensibles i enriqueixen de nutrients el medi local [152].

Fins al moment s'han identificat 18 tipus de colicines diferents i han estat classificades segons la seva immunitat i resistència i es poden agrupar en colicines enzimàtiques (colicina E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9 i D) i colicines formadores de porus (colicina A, B, E1, Ia, Ib, K i N). El receptors on s'uneixen les colicines per poder entrar dins el bacteri són proteïnes integrals de membrana amb un domini transmembrana i un domini extern exposat al medi. Les colicines formadores de canal es poden agrupar en dos grups depenent del seu canal d'entrada, el grup A (colicines A, E1, K) que requereixen un sistema Tol, i el grup B (B, Ia, Ib, N) que requereixen un sistema Ton. Entre aquests receptor troben la proteïna TolC on els seus *loops* exteriors actuen com a receptor de colicines del grup A i l'entrada al citoplasma estaria regulada per l'obertura/tancament de l'estructura α -hèlix situada al final del túnel [152]. La colicina E1 (colE1) presenta dues vies d'entrada la proteïna BtuB (receptor de la vitamina B12) i la proteïna TolC, aquesta colicina té el seu domini d'unió als *loops* de la proteïna TolC situat al centre de la proteïna on hi ha una estructura en forma de hèlix, gràcies a l'estructura de TolC, colE1 passa del medi extern directament al interior del citoplasma bacterià per la interacció de TolC amb la proteïna de membrana interna TolA [153].

Els resultats obtinguts en la seqüenciació de la proteïna TolC de *K. oxytoca* i els de la creació del model estructural de la proteïna TolC a partir de la seva seqüència d'aminoàcids van posar de manifest que el *loop* exterior d'aquesta proteïna presenta unes característiques molt diferents al *loop* de la mateixa proteïna en *E. coli*. Aquestes característiques ens van fer pensar que l'estructura dels *loops* de TolC podrien fer que aquesta proteïna no fos receptora per la colicina E1. Per tant, el següent objectiu que ens varem plantejar va ser determinar si la proteïna TolC de *K. oxytoca* actuava com a receptor de la colicina E1.

Primerament es va realitzar un aïllament i una purificació de la colicina E1 que utilitza com a receptor per entrar dins del bacteri la proteïna TolC, i les colícines colE2 i colE3, que per entrar dins del bacteri utilitzen receptors diferents a TolC. Aquests tres tipus de colícines es van purificar a partir de tres soques productores *E. coli* 2510, *E. coli* 2511 i *E. coli* 2512, respectivament. El mètode seguit per l'aïllament i la purificació de les colícines fou el descrit en l'apartat 3.17.1 de material i mètodes.

Es va determinar la susceptibilitat a les colícines en la soca *K. oxytoca* K6, portadora de la proteïna TolC estudiada i una soca de *E. coli* que expressa la proteïna TolC receptora de colícines, que es va utilitzar com a control positiu. El mètode utilitzat per determinar la susceptibilitat fou el descrit en l'apartat 3.16.2 de material i mètodes.

En la figura 4.29. es mostren dues fotografies de les plaques de LB agar on es realitzà la prova de susceptibilitat a les colícines en K6 i la soca control.

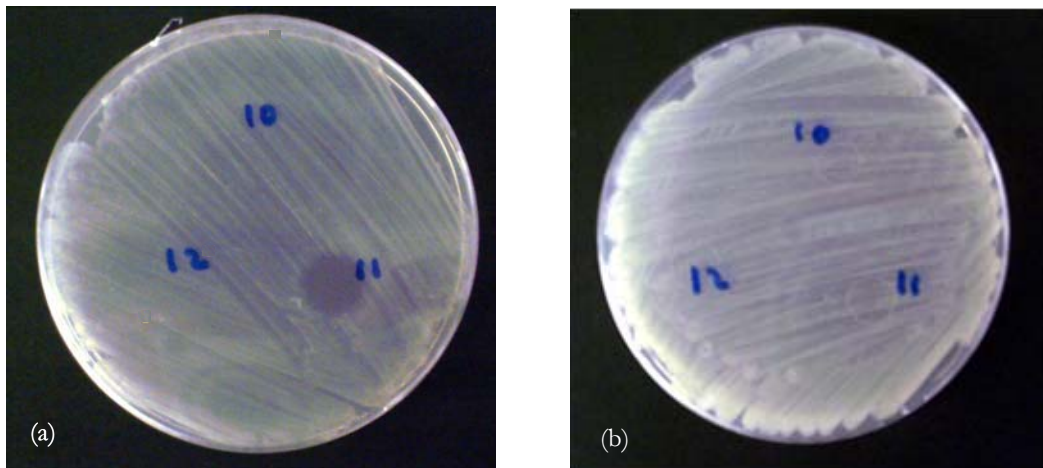


Figura 4.29. Determinació de la sensibilitat les colicines en agar LB. (a) Creixement d'*E. coli* receptora de colE1. (b) Creixement de *K. oxytoca* amb TolC en estudi. [10=colE2; 11=colE1; 12=colE3]

Com es pot observar en la figura 4.29., per les colicines colE2 i colE3 que utilitzen receptors per entrar dins del bacteri diferents als de la família Tol, les dues soques estudiades presenten resistència a aquestes dues colicines ja que en el punt on es va dipositar la gota amb colicina hi ha creixement del bacteri. Pel que fa la colicina E1 (11), en el cas de la soca d'*E. coli* productora de TolC receptora de colicina podem comprovar com aquesta soca és sensible a colE1 ja que s'ha produït un halos d'inhibició al voltant on es va dipositar la gota de colE1, per tant podem dir que colE1 ha entrat a través del canal de TolC, en canvi en el cas de la soca estudiada de *K. oxytoca* es pot veure com no s'ha produït inhibició del creixement en el lloc de la colicina colE1, el que ens indica que aquesta soca és resistent a colE1.

