

## APLICACIONES DE LAS HALOCINAS PRODUCIDAS POR ARQUEAS HALÓFILAS

Inmaculada Meseguer Soria

Dpto. de Producción Vegetal y Microbiología. Universidad Miguel Hernández de Elche

\* Avda. de la Universidad s/n, Edificio Torregaitán. 03202 ELCHE (Alicante) SPAIN

E-mail: meseguer@umh.es

### BACTERIOCINAS

El término bacteriocina se empleó inicialmente para describir proteínas producidas por bacterias Gram negativas con capacidad antibiótica frente a organismos filogenéticamente emparentados con la productora. Se trataba de proteínas de peso molecular relativamente elevado, codificadas en plásmidos con un espectro de acción reducido, modo de acción bactericida, unión a receptores específicos, etc<sup>(1)</sup>. Estos criterios se extrajeron de los primeros grupos de bacteriocinas que se descubrieron y estudiaron que fueron las colicinas producidas por *Escherichia coli*. Sin embargo, a medida que aumentaba el número de bacteriocinas estudiadas, como las producidas por bacterias Gram positivas, comenzaron a aparecer algunas que no cumplían tales criterios, así, algunas tienen un espectro de acción más amplio, otras son péptidos de bajo peso molecular como las microcinas, en muchos casos no necesitan la interacción con un receptor específico, sino que su acción se ve ayudada por la secreción de otros enzimas como las lisinas, etc. Estas diferencias han llevado a definir el acrónimo inglés BLIS (bacteriocin like inhibitory substance) para todas aquellas sustancias que cumplen al menos dos requisitos esenciales:

- Que sean proteínas o péptidos sintetizados ribosómicamente (para diferenciar de los antibióticos peptídicos) y liberados al exterior celular.
- Que su modo de acción sea bactericida.

### SIGNIFICADO BIOLÓGICO

Resulta muy tentador asignar a las bacteriocinas un papel importante en la regulación de la dinámica de poblaciones en ecosistemas microbianos. Un dato que apoya esta hipótesis es el hecho de que las bacteriocinas son ubicuas y prácticamente se han encontrado en todos los grupos procarióticos en que se han buscado.

En la actualidad, no se dispone de resultados fehacientes que demuestren el papel que juegan las halocinas y en general todas las bacteriocinas en el medio natural. Todo parece apuntar a que la producción de estas sustancias es un mecanismo de competencia territorial, que permite a los microorganismos eliminar posibles competidores por los nutrientes, la luz, el oxígeno, etc. Este objetivo parece en sí mismo suficiente para que los microorganismos destinen parte de sus recursos energéticos a la producción de estas sustancias. Así lo piensan una parte importante de los científicos que trabajan en este campo. Sin embargo y, a pesar de la lógica del razonamiento, los intentos que se han realizado hasta la fecha para demostrar su significado biológico en el medio natural, no han dado resultados suficientemente concluyentes.

Otros autores opinan que en realidad las bacteriocinas tal vez intervengan en algún proceso vital para las células que las producen, es decir, que tienen una función primaria distinta a la actividad antibiótica que manifiestan sobre otros organismos.

Sea cual fuere el planteamiento que se acepte, lo cierto es que la capacidad de producir bacteriocinas proporciona, al menos en teoría, ciertas ventajas a los microorganismos que la poseen.

La presencia de receptores específicos (estructuras presentes en las células sensibles donde se unen las bacteriocinas) es otra incógnita sin resolver. Algunos autores<sup>(2)</sup> han discutido sobre la "razón de ser" de estos receptores y sugieren que deben tener seguramente una función esencial alternativa para las células. Es indudable desde luego, que si dichos receptores no tuviesen otra función que la de permitir la unión de una bacteriocina, sería absurdo que las células lo conservasen en su propio detrimento.

