

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR



**CARACTERIZACION FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LMM-PBP4 Y
ANALISIS DE SU PAPEL MODULADOR EN LA INTEGRIDAD
MOLECULAR DEL PEPTIDOGLICANO PARA EL MODELO
BACTERIANO *Pseudomonas aeruginosa***

TESIS DOCTORAL

CRISTIAN GUSTAVO AGUILERA ROSSI

2015



CARACTERIZACION FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LMM-PBP4 Y ANALISIS DE SU PAPEL
MODULADOR EN LA INTEGRIDAD MOLECULAR DEL PEPTIDOGLICANO PARA EL MODELO
BACTERIANO *Pseudomonas aeruginosa*

Memoria presentada por Cristian Gustavo Aguilera Rossi para optar al grado de
Doctor en Microbiología por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis Doctoral
Dr. Juan Alfonso Ayala Serrano

Madrid, Febrero de 2015

“But you look at science (or at least talk of it) as some sort of demoralising invention of man, something apart from real life, and which must be cautiously guarded and kept separate from everyday existence. But science and everyday life cannot and should not be separated. Science, for me, gives a partial explanation of life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment”

Rosalind Franklin

A mis padres, hermana, sobrinos

y a mi pequeña Irene...

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido posible gracias al financiamiento obtenido desde los siguientes proyectos de investigación en los que el Laboratorio de División Celular Bacteriana y Resistencia a Antibióticos del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” ha participado.

I.P. Ayala Serrano, J. A. 2007. COMBACT. Nuevas dianas para combatir a las bacterias patógenas. Enero 2007-Diciembre 2010. Instituto de Biología Molecular, C.B.M.S.O., C.S.I.C, Madrid. Programa de actividades de I+D entre grupos de investigación de la Comunidad de Madrid en Biociencias, Consejería de Educación, Comunidad de Madrid, S-BIO-0260/2006

I.P. Ayala Serrano, J. A. 2009. Nuevas funcionalidades de las proteínas fijadoras de penicilina en diferentes especies de bacteria. Octubre 2009-Septiembre 2012. Instituto de Biología Molecular, C.B.M.S.O., C.S.I.C., Madrid. Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica del Ministerio de Ciencia e Innovación/Programa BioFundamental/Proyecto BFU2009-09200

I.P. Ayala Serrano, J. A. 2008. DIVINOCELL. Exploiting Gram-negative cell division targets in the test tube to obtain antimicrobial compounds. Marzo 2009-Febrero 2013. Instituto de Biología Molecular, C.B.M.S.O., C.S.I.C., Madrid. Collaborative project: Small and medium-size research Project. HEALTH-2007-2.3.1-1: Novel targets for drugs against Gram negative bacteria. Specific Programme “Cooperation” Theme “Health”, Call identifier: FP7-HEALTH-2007-B. Proposal N°: 223431

El autor de esta investigación ha realizado su periodo formativo gracias a la consecución de una beca para estudios de Doctorado en el Extranjero-Becas Chile (Folio 72090404, Res. Ex. N°164, Res. Ex. N°2570). Programa de Formación de Capital Humano Avanzado, Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), Gobierno de Chile

Esta Tesis Doctoral es, sin duda, fruto del esfuerzo y dedicación personal, pero también del trabajo colectivo y solidario de muchas personas, que desde el ámbito profesional y personal, me han ayudado y contenido durante este período formativo, permitiendo que mi estancia en España y particularmente en el Laboratorio de División Celular Bacteriana y Resistencia a Antibióticos del CBMSO, haya sido una experiencia de vida tremendamente enriquecedora. No ha sido fácil, pero la compañía, el aliento y la contribución de muchos, debe ser destacada.

Quisiera agradecer, en primer lugar, al Prof. Dr. Juan Alfonso Ayala Serrano, Director de mi Tesis Doctoral, Investigador Principal del Laboratorio de División Celular Bacteriana y Resistencia a Antibióticos y científico referente en el estudio de proteínas implicadas en el metabolismo del peptidoglicano, por permitirme formar parte de su equipo de investigación, por su pasión en la ciencia, por su ayuda en todo momento, por su amabilidad, sus palabras, su confianza, su calidad docente, y particularmente, por permitirme evolucionar y crecer en esta disciplina que amo profundamente

Al Prof. Dr. Miguel Ángel de Pedro Montalbán, Investigador Principal del grupo de Morfogénesis Bacteriana, por su apoyo experimental y valiosa cooperación en nuestro trabajo, nadie mejor que él si se desea profundizar en el estudio molecular y estructural de la pared celular.

Al Dr. Paulino Gómez-Puertas, líder del grupo de Modelado Molecular del CBMSO, por su tiempo, su excelente disponibilidad y significativa colaboración en nuestro estudio, que ha permitido obtener información estructural importante a partir de la aplicación de una disciplina científica (bioinformática) con enormes potencialidades.

A la Dra. Silvia Marina González-Leiza, por su ayuda permanente y en toda situación (profesional y personal), su tiempo, sus consejos, su generosidad, su compañía, su calidad humana, su excepcional sentido del humor, sus conversaciones, y sobre todo, por la amistad y el cariño que se ha establecido, sentimientos y relación que seguro trascenderán. Eres una gran mujer, una magnífica investigadora, una amiga como pocas. Te quiero mucho, y espero que nos veamos muy pronto, en Chile o en Uruguay.

A mis compañeros: Ayelén, Ana, Paula, Margarita, Sandra, Andrea, Pilar, María, Manon, Bárbara, Olga, Héctor, Enrico, Godofrey, Ali, Francisco, Akbar, Gonzalo y Tobias, integrantes de este grupo de investigación durante sus respectivas etapas formativas de pregrado y postgrado, que han dado vida a este laboratorio, y cuya diversidad, desde el punto de vista de sus nacionalidades, ha entregado un sello particular, generando un aprendizaje personal muy valioso.

A Alaa, mi compañero egipcio, quien a pesar de la barrera cultural e idiomática, estuvo presente y compartió junto a mí "casi" la totalidad de los buenos y malos momentos vividos durante todos estos años de trabajo, destacando siempre por su carácter respetuoso, su amabilidad, su excelente predisposición al trabajo, su solidaridad, su buen sentido del humor y su amistad. No se olvidará.

Agradecimientos

Al personal de los servicios científicos y técnicos del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”: Fermentación, Genómica, Proteómica, Microscopía Óptica y Confocal, Microscopía Electrónica, Bioinformática, Animalario, Diseño Gráfico-Fotografía, Cultivos, Esterilización, Instrumentación, Informática, Seguridad Biológica y Biblioteca, unidades que muy amablemente y con absoluto profesionalismo atendieron cada una de mis consultas, y contribuyeron a la culminación de esta aventura; sin duda, personas imprescindibles para el desarrollo de una investigación científica de calidad.

Al personal investigador, técnico y estudiantes del laboratorio 109 (laboratorio vecino), por el apoyo proporcionado, y el reconocimiento para cada una de aquellas personas de este Centro de Investigación, que diligentemente respondieron y me brindaron su ayuda, al solicitarla masivamente a través del correo institucional, un ejemplo simple de solidaridad, pero extraordinariamente importante y digno de imitar, que me ha sorprendido gratamente.

Al personal predoctoral y postdoctoral de los laboratorios dirigidos por el Dr. José Luis Martínez, Dr. Fernando Rojo, Dr. Jesús Blázquez y Dr. Víctor de Lorenzo, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), por la asistencia proporcionada para el adecuado desarrollo de esta investigación.

El agradecimiento a mis compañeros de trabajo en Chile (Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco-Chile), por sus ánimos permanentes que han hecho mucho más llevadera la situación de distancia. A las autoridades del Departamento, Facultad y Universidad, por potenciar y favorecer este tipo de iniciativas formativas, entregando un sólido y necesario respaldo institucional.

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT), específicamente al Programa de Formación de Capital Humano Avanzado y su iniciativa Becas Chile para estudios de Doctorado en el Extranjero, por promover el crecimiento personal, profesional y académico en áreas tan diversas del conocimiento, contribuyendo al desarrollo de nuestro país.

A mi familia, que tanto extraño desde el primer día lejos de casa, mi padre (te recuerdo permanentemente, esto es por ti y para ti), mi madre, mi hermana y mis sobrinos, que siempre me han entregado su amor, fortaleza y apoyo en cada una de las empresas que he iniciado, aceptando con gran generosidad las dificultades que estas decisiones implican. Son lo mejor que tengo, los amo demasiado y los llevo siempre conmigo.

Y finalmente, gracias a ti Irene (mi pequeña), por la paciencia que has tenido, por cada instante compartido, por tu sonrisa, por tus comidas (torrijas), por ese encanto tan tuyo que me ha permitido olvidar lo malo y enfocarme en lo importante, por tu incondicional fuerza y soporte, por tu cariño, por tu dedicación y amistad, por nuestros viajes, por mostrarme tu país y tu segundo país, por estar a mi lado, por tu amor sincero, leal y verdadero. Lo mejor de España eres tú, lo mejor de estos cuatro años eres tú. TE AMO.

INDICE

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

SUMMARY

1. INTRODUCCION	3
1.1. Modelo bacteriano <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.1.1. Género <i>Pseudomonas</i>	3
1.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Antecedentes	4
1.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Importancia clínica	4
1.1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Virulencia-Patogenicidad	5
1.1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Resistencia bacteriana	6
1.1.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Fenotipos y mecanismos de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos	7
1.1.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Mecanismos de resistencia. Inactivación enzimática	7
1.1.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Mecanismos de resistencia. Eflujo activo	9
1.1.9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Mecanismos de resistencia. Permeabilidad alterada	9
1.1.10. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Mecanismos de resistencia. Modificación del sitio blanco	9
1.2. Peptidoglicano	10
1.2.1. Pared Celular-Peptidoglicano. Antecedentes	10
1.2.2. Peptidoglicano. Biosíntesis	11
1.2.3. Peptidoglicano. Recambio-Reciclaje	12
1.2.4. Peptidoglicano. Parámetros estructurales	14
1.2.5. Peptidoglicano. Propiedades biofísicas. Modelo de crecimiento y arquitectura	16
1.3. <i>Penicillin-Binding Proteins</i>	19
1.3.1. <i>Penicillin-Binding Proteins</i> . D,D-peptidasas	19
1.3.2. <i>Penicillin-Binding Proteins</i> . Clasificación	20
1.3.3. <i>Penicillin-Binding Proteins</i> . Características estructurales y funcionales	21
1.3.4. <i>Penicillin-Binding Proteins</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.3.5. <i>Penicillin-Binding Proteins</i> . HMM-PBPs para el modelo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.3.5.1. HMM-PBP clase A. PBP1a-PBP1b	23
1.3.5.2. HMM-PBP clase B. PBP2	24
1.3.5.3. HMM-PBP clase B. PBP3	24
1.3.5.4. HMM-PBP clase B. PBP3a (PBP3x)	25
1.3.6. <i>Penicillin-Binding Proteins</i> . LMM-PBPs para el modelo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
1.3.6.1. LMM-PBP clase C. PBP5/6	26
1.3.6.2. LMM-PBP clase C. PBP7	27
1.4. Mecanismo de inducción de β-lactamasa cromosomal AmpC en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
1.4.1. β -lactamasa AmpC en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
1.4.2. Reciclaje de peptidoglicano y mecanismo regulador de la inducción de AmpC	28

1.4.3.	Proteínas involucradas en la regulación de la producción de AmpC	29
1.4.3.1.	Regulador transcripcional. AmpR	29
1.4.3.2.	Permeasas. AmpG-AmpP	30
1.4.3.3.	β -N-acetilglucosaminidasa. NagZ	31
1.4.3.4.	N-acetilmuramil-L-alanina amidasas. AmpD-AmpDh2-AmpDh3	31
1.4.3.5.	Proteína AmpE	32
1.4.3.6.	Sistema regulador CreBCD	33
1.4.4.	Mecanismos de desrepresión de <i>ampC</i>	33
1.4.5.	LMM-PBP4 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e hiperproducción de AmpC	34
1.4.6.	Modelos de regulación para β -lactamasa cromosomal AmpC en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
2.	OBJETIVOS	41
3.	MATERIALES Y METODOS	45
3.1.	Caracterización funcional y estructural de LMM-PBP4 para el modelo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
3.1.1.	Cepas bacterianas, plásmidos, fagos, <i>primers</i> y constructos recombinantes	45
3.1.2.	Condiciones de crecimiento	45
3.1.3.	Identificación de secuencias nucleotídica, aminoacídica y ambiente genético para LMM-PBP4. Predicción de péptido señal y estructura secundaria. Homología de secuencias entre proteínas ortólogas	49
3.1.4.	Diseño de constructos, clonaje, secuenciación e inducción de proteínas recombinantes	49
3.1.5.	Susceptibilidad antimicrobiana y microscopía de campo claro en cultivos no inducidos e inducidos	50
3.1.6.	Sobreexpresión, aislamiento y purificación para formas soluble e insoluble de LMM-PBP4	51
3.1.7.	Digestión de secuencia His-tag por proteasa TEV	52
3.1.8.	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Transferencia e inmunodetección (<i>western blot</i>)	52
3.1.9.	Análisis proteómico de proteínas recombinantes purificadas. Espectrometría de masas	53
3.1.10.	Lisogenización de estirpe mutante <i>E. coli</i> DV900	54
3.1.11.	Células competentes para lisógenos <i>E. coli</i> DV900(λ DE3). Transformación, inducción y expresión de clones recombinantes	54
3.1.12.	Preparación de proteínas de membranas	54
3.1.13.	Ensayos de unión a penicilina fluorescente BOCILLIN™ FL	55
3.1.14.	Ensayos de competencia. Determinación de IC ₅₀	55
3.1.15.	Cuantificación de actividad β -lactamasa	56
3.1.16.	Actividad D,D-carboxipeptidasa sobre sustrato tripéptido sintético	56
3.1.17.	Aislamiento de peptidoglicano	57
3.1.18.	Preparación y separación de muropéptidos	57
3.1.19.	Purificación y cuantificación de muropéptidos	59
3.1.20.	Actividad D,D-peptidasa sobre peptidoglicano macromolecular. Análisis por HPLC	60
3.1.21.	Actividad D,D-peptidasa sobre sustrato natural (muropéptidos purificados). Análisis por HPLC	60
3.1.22.	Fraccionamiento celular. Localización subcelular	61

3.1.23.	Imunización y producción de anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 (PAO1)	62
3.1.24.	Purificación de anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 por cromatografía de afinidad	63
3.1.25.	Ensayo de absorción para anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4	63
3.1.26.	Fijación, permeabilización e inmunomarcaje para LMM-PBP4 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
3.1.27.	Microscopía y procesamiento de imágenes	65
3.1.28.	Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Identificación de secuencia aminoacídica con estructura conocida y de mayor similitud para simulación bioinformática	65
3.1.29.	Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Modelado bioinformático por homología	66
3.1.30.	Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Distancias entre residuos catalíticos	66
3.1.31.	Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Interacción enzima-sustratos	66
3.1.32.	Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Cálculo de energías de <i>binding</i> con sustratos inductores	67
3.2.	Análisis del papel modulador de LMM-PBP4 en la integridad molecular del peptidoglicano para el modelo bacteriano <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
3.2.1	Cepa de referencia y mutantes de inserción por transposición para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
3.2.2.	Condiciones de crecimiento	68
3.2.3.	Confirmación de identidad para mutantes de inserción por transposición desde librería PA14NR	68
3.2.4.	Vectores de expresión para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
3.2.5.	Constructos recombinantes para el modelo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
3.2.6.	Células competentes para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Transformación por electroporación	70
3.2.7.	Selección de transformantes en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71
3.2.8.	Inducción y sobreexpresión de clones recombinantes en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71
3.2.9.	Peptidoglicano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en condiciones naturales y de sobreexpresión	72
3.2.10.	Peptidoglicano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en condiciones de inactivación antibiótica	72
3.2.11.	Aislamiento de peptidoglicano	72
3.2.12.	Preparación y separación de muropéptidos	72
3.2.13.	Muropéptidos purificados. Análisis proteómico	73
4.	RESULTADOS	77
4.1.	Identificación de secuencias nucleotídica, aminoacídica y ambiente genético para LMM-PBP4. Predicción de péptido señal-estructura secundaria. Homología de secuencia entre proteínas ortólogas	77
4.1.1.	Antecedentes genómicos para locus PA3047 y PA14_24690 en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77
4.1.2.	Análisis de secuencias nucleotídicas PA3047 y PA14_24690 en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
4.1.3.	Antecedentes proteómicos para DacB en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Predicción de péptido señal y estructura secundaria. Homología de secuencia entre proteínas ortólogas	80
4.2.	Constructos recombinantes. Inducción, sobreexpresión, aislamiento y purificación de formas soluble e insolubles para LMM-PBP4 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	85
4.3.	Análisis de proteínas recombinantes purificadas mediante MALDI-TOF. Espectrometría de masas	90
4.4.	Susceptibilidad antimicrobiana y microscopía de campo claro para clones recombinantes transformados en <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	91

Indice

4.5.	Lisogenización de estirpe mutante <i>E. coli</i> DV900. Transformación, inducción y expresión de proteínas recombinantes	93
4.6.	Digestión de secuencia His-tag por proteasa TEV para proteína recombinante PBP4(SPS)HN y confirmación de su actividad enzimática	95
4.7.	Afinidad para LMM-PBP4 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> O1. Ensayos de competencia (IC ₅₀)	98
4.8.	Actividad β-lactamasa específica	102
4.9.	Actividad D,D-carboxipeptidasa <i>in vitro</i> sobre sustrato sintético	103
4.10.	Actividad D,D-peptidasa sobre peptidoglicano macromolecular. Análisis por HPLC	104
4.11.	Estudio cinético para actividad D,D-peptidasa sobre muropéptidos purificados. Análisis por HPLC	109
4.12.	Fraccionamiento celular. Localización subcelular	112
4.13.	Producción y purificación de anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> O1	116
4.14.	Inmunolocalización de LMM-PBP4 en el modelo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	118
4.15.	Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Identificación de secuencias aminoacídicas con estructura conocida y de mayor similitud para modelado bioinformático	123
4.16.	Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Modelado bioinformático por homología	125
4.17.	Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Interacción enzima-sustratos	133
4.18.	Análisis del papel modulador de LMM-PBP4 en la integridad molecular de la pared celular para el modelo bacteriano <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Confirmación de identidad para mutantes de inserción por transposición desde librería genómica PA14NR	137
4.19.	Análisis del papel modulador de LMM-PBP4 en la integridad molecular de la pared celular. Constructos recombinantes para el modelo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y ensayos de inducción	139
4.20.	Análisis del papel modulador de LMM-PBP4 en la integridad molecular de la pared celular. Peptidoglicano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en condiciones naturales, de complementación, sobreexpresión e inactivación antibiótica	141
4.21.	Muropéptidos purificados. Análisis proteómico	154
5.	DISCUSION	165
6.	CONCLUSIONES	177
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	181
8.	ANEXOS	195