Per tant amb els resultats obtinguts podríem afirmar que, com ja havíem vist en el model estructural de la proteïna TolC de *K. oxytoca*, la proteïna TolC d'aquesta soca bacteriana presenta unes modificacions en els seus *loops* exteriors que eviten que sigui reconeguda per la colicina E1.

4.7.5 EXPERIMENTS DE CONDUCTÀNCIA APLICANT LA TÈCNICA DE *BLACK LIPID BILAYER*

Hi ha una gran varietat de sistemes de reconstitució que han demostrat la funció de les porines de ser proteïnes formadores de canal *in vitro*. Entre aquests destaquem, dos mètodes desenvolupats per Nakae un basat en la formació de proteoliposomes utilitzant un reflux de radioisòtops i l'altre en la formació de proteoliposomes que contenen un enzim i permeten l'entrada del seu substrat, el inflament de liposomes (*liposome swelling assay*) i un altre mètode basat en l'estudi de conductància a través d'una bicapa lipídica (*planar lipid bilayer technique*). Aquest últim mètode, és un procediment de mesura de la conductivitat d'ions a través de les porines i fou desenvolupat per Benz i Hancock l'any 1981.

L'aparell on es realitza l'experiment inclou una cambra de tefló dividida en dos compartiments que estan separats per un envà de tefló que conté un petit forat de 1-2 mm² i que connecta ambdós espais. Hi ha elèctrodes en tots dos compartiments en la solució aquosa. Al voltant d'aquest forat es forma una membrana de lípid utilitzant com a solvent *n*-decà. La membrana que es forma és una bicapa que és òpticament negra quan és vista amb llum incident i és impermeable a la majoria dels ions. Per això, quan s'aplica un voltatge a través de la bicapa, no s'observa corrent. Si s'afegeixen porines en una solució de detergent en un costat de la membrana s'observen fluctuacions en la conductància. Aquestes fluctuacions poden ser interpretades com els passos d'incorporació d'oligòmers formadors d'un únic porus a la membrana. L'augment de corrent és petit (aproximadament 10⁻¹¹-10⁻¹² A) i s'amplifica en un amplificador de senyal que pot ser posteriorment enregistrat. Aquest mètode té l'inconvenient que únicament pot estudiar la permeabilitat d'ions. Tanmateix, permet estimar el diàmetre del porus, estudiar la selectivitat del porus per una gran quantitat d'anions i cations, informar-nos sobre els llocs d'unió dels ions al canal i determinar si el canal és regulat pel voltatge.

A partir de la purificació de la proteïna TolC de *K. oxytoca*, es procedí a l'aplicació d'aquesta última tècnica.

4.7.5.1 Anàlisi de la conductància del canal produït per la porina TolC de *Klebsiella oxytoca*.

Es va analitzar la formació del canal de la porina de 51 KDa de *K. oxytoca* en experiments de conductància. Per això, es van afegir petites quantitats de porina (aproximadament 100 ng/ml) a la fase aquosa d'una o ambdues cares de l'envà que separa els compartiments de la cambra descrita a l'apartat 3.18.1. Després d'un temps d'inactivitat d'aproximadament un o dos minuts, probablement a conseqüència de la lenta difusió aquosa de la proteïna, es va observar un augment esglaonat de corrent similar a l'observat en d'altres porines de Gram negatiu [154]. Cada esglaó representa la inserció dins de la membrana d'una unitat conductiva (una canal de membrana).

L'experiment es realitzà després d'afegir la proteïna TolC de *K. oxytoca*, uns cinc minuts després de la formació de la membrana i s'aplicà un voltatge de 80 mV. La figura 4.30. ens mostra els resultats obtinguts. Sota aquestes condicions l'augment de corrent és lent i la conductància d'aquest canal arriba a 81.5 pS.

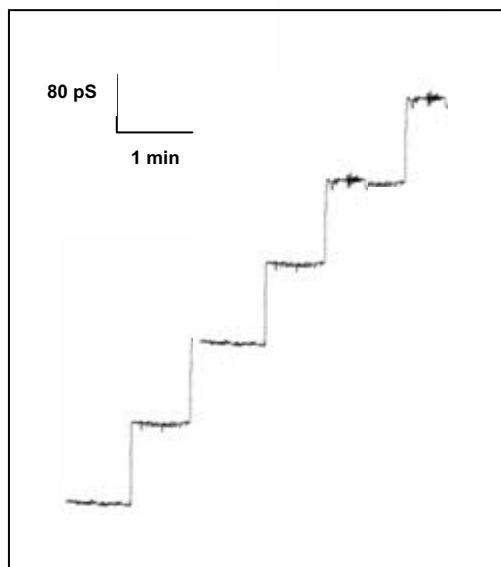


Figura 4.30. Registre de conductància de canals simples de la proteïna TolC de *K. oxytoca* K6 en una membrana de difitanoi-fosfatidilcolina/n-decà aplicant un voltatge de 80 mV. La fase aquosa contenia 1 M KCl a pH 7.5. La temperatura de l'experiment va ser de 20°C.

Aquests resultat és molt diferent a la conductància d'altres porines de bacteris Gram negatiu, com les porines OmpC i OmpF d'*E. coli*, les quals presenten valors de conductància entre 1.5 i 2 nS sota les mateixes condicions i Omp1 de *S. marcescens* que presenta un valor de conductància de 2 nS [83], però són molt semblants als obtinguts en estudis realitzats amb la proteïna TolC d'*E. coli* [155]. Els porus formats per aquesta proteïna són molt estables i no sembla que l'entrada del porus sigui depenent de voltatge, tot i que a l'anar augmentant el voltatge s'observà un petit augment de conductància aquest no fou significatiu.