## MECANISMO DE ACCIÓN

Una de las características comunes a las BLIS mejor estudiadas es que actúan sobre las células susceptibles afectando una estructura o función concreta cuyo daño es responsable de la muerte celular. La forma en que las BLIS atacan a las células es lo que se conoce como mecanismo de acción y la estructura o función que atacan es el objetivo primario o diana. Llegar a conocer el mecanismo de acción y el objetivo primario de una bacteriocina es una tarea más compleja de lo que en principio pudiera pensarse ya que se ha comprobado en numerosos estudios que existe todo un abanico de posibilidades de intervención de las BLIS. El principal inconveniente es poder diferenciar entre el efecto inmediato producido por una bacteriocina sobre su objetivo, y los efectos secundarios que se desencadenan inmediatamente.

En el caso de las bacteriocinas producidas por bacterias, ya se conocen unos cuantos mecanismos de acción. Así hay ciertas colicinas que tienen actividad RNasa o endonucleasa sobre el DNA, algunas forman canales permeables a los iones en la membrana citoplasmática, otras actúan sobre la síntesis de macromoléculas (proteínas, DNA, RNA, peptidoglicano), etc<sup>(1)</sup>. Entre las halocinas estudiadas, únicamente se ha llegado a conocer el mecanismo de acción de la halocina H6 que trataremos más adelante.

## HALOCINAS: ANTAGONISMOS ENTRE ARQUEAS HALÓFILAS

Las halocinas son sustancias BLIS, producidas por arqueas halófilas. Su descubrimiento tuvo lugar en 1982<sup>(3)</sup> y, aunque en aquel primer estudio únicamente se detectaron 7 microorganismos productores, posteriormente se ha podido comprobar que los antagonismos debidos a la producción de halocinas es un hecho bastante común entre las arqueas halófilas, hasta el punto de que prácticamente todas las que se han estudiado producen algún tipo de halocinas<sup>(4, 5)</sup>. Se podría considerar una excepción, ya que hasta la fecha no se ha descrito ninguna halocina producida por especies del género *Halococcus*. Sin embargo, hay que tener presente que el descubrimiento de una sustancia antibiótica precisa encontrar el microorganismo indicador o sensible, que ponga de manifiesto tal actividad. En ocasiones resulta difícil encontrar dicho indicador, por lo que no se puede descartar su existencia.

Las halocinas, y en general, las bacteriocinas suelen poseer un espectro de acción determinado. Esto significa que una bacteriocina es letal frente a determinadas especies pero no frente a otras. Este hecho se explica por el modo de acción de las bacteriocinas que normalmente requieren la presencia de un receptor apropiado en la envoltura celular de los organismos susceptibles, por el cual se unen antes de ejercer su efecto. Así, en principio, es posible diferenciar entre dos bacteriocinas si poseen un espectro de acción diferente. Frecuentemente, las cepas productoras son inmunes a su propia bacteriocina, pero en ocasiones son sensibles, si bien la sensibilidad que manifiestan suele ser débil.

El espectro de acción de una halocina se determina ensayando su actividad sobre el mayor número posible de cepas disponibles. Un estudio de estas características requiere una colección de al menos 40-50 cepas. De este modo, se enfrentan unas a otras para detectar actividades antagonicas entre ellas. El procedimiento habitual consiste en inocular la cepa indicadora en doble capa y sobre ésta colocar pequeñas gotas (10 microlitros) a partir de suspensiones acuosas de todas las cepas (figura 1). Tras la incubación se observan los halos de inhibición que indican la presencia de una sustancia antibiótica. Se obtiene así el espectro de sensibilidad de la cepa inoculada