Símbolos y abreviaturas

Å	: ångström (10^{-10} metros)
aa	: aminoácido
ADN	: ácido desoxirribonucleico
ADP	: adenosina difosfato
AM	: ampicilina
AMC	: amoxicilina/ácido clavulánico
ARN	: ácido ribonucleico
ATM	: aztreonam
ATP	: adenosina trifosfato
BrEt	: bromuro de etidio
BSA	: albúmina de suero bovino
C	: cloranfenicol
CAZ	: ceftazidima
CBMSO	: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CFFT	: Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics
cm	: centímetro
COG	: Clusters of Orthologous Groups
CRO	: ceftriaxona
CSIC	: Consejo Superior de Investigaciones Científicas
C-terminal	: carboxilo terminal (-COOH)
CTX	: cefotaxima
dATP	: desoxiadenosina trifosfato
dGTP	: desoxiguanosina trifosfato
DMSO	: dimetilsulfóxido
D44N	: dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido anhidro
EBI	: European Bioinformatics Institute

Símbolos y abreviaturas

EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
EMBL	: European Molecular Biology Laboratory
FAD	: dinucleótido de flavina-adenina (forma oxidada)
Fc	: fragmento cristalizable (dominio constante)
FOX	: cefoxitina
g	: gramos
GM	: gentamicina
GM ₁	: ganglio-N-tetraosilceramida
G+C	: guanina + citosina
G+T	: guanina + timina
CRG	: Centre de Regulació Genòmica (Barcelona)
h	: hora
His-tag	: etiqueta de polihistidina
HQ-tag	: etiqueta histidina-glutamina
HRP	: peroxidasa de rábano picante
ID	: identificador (número único asignado)
IgG	: inmunoglobulina G
IPM	: imipenem
IPTG	: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
IQFR	: Instituto de Química Física Rocasolano
K	: kanamicina
Kb	: kilobase (10 ³ pares de bases)
Kcal	: kilocaloría
<i>k_{cat}</i>	: constante catalítica
kDa	: kilo Dalton (10 ³ daltons)
kg	: kilogramo (10 ³ gramos)
<i>K_m</i>	: constante de Michaelis-Menten

kV	: kilovoltio
M	: molaridad
mA	: miliamperio
MALDI-TOF	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
Mb	: megabase (10^6 pares de bases)
mg	: miligramo (10^{-3} gramos)
min	: minuto
ml	: mililitro (10^{-3} litros)
mM	: milimolar (10^{-3} molar)
mm	: milímetro
N	: normalidad
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ng	: nanogramo (10^{-9} gramos)
Ni	: níquel
nm	: nanómetro (10^{-9} metros)
nmol	: nanomol (10^{-9} moles)
NN	: tobramicina
n-PB	: <i>non-Penicillin-Binding</i>
N-terminal	: amino terminal (-NH ₂)
ORF	: Open Reading Frame
PA14NR	: PA14 no redundante
PB	: <i>Penicillin-Binding</i>
pb	: pares de bases
PBS	: tampón fosfato salino
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
PDB	: Protein Data Bank
<i>Pfu</i>	: <i>Pyrococcus furiosus</i>

Símbolos y abreviaturas

PIR	: Protein Information Resources
pK_a	: constante de disociación ácida
pI	: punto isoeléctrico
P_i	: fosfato inorgánico
PP	: pirofosfato
psi	: libras por pulgada cuadrada
rpm	: revoluciones por minuto
s	: segundo
SDS	: dodecilsulfato sódico
SIB	: Swiss Institute of Bioinformatics
TE	: tetraciclina
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TFA	: ácido trifluoroacético
TIC	: ticarcilina
T_m	: temperatura de <i>melting</i>
Tn	: transposón
UDP	: uridina difosfato
UFC	: unidad formadora de colonias
UFP	: unidad formadora de placas
V	: volts
V_{max}	: velocidad máxima
WT	: wild-type
X-Gal	: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
α	: alfa
β	: beta
γ	: gamma
ϵ	: épsilon

λ	: lambda
μF	: microfaradio
μg	: microgramos (10^{-6} gramos)
μl	: microlitro (10^{-6} litros)
μM	: micromolar (10^{-6} molar)
μm	: micrómetro (10^{-6} metros)
$^{\circ}\text{C}$: grado centígrado/Celsius
^{14}C	: carbono-14
::	: inserción
~	: aproximación
Δ	: delección; cambio en una variable
Ω	: ohmio
A	: adenina
T	: timina
C	: citosina
G	: guanina
A (Ala)	: alanina
C (Cys)	: cisteína
D (Asp)	: ácido aspártico
E (Glu)	: ácido glutámico
F (Phe)	: fenilalanina
G (Gly)	: glicina
H (His)	: histidina
I (Ile)	: isoleucina
K (Lys)	: lisina
L (Leu)	: leucina
M (Met)	: metionina

Símbolos y abreviaturas

N (Asn)	: asparagina
P (Pro)	: prolina
Q (Gln)	: glutamina
R (Arg)	: arginina
S (Ser)	: serina
T (Thr)	: treonina
V (Val)	: valina
W (Trp)	: triptófano
Y (Tyr)	: tirosina

Nosocomial and community-acquired infections by *Pseudomonas aeruginosa* continue to represent a major therapeutic challenge where the choice of an appropriate antibiotic is essential. Resistance of this pathogen against β -lactam antibiotics is mainly determined by the production of inactivating enzymes (β -lactamases) AmpC type whose regulatory mechanism is much more complex than the existing in members of the *Enterobacteriaceae* family, by including the protein AmpR responsible for regulation of additional genes in regards to *ampC*, such as *ampE* and *creD* as well as *dacB*, involved in the overproduction of this cephalosporinase. The connection between the replacement and recycling processes of peptidoglycan and its regulatory pathways for constitutive overproduction of chromosomal AmpC β -lactamase, particularly the mechanism associated with inactivation of PBP4, raises a need for detailed structural and functional research of this LMM-PBP class C subclass C1 in *Pseudomonas aeruginosa* that allows to establish similarities and differences with other low molecular mass penicillin-binding proteins in this bacterial model and between functional orthologs from related species, also evaluating its participation in the metabolism of cell wall and the biology of resistance to β -lactam antibiotics.

The methodological approach designed and implemented to address this Thesis demonstrated the lack of β -lactamase activity for the LMM-PBP4 native form, the presence of DD-carboxypeptidase and DD-endopeptidase activities in this protein (this last was defined as the predominant activity) and its absence at the site of cell division discarding its association with septal and bacterial divisome proteins. Its subcellular localization in the inner membrane and periplasmic space strengthens its proposal as a potential hydrolase-autolysin associated with the maturation-recycling of the peptidoglycan. The high affinity demonstrated between the β -lactam antibiotics cefoxitin and imipenem with LMM-PBP4 (purified and bound to membrane) correlates with the binding activity for these proteins and their probable inactivation and its role on constitutive overproduction of AmpC β -lactamase. The structural model for the monomeric unit of LMM-PBP4 confirms the presence of domains II and III which define it as a LMM-PBP class C subclass C1 allowing to estimate the dimension of the cavity in the active site that favors the access of large substrates and recognizes the existence of a threonine amino acid at position 386 (T386) which would accommodate the peptide chain of a second strand of peptidoglycan. These structural precedents support the development of a DD-endopeptidase activity in this protein.

Analysis of the cell wall in relation to its muropeptides composition from the reference strain and mutants in regulatory proteins for AmpC production (DacB, AmpE, AmpDh2) under natural conditions, supplementation-overexpression and antibiotic inactivation of LMM-PBP4, exhibits no changes to propose an activation system for *ampC* via an effector of pentapeptide nature but confirms in vivo the DD-peptidase bifunctionality mentioned above. Moreover, it was achieved the identification of new muropeptides related to structure and functionality still not described in *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCION

1

1. Introducción

1.1. Modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1. Género *Pseudomonas*

Se encuentra taxonómicamente aceptado que el orden *Pseudomonadales* pertenece a la clase *Gammaproteobacteria*, al *phylum Proteobacteria*, y comprende las familias *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae*. La familia *Pseudomonadaceae* incluye los géneros *Azomonas*, *Azotobacter*, *Azorhizophilus*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, *Serpens* y *Pseudomonas* (Brenner *et al.*, 2005). El género *Pseudomonas* es reconocido por su versatilidad metabólica y plasticidad genética, e incluye especies que crecen rápidamente, presentan habilidad para metabolizar una amplia variedad de sustratos, son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos, y son ubicuos, capacidad determinada por sus requerimientos nutricionales simples que favorece, en algunas especies, un eventual comportamiento como patógeno (Brenner *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2009). Las especies del género presentan una morfología bacilar recta o ligeramente curvada, y de tamaño variable (1.5-5 μm de longitud y 0.5-1 μm de diámetro), son bacterias Gram negativas, no esporuladas y su movilidad está determinada por la existencia de uno o más flagelos polares. La mayoría de las especies no requiere factores de crecimiento, son oxidasa positivo (o negativo) y catalasa positivo, e incapaces de fermentar lactosa, pero pueden degradar la glucosa oxidativamente y llevar a cabo procesos de desnitrificación. Poseen un metabolismo respiratorio estrictamente aerobio, con el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque algunos aislados pueden crecer lentamente en condiciones anaerobias utilizando nitrato como aceptor alternativo. Pueden ser encontradas y aisladas desde ecosistemas muy diversos (agua, suelo, sedimentos, plantas, tejido animal, hongos, rizósfera, etc.), principalmente en condiciones aerobias, mesófilas y de pH neutro, pudiendo comportarse en la naturaleza como organismos saprófitos o parásitos. Tienen la capacidad de producir colonias distintivas en cuanto a tamaño, color, forma, bordes y ornamentación superficial. El pigmento soluble piocianina (color azul-verdoso) corresponde a una fenazina característica de *Pseudomonas aeruginosa*; entre las fenazinas insolubles (asociadas a estructuras celulares o difusibles en una extensión limitada) se encuentran: clororafina (*P. chlororaphis*), oxiclolorafina (*P. aureofaciens*), piorubina (*P. aeruginosa*), además de un pigmento azul intracelular (*P. fluorescens* biovar IV), indigoidina (*P. indigofera*) y pigmentos tipo melanina producidos por algunas cepas de *P. aeruginosa*, incluidos en esta categoría; la pioverdina, un pigmento fluorescente de color amarillo-verdoso, es considerada el principal sideróforo en especies del género *Pseudomonas*. En cuanto a su utilidad, especies del género presentan una tendencia a aceptar modificaciones genéticas, por lo que han sido reconocidas como agentes importantes en aplicaciones biotecnológicas e industriales. La combinación de todas estas respuestas adaptativas ubica a determinadas especies de este género, en una posición favorable respecto a otros géneros bacterianos (Gunsalus *et al.*, 1986; Brenner *et al.*, 2005; Falkow *et al.*, 2006).

1.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*. Antecedentes

La denominación de la especie deriva de la palabra latina *aeruginosum* “cubierto de óxido de cobre”, por el característico color verdoso que presentan sus colonias debido a la producción de los pigmentos pioocianina y piooverdina. *Pseudomonas aeruginosa* corresponde a un bacilo Gram negativo aerobio, metabólicamente versátil (puede utilizar más de 80 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía) y con una temperatura óptima de crecimiento de 37°C (Brenner *et al.*, 2005). La secuenciación del genoma de *P. aeruginosa* cepa O1 (PAO1) ha permitido entender el rol de esta especie como patógeno bacteriano; el tamaño de su genoma (6.3 Mb) posee una relación directa con la complejidad genética presente en esta bacteria (mayor número de genes de función única). PAO1 posee además, un número importante de genes parálogos, indicando que su genoma ha evolucionado mediante expansión génica, lo que sugiere procesos de adaptación a la colonización y de evolución en su *fitness* competitivo para un amplio rango de nichos ecológicos. PAO1 codifica un gran número de proteínas reguladoras y de membrana externa e interna, lo que es consistente con su exposición a ambientes diversos; esta bacteria presenta además, un número importante de transportadores, genes relacionados a sistemas de secreción tipo I, II y III, e involucrados en quimiotaxis y movilidad bacteriana (Stover *et al.*, 2000; Silby *et al.*, 2011). El genoma de otra cepa tipo *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 (PA14) también ha sido secuenciado, demostrando un tamaño ligeramente superior al de PAO1 (6.5 Mb) y alta similitud (92% del genoma de PA14 está presente en PAO1, y 96% del genoma de PAO1 está contenido en PA14). El genoma de PA14 posee 322 secuencias codificantes más que el de PAO1, además de genes agrupados en *clusters* en áreas de bajo %G+C, sin embargo, la principal diferencia genómica entre PAO1 y PA14, relacionada con virulencia, es la presencia de dos islotes de patogenicidad en ésta última. La mayor virulencia demostrada en la cepa PA14, la ha transformado en un modelo adecuado para la investigación de las bases genéticas que condicionan la virulencia-patogenicidad en la especie (Lee *et al.*, 2006).

1.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*. Importancia clínica

En el ser humano, *Pseudomonas aeruginosa* se comporta como un patógeno oportunista, capaz de afectar un amplio rango de tejidos, y generar episodios clínicos de infección asociados al compromiso de los mecanismos de defensa del hospedador (Lyczak *et al.*, 2000). Las tasas de colonización de *P. aeruginosa*, varían desde 0-2% para la piel, 0-3.3% en fosas nasales, 0-6.6% en vías respiratorias altas, y 2.6-24% en tracto digestivo. Estos índices pueden incrementarse durante el período de hospitalización en pacientes que han sufrido la alteración de sus barreras mucosa o cutánea por procedimientos médicos invasivos (ventilación mecánica, traqueotomía, cateterización, cirugía, quemaduras), con inmunidad debilitada y como resultado de terapia antimicrobiana. *P. aeruginosa* ha sido identificado como el quinto patógeno más frecuentemente aislado en el ambiente hospitalario, representando cerca del 9% del total de infecciones nosocomiales en los Estados Unidos. Es también la segunda causa de neumonía nosocomial (14-16%), la tercera causa de infecciones del tracto urinario (7-11%), el cuarto patógeno aislado en infecciones de sitio quirúrgico (8%) y el séptimo agente en infecciones del torrente circulatorio (2-6%). Datos derivados de un estudio

europeo identifican a *P. aeruginosa* como la segunda causa más frecuente de infecciones adquiridas en unidades de cuidados intensivos, siendo responsable del 30% de los casos de neumonías, del 19% de los episodios de infecciones del tracto urinario y del 10% de las infecciones del torrente circulatorio (Lister *et al.*, 2009). La presencia de tres sistemas de *quorum sensing*, cinco sistemas de secreción (de los seis descritos para bacterias Gram negativas), factores sigma y sistemas reguladores de dos componentes, controlando la virulencia y resistencia en *P. aeruginosa*, dan cuenta de la enorme versatilidad patogénica en esta bacteria (Bleves *et al.*, 2010; Silby *et al.*, 2011).

1.1.4. *Pseudomonas aeruginosa*. Virulencia-Patogenicidad

Condiciones de inmunosupresión general predisponen a una variedad de infecciones bacterianas y fúngicas, que ocultan información específica sobre virulencia y patogenicidad en *Pseudomonas aeruginosa*. En este sentido, infecciones pulmonares crónicas (en pacientes con fibrosis quística), bacteriemia en quemaduras graves y queratitis ulcerativa aguda, son los procesos infecciosos que mayor cantidad de antecedentes entregan al entendimiento de la capacidad de esta bacteria para producir enfermedad. Una de las características más llamativas de la infección pulmonar por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística; un trastorno autosómico recesivo resultado de una mutación en el gen codificante de la proteína RTFQ (proteína reguladora de la conductancia transmembrana en fibrosis quística); es que la condición de cronicidad se relaciona con la transición del microorganismo a un fenotipo mucoso, resultado de la producción de alginato. Evidencias recientes sugieren que la proteína RTFQ, además de su función en el transporte de sal y secreción de fluidos, influye directamente en la infección pulmonar a través de su rol como receptor epitelial para este microorganismo. La internalización de *P. aeruginosa* en el epitelio de las vías aéreas, constituye un mecanismo de defensa que minimiza la carga bacteriana, situación que fracasa en pacientes con fibrosis quística y favorece el establecimiento de infección crónica. Una respuesta inflamatoria exagerada (altos niveles de mediadores inflamatorios oxidativos y no-oxidativos), consecuencia de infecciones previas por otros patógenos respiratorios, genera un compromiso de la barrera epitelial o acumulación de células senescentes, que fomenta la persistencia bacteriana (Lyczak *et al.*, 2000).

Numerosos factores de virulencia contribuyen a la patogénesis de la infección en herida por quemadura, donde un papel importante ha sido establecido para estructuras tipo pili y flagelos, además de elastasas (LasA, LasB) y otras proteasas, que promueven la diseminación bacteriana a través de la destrucción de las barreras físicas del hospedador. Otros factores de virulencia involucrados en éste proceso son: fosfolipasa C, proteínas de unión a pioquelina, lipopolisacárido (LPS) y exoproductos secretados por el sistema de secreción tipo III (SSTIII). Deficiencias locales en anticuerpos protectores, proteínas del complemento y receptores Fc para polimorfonucleares (PMNs), explican los defectos observados en la migración y quimiotaxis de PMNs hacia el sitio de la herida. La capacidad para colonizar una herida por quemadura y generar un proceso bacteriémico depende, por lo tanto, de la deficiencia concertada de mecanismos inmunes en el hospedador, de la habilidad de *P. aeruginosa* para tomar ventaja de éste

compromiso y de la secreción de una importante variedad de factores de virulencia (Wilson & Dowling, 1998; Lyczak *et al.*, 2000).