TolC presenta aquesta baixa conductància (ca 80 pS) possiblement degut a la constricció que es dona a l'entrada de l'espai periplasmàtic formant una entrada de només 3.9 Å, ja que estudis realitzats *in vitro* de *black lipid bilayer*, amb modificacions produïdes en TolC d'*E. coli*, que donaven lloc a una obertura de 16 Å, donen com a resultat un augment de la conductància [156].

4.7.5.2 Mesura del potencial de membrana a corrent zero

Els resultats dels experiments del canal simple de la porina TolC estan d'acord amb les mesures de potencial de membrana en presència de gradients de sal. Després de la incorporació d'un gran nombre de canals en membranes banyades en 100 mM de KCl, es va establir un gradient cinc vegades major per addició de petites quantitats de solució KCl a un costat de la membrana. Pel KCl el costat més diluït de la membrana va esdevenir més positiu i presentava un potencial promig de 47 mV. El principal motiu d'aquesta conductància que presenta TolC és deguda a la manca de constricció en l'entrada del porus i a la constricció que presenta a l'entrada de l'espai periplasmàtic.

Aquests resultats ens indiquen que es tracta d'un canal selectiu pels cations, pel que existeix un moviment preferencial del potassi a través del canal, és a dir, selectivitat catiònica com ja s'ha suggerit en les dades d'únic canal. L'anàlisi del potencial de membrana a corrent zero utilitzant l'equació de *Goldman-Hodgkin-Katz* (apartat 3.18.2), va revelar un coeficient de permeabilitat catió/anió (P_K/P_{Cl}) de 16.5, el que ens indica que per cada anió de Cl⁻ passen aproximadament 16 cations K⁺. Aquests experiments ens demostren que TolC forma un canal el corrent del qual està principalment determinat pel flux de cations.

4.7.5.3 Avaluació de la dependència de la conductància en funció de la concentració d'electròlits

Per investigar la influència de la concentració d'electròlits es realitzaren lectures de la conductància a diferents concentracions de KCl a pH 7.5, la mesura sempre es realitzà per 60 mV. Com es mostra en la figura 4.31, la conductància de TolC és menor quan menor és la concentració d'electròlits.

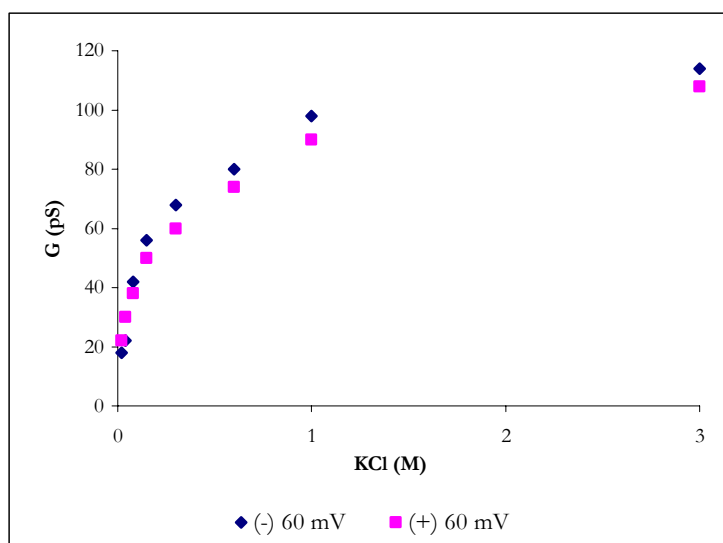


Figura 4.31. Representació gràfica de la dependència de la conductància de la concentració d'electròlits mesurada a +60 mV i -60mV.

Com es pot observar en la figura 4.31., a major concentració de KCl major és la conductància que presenta la proteïna TolC, però la relació que s'estableix entre l'augment de concentració d'electròlits amb l'augment de conductància no és lineal. Aquest resultat és diferent del que presenten la gran majoria de porines formadores de canal que si que presenten una relació lineal entre l'augment de conductància amb un augment de concentració de sals [83, 154].

5. RESUM I CONCLUSIONS

1. Les soques clíniques K5 i K6 de *K. oxytoca* així com K1 i K2 de *K. pneumoniae* són aïllats multiresistents. En el cas de K6 aquesta resistència afecta a pràcticament tots els antibiòtics assajats.
2. Les soques d'ambdues espècies presenten perfils proteics de membrana externa totalment superposables formats per les dues proteïnes de membrana externa majoritàries en *Klebsiella* (OmpK36 i OmpK35) de 38 i 37 kDa respectivament.
3. Les seqüències de K2 i K6 (resistents a les quinolones) de les seves regions QRDR dels loci *gyrA* i *parC* demostraren que K2 presenta dues mutacions en el gen *gyrA* descrites prèviament com a responsables de la resistència a quinolones i K6 presentava una mutació també en *gyrA*. La resta de les mutacions en les regions QRDR no afecten a la susceptibilitat d'aquests antibiòtics.
4. L'addició d'un inhibidor de les bombes de reflux com el CCCP condueix a una reducció dels valors de concentració mínima inhib tòria que permet concloure que les bombes de reflux juguen un paper significatiu en les susceptibilitats baixes de les soques estudiades. Això ve corroborat pels experiments de l'efecte dels antibiòtics sobre el creixement, mesures espectrofluorimètriques d'acumulació de fluoroquinolones i les corbes de mort.
5. S'ha posat de manifest l'existència dels gens *acrA* i *acrB*, pertanyents a la bomba de reflux AcrAB, en les soques clíniques *K. oxytoca* K6 i *K. pneumoniae* K2.
6. S'ha localitzat i determinat la seqüència del gen que codifica la proteïna de membrana externa TolC de *K. oxytoca* K6, posant de manifest que presenta una elevada homologia amb proteïnes TolC d'altres enterobacteris, essent especialment important l'homologia entre TolC de *K. oxytoca* i d'*E. aerogenes*, que va ser d'un 92%.
7. S'ha clonat el gen de la proteïna TolC de *K. oxytoca* en *E. coli* deficient en aquesta proteïna. Mesures espectrofluorimètriques d'acumulació de fluoroquinolones, amb i sense CCCP, i experiments de corbes de mort, han posat de manifest la participació de la proteïna TolC en l'expulsió d'aquests antibiòtics.