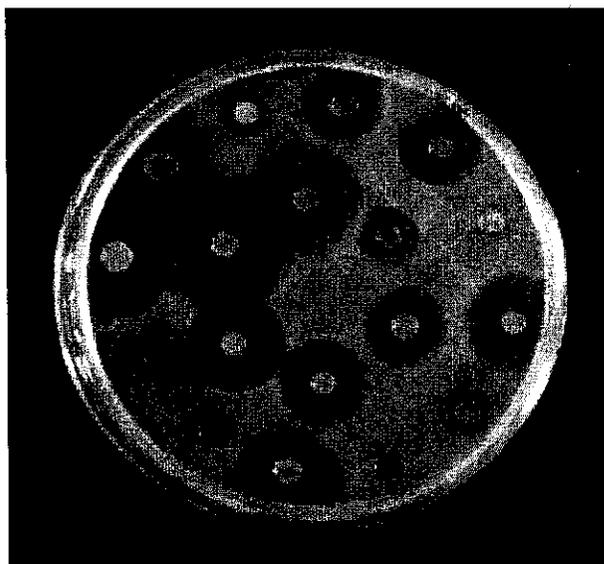
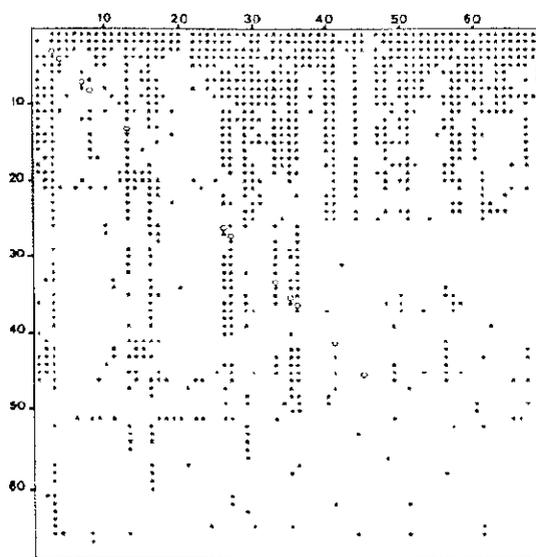


Figura 1. Espectro de sensibilidad de *Halobacterium salinarum* (en doble capa) frente a 18 cepas diferentes. En la imagen se pueden apreciar tanto las cepas productoras que han originado halos de inhibición, como las no productoras que han crecido sobre la doble capa.

en la doble capa. Se realiza el mismo procedimiento con cada una de las cepas en estudio hasta haber ensayado todas contra todas.

Uno de los problemas que se presentan en este tipo de estudios es que las cepas a enfrentar tengan una velocidad de crecimiento muy diferente. Normalmente, las halocinas estudiadas suelen producirse al final de la fase exponencial de crecimiento. Así, si la cepa que inoculamos en doble capa crece más rápido que las otras, cuando éstas inician la producción, la doble capa ya ha crecido y no se aprecian halos de inhibición. Para estos casos, será necesario emplear métodos alternativos para asegurar la presencia de la halocina antes de que crezca el microorganismo de la doble capa (p.e. cultivar las cepas de crecimiento lento en medio líquido hasta avanzada la fase exponencial y utilizar el cultivo en vez de la suspensión acuosa).

El resultado de un estudio de este tipo se muestra en la figura 2, donde las líneas horizontales representan los espectros de acción y las verticales los espectros de sensibilidad. Este tipo de estudios son muy interesantes, ya que aportan mucha información como los espectros de acción y de sensibilidad,



**Figura 2.** Actividades antagónicas entre 69 cepas de haloarqueas, debidas a la producción de halocinas. Al margen izquierdo se enumeran las cepas como productoras y en el superior las mismas cepas como indicadoras. (\*) Actividad inhibitoria positiva; (o) actividad inhibitoria frente a sí misma; los espacios en blanco indican ausencia de actividad.

diversidad de halocinas, si se trata de una característica frecuente o no, etc. Pero quizás tanto o más importante es el hecho de que abren un gran abanico de posibilidades de estudio de nuevas halocinas.

Siguiendo con el ejemplo ilustrado en la figura 2, se aprecia espectros de acción (líneas horizontales) muy extensos, por ejemplo los de las cepas nº 1 y 2 (margen izquierdo), que producen sendas halocinas capaces de inhibir a prácticamente todas las cepas. En contraste, las cepas de la mitad inferior de la imagen, presentan espectros de acción muy reducidos, ya que apenas inhiben a unas pocas. Del mismo modo, se puede observar los espectros de sensibilidad (líneas verticales), donde se observa cepas sensibles a muchas halocinas, como la cepa nº 3 (margen superior) frente a otras que no son sensibles a prácticamente ninguna, como la cepa nº 46 (margen superior).