P. aeruginosa sintetiza una importante cantidad de factores de virulencia durante el inicio y curso de la infección corneal (queratitis ulcerativa). El glicocálix genera importantes agregados bacterianos capaces de resistir la fagocitosis, una condición determinada por el tamaño alcanzado por éstos, o por su firme adherencia al tejido del huésped. La endotoxina participa en las etapas iniciales de la inflamación, favoreciendo la quimiotaxis de PMNs y su activación, además de servir como ligando para el receptor celular de la proteína RTFQ. La exotoxina A genera una rápida destrucción celular y eventual ulceración corneal. El rol preciso de proteasas en el proceso de enfermedad ha sido difícil de definir con certeza, debido a la importante contribución realizada por proteasas derivadas del hospedador, las cuales actúan tanto en la propia infección como en la exacerbación del daño. Flagelo y pili funcionan como adhesinas en la infección corneal, demostrándose la unión específica de estos apéndices al glicoesfingolípidio (asialo-GM1) de las células del hospedador, y lo esencial de este evento de *binding* en invasión epitelial y citotoxicidad (Figura 1) (Wilson & Dowling, 1998; Lyczak *et al.*, 2000; Silby *et al.*, 2011).

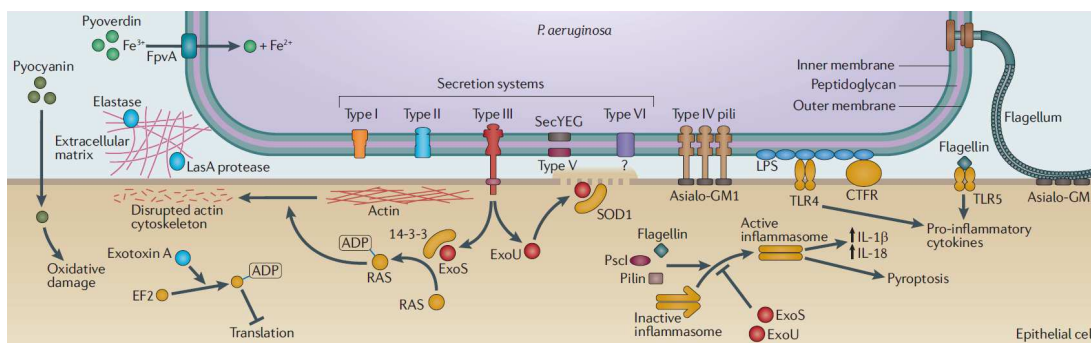


Figura 1 | Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad en *Pseudomonas aeruginosa* (Hauser & Ozer, 2011)

1.1.5. *Pseudomonas aeruginosa*. Resistencia bacteriana

Infecciones nosocomiales y comunitarias por *Pseudomonas aeruginosa* representan un desafío terapéutico importante, donde la elección del antibiótico apropiado es fundamental. Desafortunadamente, esta selección es complicada, ya que *P. aeruginosa* presenta resistencia natural (por baja permeabilidad de su membrana externa, expresión constitutiva de bombas de flujo y de β -lactamasa cromosomal AmpC) frente a agentes antibacterianos no relacionados estructuralmente, pudiendo incluso, adquirir resistencia durante la terapia antibiótica (Lister *et al.*, 2009; Strateva & Yordanov, 2009). Estudios epidemiológicos han demostrado que infecciones causadas por cepas resistentes están relacionadas con el incremento en las tasas de morbi-mortalidad, con la necesidad de intervenciones quirúrgicas, con el aumento en los días de permanencia hospitalaria, y con los costes asociados al tratamiento. *P. aeruginosa* puede desarrollar resistencia a través de la adquisición de genes de resistencia presentes en elementos genéticos móviles, o por mutaciones que alteran la expresión y/o función de mecanismos codificados

cromosomalmente, ambas estrategias limitan significativamente las opciones terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones (Lister *et al.*, 2009).

1.1.6. *Pseudomonas aeruginosa*. Fenotipos y mecanismos de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos

El fenotipo susceptible en *Pseudomonas aeruginosa* (*wild-type*) incluye sensibilidad frente a carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (azlocilina, piperacilina), algunas cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, cefsulodin, cefoperazona), la totalidad de cefalosporinas de cuarta generación, el monobactámico aztreonam y los carbapenémicos imipenem y meropenem. La resistencia natural/intrínseca en esta bacteria se presenta frente a bencilpenicilina, aminopenicilinas (incluyendo combinaciones con inhibidores para β -lactamasa) y cefalosporinas de primera y segunda generación. Cuatro fenotipos básicos de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos pueden presentarse en cepas de *P. aeruginosa*: i) un primer fenotipo de resistencia intrínseco a carbenicilina, se caracteriza por un incremento en 4-8 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la mayoría de los antibióticos β -lactámicos (incluyendo meropenem pero no imipenem), sin producción de β -lactamasa cromosomal AmpC, y resistencia frente a antibióticos no β -lactámicos como quinolonas, trimetoprim, tetraciclina y cloranfenicol; ii) el segundo fenotipo presenta resistencia a la totalidad de β -lactámicos, excepto cefalosporinas de cuarta generación (cefepime y cefpirome) y carbapenémicos, y la extensión del efecto es dependiente del antibiótico y causada por la desrepresión de β -lactamasa AmpC; iii) en el tercer fenotipo, la resistencia a penicilinas (ticarcilina, azlocilina y piperacilina) es mayor que la presentada frente a cefalosporinas, como resultado de la producción de β -lactamasas tipo OXA; iv) el cuarto fenotipo se caracteriza por CMIs aumentadas frente a carbapenémicos, no presentándose resistencia frente a otros β -lactámicos, debido a que las cepas que exhiben este fenotipo poseen un nivel disminuido de OprD, una porina específica para estos antibióticos. Otros fenotipos de resistencia están determinados, principalmente, por la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) codificadas en plásmidos o integrones. En *P. aeruginosa*, los posibles mecanismos determinantes de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos (inactivación enzimática, eflujo activo, cambios en permeabilidad de la membrana externa y síntesis de *Penicillin-Binding Proteins* con baja afinidad por β -lactámicos) pueden presentarse simultáneamente o de manera combinada (Figura 2) (Strateva & Yordanov, 2009).

1.1.7. *Pseudomonas aeruginosa*. Mecanismos de resistencia. Inactivación enzimática

En *Pseudomonas aeruginosa*, la producción de enzimas inactivantes (β -lactamasas) corresponde al principal mecanismo de resistencia adquirida frente a antibióticos β -lactámicos; estas enzimas rompen el enlace amida en el anillo β -lactámico del antibiótico, generando productos carentes de actividad antibacteriana. Se reconocen cuatro clases de enzimas (clases A, B, C y D), de acuerdo a su clasificación molecular (Ambler, 1980), correlacionadas con su clasificación funcional (Bush y col. 1995). Mientras las enzimas de clase A, C y D actúan mediante un mecanismo basado en serina, las de clase B o metalo- β -lactamasas necesitan zinc²⁺ para realizar su actividad. Un número

importante de β -lactamasas, pertenecientes a las cuatro clases moleculares, han sido identificadas en cepas de *P. aeruginosa*, incluyendo BLEE de clases A, B y D (Strateva & Yordanov, 2009).

β -lactamasas Clase A. Cuatro β -lactamasas capaces de hidrolizar carbenicilina han sido descritas en *Pseudomonas aeruginosa* (CARB-1-4), con un perfil de sustrato que incluye carboxipenicilinas, ureidopenicilinas y cefsulodin. BLEE clase A, generan resistencia extra a cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidima, cefepime, cefpirome) y aztreonam, presentando baja afinidad por carbapenémicos. En *P. aeruginosa* se han identificado otros tipos enzimáticos (PER, VEB, GES/IBC y BEL), similares en su perfil de hidrólisis pero con baja identidad a nivel genético. Plásmidos e integrones son elementos genéticos fundamentales en la diseminación de resistencia determinada por BLEE clase A. La localización de genes de resistencia en transposones ofrece una ruta adicional y puede explicar la ubicación simultánea en un plásmido, así como, en el cromosoma de *P. aeruginosa* (Strateva & Yordanov, 2009).

β -lactamasas Clase B. Conocidas como carbapenemasas o metalo- β -lactamasas (por la presencia de zinc²⁺ en su centro activo), determinan resistencia frente a casi todos los antibióticos β -lactámicos, incluyendo los carbapenémicos imipenem y meropenem; solo el monobactámico aztreonam no es afectado por la actividad de estas enzimas. No son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam, pero sí por la acción de queladores iónicos bivalentes (EDTA). Enzimas tipo IMP, VIM, SPM y GIM corresponden a metalo- β -lactamasas identificadas en cepas de *P. aeruginosa*, y sus genes codificantes presentan una ubicación cromosomal y extracromosomal (*cassettes* genéticos incluidos en integrones clase 1 y plásmidos) (Strateva & Yordanov, 2009).

β -lactamasas Clase C. Como algunas especies de la familia *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* y *Yersinia enterocolitica*), *Pseudomonas aeruginosa* produce una β -lactamasa inducible y codificada cromosomalmente (AmpC). Usualmente, esta enzima es producida en baja cantidad, determinando resistencia frente a aminopenicilinas y a la mayoría de las primeras cefalosporinas sintetizadas; sin embargo, *P. aeruginosa* puede adquirir resistencia frente a cefalosporinas de tercera generación a través de la hiperproducción de β -lactamasa AmpC en presencia de un antibiótico β -lactámico inductor (especialmente imipenem). Esta cefalosporinasa es codificada por el gen *ampC* y los mecanismos regulatorios de su expresión en *P. aeruginosa* son similares a los estudiados en detalle para *Enterobacter cloacae*, con muchos genes involucrados en su inducción e íntimamente relacionados al mecanismo de reciclaje del peptidoglicano. A diferencia de lo que sucede en bacterias entéricas, en *P. aeruginosa* no se han identificado genes codificantes para esta enzima de ubicación plasmidial (Strateva & Yordanov, 2009).

β -lactamasas Clase D. Pertenecen a esta clase molecular enzimas (tipo OXA-1, OXA-2, OXA-10) que determinan resistencia frente a carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, pero no a ceftazidima, aztreonam y moxalactam. La mayoría de oxilinasas de espectro extendido están codificadas en genes localizados en plásmidos o integrones, situación que contribuye a su fácil diseminación y prevalencia aumentada (Strateva & Yordanov, 2009).

1.1.8. *Pseudomonas aeruginosa*. Mecanismos de resistencia. Eflujo activo

Por mucho tiempo se consideró que la baja permeabilidad de la membrana externa, debido a la presencia de proteínas de alto peso molecular (~50 kDa), en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, era la razón principal de la resistencia natural en esta especie. Según la concepción actual, estas proteínas (OprM, OprJ, OprN) corresponden a componentes de sistemas de eflujo activo con amplia especificidad de sustrato; por lo tanto, el nivel de resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* está determinado, en gran medida, por la interacción entre una baja permeabilidad de su membrana y el eflujo de agentes antibacterianos. El eflujo activo es un importante mecanismo no enzimático de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos, contribuyendo además al desarrollo de multiresistencia sobre antibióticos anti-*Pseudomonas* (β -lactámicos, fluoroquinolonas, aminoglicósidos y polimixina B) (Strateva & Yordanov, 2009; Wolter & Lister, 2013). En *P. aeruginosa*, esta resistencia es mediada por 4 sistemas de eflujo activo (de tres componentes) genéticamente diferentes: MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN y MexX-MexY-OprM. Las bombas de eflujo están formadas por proteínas formadoras de canal en membrana externa (OMFs), un antiporter asociado a membrana interna (RND) y una proteína de fusión en el espacio periplásmico (MFP) (Hauser & Ozer, 2011; Wolter & Lister, 2013). Los sistemas de eflujo MexA-MexB-OprM y MexX-MexY-OprM participan en resistencia natural y adquirida, mientras que MexC-MexD-OprJ y MexE-MexF-OprN actúan solo en resistencia adquirida (Wolter & Lister, 2013).

1.1.9. *Pseudomonas aeruginosa*. Mecanismos de resistencia. Permeabilidad alterada

Muchos de los aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a imipenem, presentan una deficiencia en su proteína OprD, una porina de membrana externa que forma canales específicos promoviendo la entrada de aminoácidos básicos y antibióticos carbapenémicos. El influjo celular de meropenem es menos afectado por la deficiencia de OprD. La pérdida de esta proteína determina resistencia frente a carbapenémicos (imipenem), solo en casos de expresión cromosomal de β -lactamasa AmpC, lo que demuestra la estrecha cooperación entre estos mecanismos de resistencia. La selección de resistencia durante la terapia con imipenem es un fenómeno mucho más frecuente que el aumento de mutantes resistentes a ceftazidima, piperacilina o ciprofloxacino (Strateva & Yordanov, 2009).

1.1.10. *Pseudomonas aeruginosa*. Mecanismos de resistencia. Modificación del sitio blanco

El mecanismo más inusual de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* involucra la modificación de su sitio blanco, a través de la síntesis de *Penicillin-Binding Proteins* (PBPs) con baja afinidad por β -lactámicos (Strateva & Yordanov, 2009).

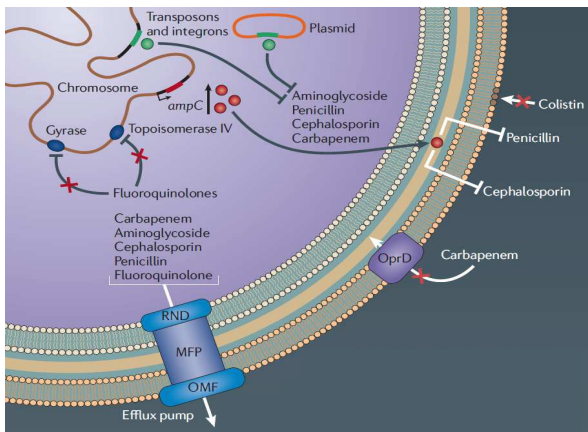


Figura 2 | Resistencia antibiótica en *Pseudomonas aeruginosa* (Hauser & Ozer, 2011)

1.2. Peptidoglicano

1.2.1. Pared Celular-Peptidoglicano. Antecedentes

La mayoría de las especies bacterianas posee una pared celular que mantiene la forma bacteriana y entrega protección frente a lisis osmótica. Esta resistencia depende de la presencia de una capa de peptidoglicano, una estructura macromolecular covalentemente cerrada y formada por rígidas cadenas de glicano entrecruzadas por puentes peptídicos flexibles, que funciona además, como plataforma de anclaje para otros componentes de la envoltura celular (proteínas y polisacáridos) (Cabeen *et al.*, 2005; Bouhss *et al.*, 2008; Vollmer *et al.*, 2008). La unidad monomérica del peptidoglicano (PG), reconocida comúnmente como mureopéptido, corresponde al disacárido N-acetilglucosamina (GlcNAc) (β -1,4) N-acilmurámico (MurNAc), en éste último sucede el acoplamiento de una cadena peptídica con la secuencia L-Ala-(γ)-D-Glu-*meso*A₂pm-D-Ala-D-Ala, generando una estructura conocida como disacárido pentapéptido. El monómero es una biomolécula inusual con características distintivas (presencia de residuos MurNAc), además de infrecuente y encontrada exclusivamente en mureina bacteriana. La presencia de un residuo (γ)-D-Glu (D-glutámico), enlaces peptídicos L,D y D,D no encontrados en proteínas, aminoácidos no proteicos como *meso*A₂pm (ácido diaminopimélico), L-ornitina y L-lantionina y un dipéptido D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) en el extremo C-terminal de la cadena peptídica, constituyen antecedentes diferenciadores (Vollmer *et al.*, 2008; de Pedro, 2009). El PG o mureina (del latín *murus*: pared) está presente en casi la totalidad de eubacterias, con la excepción de *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp. y *Orientia tsutsugamushi*; aunque *Chlamydia* spp. carece de PG detectable, las especies de este género poseen un grupo de genes relacionados con su biosíntesis (Vollmer *et al.*, 2009). El PG es rígido (para proteger la integridad de la célula bacteriana), flexible (para permitir el crecimiento celular) y poroso (para permitir la entrada o salida de nutrientes y otros compuestos). Esta rigidez supone que la pared celular determina la forma bacteriana -cuando se aísla el PG que rodea la célula (*sacculus* de mureina), su forma es idéntica a la del organismo vivo, su flexibilidad es también evidente -un *sacculus* de mureina aislado puede expandirse o contraerse dependiendo de su ambiente químico, además de estas funciones mecánicas, el PG puede permitir el

paso de proteínas, y comportarse como una estructura estable para la incorporación de grandes organelos. La composición y (quizás) la estructura del peptidoglicano cambian cuando una bacteria pasa desde un estado fisiológico a otro, las razones de esta flexibilidad estructural no están claras, sin embargo, estos cambios pueden ayudar a la bacteria a resistir el estrés ambiental, la actividad de agentes antibacterianos o las respuestas inmunes del hospedador; información reciente demuestra que algunas bacterias producen grandes cantidades de D-aminoácidos (formas inusuales) que afectan la composición de la pared celular. Existe mayor evidencia de que fragmentos de PG activan el sistema inmune de animales y seres humanos, favoreciendo su maduración, o pueden ser utilizados por la propia bacteria como herramientas para manipular la inmunidad y evitar ser eliminada (Young, 2011). El PG es la estructura más importante para el adecuado entendimiento del crecimiento bacteriano, ya que este proceso está restringido a cambios coordinados en las dimensiones físicas de este polímero. A pesar de que el *sacculus* de mureina es elástico y puede ser estirado considerablemente, el crecimiento continuo, la división celular, y la generación de forma y apéndices bacterianos, requieren la incorporación de nuevos precursores en la pared celular ya existente; la síntesis e inserción de nuevo PG, son procesos que también están coordinados por proteínas del citoesqueleto bacteriano en diferentes etapas del ciclo celular (Cava *et al.*, 2013). Con la cooperación de MreB (proteína tipo actina, determinante de la forma bacilar), células recién divididas sufren “elongación dispersa” a través de la inserción de PG en múltiples sitios de su pared lateral, y posteriormente, la proteína FtsZ (proteína de división tipo tubulina) localizada en el centro de la célula, guía la fase de “elongación preseptal”, permitiendo la síntesis de un “septum constrictivo”, que favorece la división y la separación de las células hijas (Typas *et al.*, 2011; Egan & Vollmer, 2013).