8. S'ha estudiat l'esmentada proteïna TolC pel que fa a la seva estructura i la seva funció, posant-se de manifest que *K. oxytoca* és resistent a les colicines que utilitzen la proteïna TolC per penetrar al bacteri. Això és degut possiblement a la menor longitud de les cadenes α -hèlix que uneixen els components del β -barril i que s'exposen a l'exterior cel·lular, com ho demostra el model estructural establert a partir de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna TolC de *K. oxytoca*.

9. TolC de *K. oxytoca* forma canals transmembrana en bicapes lipídiques artificials amb una conductància aproximada de 80 pS en KCl 1M, valor similar a l'obtingut en la mateixa proteïna en *E. coli*. Aquesta proteïna presenta una forta selectivitat catiònica, amb un coeficient de partició de potassi i clor de 16.5, aproximadament.

6. BIBLIOGRAFIA

-
- [1] **R. Podschun and U. Ullmann.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998. 11: 589-603.
- [2] **D.H. Bergey, F.C. Harrison, R.S. Breed, B.W. Hammer and F.M. Huntoon.** *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore. USA. 1994.
- [3] **F. Grimont, P.A.D. Grimont and C. Richard.** The genus *Klebsiella*. A: *The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. Edited by M. Dworkin *et al.* Springer-Verlag, New York. 1999.
- [4] **M. Drancourt, C. Bollet, A. Carta and P. Rousselier.** Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001. 51: 925-932.
- [5] **I. Ørskov.** Genus *Klebsiella*. N. R. Krieg and J. G. Holt. *Bergey's manual of sistematic bacteriology*. Vol. 1. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, Md. 1994.
- [6] **S. Brisse, S. Issenhuth-Jeanjean and P.A.D. Grimont.** Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42: 388-3398.
- [7] **M. Rosenblueth, L. Martinez, E. Martinez-Romero.** *Klebsiella variicola*: reflexión sobre el concepto de especie bacteriana. *Syst. Appl. Microbiol.* 2004. 27: 27-35.
- [8] **A. Brochert.** *Klebsiella*: one potentially nasty bacteria. *International Specialty Supply*. 2004.
- [9] **O. Umeh.** *Klebsiella* infections. *MBBS*. 2002. 7:1-9.
- [10] **D.S. Hansen, H.M. Aucken, T. Abiola and R. Podscun.** Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical test. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42: 3665-3669.
- [11] **J. Martínez, L. Martínez, M. Rosenblueth, J. Silva and E. Martínez-Romero.** How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Interational Microbiology*. 2004. 7: 261-268.

- [12] **P. Williams, B. Ciurana, S. Camprubi and J.M. Tomas.** Influence of lipopolysaccharide chemotype on the interaction between *Klebsiella pneumoniae* and human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS. Microbial Letters*. 1990. 57:305-9.
- [13] **G. Cortés, N. Borrell, B. de Astroza, C. Gómez, J. Sauleda and S. Albertí.** Molecular analysis of the contribution of the capsule polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in murine model of pneumonia. *Infection and Immunity*. 2002. 70: 2583-2590.
- [14] **R. Podschun, S. Pietsch, C. Höller and U. Ullmann.** Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. 67: 3325-3327.
- [15] **V. Livrelli, C. De Champs, P. Di Martino, A. Darfeuille-Michaud, C. Forestier and B. Joly.** Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996. 34: 1963-1969.
- [16] **D.S. Hansen, F. Mestre, S. Alberti, S. Hernandez-Alles, D. Alvarez, A. Domenech-Sanchez, J. Gil, S. Merina, J.M. Tomas and V.J. Benedí.** *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *Journal Clin. Microbiol.* 1999. 37: 56-62.
- [17] **W.C. Ko, D.L. Paterson, A.J. Sagnimeni, D.S. Hansen, A. Von Gottberg, S. Mohapatra, J.M. Casellas, H. Goossens, L. Mulazimoglu, G. Trenholme, K.P. Klugman, J.G. McCormack and V.L. Yu.** Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteriemia: global differences in clinical patterns. *Emerging Infectious Diseases*. 2002. 8: 160-166.
- [18] **S. Brisse and J. Verhoef.** Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001. 51: 915-924.
- [19] **W.F. Vincent, M. Rimai, E. Labrecque, N. Singh and M. Orth.** Infections caused by members of the Genus *Klebsiella*. *Infections Disease Update*. 2005. 11: 28-33.
- [20] **S. Hernández-Allés, M.C. Conejo, A. Pacual, J.M. Tomás, V.J. Benedí and L. Martínez-Martínez.** Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000. 46: 273-277.