Un aspecto destacable en la figura 2, es que prácticamente todos los microorganismos ensayados producen halocinas y que además los espectros de acción son aparentemente diferentes. Esto equivaldría a decir que existen tantas halocinas distintas como cepas se han ensayado, lo cual genera una expectativa casi inagotable de objetivos para futuros estudios. Sin embargo, antes de iniciar el estudio de una nueva halocina es importante comprobar que la actividad inhibitoria es realmente debida a una halocina y no a otra causa como a la producción de enzimas hidrolíticas o bacteriófagos.

## HALOCINAS ESTUDIADAS

En contraste con el gran número de halocinas que se han detectado, el número de ellas que han sido estudiadas en profundidad es muy reducido (tabla 1).

Como puede apreciarse en la tabla 1, la mayoría de las halocinas que se han caracterizado hasta el momento, excepto la II4 y la III, son péptidos de bajo peso molecular, más comparables a las microcinas bacterianas. Por ello, resulta más adecuado referirnos a ellas con el término microhalocinas. Además, al igual que algunas de las microcinas, éstas también se sintetizan como un precursor o pre-proteína de mayor peso molecular que posteriormente es procesada por la acción de proteasas para dar lugar a la forma madura de la halocina.

Tabla 1. Halocinas caracterizadas hasta la fecha.

HALOCINA	Microorganismo productor	Peso molecular	Precursor	1.ª Referencia
H4	<i>Haloferax mediterranei</i> R4 (ATCC 33500)	34,9 kD	No	Meseguer & Rodriguez-Valera, 1985 (6)
Hal R1	<i>Halobacterium</i> spp. GN101	2,5 kD	Si	Rdest & Sturm, 1987 (7)
Hal R2	<i>Halobacterium</i> spp. TuA4	6,2 kD	No hay datos	Rdest & Sturm, 1987 (7)
H6	<i>Haloferax gibbonsii</i> (ATCC 33959)	2,7 kD	Probablemente	Torreblanta <i>et al.</i> , 1989 (8)
H1	<i>Haloferax mediterranei</i> M2a	31 kD	No	Platas <i>et al.</i> , 1996 (9)
S8	Cepa S8a	3,58 kD	Si	Price & Shand, 2000 (10)
C8	<i>Halobacterium</i> spp. AS7092	6,3 kD	Si	Li <i>et al.</i> , 2003 (11)

Los genes que codifican halocinas, estudiados hasta el momento, se han localizado en plásmidos. Ésta también es una característica muy típica de las bacteriocinas bacterianas.

Un tema también interesante es el de la inmunidad. En la figura 2, se observa como algunas cepas manifiestan cierta sensibilidad a su propia halocina, aunque lo normal es que los microorganismos productores sean inmunes a su propio inhibidor. En bacterias, este efecto se ha identificado con la producción simultánea de proteínas responsables de la inmunidad, que impiden la actividad de la bacteriocina. Entre las halocinas, únicamente se ha descrito un caso, el de *Halobacterium* spp. AS7092 que produce HalC8 (halocina C8) y HalI (proteína responsable de la inmunidad) ambas codificadas en el mismo gen<sup>(12)</sup>.

A continuación, se describen las halocinas H4 y H6, por ser las más estudiadas con relación al mecanismo de acción.

#### Halocina H4

La halocina H4, la primera que se descubrió, fue estudiada y caracterizada en primera instancia por

nuestro grupo<sup>(6)</sup> y, con posterioridad, el gen fue clonado y secuenciado por otro grupo<sup>(13)</sup>. H4 se obtiene del sobrenadante de cultivos de *Hfx. mediterranei*. La máxima actividad se alcanza al final de la fase estacionaria, momento en el cual se eliminan las células para proceder a la extracción y purificación de la halocina. Se trata de una proteína que se sintetiza como una pre-proteína de 39.6 kD que luego es procesada para dar lugar a la forma madura de 34.9 kD. Es una proteína sal-dependiente y posee una región hidrofóbica de 32 residuos de aminoácidos en el centro de la secuencia peptídica. H4 posee un espectro de acción bastante amplio<sup>(4)</sup>. En contacto con las células sensibles, se adsorbe y produce la muerte celular, hinchando y deformando las células. Estudios realizados para determinar el mecanismo de acción, mostraron que produce inhibición tanto del transporte de aminoácidos como del retorno pasivo de protones al medio intracelular<sup>(14)</sup>. Las células tratadas con H4, sufren un aumento del volumen intracelular y se lisan. Tales efectos sugieren que el objetivo primario de esta halocina se encuentra localizado en la membrana citoplasmática y concuerdan con la presencia de la mencionada región hidrofóbica de la molécula. La H4 se uniría a la membrana alterando su permeabilidad y equilibrio iónico, produciendo finalmente la muerte celular.