1.2.2. Peptidoglicano. Biosíntesis

La biosíntesis del PG es un proceso complejo que incluye diferentes etapas citoplasmáticas y de membrana. El primer paso consiste en la formación de precursores solubles, desde UDP-GlcNAc a UDP-MurNAc-pentapéptido; la síntesis de UDP-GlcNAc desde fructosa-6-fosfato requiere la acción secuencial de cuatro enzimas (GlmS, GlmM, glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa y N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa), con las dos últimas etapas realizadas por la enzima bifuncional GlmU (Barreteau *et al.*, 2008; Bouhss *et al.*, 2008). La formación de UDP-MurNAc necesita de UDP-GlcNAc y la acción coordinada de 2 enzimas, MurA y MurB. El ensamblaje de la cadena peptídica es realizado por cuatro enzimas (ligasas MurC, D, E y F), que ejecutan la adición de L-alanina (MurC), D-glutámico (MurD), un diaminoácido, generalmente *meso*A₂pm o L-lisina (MurE), y un dipéptido D-Ala-D-Ala (MurF), al grupo D-lactoil de UDP-MurNAc, mediante la formación de un enlace peptídico o amida con formación de ADP y P_i desde ATP; la estructura de este péptido y la especificidad de sustrato de estas enzimas, presentan algunas variaciones en el mundo bacteriano. Las etapas en membrana comienzan con la transferencia de este producto desde el precursor citoplasmático al aceptor lipídico undecaprenil-fosfato (C₅₅-P) unido a membrana interna, una reacción controlada por MraY (UDP-MurNAc-pentapéptido-fosfotransferasa o simplemente translocasa), que produce undecaprenil-PP-

MurNAc-pentapéptido (lípidio I). La translocasa II o MurG (UDP-GlcNAc-undecaprenil-PP-MurNAc-pentapéptido-transferasa), cataliza la transferencia de la fracción GlcNAc desde el precursor UDP-GlcNAc al lípidio I generando undecaprenil-PP-MurNAc-(pentapéptido)-GlcNAc (lípidio II). El lípidio II sintetizado en la cara citoplasmática de la membrana interna debe ser transferido hacia la cara externa, la posible existencia de una flipasa capaz de catalizar este proceso ha sido motivo de discusión e hipótesis por muchos años. Se ha demostrado, que la translocación no sucede de manera espontánea o acoplada a la síntesis de lípidio II, esto sugiere la participación de una o más proteínas asociadas a membrana. Estudios en *E. coli* han relacionado a la proteína MviN (MurJ) en este proceso, sin embargo, las proteínas RodA y FtsW han sido propuestas como mejores candidatas, encontrándose genes parálogos para *rodA* y *ftsW* en otras especies bacterianas (Barreteau *et al.*, 2008; Vollmer *et al.*, 2008; de Pedro, 2009; van Dam *et al.*, 2009). Las siguientes etapas, tomando lugar en la cara externa de la membrana interna, involucran la actividad de glicosiltransferasas (para polimerizar cadenas de glicano) y D,D-transpeptidasas (para entrecruzar cadenas peptídicas y catalizar su incorporación al PG existente). Luego de que la fracción GlcNAc-MurNAc-pentapéptido es liberada por acción de PBP1b (en *E. coli*), se genera una molécula de undecaprenil-PP libre unida a membrana, la cual es transportada (como C₅₅-P) de regreso a la cara citoplasmática de la membrana interna (Figura 3) (Typas *et al.*, 2011; Cava *et al.*, 2013).

1.2.3. Peptidoglicano. Recambio-Reciclaje

El proceso de recambio de PG, que corresponde a la salida de muropéptidos desde el *sacculus* de mureina durante el crecimiento normal, fue reconocido inicialmente en bacterias Gram positivas (la ausencia de una barrera externa al *sacculus* de mureina facilitó la detección directa de precursores marcados en el medio de cultivo). En bacterias Gram negativas, el recambio es un proceso acoplado a un sistema altamente eficiente de reciclaje para los productos liberados, los que son transportados de regreso al citoplasma para luego reincorporarse a la vía biosintética de la mureina. La magnitud del recambio es variable entre especies y posiblemente dependa de las condiciones de crecimiento, sin embargo, se ha indicado que la tasa de recambio de mureina en cada generación, para la mayoría de las especies estudiadas, se encuentra en un rango de 20-50% (*E. coli*, 30-40%; *B. subtilis*, 50%; *B. megaterium*, 50%; *S. aureus*, 25%; *N. gonorrhoeae*, 20-50%). El proceso de recambio se asocia a valoración de daño y a mecanismos de defensa, y es considerado un requisito para la expansión celular (de Pedro, 2009). En *E. coli* se ha demostrado que el recambio de PG ocurre de modo simultáneo a la incorporación de nuevo material a lo largo de la superficie cilíndrica de esta bacteria, mientras los polos celulares permanecen metabólicamente inactivos y sin recambio. Durante el proceso de elongación celular, la capa de mureina es continuamente degradada por enzimas que rompen enlaces, generando productos de degradación de PG (Reith & Mayer, 2011; Van Heijenoort, 2011; Vollmer, 2012).

En *E. coli* se han identificado, al menos, 35 hidrolasas para PG, clasificadas en 12 familias diferentes y 3 clases principales: la clase 1, incluye D,D-endopeptidasas (PBP4, PBP7 y MepA) que rompen el entrecruzamiento entre residuos D-Ala de una cadena de glicano y *meso*A₂pm de una cadena vecina; la clase 2, incluye N-acetilmuramyl-L-alanina amidasas (AmiA, AmiB y AmiC), capaces de hidrolizar la unión entre MurNAc y su cadena

peptídica. Estas enzimas se localizan en el espacio periplásmico, y participan de la separación celular durante la etapa de división, liberando cantidades menores de PG durante este proceso (liberan tri, tetra o pentapéptidos al periplasma bacteriano desde el cual difunden fuera de la célula, con una pequeña fracción ingresando al citoplasma a través de permeasas MppA-OppBCDF); AmiD (AmpDh2), una amidasa recientemente identificada y asociada a membrana externa, ha demostrado actividad lítica sobre anhidromuropéptidos. La clase 3 está representada por transglicosilasas líticas que rompen los enlaces GlcNAc-MurNAc en la cadena de glicano, liberando 1,6-anhidroMurNAc con fragmentos de PG (anhidromuropéptidos). La principal transglicosilasa lítica responsable del recambio de la mureína es SltY, una proteína soluble de ubicación periplásmica. Existen múltiples transglicosilasas líticas unidas a membrana, capaces de romper cadenas de glicano y desarrollar funciones especiales, como la de proporcionar el espacio para la adecuada síntesis del flagelo. Otras enzimas líticas (PBP4, PBP5 y PBP6) con actividad D,D-carboxipeptidasa, catalizan la conversión de la cadena pentapéptida en tetrapéptida, a través de la liberación de residuos D-Ala terminales (Figura 3) (Reith & Mayer, 2011; Van Heijenoort, 2011).

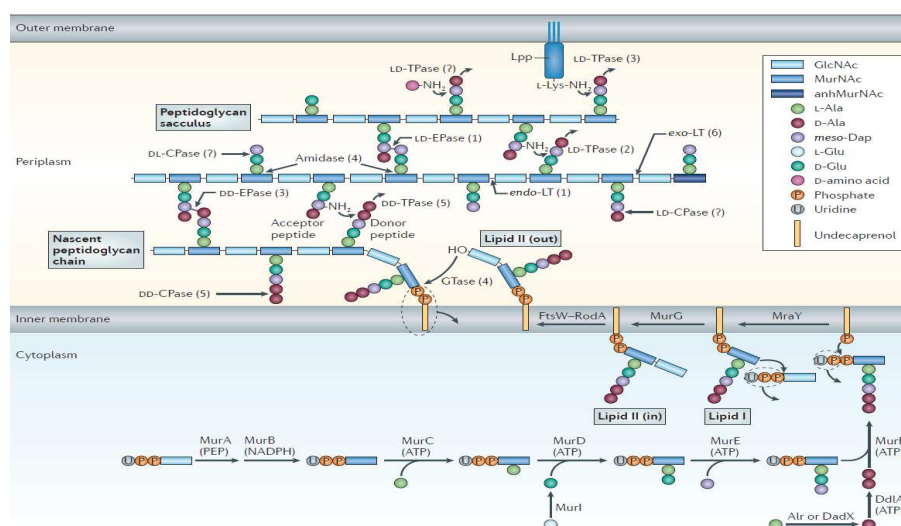


Figura 3 | Síntesis e hidrólisis del PG para el modelo *Escherichia coli* (Typas et al., 2011)

La captura de péptidos derivados de la pared celular corresponde solo a un vía de reciclaje menor en *E. coli*, la principal ruta de reciclaje involucra la incorporación al citoplasma de anhidromuropéptidos periplásmicos a través de AmpG, un transportador específico para GlcNAc-1,6-anhidroMurNAc y GlcNAc-1,6-anhidroMurNAc-péptidos (tri, tetra o pentapéptido), anhidromuropéptidos que son degradados en el citoplasma por una β -N-acetilglucosaminidasa (NagZ, que cataliza la ruptura del enlace β -1,4 en la cadena de glicano), una N-acetilmuramil-L-alanina amidasa (AmpD, que libera la cadena peptídica por ruptura del enlace anhidroMurNAc-L-Ala) y una L,D-carboxipeptidasa (LdcA, que libera un residuo D-Ala desde una cadena tetrapéptida), actividades enzimáticas que generan: GlcNAc, anhidroMurNAc, D-Ala y L-Ala(γ)-D-Glu-*meso*A₂pm. El tripéptido es directamente transferido a UDP-MurNAc a través de la acción catalítica de una muropéptido ligasa (Mpl), produciendo UDP-MurNAc-L-Ala(γ)-D-Glu-*meso*A₂pm y

comenzando, de este modo, un nuevo ciclo de síntesis de PG (Gan *et al.*, 2008; Desmarais *et al.*, 2013). El reciclaje en algunas especies Gram negativas (pero no en *E. coli*), está íntimamente relacionado a la inducción de β -lactamasa AmpC, con AmpG y AmpD actuando como reguladores de expresión positiva y negativa, respectivamente. Una conexión similar entre productos de recambio de PG e inducción de resistencia, no ha sido identificada aún en representantes Gram positivos (Desmarais *et al.*, 2013).

1.2.4. Peptidoglicano. Parámetros estructurales

Los peptidoglicanos difieren en la longitud de sus cadenas de glicano y la extensión de su entrecruzamiento peptídico, por lo que estos parámetros son utilizados para identificar las propiedades estructurales de este polímero. El entrecruzamiento da cuenta de la proporción de muropéptidos covalentemente unidos a través de enlaces peptídicos a las respectivas cadenas peptídicas, y es expresado como la fracción molar (mol%) de lo entrecruzado con respecto al total de muropéptidos. En bacterias Gram positivas, el entrecruzamiento es habitualmente alto con valores cercanos al 100% teórico (93% en *Staphylococcus aureus*), mientras que los valores alcanzados en bacterias Gram negativas resultan ser mucho más bajos, con un rango que varía entre 20-40%, para la mayoría de los casos. Esta gran diferencia es consecuencia, principalmente, de la disposición en monocapa del *sacculus* de mureina en bacterias Gram negativas (restricciones geométricas limitan el entrecruzamiento máximo teórico a un valor cercano de 50%) (Vollmer *et al.*, 2008; de Pedro, 2009). Existen variaciones en la modalidad de entrecruzamiento y la composición del enlace interpeptídico, de esta manera, se han distinguido 2 tipos principales de entrecruzamientos peptídicos, el primero, un tipo 4-3 (el grupo carboxilo de un residuo D-Ala en posición 4 de una cadena “donadora”, se une al grupo amino de la cadena lateral de un diaminoácido en posición 3 de una cadena peptídica “aceptora”), que corresponde al entrecruzamiento principal (más frecuente), formado por D,D-transpeptidasas, y cuyo enlace puede ser directo (principalmente en especies Gram negativas), o indirecto, a través de un puente interpeptídico (principalmente en especies Gram positivas); en el segundo tipo, denominado entrecruzamiento 2-4, el grupo α -carboxilo de un D-isoglutámico en posición 2 de una unidad peptídica y el grupo carboxilo de un residuo D-Ala en posición 4 de otra unidad, se encuentran conectados indirectamente, a través de un puente interpeptídico conteniendo un diaminoácido. Otros tipos de uniones interpeptídicas y entrecruzamientos pueden ocurrir, con menor frecuencia, en especies que normalmente presentan un entrecruzamiento tipo 4-3, como los entrecruzamientos 3-3, catalizado por L,D-transpeptidasas y presentes en muy pequeñas cantidades en células de *E. coli* durante su desarrollo exponencial (Vollmer *et al.*, 2009). Dependiendo de las especies y las condiciones de crecimiento, la longitud promedio de las cadenas de glicano varían entre 10 y cientos de unidades disacáridas (una unidad disacárida posee una longitud de 1.03 nm), no existiendo una relación entre este parámetro y el grosor de la pared celular; *Bacillus* spp. posee una longitud promedio de cadena de 50-250 unidades disacáridas, mientras que las cadenas de glicano de *Staphylococcus aureus* tienen una longitud promedio de 18 unidades disacáridas. En bacterias Gram negativas también existe alguna variación, pero el rango normal se ubica en valores de 20-40 unidades disacáridas (Vollmer *et al.*, 2009; Vollmer & Seligman, 2010).

La longitud promedio de las cadenas de glicano puede ser determinada a través de la cuantificación de muropeptidos con extremos 1,6-anhidroMurNAc (residuos que determinan término de cadena), o por la cuantificación de galactosa radioactiva enzimáticamente unida a GlcNAc terminal. La longitud de las cadenas de glicano de *E. coli* y la mayoría de las especies Gram negativas estudiadas, depende de la cepa y las condiciones de crecimiento, de este modo, las hebras en *E. coli* presentan mayor longitud (50-60 unidades disacáridas en promedio) en el PG recién sintetizado, y son más cortas en células en fase de crecimiento estacionario, donde el 70-75% del material de glicano está formado por hebras de 1-30 unidades disacáridas, siendo predominantes las hebras cortas de 7-12 unidades, mientras el 25-30% residual contiene hebras de más de 80 unidades disacáridas. Es evidente que la mayoría de las hebras de glicano en *E. coli* y *P. aeruginosa* son mucho más largas que el espesor de su capa de PG, de hecho, más del 50% del PG de *E. coli* corresponde a cadenas de glicano de una longitud mayor a la amplitud de su espacio periplásmico, por este motivo, la disposición vertical de las hebras de glicano (propuesta en el modelo "scaffold") no es posible, y las cadenas de glicano necesariamente deben organizarse paralelamente a la membrana celular. Estudios mediante criotomografía electrónica sugieren que el *sacculus* de mureína en *E. coli* corresponde a una capa única, sin embargo, existen evidencias que parecen contradecir una arquitectura en monocapa; primero, las células de *E. coli* tendrían un "exceso" de PG, situación sugerida por el hecho de que pueden crecer aún presentando un 50% menos de PG por unidad de superficie celular; segundo, experimentos de dispersión de neutrones han demostrado que 20-25% de la superficie del *sacculus* de mureína fue más denso que una monocapa y compatible, probablemente, con una tricapa; tercero, algunos de los muropeptidos en la composición del PG de *E. coli* son triméros (3-10%) o tetraméros (0.1-0.2%), la presencia de estas estructuras con 3 o 4 péptidos conectados no parece consistente con un PG formado exclusivamente por una capa; cuarto, se ha determinado que el PG de *P. aeruginosa* es significativamente más delgado que el de *E. coli*, demostrando que el PG de *E. coli* no posee el grosor mínimo esperable para un PG monocapa. El espesor de la mureína en ambas especies, ha sido medido a través de ensayos de microscopía de fuerza atómica (MFA), y los valores asignados son de 6.35 ± 0.53 nm para *E. coli*, y 2.41 ± 0.54 nm para el PG de *P. aeruginosa* (Figura 4). Esta contradicción en los datos puede ser explicada por las diferencias en las densidades de superficie para ambos modelos. *P. aeruginosa* posee hebras de glicano más cortas que *E. coli* (17 unidades disacáridas) y un bajo porcentaje de entrecruzamiento (34.6%) (Tabla 1), siendo probable que las medidas por MFA que determinan un menor grosor para el PG de esta bacteria, estén relacionadas al menor nivel de entrecruzamiento, que incrementaría la distancia entre las cadenas de glicano, generando una trama de mayor amplitud y mayor tamaño de poro (Vollmer & Seligman, 2010).