-
- [21] **G. Kovtunovych, T. Lytvynenko, V. Nagrutska, O. Lar, S. Brisse and N. Kozyrovska.** Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pheX* gene. *Research in Microbiology*. 2003. 154: 587-592.
- [22] **S.A. Granier, L. Plaisance, V. Leflon-Guibout, E. Lagier, S. Morand, F. W. Goldstein and M.H. Nicolas-Chanoine.** Recognition of two groups in the *Klebsiella oxytoca* taxon on the basis of chromosomal β -lactamase and housekeeping gene sequences as well as ERIC-1R PCR typing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003. 53: 661-668.
- [23] **T. Vallot.** *Klebsiella oxytoca*. *Act Med. Int. Gastroentérologie*. 2000.
- [24] **J. García de Lomas, D. Navarro, i C. Gimeno.** Mecanismo de acción de los antibióticos. A *Tratamiento antimicrobiano*. Drobnic, L. Editor. Grupo Bristol. Ediciones Doyma. Universitat de Barcelona. 1993.
- [25] **H.C. Neu.** The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 1992. 257: 1064-1072.
- [26] **M. Texler.** Antibacterial therapy: principles of selection and use of antibacterial agent. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2000. 14: 1-17.
- [27] **L. Cordiés, L.A. Machado, M.L. Hamilton.** Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta. Médica*. 1998. 8: 58-65.
- [28] **J.S. Wolfson and D.C. Hooper.** Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1989. 2: 378-424.
- [29] **D.E. King, R. Malone and S.H. Lilley.** New classification and update on the quinolone antibiotics. *American Family Physician*. 2001. 61: 2741-2748.
- [30] **N. Gutiérrez-Zufiaurre.** Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Rev. Esp. Quimioterap*. 2004. 17: 232-243
- [31] **A.E. Asuquo and L.J. Piddock.** Accumulation and killing kinetics of fifteen quinolones for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Antimicrob. Chemother*. 1993. 31:865-880.
- [32] **D.T.W. Chu and P.B. Fernández.** Structure-activity relationship of the fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989. 33: 131-135.

- [33] **D.C. Hooper and J.S. Wolfson.** Mode of action of the quinolone antimicrobial agents: review of recent information. *Reviews of Infectious Diseases*. 1989. 11: S902-S911.
- [34] **D.C. Hooper.** Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates*. 1999. 2: 38-55.
- [35] **J.M. Driver.** Quinolone uptake by bacteria and bacterial killing. *Reviews of Infectious Diseases*. 1989. 11: S941-S945.
- [36] **L.J.V. Piddock, Y.F. Jin, V. Ricci and A.E. Asuquo.** Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999. 43: 61-70.
- [37] **R.M. Daza Pérez.** Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 1998. 22: 57-67.
- [38] **D. Mazel and J. Davies.** Antibiotic resistance in microbes. *Cell. Mol. Life Sci*. 1999. 56: 742-754.
- [39] **A.A. Salyers and D.D. Witt.** Bacterial pathogenesis. Molecular approach. 1994. ASM Press. Washintong, D.C. 97-110.
- [40] **M.L. Cohen.** Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*. 1992. 257: 1050-1055.
- [41] **J.A. García and E. García.** Resistencias bacterianas y antibioticoterapia. A: Eficacia *in vivo*, eficacia *in vitro*. Ed. Doyma. Barcelona 1997. 39-50.
- [42] **D.M. Livermore.** Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clinical Infectious Diseases*. 2003. 36: S11-23.
- [43] **J.S. Williamson and C.M. Wyandt.** Microbial resistance: the plague of tomorrow. *Drug Topics*. 2001. 10: 55-65.
- [44] **D.M. Livermore.** Epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Med*. 2000. 26: S14-S21.
- [45] **C. Lévesqué, L. Piché, C. Larose and P.H. Roy.** PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995. 39: 185-191.

- [46] **P. Gruteke, W. Ggoessens, J. Van Gils, P. Peerbooms, N. Lemmens-den Toom, M. Van Santen-Verheuevel, A. Van Belkum and H. Verbrugh.** Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum β -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *Journal of clinical Microbiology*. 2003. 41: 1161-1166.
- [47] **H. Nikaido.** Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. 1994. 24: 382-388.
- [48] **L.L. Grinius and E.B. Goldberg.** Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *Journal of Biological Chemistry*. 1994. 269: 29998-30004.
- [49] **O. Lomovskaya and K. Lewis.** *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Academic Scientific. USA*. 1992. 89: 8938-8942.
- [50] **A.M. George.** Multidrug resistance in enteric and other Gram-negative bacteria. *FEMS. Microbiology Letters*. 1996. 139:1-10.
- [51] **F.W. Goldstein and J.F. Acar.** Epidemiology of quinolone resistance: Europe and North and South America. A: *Quinolone Resistance Drugs*. 1995. 49: 36-42.
- [52] **R. Taléns-Visconti, T.M. Garrigues and E. Cantón.** Mechanisms of bacterial resistance to quinolones. *Rev. Esp. Quimioter*. 2002. 15: 25-31.
- [53] **L.M. Weigel, C.D. Steward and F.C. Tenover.** *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998. 42: 2661-2667.
- [54] **M.M. Tavío, J. Vila, J. Ruiz, J. Ruiz, A.M. Martín-Sánchez and M.T. Jimenez de Anta.** Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999. 44: 735-742.
- [55] **J.E. Acar and E.W. Goldstein.** Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical Infections Diseases*. 1997. 24: S67-S73.
- [56] **T. Scneiders, S.G.B Amyes and S.B. Levy.** Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003. 47: 2831-2837.