### Halocina H6

La halocina H6 es, sin duda, la de mayor interés desde el punto de vista biotecnológico. Fue la segunda halocina estudiada por nuestro grupo y sigue siendo, todavía en la actualidad, objeto de nuestras investigaciones a nivel molecular y de aplicaciones.

H6 se obtiene a partir de cultivos de *Hfx. gibbonsii* al final de la fase exponencial de crecimiento (8). Tras eliminar las células, el sobrenadante se concentra por ultrafiltración tangencial utilizando membranas filtrantes de tienen un tamaño de poro inferior al tamaño de la proteína. Una propiedad curiosa de esta halocina es que empleando métodos poco agresivos para la purificación se obtiene una proteína activa de 32 kD (determinado por HPLC); sin embargo, cuando se utilizan métodos más agresivos para la clarificación o limpieza de la muestra, tales como la precipitación con acetona, la H6, que permanece en solución, se identifica en realidad con un péptido de 2-3 kD de peso molecular (determinado por SDS-PAGE) que tiene la misma actividad que la proteína de 32 kD (resultados no publicados). Todavía no están aclarados estos hechos, pero una hipótesis plausible es que el péptido de bajo peso molecular forma un agregado con otra molécula proteica que le sirve de transporte pero, al tratar con acetona se disgregan y, mientras el péptido se queda en el sobrenadante, la proteína mayor tamaño se precipita junto con otras proteínas. También es posible, que del mismo modo que sucede con otras microhalocinas, inicialmente se sintetice como una pre-proteína de 32 kD, que después es procesada por proteasas para dar la forma madura y activa de 2,7 kD. Pero una vez formada, en lugar de separarse completamente, la microhalocina permanece unida al resto de la mo-

lécula por uniones débiles (puentes de hidrógeno, cargas, etc.) aunque, en conjunto, lo suficientemente fuertes como para que requiera un tratamiento relativamente agresivo para su separación.

El aspecto más importante de la halocina H6, que sugiere su potencial aplicado, es su mecanismo de acción. La halocina H6 es un inhibidor específico del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  o NHE, (acrónimo del inglés: sodium proton exchanger)<sup>(14)</sup>. Las haloarqueas viven en un ambiente donde la concentración de  $\text{Na}^+$  alcanza valores de saturación (3-4 molar). Sin embargo, la concentración de  $\text{Na}^+$  en el medio intracelular, oscila entre valores de 0,5 a 3 dependiendo de las especies y, por encima de éstos valores, comienza a ser perjudicial para la actividad celular. Para contrarrestar la entrada de  $\text{Na}^+$ , estos microorganismos disponen de un NHE unidireccional activado por la fuerza protón motriz, que se encarga de extraer este catión del citoplasma en contra de su gradiente. Si el NHE deja de funcionar, la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular aumenta rápidamente, provocando un desajuste osmótico. El agua comienza a entrar, las células se hinchan progresivamente y finalmente se lisan (Figura 3).

Así pues, el mecanismo de acción de la halocina H6, realmente es un procedimiento tremendamente eficaz para destruir células de arqueas halófilas.

### APLICACIONES DE LAS HALOCINAS

El espectro de acción de la halocina H6 frente a otras haloarqueas, no es muy amplio, pero en contraste, su actividad no se restringe a las arqueas halófilas sino que sorprendentemente es capaz de inhibir el



Figura 3. Cambios morfológicos de células de *H. salinarum* tratadas con halocina H6. Las barras representan 1  $\mu\text{m}$ . (a) Células no tratadas; (b) después de 5 horas de iniciar el tratamiento; (c) a las 24 horas de iniciar el tratamiento.