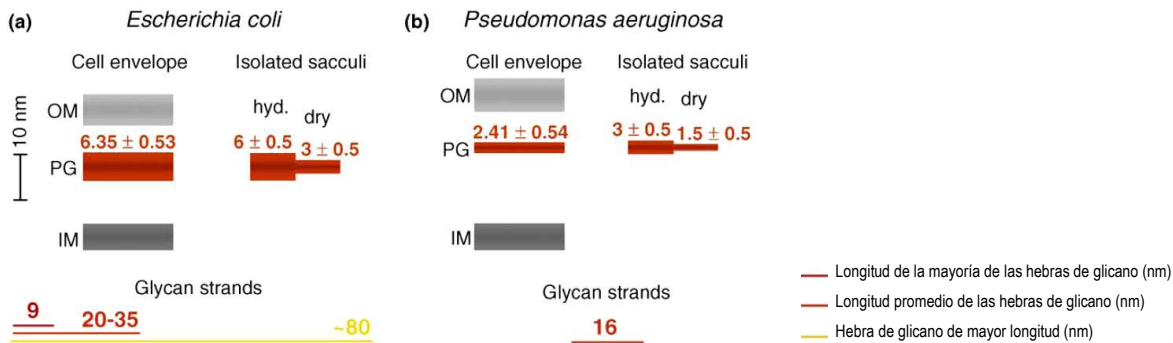


Figura 4 | Dimensiones de envolturas celulares, peptidoglicano y cadenas de glicano en los modelos bacterianos *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Mediciones realizadas por MFA (Vollmer & Seligman, 2010)

Tabla 1 | Longitud de cadenas de cadenas de glicano y entrecruzamiento en PG de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Vollmer & Seligman, 2010)

Organism (growth conditions), remarks	Mean length of glycan strands		Cross-linkage (%)
	DS units ^a	Method	
Gram-negatives			
<i>Escherichia coli</i> KN126 (LB medium, exponential growth)	25.8	Anh ^b	48.5
<i>E. coli</i> KN126 (LB medium, stationary)	17.8	Anh	60.6
<i>E. coli</i> KN126 (PB medium, 30 °C)	33.3	Anh	44.7
<i>E. coli</i> KN126 (PB medium, 42 °C)	37.9	Anh	44.6
<i>E. coli</i> W7, different growth rates	23–30	Anh	45–49
<i>E. coli</i> W7, newly made peptidoglycan	50–60	Anh	~40
<i>E. coli</i> EH3247	8.9 (70–75%)	GL ^d	
	45.1 (25–30%)	Anh	
	21 (total)	GL/Anh	
<i>E. coli</i> P678-54, isolated minicells (cell poles)	23.5	Anh	54.8
<i>E. coli</i> P678-54, whole cells	27.8	Anh	52.4
<i>E. coli</i> MC4100 <i>lysA</i> , normal rod-shaped	31	Anh	47
<i>E. coli</i> MC4100 <i>lysA ftsA</i> , filamentous cells	30	Anh	46
<i>E. coli</i> MC4100 <i>lysA pbpB</i> , spherical cells	32	Anh	47
<i>E. coli</i> , different strains and growth conditions	33–52	Gal ^e	
<i>E. coli</i> MC6RP1	22	Anh	30.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	Anh	34.6

1.2.5. Peptidoglicano. Propiedades biofísicas. Modelo de crecimiento y arquitectura

El PG posee propiedades biofísicas únicas que han sido estudiadas, principalmente, para el modelo Gram negativo *E. coli*. El *sacculus* de mureina en esta bacteria es extremadamente delgado, sin embargo, posee la fuerza necesaria para resistir un turgor celular de muchas atmósferas de presión. El PG no es una estructura rígida, por el contrario, sus capacidades elásticas permiten la expansión y contracción celular de modo reversible frente a cambios de osmolaridad en el ambiente. El *sacculus* de mureina puede presentarse más organizado u “ordenado” cuando es estirado y más desorganizado cuando se relaja, evidencia reciente indica la existencia de fuerzas mecánicas que afectan el crecimiento del PG, como por ejemplo, la tensión en enlaces covalentes causada por el turgor celular. Se ha especulado que un alto turgor genera crecimiento con un PG mas “ordenado”, proponiéndose además, que complejos enzimáticos asociados a la síntesis de PG podrían reconocer y requerir PG en este estado (estirado u “ordenado”) para la fijación e inserción eficientes de cadenas de glicano, sin embargo, se requiere de más información para valorar el posible rol del turgor celular sobre la estructura y el crecimiento del PG (Vollmer *et al.*, 2009; Vollmer & Seligman, 2010). En bacterias Gram negativas cilíndricas, el alineamiento de la porción peptídica sucede en dirección

al eje longitudinal de la bacteria, y las cadenas de glicano (monocapa) se disponen desorganizadamente alrededor la célula y de modo perpendicular a este eje, con un nivel de organización en forma de bandas circunferenciales. Las cadenas de glicano poseen una constante de elasticidad teóricamente más alta que la fracción peptídica, lo que les permite resistir la tensión circunferencial (dos veces superior a la tensión longitudinal). *Sacculus* de mureina aislados desde *Escherichia coli* son significativamente más deformables longitudinalmente que circunferencialmente, sugiriéndose que esta anisotropía en la elasticidad es consecuencia de la presencia de cadenas de glicano más rígidas (menos elásticas) y un componente peptídico más flexible (mayor elasticidad), sin embargo, observaciones recientes indican que la anisotropía presente en bacterias Gram negativas de morfología bacilar podría ser mejor atribuida a la orientación de las bandas circunferenciales, donde mayor cantidad de material está presente, generando zonas menos elásticas y cuya arquitectura podría soportar *in vivo* la tensión circunferencial en el PG (Turner *et al.*, 2013).

La arquitectura del PG se propaga adecuadamente por la célula en crecimiento, este proceso requiere que nuevo PG sea insertado de tal manera que se mantenga la integridad, forma y grosor del *sacculus* de mureina preexistente. Un nuevo método de tratamiento y fijación celular permite el marcaje directo de *sacculus* de mureina con vancomicina fluorescente, no obstante, la resolución alcanzada mediante microscopia de fluorescencia estándar no permite una estimación precisa de la incorporación de nuevo material. Un sistema de microscopia STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) permitió resolver el patrón de inserción de mureina en bacterias Gram negativas, demostrando la existencia de múltiples focos de incorporación para nuevo PG y una maquinaria de elongación movilizándose circunferencialmente. Los patrones de inserción no encajan con modelos existentes, por lo que la explicación más adecuada para los datos obtenidos, es que ciertas regiones del *sacculus* de mureina son más permisivas que otras a la incorporación de PG naciente, siendo bastante improbable que puedan corresponder a zonas de mayor densidad de mureina. Se ha propuesto un nuevo modelo de crecimiento regulado por la arquitectura del PG, donde la incorporación de nuevo material sucede en regiones del *sacculus* con abundancia de poros de gran tamaño (arquitectura permisiva). Estas zonas con arquitectura porosa permiten que la lipoproteína de membrana externa LpoA pueda extenderse hacia la capa de PG e interactuar con PBP1A y el complejo de elongación. El aparato biosintético del PG incluye PBPs, lipoproteínas y MreB, una proteína móvil que forma parte del citoesqueleto bacteriano. Se cree que la incorporación de nuevo material podría seguir un patrón helicoidal (controlado por MreB), sin embargo, proteínas Lpo están presentes en “parches” por toda la célula, lo que sugiere la existencia de factores adicionales guiando este proceso de inserción. El depósito de nuevo PG en zonas de mayor porosidad, conduce al cambio hacia una arquitectura no permisiva (*feedback* negativo), generando de esta manera un mecanismo regulatorio para el control del espesor del PG y la localización de su síntesis. El crecimiento puede también suceder desde una arquitectura no permisiva, donde regiones de menor porosidad enzimáticamente hidrolizadas y estiradas por el turgor celular, son convertidas en nuevas zonas de incorporación con una arquitectura permisiva. Existen múltiples hidrolasas para PG en *E. coli*, algunas de ellas formando complejos con PBPs, lo que sugiere una

vinculación espacio-temporal con el metabolismo del PG, compatible con el modelo antes descrito (Figura 5) (Turner *et al.*, 2013).

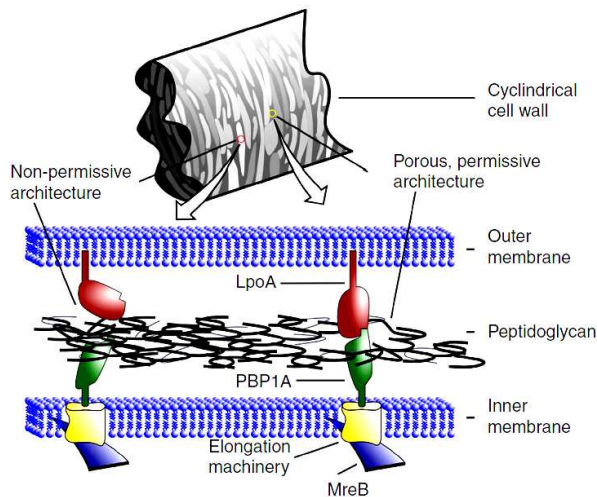


Figura 5 | Modelo de incorporación de peptidoglicano (Turner *et al.*, 2013)

Sacculus derivados desde cepas de *E. coli* en fase de crecimiento exponencial y estacionario, y visualizados mediante MFA, presentaron bandas circunferenciales rugosas en tonos claro y oscuro (MFA genera contraste de acuerdo al peso relativo, bandas claras contienen mayor cantidad de material que bandas oscuras), dispuestas de manera discontinua y sin rodear totalmente a la célula. No presentaron una frecuencia definida o bordes distintivos, el grosor cambió continuamente desde una banda a la siguiente y su orientación fue de 90° en relación al eje longitudinal del *sacculus* de mureina. Las bandas de orientación circunferencial fueron demasiado largas para corresponder a cadenas de glicano, y su arquitectura, estudiada mediante MFA de alta resolución, corresponde a la de un entramado con gran porosidad. La variación entre *sacculus* de mureina intactos y dañados, muestra que la capa de PG es una red polimérica donde sus cadenas pueden estar densamente o pobremente empaquetadas, superponiéndose entre sí y formando una estructura continua. Los datos no son compatibles con el modelo “*tessera*” de organización del PG, ya que se presentan poros con un diámetro efectivo (~10 nm) superior al propuesto por el modelo (~1 nm), siendo muy numerosos y claramente visibles. Las bandas que aparecen claras en resoluciones menores, contienen poros más pequeños, pudiendo contener poros aún menores al límite de detección de MFA, mientras que bandas más oscuras contienen poros de mayor tamaño (Figura 6). Un ensayo de nano-digestión por lisozima y amidasa, sugiere que las cadenas de glicano se disponen paralelamente al plano de la membrana celular, sin presentar una orientación circunferencial (Turner *et al.*, 2013).

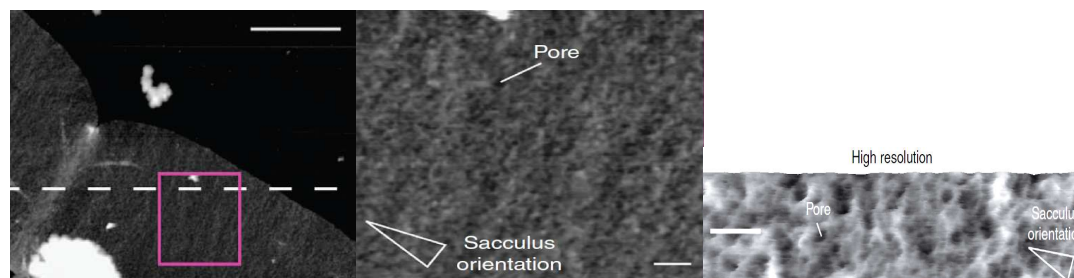


Figura 6 | Arquitectura del peptidoglicano de *Escherichia coli* por MFA y alta resolución (barra de escala 50 nm) (Turner *et al.*, 2013)

La arquitectura del *sacculus* de mureina para algunas especies Gram negativas presentó un alto nivel de conservación. El análisis del *sacculus* de mureina por MFA para la especie *Pseudomonas aeruginosa* demostró la presencia de poros de gran tamaño ($13 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$) cerca de los polos celulares, en zonas de localización de múltiples pili (el tamaño de poro permitiría acomodar un SSTIV necesario para cada *pilus*) (Figura 7) (Turner *et al.*, 2013).

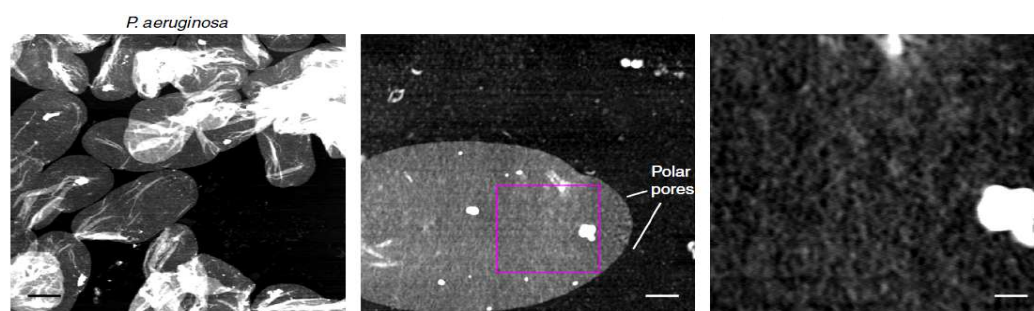


Figura 7 | Imágenes obtenidas por MFA para *sacculus* de mureina de *Pseudomonas aeruginosa* (Turner *et al.*, 2013)

El PG de bacterias Gram negativas se presenta más desorganizado de lo que inicialmente se pensaba; la capa de PG es una red polimérica tridimensional y porosa, con bandas diferenciadas. Esta arquitectura, en vinculación con los componentes de la maquinaria de elongación, hace posible la propagación en alta fidelidad de la forma y el grosor de la pared celular, dando lugar a un nuevo modelo de arquitectura y síntesis, aplicable a muchas especies Gram negativas (Turner *et al.*, 2013).

1.3. Penicillin-Binding Proteins

1.3.1. Penicillin-Binding Proteins. D,D-peptidasas

La síntesis de PG requiere de glicosiltransferasas (GTasas) para polimerizar las cadenas de glicano y D,D-transpeptidasas (D,D-TPasas) para entrecruzar sus cadenas peptídicas. TPasas, también llamadas *Penicillin-*

Binding Proteins (PBPs), son acil-serina transferasas (D,D-peptidasas) inicialmente identificadas por su habilidad para unir penicilina covalentemente (Typas *et al.*, 2011). Estas enzimas corresponden al sitio blanco (diana) para antibióticos β -lactámicos, quienes actúan como inhibidores suicidas debido a la semejanza estructural con su sustrato natural, los residuos terminales D-Ala-D-Ala de una cadena pentapeptídica precursora (de Pedro, 2009; Sainsbury *et al.*, 2011). D,D-peptidasas constituyen una familia muy numerosa de proteínas, que probablemente deriva desde una serina hidrolasa ancestral; miembros de esta superfamilia poseen secuencias aminoacídicas muy diferentes, pero retienen grupos funcionales comunes en su sitio activo. Se han construido árboles evolutivos, en base a la homología de sus secuencias aminoacídicas, que subdividen esta familia en clases y subclases, funcionalmente relacionadas. PBPs se encuentran localizadas en diferentes posiciones dentro de la célula y operan en distintas etapas del ciclo celular. Además de su asociación a membrana interna, es probable que *in vivo*, muchas D,D-peptidasas estén involucradas en interacciones proteína-proteína formando parte de complejos oligoproteicos (Pratt, 2008). Serina β -lactamasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de antibióticos β -lactámicos y generan resistencia bacteriana, son miembros de esta superfamilia, sin embargo, no son peptidasas efectivas. Las profundas similitudes y contrastes entre los mecanismos utilizados por PBPs y este tipo de β -lactamasas en sus funciones, han sido el motivo de muchas investigaciones, que finalmente han propuesto la evolución de estas enzimas desde PBPs; el proceso sucede por la adquisición de nuevas secuencias estructurales, que permiten altas tasas de hidrólisis para intermediarios acil-enzima, derivados desde antibióticos β -lactámicos. La propuesta evolutiva es respaldada por las similitudes estructurales que comparten ambos grupos enzimáticos, tanto en su plegamiento general como en la configuración aminoacídica de sus sitios activos. La totalidad de PBPs y serina β -lactamasas contienen una secuencia principal S*xxK que contiene el residuo catalítico S* (serina), y las triadas SxN y KTG, que en conjunto permiten procesos de acilación y deacilación. PBPs y serina β -lactamasas están estrechamente relacionadas, la evolución de sus actividades enzimáticas implica cambios sutiles en sus roles catalíticos, por presencia y reubicación de nuevos aminoácidos (Smith *et al.*, 2013).

1.3.2. *Penicillin-Binding Proteins*. Clasificación

PBPs son clasificadas en base a su secuencia aminoacídica y su movilidad relativa (electroforesis) en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Han sido divididas en dos categorías principales, PBPs de alta masa molecular, HMM-PBPs (>60 kDa) y de baja masa molecular, LMM-PBPs (<60 kDa), y proteínas de ambos grupos se encuentran localizadas en la cara externa de la membrana interna. HMM-PBPs son enzimas multimodulares responsables de la polimerización del peptidoglicano y de su incorporación en la pared celular preexistente. Dependiendo de la estructura y actividad catalítica de su dominio N-terminal, HMM-PBPs pueden pertenecer a la clase A o a la clase B, cada una de ellas con sus respectivas subclases. El dominio de unión a penicilina (PB) en el extremo C-terminal de ambas clases posee actividad transpeptidasa, catalizando el entrecruzamiento peptídico entre dos cadenas de glicano adyacentes. En la clase A, el dominio N-terminal es responsable de la actividad glicosiltransferasa; mientras que en las de clase B, este dominio parece tener un rol en morfogénesis celular, interactuando con otras proteínas involucradas en estos

procesos (Ghosh *et al.*, 2008; Sauvage *et al.*, 2008). LMM-PBPs corresponden a enzimas monofuncionales o bifuncionales, generalmente involucradas en procesos de separación celular, maduración y reciclaje de PG, y clasificadas como PBPs clase C (subclases C1, C2 y C3; o tipos funcionales 4, 5, 7, AmpH), catalizando actividades D,D-carboxipeptidasa (D,D-CPasa) o D,D-endopeptidasa (D,D-EPasa). Estas enzimas no son esenciales para la viabilidad bacteriana *in vitro*, lo que ha obstaculizado los intentos para definir su funciones *in vivo*, sin embargo, su ubicuidad y redundancia implica una fuerte presión conservacionista, y una funcionalidad en el ciclo de vida bacteriano que aún permanece bastante indefinida (Tabla 2) (Clarke *et al.*, 2008; Potluri *et al.*, 2010).