- [57] **S. Brisse, D. Milatovic, A.C. Fluit, J. Verhoef, N. Martin, S. Scheuring, K. Köhrer and F.J. Schmitz.** Comparative in vitro activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and trovafloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* clinical isolates with alteration in GyrA and ParC proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999. 43: 2051-2055.
- [58] **B. Fournier, P.H. Lagrange and A. Phillippon.** β -lactamase gene promoters of 71 clinical strains of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996. 40: 460-463.
- [59] **F.J. Chen, T.L. Lauderdale, M. Ho and H.J. Lo.** The roles of mutations in *gyrA*, *parC* and *ompK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance*. 2003. 9: 265-271.
- [60] **A. Mazzariol, J. Zuliani, G. Cornaglia, G.M. Rossolini and R. Fontana.** AcrAB efflux system: expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 2002. 46: 3984-3986.
- [61] **T. Deguchi, T. Kawamura, M. Yasuda and M. Nakano.** In vivo selection of *Klebsiella pneumoniae* strains with enhanced quinolone resistance during fluoroquinolone treatment of urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997. 41: 1609-1611.
- [62] **K.S. McKeegan, M.I. Borges-Walmsley and A.R. Walmsley.** Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends in Microbiology*. 2000. 10: S8-S14.
- [63] **H. Nikaido.** Antibiotic resistance caused by Gram negative multidrug efflux pumps. *Clinical Infect. Diseases*. 1998. 27: 532-542.
- [64] **L. Martínez-Martínez, I. García, S. Ballesta, V.J. Benedí, S. Hernández-Allés and A. Pascual.** Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolones resistance *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998. 42: 1850-1852.
- [65] **L. Martínez-Martínez, A. Pascual, M.C. Conejo, I. García, P. Joyanes, A. Doménech-Sánchez and V.J. Benedí.** Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum β -lactamase production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002. 46: 3926-3932.
- [66] **K. Nishino, J. Yamada, H. Hirakawa, T. Hirata and A. Yamaguchi.** Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to β -lactams. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 2003. 47: 3030-3033.

- [67] **S. Baucheron, E. Chaslus-Dancla and A. Cloeckaert.** Role of TolC and *parC* mutation in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT204. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004. 53: 657-659.
- [68] **M.P. Molloy, B.R. Herbert, M.B. Slade, T. Rabilloud, A.S. Nouwens, K.L. Williams and A.A. Gooley.** Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membranes. *Eur. Journal Biochem.* 2000. 267: 2871-2881.
- [69] **R. Koebnik, K.P. Locher and P. Van Gelder.** Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*. 2000. 37: 239-253.
- [70] **C.A. Mulford and M.J. Osborn.** An intermediate step in translocation of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983. 80:1159-1163.
- [71] **R. Benz.** Permeation of hydrophobic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochem. Biophys. Acta*. 1994. 1197:167-196.
- [72] **H. Nikaido.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiological and Molecular Biology Reviews*. 2003. 67: 593-656.
- [73] **M.J. Osborn and H.C.P. Wu.** Proteins of the outer membranes of Gram negative bacteria. *Annual Reviews Microbiol.* 1980. 34: 396-422.
- [74] **Z. Pragai and E. Nagy.** In-vitro selection of porin-deficient mutants of two strains of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibilities to meropenem, but not to imipenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998. 42: 821-824.
- [75] **W.M. Shafer, J.T. Blathazar, K.E. Hagman and S.A. Morse.** Missense mutations that alter DNA-binding domain of the MtrR protein occur frequently in rectal isolates of *Neisseria gonorrhoeae* that are resistant to fecal lipids. *Microbiology*. 2001. 141: 907-911.
- [76] **T.E. Clarke, L.W. Tari and H.J. Vogel.** Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Current Top. Med. Chem.* 2001. 1: 7-30.
- [77] **H. Nikaido and M. Vaara.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*. 1985. 49: 1-32.
- [78] **W. Achouak, T. Heulin and J.M. Pagès.** Multiple facets of bacterial porins. *FEMS. Microbiology Letters*. 2001. 199: 1-7.

- [79] **G.E. Schulz.** The structure of general porins. A: *Bacterial and eukaryotic porins: structure, functions, mechanisms*. Edited by Roland Benz, Wiley-UCH. 2004.
- [80] **M.H. Saier Jr.** Families of proteins forming transmembrane channels. *Journal Membrane Biol.* 2000. 175: 165-180.
- [81] **A. Doménech-Sánchez, S. Hernández-Allés, L. Martínez-Martínez, V.J. Benedí and S. Albertí.** Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in β -lactam antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology.* 1999. 181: 2726-2732.
- [82] **G. E. Schulz.** Porins: general to specific, native to engineered passive pores. *Current Opinion in Structural Biology.* 1996. 6: 485-490.
- [83] **N. Ruiz, E. Maier, C. Andersen, R. Benz and M. Viñas.** Molecular and functional characterisation of *Serratia marcescens* outer membrane protein Omp1. *Biophysical Chemistry.* 2004. 109: 215-227.
- [84] **J.M. Pagès.** Role of bacterial porins in antibiotic susceptibility of Gram negative bacteria. A: *Bacterial and eukaryotic porins: structure, functions, mechanisms*. Edited by Roland Benz, Wiley-UCH. 2004.
- [85] **S. Albertí, F. Rodríguez-Quñones, T. Schirmer, G. Rummel, J.M. Tomás, J.P. Rosenbush and V.J. Benedí.** A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model and complement binding. *Infection and Immunity.* 1995. 63: 903-910.
- [86] **S. Hernández-Allés, S. Albertí, D. Álvarez, A. Doménech-Sánchez, L. Martínez-Martínez, J. Gil, J.M. Tomás and V.J. Benedí.** Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology.* 1999. 145: 673-679.
- [87] **M. Pajastch, C. Andersen, A. Mathes, A. Böck, R. Benz and H. Engelhardt.** Properties of a Cyclodextrin-specific, unusual porin from *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Biological Chemistry.* 1999. 274: 5159-25166.
- [88] **H. Nikaido.** Transport across the outer membrane. *J. Bioenergetics and Biomembranes.* 1993. 25: 581-589.
- [89] **J. Chevalier, J.M. Pagès, A. Eyraud and M. Malléa.** Membrane permeability modifications are involved in antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2000. 274: 496-499.