NHE de células eucariotas. Este es el primer caso en que una bacteriocina o BLIS ejerce su efecto sobre organismos tan distantes filogenéticamente del productor. Sin embargo, este hecho no hace más que aportar una nueva evidencia de la relación entre arqueas y eucariotas. Además, esto es realmente lo que más importa desde el punto de vista aplicado de esta halocina, ya que el NHE es un mecanismo presente en todas las células conocidas, tanto procariontas como eucariotas. En todas ellas, es bidireccional (excepto en las arqueas halófilas), y tiene funciones tan importantes como la regulación del pH y el volumen intracelular. De hecho, en mamíferos algunos estados patológicos provocan la hiperactividad del NHE que causa daños irreversibles en las células que las conduce a la muerte. Tales estados patológicos son, por ejemplo, situaciones de isquemia como las que se producen en el infarto de miocardio o el cerebral. Si en esos procesos patológicos se pudiera administrar un inhibidor del NHE, muchas células podrían sobrevivir. Y esto es realmente lo que ocurre. Ensayos realizados en animales de experimentación han puesto de manifiesto un gran efecto protector del miocardio al suministrar halocina H6 intravenosa a los animales durante el infarto. En dichos experimentos también se demostró una importante reducción de arritmias y de la hipertensión arterial (15). Asimismo se ha demostrado *in vitro* que la H6 es activa sobre el NHE de células humanas en cultivo (15).

Estos resultados, que han sido objeto de una patente (15), permiten pensar en la utilización de la halocina H6 para la fabricación de fármacos para el tratamiento de procesos patológicos provocados por una hiperactividad del NHE. En la actualidad, existen algunos inhibidores del NHE, como ciertos derivados del amiloride, que están siendo objeto de estudio para su aplicación farmacológica. Sin embargo, frente a la especificidad de acción de la halocina H6, estas otras sustancias son menos específicas por lo que afectan otros mecanismos y producen efectos secundarios no deseables.

Otro caso de posible aplicación de las halocinas se refiere a su capacidad para inhibir el crecimiento de otras arqueas halófilas. Durante el procedimiento del curtido de pieles se utiliza la sal como conservante. Sin embargo, algunos microorganismos halófilos extremos presentes en dicha sal, pueden crecer sobre la piel y deteriorarla. Algunos autores han sugerido que el empleo de microorganismos productores de halocinas o de extractos de halocina, puede

ser de utilidad para prevenir el crecimiento de las halobacterias y evitar así las alteraciones que éstas ocasionan durante el curtido de la piel (16).

Con todo, lo que aquí se ha expuesto, es a duras penas, la punta del iceberg. Si se considera el gran número de halocinas que pueden existir y en la posibilidad de que tras cada una de ellas se esconda algún tipo de aplicación, es evidente que se tendría un extenso campo por explorar con enormes posibilidades biotecnológicas.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Konisky J. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* 1982; 36: 125-144.
2. Reeves P. The bacteriocins. *Molecular biology, biochemistry and biophysics.* 1972. Vol. 11 Springer-Verlag, New York.
3. Rodríguez-Valera F, Juez G, Kushner DJ. Halocins: Salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can. J. Microbiol.* 1982; 28: 151-154.
4. Meseguer I, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. *FEMS Microbiol Lett.* 1986; 36: 177-182.
5. Torreblanca M, Meseguer I, Ventosa A. Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods. *Lett. Appl Microbiol.* 1994; 19: 201-205.
6. Meseguer I, Rodríguez-Valera F. Production and purification of halocin H4. *FEMS Microbiol Lett.* 1985; 28: 177-182.
7. Rdest U, M Sturm. Bacteriocins from halobacteria. In *Protein Purification: Micro to Macro* pp. 271-278. New York: Alan R. Liss Inc. 1987.
8. Torreblanca M, Meseguer I, Rodríguez-Valera F. Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135: 2655-2661.
9. Platas G, Meseguer I, Amils R. Optimization of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xia3. *Microbiol SEM.* 1996; 12: 75-84.
10. Price LB, Shand RF. Halocin S8: a 36-Amino-Acid Microhalocin from the Haloarchaeal Strain S8a. *J. Bacteriol.* 2000; 182(17): 4951-4958.