Tabla 2 | Clasificación de *Penicillin-Binding Proteins* (PBPs). Conjunto completo de proteínas para 10 especies bacterianas (PBPs con estructura cristalográfica se destacan en color naranja) (Sauvage *et al.*, 2008)

	Class A							Class B							Class C									
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B4-like-I	B4-like-II	Type-4	Type-5		Type-7	Type-AmpH				
Gram -																								
<i>Escherichia coli</i> K12	PBP1a	PBP1b				PBP1c										PBP4	PBP5	PBP6	PBP6b	PBP7		PBP4b	AmpH	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA 1090	PBP1															PBP3						PBP4		
Gram +																								
<i>Bacillus subtilis</i> 168		PBP1	PBP2c	PBP4			PBP2d									PBP4a		DacF	PBP5	PBP5*			PBP4*	PbpX
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA252																								
<i>Listeria monocytogenes</i> 43728																								
<i>Enterococcus faecalis</i> 1933																								
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6																								
Actinomycetes																								
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)																								
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv																								
Cyanobacteria																								
<i>Anabaena</i> species PCC7120																								

1.3.3. Penicillin-Binding Proteins. Características estructurales y funcionales

PBPs comparten actividades comunes D,D-peptidasa (D,D-transpeptidasa, D,D-carboxipeptidasa o D,D-endopeptidasa). Las reacciones de carboxipeptidación y transpeptidación siguen un mecanismo de tres etapas, i) formación rápida y reversible de un complejo no covalente entre la enzima y una cadena pentapeptídica de PG “donadora”, ii) ataque de la serina activa sobre el átomo de carbono de un grupo carbonilo del enlace peptídico D-Ala-D-Ala terminal, que conduce a la formación de un intermediario acil-enzima y a la liberación de un residuo C-terminal D-Ala (acilación), iii) deacilación, un proceso de hidrólisis con liberación de una cadena peptídica acortada (carboxipeptidación), o formación de un entrecruzamiento con una segunda cadena peptídica “aceptora” (transpeptidación). La actividad D,D-endopeptidasa consiste en la hidrólisis del entrecruzamiento peptídico (puente peptídico) generado por la actividad D,D-transpeptidasa. Las actividades D,D-peptidasa en PBPs son catalizadas por un dominio que une β-lactámicos (dominio PB), constituido por dos subdominios y un sitio catalítico (activo) ubicado entre ellos. Esta localización supone una mayor flexibilidad, característica que puede influir en la capacidad de *binding* de algunas PBPs por ligandos diferentes. El sitio activo de estas proteínas contiene nueve residuos altamente

conservados; la serina catalítica se encuentra ubicada al comienzo de una hélice α_2 y seguida por una lisina para formar la secuencia S*xxK; una segunda secuencia, SxN, se sitúa generalmente en un *loop* entre las hélice α_4 y α_5 , cuatro residuos conservados forman la tercera secuencia KTG(T/S) y un noveno residuo, una glicina (G) ubicada en la fracción posterior del sitio activo, se encuentra también rigurosamente conservada. Información estructural relacionada con la interacción de estas proteínas y su sustrato, reconoce que el penúltimo residuo D-Ala de la cadena peptídica donadora se ajusta perfectamente al sitio activo, con su grupo amida ubicado entre la cadena lateral del aminoácido asparagina (N) de la segunda secuencia y una lámina β_3 (que limita el sitio activo), el oxígeno del grupo carbonilo dispuesto en la cavidad oxianión, su grupo metilo inserto en un bolsillo hidrofóbico, y el ión carboxilato orientado hacia los dos grupos hidroxilo de la tercera secuencia. En resumen, de los nueve residuos conservados, la asparagina de la segunda secuencia (SxN) y ambos grupos hidroxilo de la tercera secuencia (KTG) son importantes para el posicionamiento correcto del sustrato, la glicina de la tercera secuencia es necesaria para evitar impedimentos estéricos en el sitio activo, y la glicina en la porción posterior del sitio catalítico, es importante en la especificidad de *binding* de la PBP por su sustrato (Figura 8). El proceso de acilación de PBPs por la penúltima D-Ala de la cadena donadora, y la liberación simultánea del residuo D-Ala terminal, requiere la sustracción de un protón desde la serina activa, una función que puede ser asumida por la lisina (K) desprotonada de la tercera secuencia. En la etapa de deacilación, un protón del aceptor (un grupo amino en transpeptidación, una molécula de agua en carboxipeptidación) debe ser extraído, para permitir que el grupo activado ataque el átomo de carbono del grupo carbonilo en el enlace éster del complejo acil-enzima; la retirada de este protón es una acción que podría ser realizada por la lisina de la tercera secuencia, o por una serina de la segunda secuencia con ayuda de la lisina antes mencionada (Sauvage *et al.*, 2008).

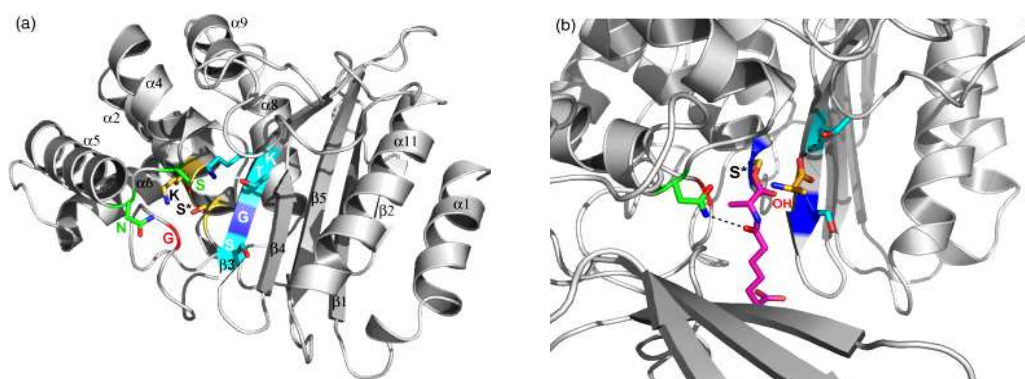


Figura 8 | (a) Dominio PB y secuencias conservadas para el sitio activo de PBP4a (*Bacillus subtilis*) (b) Dominio PB de PBP4a acilado por un dipéptido mimético para PG (D- α -amino-pymelyl- ϵ -D-alanina) en color magenta. OH indica la cavidad oxianión definida por los dos grupos amina en azul oscuro. D-alanina liberada se muestra en color naranja (Sauvage *et al.*, 2008)

1.3.4. Penicillin-Binding Proteins en *Pseudomonas aeruginosa*

Un primer estudio comparativo entre PBPs de *P. aeruginosa* y *E. coli* describe seis proteínas principales que unen penicilina [penicilina G ¹⁴C], identificadas como PBP1a, 1b, 2, 3, 4 y 5, de acuerdo a su movilidad electroforética, y que se corresponden con PBP1b, 1a, 2, 3, 4 y 5 de *E. coli* (Noguchi *et al.*, 1979).

Actualmente se reconocen 8 PBPs para el modelo *P. aeruginosa*, PBP1a, PBP1b, PBP2, PBP3, PBP3a(3x), PBP4, PBP5(6) y PBP7, que muestran homología con PBP1a, 1b, 2, 3, 4, 5 y 7 de *E. coli*. Los genes codificantes para PBP1a, 2, 3, 3a (3x) y 5 han sido clonados y caracterizados (Tabla 3) (Legaree *et al.*, 2007; Farra *et al.*, 2008).

Tabla 3 | Penicillin-Binding Proteins en *Pseudomonas aeruginosa* (PBPs con estructura cristalográfica se destacan en recuadro de color rojo) (Farra *et al.*, 2008)

PBP	Gene	Locus ID	Type	Corresponding PBP in <i>Escherichia coli</i>
1a	<i>ponA</i>	PA5045	HMW(A)	1a
1b	<i>ponB</i>	PA4700	HMW(A)	1b
2	<i>pbpA</i>	PA4043	HMW(B)	2
3	<i>pbpB</i>	PA4418	HMW	3
3a	<i>pbpC</i>	PA2272	HMW	3 homolog
4	<i>dacB</i>	PA3047	LMW	4
5/6	<i>dacC</i>	PA3999	LMW	5
7	<i>pbpG</i>	PA0869	LMW	7

1.3.5. Penicillin-Binding Proteins. HMM-PBPs para el modelo *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.5.1. HMM-PBP clase A. PBP1a-PBP1b

El gen *ponA* (locus PA5045) codifica la proteína PBP1a de *P. aeruginosa*, una HMM-PBP clase A (91.2 kDa) capaz de unir covalentemente penicilina y recuperada desde la fracción de membrana interna. PBP1a de *P. aeruginosa* presenta un 43.7% de identidad con PBP1a de *E. coli*, y un 32% de identidad estricta con PBP1b, lo que cambia la correspondencia propuesta inicialmente. La secuencia aminoacídica de esta proteína permite deducir la presencia de un potencial segmento transmembrana (N-terminal) altamente hidrofóbico, que permitiría el anclaje de esta proteína a la membrana interna; un dominio N-terminal con secuencias conservadas, que incluye un módulo de unión a penicilina (PB) y sus secuencias (S461SFK), (S520RN) y (K695PG), una extensión interna entre el extremo N-terminal y el módulo PB; y una extensión en el extremo C-terminal del módulo PB (Handfield *et al.*, 1997).

El gen *ponB* (locus PA4700) codifica la proteína bifuncional PBP1b de alta masa molecular (85.5 kDa), con actividades glicosiltransferasa y D,D-transpeptidasa. La secuencia aminoacídica para esta enzima presenta una homología de 61% con PBP1b de *E. coli* (Nakagawa *et al.*, 1984; Plá *et al.*, 1990).

1.3.5.2. HMM-PBP clase B. PBP2

El gen *pbpA* (locus PA4003) codifica una secuencia aminoacídica (masa molecular estimada de 72.2 kDa), que presenta un 43.1% de identidad y un 74.4% de homología con PBP2 de *E. coli*; se sugiere que esta proteína podría ser clasificada como una HMM-PBP clase B subclase B2, como sucede para PBP2 de *E. coli*. PBP2 de *P. aeruginosa* es una enzima monofuncional, que combina un dominio asociado a membrana de no unión a penicilina (n-PB) y un dominio PB transpeptidasa. Un análisis *upstream* y *downstream* del gen *pbpA* reconoce su ubicación, como en *E. coli*, en un *cluster* con genes implicados en el metabolismo del PG (*rodA*, *rlpA*, *dacA*), además de un gen codificante para StlB1 (transglicosilasa lítica soluble), ausente del respectivo grupo genético en *E. coli*. Células carentes de una copia funcional de *pbpA* son mucho más susceptibles a diferentes β -lactámicos, incluyendo a aquellos que no poseen actividad anti-*Pseudomonas*. Mecilinam (amidinopenicilina) se une covalentemente y en alta especificidad a PBP2 de *P. aeruginosa* y *E. coli*. La generación de células esféricas por inhibición de mecilinam o mutaciones insercionales de PBP2 en ambos modelos, indica que la función de esta proteína tiene relación directa con la biosíntesis y mantención de la pared cilíndrica en el *sacculus* de mureina, no obstante, se han demostrado diferencias en el efecto inactivante de PBP2, en relación al diámetro bacteriano y la viabilidad celular. En *E. coli*, la ausencia de PBP2 produce un aumento de tamaño que impide la generación de un anillo septal completo, ya que la concentración disponible de FtsZ es insuficiente, esta situación impide el proceso de división y conduce a autólisis celular, mientras que *P. aeruginosa* carente de PBP2, no incrementa su diámetro celular, lo que permite la formación de un anillo septal completo, y un proceso de división continuo, razón por la cual se indica que PBP2 en *P. aeruginosa* es responsable de la morfología bacilar y contribuye a la resistencia frente a antibióticos β -lactámicos, y que la viabilidad de células carentes de una PBP2 activa, sugiere que la organización de la maquinaria biosintética del PG es diferente en este patógeno (Legaree *et al.*, 2007).

1.3.5.3. HMM-PBP clase B. PBP3

El análisis del genoma de PAO1, específicamente *upstream* y *downstream* del gen *ftsI* (*pbpB*) indicó, como sucede en *E. coli*, su proximidad con un *cluster* genético involucrado en la síntesis de precursores de PG (*murE*, *murF*, *murD*, *mraW* y *mraY*), en división celular y formación del *septum* bacteriano (*ftsW*, *ftsL*). El gen *ftsI* (locus PA4418) codifica una proteína (masa molecular de 62.9 kDa) con un 45% de identidad y un 62% de similitud con PBP3 de *E. coli*. Clasificada como una HMM-PBP clase B, PBP3 de *P. aeruginosa* corresponde a una enzima monofuncional con un dominio N-terminal de no unión a penicilina (n-PB) asociado a membrana y un dominio PB transpeptidasa C-terminal (de León *et al.*, 2010). La estructura cristalográfica para PBP3 desde *P. aeruginosa* demuestra la presencia de un subdominio principal N-terminal constituido por hélices α y ubicado entre los residuos 80-149, su función se desconoce, pero posiblemente sirva para posicionar el dominio transpeptidasa a distancia de la membrana interna, como parte de un complejo multienzimático involucrado en biosíntesis de pared celular. El sitio activo de esta proteína se encuentra localizado en una cavidad paralela a una lámina β 3, que atraviesa la porción

inferior del dominio transpeptidasa. Se reconoce la presencia de las tres secuencias estructurales, conservadas y comunes a D,D-peptidasas; la secuencia S*xxK (S294T295V296K297) está localizada en el extremo N-terminal de una hélice $\alpha 2$ e incluye la serina nucleofílica (ubicada favorablemente para acilación), la secuencia SxN (S349S350N351) está presente entre las hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$, y la tercera secuencia conservada KS/TG (K484S485G486) está ubicada sobre la lámina $\beta 3$ y junto a los residuos 530-533 en el *loop* formado por la lámina $\beta 5$ y la hélice $\alpha 11$. Las tres secuencias conservadas interactúan entre sí, a través de una red de enlaces de hidrógeno, donde el grupo hidroxilo de S294 forma un enlace de hidrógeno con la cadena lateral de K297 y K484, residuos que se encuentran unidos a S349 y N351, respectivamente, la posición de K297 hace de este residuo uno de los posibles receptores del protón derivado de S294 durante la etapa de acilación (Sainsbury *et al.*, 2011). Estudios de fraccionamiento celular demostraron que la proteína recombinante PBP3 de PAO1 se presentó en membrana interna y espacio periplásmico, y mediante inmunomarcaje (proteína G-oro coloidal) y microscopía electrónica de transmisión (MET) fue localizada predominantemente en el *septum* de división (de León *et al.*, 2010).

1.3.5.4. HMM-PBP clase B. PBP3a (PBP3x)

Se sugiere que el gen *pbpC* podría haberse originado como consecuencia de una duplicación génica del gen *ftsI* en *P. aeruginosa*. El gen *pbpC* (locus PA2272) codifica PBP3a (o PBP3x), una proteína homóloga a PBP3, con una masa molecular estimada de 61.1 kDa. La secuencia traducida del gen *pbpC* presenta un 40.7% de identidad con PBP3 de *E. coli* y un 48.3% de identidad con PBP3 de *P. aeruginosa*. La sobreproducción de PBP3a no afecta la susceptibilidad frente a antibióticos β -lactámicos cuyo blanco es PBP3 (aztreonam, cefepime, ceftazidima), a diferencia del aumento en los niveles de resistencia observados al sobreexpresar PBP3. Esto podría deberse a la menor afinidad de PBP3a por estos antibióticos, condición que estaría determinada por las diferencias en los aminoácidos de la secuencia funcional SxxK de ambas proteínas (STVK, SSN, KSG son las secuencias conservadas para PBP3, y SVIK, SSN, KSG corresponden a las secuencias en PBP3a). Se ha indicado que la mutación del gen *pbpC* no genera cambios en la forma celular, sugiriendo que PBP3a no es esencial en morfología o viabilidad celular, además, la expresión de PBP3a es inversamente dependiente de la tasa de crecimiento, una situación muy diferente a la reconocida en PBP3. La comparación entre las secuencias aminoacídicas de PBP3a y otras HMM-PBPs clase B, indica que esta proteína está relacionada con PBP3 de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *Haemophilus influenzae*, y con PBP2 de *Neisseria gonorrhoeae*, un grupo de PBPs reconocidas durante la formación del *septum* de división en bacterias Gram negativas (Liao & Hancock, 1997).