- [90] **A. Domenech-Sánchez, A. Pacual, A.I Suárez, D. Alvarez, V.J. Benedí and L. Martínez-Martínez.** Activity of nine antimicrobial agents against clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* producing extended-spectrum β -lactamases and deficient or not in porins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000. 46:847-863.
- [91] **I.T. Paulsen, M.H. Brown and R.A. Skurray.** Proteon-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*. 1996. 60: 575-608.
- [92] **K.S. McKeegan, M.I. Borges-Walmsley and A.R. Walmsley.** Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition. *Current Opinion in Pharmacology*. 2004. 4: 479-486.
- [93] **P. Sánchez Díaz.** Sistemas MDR y la resistencia a los antimicrobianos. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2003. 16: 172-187.
- [94] **S.P. Cohen, H. Hächler and S.B. Levy.** Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1993. 175: 1484-1492.
- [95] **M.N. Aleskshun and S.B. Levy.** The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends in Microbiology*. 1999. 7: 410-413.
- [96] **K. Poole.** Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005. 56: 20-51.
- [97] **J.M. Pagès, M. Masi and J. Barbe.** Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends in Molecular Medicine*. 2005. 11: 382-389.
- [98] **H. Nikaido.** Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *Jouranal of Bacteriology*. 1996. 178: 5853-5859.
- [99] **K. Lewis.** Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on the theme. *TIBS Ed.* 1994. 4: 119-123.
- [100] **M. Putman, H.W. Van Veen and W.N. Konings.** Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviems*. 2000. 64: 672-693.
- [101] **I.T. Paulsen, L. Nguyen, M.K. Sliwinski, R. Rabus and M.H. Saier Jr.** Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *Journal Mol. Biol.* 2000. 301: 75-100.

-
- [102] **M.H. Saier Jr, R. Tam, A. Reizer and J. Reizer.** Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Molecular Microbiology*. 1994. 11: 841-847.
- [103] **F. Van Bambeke, E. Balzi and P.M. Yulkens.** Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*. 2000. 60: 457-470.
- [104] **H. Ashida, T. Oonishi and N. Uyesaka.** Kinetic analysis of the mechanism of action the multidrug transporter. *Journal Theor. Biol.* 1998. 195: 219-232.
- [105] **M.I. Borges-Walmsley, K.S. McKeegan and A.R. Walmsley.** Structure and function of efflux pump that confer resistance to drugs. *Biochem. Journal*. 2003. 376: 313-338.
- [106] **M.H. Saier Jr., I.T. Paulsen, M.K. Sliwinski, S.S. Pao, R.A. Skurray and H. Nikaido.** Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *The FASEB Journal*. 1998. 12: 265-274.
- [107] **E.B. Tikhonova, Q. Wang and H.I. Zgurskaya.** Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 2002. 184: 6499-6507.
- [108] **I.T. Paulsen, J.H. Peter, S. Choi and M.H. Saier Jr.** A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS. Microbiology Letters*. 1997. 156: 1-8.
- [109] **H.I. Zgurskaya and H. Nikaido.** Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology*. 2000. 37: 219-225.
- [110] **E.B. Tikhonova and H.I. Zgurskaya.** AcrA, AcrB and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. 279: 32116-32124.
- [111] **M. Berlanga, J.L. Vázquez, J. Hernández-Borrell, M.T. Montero and M. Viñas.** Evidence of an efflux pump in *Serratia marcescens*. *Microbial Drug Resistance*. 2000. 6: 111-117.
- [112] **D. Ma, D.N. Cook, M. Alberti, N.G. Pon, H. Nikaido and J.E. Hearst.** Gens *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 1995. 16: 45-55.

- [113] **D. Ma, M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaio and J. E. Hearst.** The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Molecular Microbiology*. 1996. 19: 101-112.
- [114] **A. Mazzariol, J. Zuliani, G. Cornaglia, G.M. Rossolini and R. Fontana.** AcrAB efflux system: expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002. 46: 3984-3986.
- [115] **C. Chu, L.H. Su, C.H. Chu, S. Baucheron, A. Cloeckaert and C.H. Chiu.** Resistance to fluoroquinolone linked to *gyrA* and *parC* mutations and overexpression of *acrAB* efflux pump in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *Microbial Drug Resistance*. 2005. 11: 248-253.
- [116] **H. Okusu, D. Ma and H. Nihaido.** AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic resistance (Mar) mutants. *Journal of Bacteriology*. 1996. 178: 306-308.
- [117] **A.M. George, R.M. Hall and W. Stokes.** Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gen, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 1995. 141: 1909-1920.
- [118] **M.N. Aleskshun and S.B. Levy.** Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997. 41: 2067-2075.
- [119] **A. Olliver, M. Vallé, E. Chauslus-Dancla and A. Cloeckaert.** Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of *in vitro*-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS. Microbiology Letters*. 2004. 238: 267-272.
- [120] **A. Ruzin, M.A.Visalli, D. Keeney and P.A. Bradford.** Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. 49: 1017-1022.
- [121] **K. Postle and H. Vakharia.** TolC, a macromolecular periplasmatic “chunnel”. *Nature America Inc.* 2000. 7: 527-530.
- [122] **V. Koronakis.** TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS. Letters*. 2003. 555: 66-71.
- [123] **V. Koronakis, J. Eswaran and C. Hughes.** Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annual Reviews Biochem.* 2004. 73: 467-89.