1.3.6. Penicillin-Binding Proteins. LMM-PBPs para el modelo *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.6.1. LMM-PBP clase C. PBP5/6

PBP5 o PBP6 (LMM-PBP5/6) es una de las PBPs más abundantes en *P. aeruginosa*. PBP5/6 es codificada por el gen *dacC* (locus PA3999) y su secuencia aminoacídica presenta una homología de 64% y de 66%, con PBP5 y PBP6 de *E. coli*, respectivamente, y una masa molecular estimada de 42.5 kDa. Esta proteína posee una actividad principal D,D-carboxipeptidasa, pero retiene suficiente actividad β -lactamasa para contribuir a la resistencia frente a antibióticos β -lactámicos en este modelo bacteriano. La estructura cristalográfica para PBP5 en PAO1 demuestra una naturaleza dimerica y un plegamiento proteico muy similar al de enzimas PBP5 y PBP6 en *E. coli*, con características muy parecidas a la estructura que domina el sitio activo en β -lactamasas clase A. Cada monómero presenta un dominio N-terminal de mayor tamaño que contiene al sitio activo, y un dominio menor C-terminal, rico en láminas β . Los sitios activos de ambos monómeros están ubicados en la interface dimerica, y cada uno de ellos es parcialmente bloqueado por residuos del monómero vecino, debido a las interacciones de un pequeño *loop* en el sitio activo (residuos 76 a 79). Los residuos S41 y K44 tienen conformaciones casi idénticas en ambos monómeros y un enlace de hidrógeno entre ellos, mientras que otros residuos como S78, S101, N103 y K203, presentan conformaciones diferentes en monómeros 1 y 2. Aunque diferentes conformaciones para S78, S101, N103 y K203, han sido reconocidas en otras PBPs, LMM-PBP5 de *P. aeruginosa* representa un ejemplo único, donde múltiples residuos cambian simultáneamente sus estados conformacionales (rotaméricos) para entregar diferentes configuraciones de sitio activo en la misma proteína. Se ha determinado que la conformación en el monómero 1 de los residuos antes mencionados, es parecida a la de residuos equivalentes en PBP5 y PBP6 de *E. coli*, mientras que las conformaciones en el monómero 2 son similares a la observada en β -lactamasas clase A como CTX-M. El ángulo formado entre los dominios es diferente para cada monómero, y también al compararlo con el de otras enzimas D,D-carboxipeptidasas, indicando que existe cierta flexibilidad en la región de unión que conecta ambos dominios. Esta flexibilidad no parece ser relevante para el mecanismo catalítico de la enzima, sin embargo, estudios de dinámica molecular indican que esta condición puede explicar la actividad carbapenemasa de esta enzima, una función ausente en PBP5 de *E. coli*. Para enzimas que han evolucionado hacia una eficiente actividad carbapenemasa, tales como β -lactamasa KPC-2, la cavidad de su sitio activo se ensancha, y residuos que ocupan las posiciones 96 a 105, se vuelven flexibles, cambio que también sucede en PBP5 de PAO1. La flexibilidad del sitio activo es evidente en los residuos G76-G77, encontrados en el *loop* 1 de PBP5 (*loop* 1 comprende los residuos 74 a 78, equivalentes a los residuos 101 a 105 en β -lactamasas clase A), y su expansión (en aproximadamente 1 Å) es acompañada de cambios conformacionales en la secuencia conservada SxN. Una forma soluble para PBP5 (sin péptido señal y anclaje a membrana) demostró actividad D,D-CPasa sobre sustratos sintéticos, con un perfil de pH y parámetros cinéticos muy similares a los de PBP5 de *E. coli* (una auténtica D,D-CPasa), mientras que la actividad β -lactamasa demostrada fue modesta pero cuantificable. Se sugiere que PBP5 de PAO1 puede catalizar una reacción D,D-CPasa siguiendo la vía catalítica de PBP5 de *E. coli*, durante la cual un

residuo neutral K44 funciona como aminoácido prioritario en procesos de acilación y deacilación, pudiendo asumir un rol similar durante la hidrólisis de antibióticos β -lactámicos (Smith *et al.*, 2013).

1.3.6.2. LMM-PBP clase C. PBP7

En *P. aeruginosa*, el gen *pbpG* (locus PA0869) codifica una proteína de baja masa molecular (34 kDa) con una secuencia aminoacídica que muestra un 63% de identidad con PBP7 (D,D-EPasa) de *E. coli*, un 60% de identidad con PbpG de *Vibrio cholerae* y solo un 23% de identidad con PBP7 de *Haemophilus influenzae*. Del mismo modo que PBP7 de *E. coli*, PBP7 en *P. aeruginosa* se encuentra débilmente asociada a membrana, su inactivación no produce un fenotipo evidente en condiciones habituales de cultivo, y la sobreexpresión induce lisis celular (Song *et al.*, 1998).

1.4. Mecanismo de inducción de β -lactamasa cromosomal AmpC en *Pseudomonas aeruginosa*

1.4.1. β -lactamasa AmpC en *Pseudomonas aeruginosa*

La resistencia bacteriana frente a antibióticos β -lactámicos se encuentra determinada, principalmente, por la producción de enzimas inactivantes (codificadas en genes intrínsecos y expresión inducible). Las enzimas cromosomales AmpC (β -lactamasas clase C) poseen, en general, masas moleculares estimadas de 34-40 kDa y puntos isoeléctricos >8.0 , están localizadas en el periplasma bacteriano y son activas frente a penicilinas, pero aun más eficientes sobre cefalosporinas, pudiendo hidrolizar cefamicinas tales como cefoxitina y cefotetan, cefalosporinas de 3ª generación como ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona, y monobactámicos como aztreonam. Aunque la tasa de hidrólisis para tales sustratos es baja debido a una lenta deacilación, la afinidad enzimática, reflejada por una baja K_m , es alta, un factor que es importante frente a concentraciones bajas de sustrato. Las tasas de hidrólisis para cefepime, ceftiprome y carbapenémicos es también muy baja, y los valores de K_m para estas cefalosporinas de 4ª generación son altos, lo que da cuenta de una menor afinidad enzimática. La estructura de AmpC es similar a la de β -lactamasas clase A (y D,D-peptidasas), solo el sitio activo es más abierto en las de clase C, lo que demuestra una mayor habilidad para acomodar grandes cadenas laterales de cefalosporinas. Residuos claves en enzimas AmpC, además de la serina catalítica (S64), incluyen a K67 (unida a S64 a través de un enlace de hidrógeno), Y150, N152, K315 y A318; sustituciones de estos residuos disminuyen dramáticamente su actividad enzimática (Jacoby, 2009). En *P. aeruginosa*, el gen *ampC* (locus PA4110) codifica una proteína periplásmica con una masa molecular estimada de 43.4 kDa y pI teórico de 8.65. AmpC de *P. aeruginosa* es una enzima naturalmente inducible, de este modo, y en ausencia de un β -lactámico inductor, cepas *wild-type* pueden ser susceptibles a penicilinas anti-*Pseudomonas*, combinaciones inhibidor-penicilina, cefalosporinas y carbapenémicos, si otro mecanismo de resistencia no se encuentra operativo, sin embargo, un incremento en la producción de AmpC puede causar resistencia a casi todos los β -lactámicos conocidos, excepto a carbapenémicos (la resistencia a esta clase de antibióticos requiere la cooperación de mecanismos adicionales). La sobreproducción de AmpC puede suceder a través de la inducción reversible de la

expresión de *ampC* durante la exposición a ciertos β -lactámicos (cefamicinas y carbapenémicos) e inhibidores de β -lactamasa (ácido clavulánico), sin embargo, esta sobreexpresión no siempre impacta en la susceptibilidad frente a antibióticos carbapenémicos. Variantes mutacionales para AmpC (β -lactamasas AmpC de espectro extendido) descritas inicialmente en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, y recientemente en cepas de *P. aeruginosa*, demuestran una actividad hidrolítica mayor frente a cefalosporinas e imipenem, y su sobreproducción parece ser un requisito para la resistencia frente a carbapenémicos. Una amenaza terapéutica importante sucede cuando la regulación de *ampC* se pierde por desrepresión, condición que generalmente involucra mutaciones genéticas en proteínas responsables de regular la expresión de *ampC* (Poole, 2011; Wolter & Lister, 2013). En *P. aeruginosa*, el mecanismo que controla la producción de la cefalosporinasa AmpC está involucrado en el control de numerosos genes, la inducción del gen *ampC* se encuentra íntimamente conectada al reciclaje del PG, pero la regulación de la expresión de *ampC* no es aún totalmente entendida (Tsutsumi *et al.*, 2013).

1.4.2. Reciclaje de peptidoglicano y mecanismo regulador de la inducción de AmpC

La vía de reciclaje de PG es un sistema muy regulado, que permite remodelar eficientemente la pared celular bacteriana durante los procesos de crecimiento y división, sin comprometer su integridad. *P. aeruginosa* ha sido propuesta como una bacteria capaz de “sensar” el trastorno de su pared celular, induciendo la expresión de β -lactamasa AmpC y recuperando la homeostasis del PG mediante la hidrólisis del antibiótico, que restablece la producción de esta enzima a niveles basales. Durante el crecimiento y división normal, fragmentos de PG son eliminados por autolisinas, produciendo una serie de péptidos periplásmicos GlcNAc-1,6-anhidroMurNAc-péptidos (tri, tetra o pentapéptidos) transportados al citoplasma a través de permeasas de membrana interna AmpG y AmpP. En el citoplasma, GlcNAc es eliminada desde el muropéptido por acción de una glucósido hidrolasa (β -N-acetilglucosaminidasa) NagZ, y el *pool* de 1,6-anhidroMurNAc-péptidos (tri y pentapéptidos) es reciclado para formar UDP-MurNAc-pentapéptido, un precursor de PG que será reincorporado en la mureina de la pared celular. Desde el *pool* de catabolitos 1,6-anhidroMurNAc-péptidos, las especies tripeptídicas y pentapeptídicas han sido propuestas como moléculas efectoras que inducen la transcripción de *ampC*; mientras que el producto anabólico UDP-MurNAc-pentapéptido se cree que reprime esta transcripción. La especie 1,6-anhidroMurNAc-tetrapéptido no se acumula en el citoplasma, ya que es convertido en 1,6-anhidroMurNAc-tripéptido por una L,D-CPasa citosólica, LdcA (no existe evidencia de que este muropéptido esté implicado en la activación de AmpR). Los niveles relativos de metabolitos anabólicos y catabólicos de PG, controlan la transcripción de *ampC*, esto se logra a través de lo que se cree es la unión competitiva de las moléculas a AmpR (regulador transcripcional tipo LysR). Juntos, los genes *ampR-ampC* forman un operón divergente con promotores superpuestos a los que se une AmpR y regula la transcripción de ambos genes. En ausencia de antibióticos β -lactámicos, la concentración citoplasmática de 1,6-anhidroMurNAc-péptidos es controlada por la actividad de AmpD, una N-acetilmuramil-L-alanina amidasa que remueve la cadena peptídica desde 1,6-anhidroMurNAc y GlcNAc-1,6-anhidroMurNAc, reduce su concentración y evita la sobreexpresión

de AmpC, de esta manera, UDP-MurNAc-pentapéptido predomina y se une a AmpR, favoreciendo la represión de la transcripción de *ampC*. La exposición a β -lactámicos (inductores) detiene la síntesis y eleva la fragmentación del PG, favoreciendo la acumulación de 1,6-anhidroMurNAc-péptidos, y permitiendo que probablemente sean las especies tripeptídicas o pentapeptídicas, las que desplacen a UDP-MurNAc-pentapéptido desde el regulador AmpR, determinado la activación transcripcional del gen *ampC* (Jacoby, 2009; Kong *et al.*, 2010a; Mark *et al.*, 2011). El mecanismo regulador de AmpC en *P. aeruginosa*, es mucho más complejo que el presente en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, al incluir una proteína AmpR comprometida en la regulación de genes adicionales a *ampC*, como *ampE* y *creD* (sistema regulador de dos componentes CreBCD), además del gen *dacB* (LMM-PBP4), involucrados en la hiperproducción constitutiva de AmpC (Jacoby, 2009).

1.4.3. Proteínas involucradas en la regulación de la producción de AmpC

1.4.3.1. Regulador transcripcional. AmpR

AmpR pertenece a la familia de reguladores transcripcionales tipo LysR, un grupo muy abundante de proteínas, altamente conservadas y ubicuas en el dominio *Bacteria*, con ortólogos funcionales identificados en arqueas y organismos eucarióticos. AmpR posee un dominio N-terminal de unión a ADN y un dominio C-terminal de unión a efector (*effector binding domain*, EBD); la estructura cristalográfica para el dominio EBD (*Citrobacter freundii*), demuestra una naturaleza dimérica, con cada monómero consistente en dos subdominios con un plegamiento α/β tipo Rossmann, entre los cuales existe un bolsillo muy profundo. El bolsillo, junto a un surco a lo largo de la superficie del subdominio I, forma un sitio de unión a efector, cuyas dimensiones y carga electrostática parecen adecuadas para la unión del ligando activador 1,6-anhidroMurNAc-tripeptido (o pentapéptido), y la molécula represora UDP-MurNAc-pentapéptido. Se ha sugerido que UDP-MurNAc-pentapéptido puede reprimir AmpR, a través de su unión en un sitio diferente al del bolsillo interdominio, ya que el modelaje realizado para este efector en la cavidad no fue concluyente. Sustituciones conservadas en la base del bolsillo interdominio (T103V, S221A y Y264F), fueron suficientes para cancelar la activación de AmpR (previniendo la inducción de *ampC*), sin alterar la estructura del dominio EBD; mientras que una mutación no conservativa G102E, induce un cambio conformacional que resulta en producción constitutiva de AmpC (Maddocks & Oyston, 2008; Balcewich *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2010b). En *P. aeruginosa* O1 el gen *ampR* (PA4109) codifica una proteína reguladora de unión a ADN con una masa molecular estimada de 32.6 kDa y pl teórico de 6.84. La similitud estructural con respecto a la proteína AmpR presente en *C. freundii* y *E. cloacae* fue de 58% y 62%, respectivamente. Un reciente estudio identifica el amplio repertorio de regulación de AmpR en *P. aeruginosa*, y concluye que esta proteína funciona como un regulador global (regulón AmpR) con un rol fundamental en resistencia antimicrobiana, en virulencia y en el metabolismo general de esta bacteria (Figura 9) (Balasubramanian *et al.*, 2012).

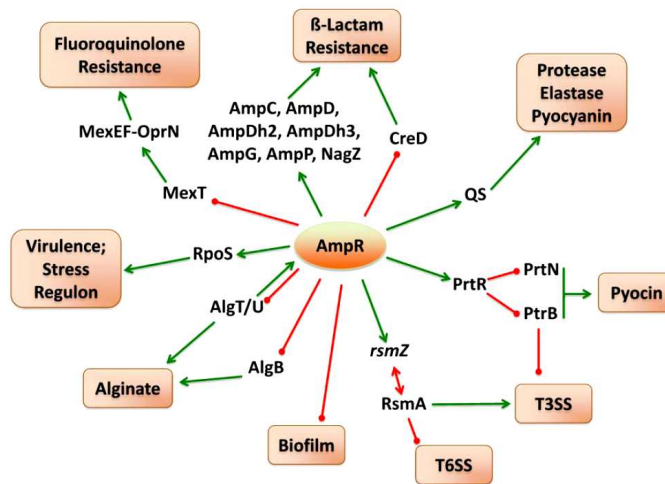


Figura 9 | AmpR como regulador global de la expresión génica en *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) (Balasubramanian *et al.*, 2012)

1.4.3.2. Permeasas. AmpG-AmpP

En *E. coli*, AmpG ha sido reconocida como una permeasa sustrato específica que permite el transporte de GlcNAc-anhidroMurNAc y GlcNAc-anhidroMurNAc-péptidos (tri, tetra y pentapéptido), desde el espacio periplásmico al citoplasma. El análisis del genoma de *P. aeruginosa* O1 identifica dos genes ortólogos de *ampG*, PA4218 y PA4394 (PA4218 presenta un 21.8% de identidad y un 34.8% de similitud con AmpG de *E. coli*, mientras que PA4393 es 23.2% idéntico y 34.3% similar a AmpG de *E. coli*). El locus PA4393 codifica una permeasa putativa, AmpG (masa molecular estimada 64.6 kDa), mientras que PA4218 es identificada como la secuencia codificante de un probable trasportador AmpP (masa molecular estimada 43.2 kDa). Consistente con sus roles como permeasas, los análisis topológicos sugieren que AmpG y AmpP poseen 14 y 10 dominios transmembrana, respectivamente, y que en ambas proteínas, sus extremos N-terminal y C-terminal presentan ubicación citoplasmática. Se ha demostrado que la expresión de *ampG* es β-lactámico y *ampR*-independiente, mientras que la expresión de *ampP* es β-lactámico y *ampR*-dependiente, destacándose que *ampP* puede autoregular su propia expresión y la de *ampG*. Estas dos proteínas no redundantes, parecen necesarias para la máxima expresión de *ampC*. Ambas proteínas poseen elementos estructurales que son consistentes con un rol en transporte, sugiriéndose que una de ellas podría estar involucrada en el importe de 1,6-anhidroMurNAc-péptidos, mientras que para la segunda proteína se ignora su funcionalidad (podría estar involucrada en el importe y exporte de estos catabolitos de PG); actualmente se desconoce la identidad de la(s) molécula(s) efectora(s) que controlan el proceso de inducción de AmpC en *P. aeruginosa* (Kong *et al.*, 2010a).

1.4.3.3. β -N-acetilglucosaminidasa. NagZ

Los productos de reciclaje del PG que ingresan a través de la(s) permeasa(s) de membrana interna al citoplasma bacteriano, son procesados por una glucósido hidrolasa citoplasmática β -N-acetilglucosaminidasa (NagZ), que remueve un residuo GlcNAc y genera un *pool* de 1,6-anhidroMurNAc-péptidos, que se sugiere pueden inducir la producción de AmpC, al interactuar con el regulador transcripcional AmpR, sin embargo, durante el crecimiento bacteriano regular, los productos generados por NagZ son procesados por AmpD, y transformados en UDP-MurNAc-pentapéptido, un precursor que es exportado al periplasma y reincorporado a la pared celular, y que además previene la inducción de *ampC* (Asgarali *et al.*, 2009; Zamorano *et al.*, 2010). En *P. aeruginosa*, el gen *nagZ* (PA3005) codifica una proteína con una masa molecular estimada de 36.1 kDa y pI teórico de 5.82, y del mismo modo que en *E. coli*, corresponde a un componente esencial para la sobreproducción de AmpC. La inactivación de *nagZ* previene y revierte la resistencia frente a antibióticos β -lactámicos, determinada por mutaciones en proteínas AmpD y PBP4. Recientes estudios han demostrado la marcada disminución de la resistencia frente a β -lactámicos anti-*Pseudomonas*, ejercida por la inactivación de *nagZ*, y asociada a la pérdida de actividad AmpD (la inactivación del gen restituyó la susceptibilidad a β -lactámicos en un mutante triple *ampD*). La pérdida de NagZ restableció además, los niveles de CMI y de expresión de *ampC* en un mutante *dacB* (LMM-PBP4), reduciendo significativamente el impacto de un doble mutante *dacB-ampD* (Zamorano *et al.*, 2010; Mark *et al.*, 2011).