- [124] **A.M. Augustus, T. Celaya, F. Husain, M. Humbard and R. Mirsa.** Antibiotic-sensitive TolC mutants and their suppressors. *Journal of Bacteriology*. 2004. 186: 1851-1860.
- [125] **J.A. Fralick and L.L. Burns-Keliher.** Additive effect of *tolC* and *rfa* mutations on hydrophobic barrier of the outer membrane of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 1994. 176: 6404-6406.
- [126] **J.A. Fralick.** Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1996. 178: 5803-5805.
- [127] **V. Koronakis, C. Andersen and C. Hughes.** Channel-tunnels. *Current Opinion in Structural Biology*. 2001. 11: 403-407.
- [128] **C. Andersen, C. Hughes and V. Koronakis.** Channel vision: export and efflux through bacterial channel-tunnels. *Journal of Biological Chemistry*. 2004. 279: 32116-32124.
- [129] **A. Sharff, C. Fanutti, J. Shi, C. Calladine and B. Luisi.** The role of TolC family in protein transport and multidrug efflux. *Eur. Journal Biochem*. 2001. 268: 5011-5026.
- [130] **S.K. Buchanan.** Type I secretion and multidrug efflux: transport through the TolC channel-tunnel. *Trends in Biochemical Sciences*. 2001. 26: 3-6.
- [131] **C. Andersen, C. Hughes and V. Koronakis.** Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Current Opinion in Cell Biology*. 2001. 13:412-416.
- [132] **N. Tamura, S. Murakami, Y. Oyama, M. Ishiguro and A. Yamaguchi.** Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking. *Biochemistry*. 2005. 44: 11115-11121.
- [133] **T. Touzé, J. Eswaran, E. Bokma, E. Koronakis, C. Hughes and V. Koronakis.** Interactions Underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Molecular Microbiology*. 2004. 53: 697-706.
- [134] **S. Murakami and A. Yamaguchi.** Multidrug-exporting secondary transporters. *Current Opinion in Structural Biology*. 2003. 13: 443-452.
- [135] **U.O. Hasdemir, J. Chevalier, P. Nordmann and J.M. Pagès.** Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42: 2701-2706.

- [136] **R.D. Barabote, O.L. Johnson, E. Zetina, S.K. San Francisco, J.A. Fralick and M.J.D. San Francisco.** *Erwinia chrysanthemi* tolC is involved in resistance to antimicrobial plant chemical and is essential for phytopathogenesis. *Journal of Bacteriology*. 2003. 185: 5772-5778.
- [137] **Colección Española de Cultivos Tipo.** Departamento de Microbiología. Facultad de ciencias Biológicas. Universidad de Valencia, España, 3ª ed., 1990.
- [138] **J. Sambrook, E.F. Frisch and T. Maniatis.** Molecular cloning: A laboratory Manual. 1993. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York..
- [139] **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Disk diffusion supplemental Tables. Document M100-S10. 2000. NCCLS, Wayne, P.A.
- [140] **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Methods for dilution antimicrobial tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. 1997. NCCLS, Wayne, P.A.
- [141] **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** MIC Testing. Supplemental Tables Document M100-S10. 2000. NCCLS, Wayne, P.A.
- [142] **R. Beyer, E. Pestova, J.J. Millichap, V. Stosor, G.A. Noskin and L.R. Peterson.** A convenient assay for estimating the possible involvement of efflux of fluoroquinolones by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: evidence for diminished moxifloxacin, sparfloxacin and trovofloxacin efflux. *Antimicrobial Agents Chemother*. 2000. 44: 798-801.
- [143] **P.G. Mortimer and L.J. Piddock.** A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal Antimicrobial Chemother*. 1991. 28: 639-653.
- [144] **M. Puig, M.C. Fusté and M. Viñas.** Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol*. 1993. 39:108-111.
- [145] **S. Leranoz, M.C. Fusté, R.A. Hull, R.P. Williams and M. Viñas.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding proline oxidase of *Serratia marcescens*. *Microbios*. 1991. 67:87-94.
- [146] **K. Shigekawa and W.J. Dower.** Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques*. 1988. 6: 742-51.

- [147] **J. Muñoz-Rojas**. Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. Universidad Autónoma de Méjico. Centro de investigación sobre fijación de nitrógeno.
- [148] **P.H. O'Farrel**. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1975. 250: 4007-4021.
- [149] **I. Chopra, J. Hodgson, B. Metcalf and G. Poste**. The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997. 41: 497-503.
- [150] **Departamento de Biología Molecular**. Mecanismos moleculares de resistencia bacteriana. *Salud Pública de Méjico*. 1994. 36: 1-13.
- [151] **J.C. Sherris**. Medical Microbiology. An introduction to clinical diseases. Editorial Elsevier. 1990. 2a. Edición. 197-231.
- [152] **G. Alonso, G. Vilchez and L. Vidal-Rodríguez**. How bacteria protect themselves against channel-forming colicins?. *Internatl. Microbiol.* 2000. 3: 81-88.
- [153] **S.D. Zakharov, W.A. Cramer**. Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002. 1565: 333-346.
- [154] **R. Benz, R. Janko and P. Läuger**. Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys Acta*. 1979. 551: 238-247.
- [155] **C. Andersen, C. Hughes and V. Koronakis**. Electrophysiological behavior of the TolC channel-tunnel in planar lipid bilayer. *Journal Membrane Biol.* 2002. 185: 83-92.
- [156] **C. Andersen, E. Koronakis, E. Bokma, D. Humphreys, C. Hughes and V. Koronakis**. Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *PNAS*. 2002. 99: 11103-11108.