1.4.3.4. N-acetilmuramil-L-alanina amidasas. AmpD-AmpDh2-AmpDh3

En miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, AmpC es regulada por un modelo de expresión de un solo paso (inducción-desrepresión), en el cual la hiperproducción constitutiva de esta β -lactamasa se alcanza, mediante inactivación de AmpD (Schmidtke & Hanson, 2008). La proteína AmpD (N-acetilmuramil-L-alanina amidasa) corresponde a una amidasa citoplasmática involucrada en el reciclaje de la pared celular y en la resistencia frente a antibióticos β -lactámicos. Presenta especificidad por 1,6-anhidroMurNAc-pentapéptidos, y cataliza la hidrólisis del enlace amida entre la cadena peptídica y la fracción MurNAc, generando como productos 1,6-anhidroMurNAc y péptidos. Pertenece a una familia de amidasas bacterianas que incluye a miembros Zinc-dependientes, y a la totalidad de proteínas de reconocimiento de PG. La estructura cristalográfica para AmpD (*Citrobacter freundii*) presenta una conformación abierta, con un sitio de unión a PG ubicado en una cavidad profunda (~ 26 Å), con una zona mucho más estrecha cerca del sitio activo (~ 9 Å), y regiones de amplitud variable en el propio sitio catalítico (~ 12 Å de amplitud en el sitio de unión a residuos de glicano, y ~ 16 Å en el extremo del sitio de unión para la porción peptídica del sustrato) (Carrasco *et al.*, 2011).

En *P. aeruginosa*, la inactivación del gen *ampD* ha sido relacionada con un fenotipo de desrepresión parcial en la regulación de *ampC*, una condición caracterizada por el incremento en la producción de AmpC, pero reteniendo inducibilidad. Se ha reconocido para este modelo bacteriano, que la expresión de *ampC* es reprimida de manera coordinada por 3 homólogos de *ampD*, un gen *ampD* (PA4522) que codifica una proteína con una masa molecular

estimada de 21 kDa, y dos genes adicionales nombrados como *ampDh2* y *ampDh3*. El gen *ampDh2* (PA5485) codifica una proteína con una masa molecular de 28.9 kDa, mientras que *ampDh3* (PA0807) codifica una proteína con una masa molecular estimada de 28.7 kDa. La presencia de estos 3 homólogos, ciertamente puede ser beneficiosa en esta bacteria, ya que además de permitir diferentes niveles de expresión para β -lactamasa AmpC y resistencia antibiótica, puede tolerar la hiperproducción de esta cefalosporinasa, sin alterar el proceso de reciclaje de PG. La proteína AmpD de *P. aeruginosa*, presenta un 65%, 63% y 62% de similitud con proteínas AmpD de *E. coli*, *C. freundii* y *E. cloacae*, respectivamente; mediante el alineamiento de secuencias, se demostró que las proteínas AmpDh2 y AmpDh3 son 27% y 25% idénticas a AmpD de *P. aeruginosa*, y 26% idénticas a AmpD de *E. cloacae*, mientras que el porcentaje de identidad entre AmpDh2 y AmpDh3 fue de 40%. Los genes *ampDh2* y *ampDh3* en *P. aeruginosa* se encuentran altamente conservados en esta especie, y ambas proteínas contienen todos los residuos previamente determinados como esenciales para la actividad catalítica de AmpD para *C. freundii*, incluyendo H34, H154, K162 y D164 (Juan *et al.*, 2006). Recientemente, se ha logrado resolver la estructura cristalográfica de AmpDh2 y AmpDh3 para *P. aeruginosa*, determinándose que AmpDh2 es un dímero unido a la cara interna de la membrana externa, desde donde hidroliza la unión entre una cadena peptídica (entrecruzada o no) y el residuo MurNAc del *sacculus* de mureína, con baja actividad específica por aparente selectividad en su reacción. AmpDh3, corresponde a un tetrámero soluble de ubicación periplásmica involucrado en el remodelaje del PG, con una alta actividad específica, interactuando preferentemente con componentes poliméricos e insolubles de la pared celular. Ambas proteínas se complementan entre sí, en el recambio y/o maduración de la pared celular (Lee *et al.*, 2013). La información disponible permite deducir, a este nivel, que la regulación hacia la desrepresión total de la expresión de *ampC* en *P. aeruginosa*, es alcanzada a través de un mecanismo secuencial de 3 pasos, que producen 4 estados de expresión relevantes y fenotipos de resistencia: nivel basal de expresión inducible (PAO1 *wild-type*), nivel moderado de expresión hiperinducible con incremento en resistencia a β -lactámicos anti-Pseudomonas ($PA\Delta ampD$), nivel alto de expresión hiperinducible con alto nivel de resistencia frente a β -lactámicos ($PA\Delta ampD-ampDh3$), y muy alto nivel de expresión (desrepresión), sin incrementar el alto nivel de resistencia frente a β -lactámicos ($PA\Delta ampD-ampDh2-ampDh3$). Se concluye entonces, que la importancia relativa de las proteínas AmpD con respecto a la expresión de *ampC* y a la resistencia antimicrobiana es: AmpD>AmpDh3>AmpDh2 (Juan *et al.*, 2006; Schmidtke & Hanson, 2008).

1.4.3.5. Proteína AmpE

En *P. aeruginosa*, el codón de inicio ATG, para el gen *ampE* (PA4521), se superpone al codón de término TGA, del gen *ampD*, lo que sugiere que ambos forman un operón, como ha sido descrito para *E. coli*. La proteína codificada por *ampE*, posee las características de una proteína de membrana interna con 5 dominios transmembrana, muestra un nivel de similitud de un 30%, con su homólogo de *E. coli*, y corresponde al segundo componente del operón bicistrónico *ampDE* (Langee *et al.*, 1998). No es posible descartar la participación de AmpE en el desarrollo de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos, a pesar de no existir aislamientos clínicos que presenten mutaciones

para esta proteína; sin embargo, lo que está demostrado es que la delección del operón *ampDE* incrementa la resistencia a β -lactámicos, a través de la hiperproducción de AmpC. La proteína AmpE ha sido propuesta como un transductor de señal que modularía la actividad de AmpD, resultando imprescindible para la inducción de AmpC (con un posible rol represor para la expresión de esta β -lactamasa, en ausencia de AmpD) (Honoré *et al.*, 1989; Langee *et al.*, 1998).

1.4.3.6. Sistema regulador CreBCD

En bacterias Gram negativas, solo 2 sistemas reguladores (BlrAB y CreBC) han sido identificados como responsables del control de la expresión génica en situaciones de estrés de la pared celular (Ayala *et al.*, 2012). El sistema BlrAB de *Aeromonas hydrophila* permite la inducción de al menos tres clases de β -lactamasas, en respuesta a cambios en la composición del PG, por presencia de β -lactámicos. La inhibición de PBPs incrementa la concentración de disacárido pentapéptido (M5), este ligando activador interactúa con el sensor quinasa BlrB, causando su autofosforilación. El fosfato es transferido a BlrA (no relacionada con AmpR), proteína que se une a la secuencia TTCAC (*cre/blr-tag*) cercana a la región promotora, activando la transcripción del regulón *blr*. La totalidad de genes conocidos para el sistema regulador *cre* (*cluster* genético *creABCD*) en *E. coli*, transportan al menos una repetición directa de una secuencia *cre/blr-tag*, que media el control transcripcional dependiente de CreBC, del mismo modo que el sistema BlrAB. El sistema CreBC en *E. coli*, ha demostrado ser un regulador global involucrado en el control metabólico (Avison *et al.*, 2001; Avison *et al.*, 2004; Tayler *et al.*, 2010). Se ha sugerido que la inactivación de PBP4 conduce a la sobreexpresión de *ampC* y a la activación específica del sistema regulador de dos componentes CreBC, para el modelo *P. aeruginosa*. Este sistema regulador, así como las proteínas AmpR, AmpG y NagZ, han sido propuestos como blancos para el desarrollo y generación de inhibidores, que permitan revertir y posiblemente prevenir la resistencia determinada por AmpC (Mark *et al.*, 2011).

1.4.4. Mecanismos de desrepresión de *ampC*

Los antibióticos β -lactámicos varían significativamente en su capacidad de inducir la expresión de *ampC*; aunque susceptibles a la hidrólisis por AmpC. Cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, cefuroxima, piperacilina y aztreonam, son débiles inductores de la expresión de AmpC; bencilpenicilina, ampicilina, amoxicilina, y cefalosporinas como cefazolina y cefalotina, son fuertes inductores y buenos sustratos; mientras que ceftioxitina e imipenem son también fuertes inductores, pero mucho más estables frente a AmpC. El uso clínico en infecciones nosocomiales e infecciones pulmonares crónicas de pacientes con fibrosis quística, frecuentemente selecciona para mutaciones cromosomales en *P. aeruginosa*, eventos que desencadenan en sobreexpresión constitutiva de *ampC* (desrepresión) y fracaso terapéutico. La modificación de alguna proteína involucrada en el mecanismo de inducción de *ampC*, puede conducir a la desrepresión de la expresión de este gen. Aunque las investigaciones en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* identifican mutaciones en *ampR*, la mayoría de los cambios observados en aislamientos

clínicos se han asociado al gen *ampD* (Jacoby, 2009; Mark *et al.*, 2011). En *P. aeruginosa*, la proteína AmpD ha sido caracterizada como un regulador negativo de AmpC, sin embargo, mutaciones en su gen codificante, comprometen el procesamiento normal de anhidromuropéptidos, lo que produce un incremento permanente en la concentración de efectores citoplasmáticos, que favorece el *binding* a AmpR y eleva la expresión constitutiva de *ampC*. A diferencia de especies de la familia *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* presenta dos genes homólogos a *ampD*: *ampDh2* y *ampDh3*, cuya inactivación progresiva genera una creciente sobreexpresión en la expresión de AmpC. La desrepresión parcial de *ampC* por la inactivación de *ampD*, confiere un mecanismo de resistencia biológicamente eficiente en *P. aeruginosa*, donde el reciclaje de PG es sostenido por la acción de AmpDh2 y AmpDh3, además, la desrepresión parcial parece evitar el compromiso en *fitness* y virulencia, asociados a la hiperproducción constitutiva de AmpC (dobles y triples mutantes *ampD* pierden completamente su competitividad biológica y virulencia). Se ha determinado, que mientras las mutaciones en el gen *ampD* son identificadas frecuentemente en aislamientos clínicos, la desrepresión total de *ampC* (hiperproducción constitutiva) debido a la inactivación adicional de *ampDh2* y *ampDh3* no lo es (Moyá *et al.*, 2008; Lister *et al.*, 2009; Mark *et al.*, 2011). Una complejidad adicional para *P. aeruginosa*, es que algunas cepas sobreproduciendo AmpC, no presentan mutaciones en genes *ampR*, *ampD*, o en la región intergénica *ampR-ampC*, y no exhiben cambios en el nivel de expresión de *ampD*, lo que da cuenta de la existencia de factores suplementarios que contribuyen a la regulación de *ampC* en este modelo. La inactivación espontánea del gen *dacB*, que codifica una *Penicillin-Binding Protein* no esencial (LMM-PBP4), ha sido reconocida como una causa clínicamente relevante de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos anti-*Pseudomonas*, a través de la hiperproducción de AmpC, con niveles que exceden los producidos por mutantes *ampD*. La inactivación de esta PBP provoca una respuesta, en términos de resistencia a β -lactámicos, altamente eficiente y compleja, desencadenando la sobreproducción de β -lactamasa cromosomal AmpC y la activación específica de un regulador de 2 componentes CreBC (BlrAB), que a su vez tiene un rol en resistencia a través de un mecanismo aún desconocido. Estudios realizados en aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a β -lactámicos anti-*Pseudomonas*, muestran que mutantes *ampD* y *dacB* (frecuentemente combinados) son una causa frecuente de resistencia clínica (Lister *et al.*, 2009; Mark *et al.*, 2011).

1.4.5. LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* e hiperproducción de AmpC

A pesar de las diferencias demostradas entre el control ejercido por AmpR y el sistema regulador BlrAB, en la producción de β -lactamasas, en lo relativo a la naturaleza del ligando activador (muropéptidos para AmpR, peptidoglicano para el sistema BlrAB), y a la localización de la inducción (citoplasmática para AmpR, periplásmica para BlrAB), existe una interesante similitud, determinada por la evidencia de que la inhibición de LMM-PBPs en ambos sistemas, está involucrada en la inducción de β -lactamasas. La alteración de PBP4 activa fuertemente la producción de β -lactamasas en *A. hydrophila*, además de inducir la expresión de *ampC* (controlada por *ampR*) en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Tayler *et al.*, 2010). Un estudio ha demostrado que la resistencia clínica

de alto nivel en *P. aeruginosa*, es el resultado de la inactivación de PBP4, una enzima codificada por el gen *dacB*, y cuya función y estructura ha sido caracterizada en *E. coli*. Esta proteína corresponde a una PBP clase C de baja masa molecular con “probable” actividad D,D-CPasa y D,D-EPasa, que posiblemente desarrolla una función auxiliar en el mantenimiento de la morfología celular, en la maduración del PG, en su reciclaje, y en la separación celular durante el proceso de división. La estructura cristalográfica para PBP4 de *E. coli* demuestra una organización en tres dominios, con el dominio I conteniendo las secuencias conservadas S*xxK, SxN y KTG, características para PBPs y β -lactamasas. En PAO1, LMM-PBP4 es codificada por el gen *dacB* (PA3047), una probable D,D-CPasa con una masa molecular estimada de 51.8 kDa, pI teórico de 9.69, y 27% de identidad con su homólogo de *E. coli* (Moyá *et al.*, 2009; Mark *et al.*, 2011). Recientemente se ha reconocido, contrariamente a lo que se pensaba, que mutaciones en genes *ampD* o *ampR*, no corresponden a las causas más frecuentes, *in vitro* o *in vivo*, de sobreexpresión y alto nivel de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos, en *P. aeruginosa*. El descubrimiento de mutaciones (sin sentido, con sentido erróneo, deleciones e inserciones) para el gen PA3047 (ortólogo *dacB* de *E. coli*) en cepas resistentes a ceftazidima, condujo a la identificación de una ruta importante y absolutamente novedosa, para el desarrollo de resistencia. En un mutante espontáneo *dacB* para PAO1, la inactivación del gen *ampC* restauró la susceptibilidad a ceftazidima, demostrando que la sobreexpresión de la β -lactamasa es esencial para el fenotipo de resistencia, además, la inactivación del gen *ampR* en esta cepa restableció la susceptibilidad a ceftazidima y niveles basales de expresión de AmpC, indicando que el efecto de la mutación en PBP4 requiere un regulador AmpR funcional. Por lo tanto, considerando que PBP4 de *E. coli*, ha demostrado estar involucrada en el reciclaje de PG, parece razonable creer que la sobreexpresión de *ampC* dirigida por la inactivación de *dacB*, como ocurre en la vía clásica por mutación en *ampD*, debería ser consecuencia de la modificación cualitativa o cuantitativa de muropéptidos, moléculas efectoras necesarias para la inducción de AmpC, a través de su interacción con AmpR. Adicionalmente, se confirmó que la vía de represión AmpDE para AmpC, es funcional en mutantes PBP4, ya que la inactivación del gen *ampD* o *ampE*, incrementó notablemente la expresión de AmpC y la resistencia a ceftazidima; estos resultados, y ensayos de complementación (*dacB*-operón *ampDE*), muestran que PBP4 y AmpDE son vías regulatorias paralelas y sinérgicas de *ampC*, dependientes de AmpR. Si bien, ambos mecanismos tienen un efecto similar en la expresión de *ampC*, la mutación en PBP4 confiere un alto nivel de resistencia clínica (de acuerdo a puntos de corte vigentes) a β -lactámicos, mientras que la inactivación de *ampD* solo entrega resistencia moderada; en realidad, el nivel de resistencia en mutantes PBP4 es similar al presentado por la inactivación simultánea de los tres genes *ampD* (*ampD*, *ampDh2*, *ampDh3*) de *P. aeruginosa*, una situación que incrementa considerablemente la expresión de *ampC*. En contraste a la pérdida de competitividad y virulencia en mutantes *ampD* (dobles y triples), un ensayo de infección sistémica en modelo murino no mostró cambios en el *fitness* para un mutante *dacB* de PAO1, condición que destaca a este sistema regulador, a diferencia de la vía de inactivación de *ampD*, como un mecanismo de resistencia de alto nivel, muy eficiente y de gran relevancia clínica. Finalmente, la exploración de efectos adicionales a la mutación de PBP4, a través de un análisis de expresión génica al cromosoma completo de *P. aeruginosa*, identificó solo un gen suplementario, además de *ampC*, con un cambio significativo en su expresión. En los mutantes *dacB* estudiados, el

gen *creD* presentó niveles de ARN 25-60 veces más altos que los determinados para PAO1 *wild-type*, indicando que el efecto sobre la expresión en *creD* parece ser específico para mutantes PBP4, en lugar de una consecuencia directa de la sobreexpresión de *ampC*, ya que este gen no fue sobrerregulado en mutantes *ampD*. El gen *creD* codifica una proteína de membrana interna de función desconocida, que es controlada por el regulador de dos componentes CreBC, sugiriéndose una relación entre este sistema, las mutaciones en PBP4, y los componentes del mecanismo regulador de la expresión de *ampC*. Aunque se ha comprobado que mutantes *dacB* activan específicamente el sistema regulador CreBC, y que este evento tiene un rol principal en resistencia a antibióticos β -lactámicos, el mecanismo subyacente es aún incierto. Con el conjunto de información disponible, es evidente que la interacción entre la mutación de un sitio blanco para antibióticos, la producción de enzimas inactivantes, y reguladores globales, representa un complejidad inesperada en la biología de la resistencia frente a β -lactámicos (Moyá *et al.*, 2009).

1.4.6. Modelos de regulación para β -lactamasa cromosomal AmpC en *Pseudomonas aeruginosa*

Lo actualmente reconocido sobre la regulación de *ampC* en *P. aeruginosa*, el reciclaje de su peptidoglicano, y las similitudes y diferencias entre la resistencia a β -lactámicos determinada por la inactivación de AmpD o la mutación de PBP4, se presenta de un modo simplificado en la Figura 10 (Moyá *et al.*, 2009).

A. Cepa *wild-type* en ausencia de β -lactámicos. Durante el crecimiento bacteriano regular, los productos de degradación del PG, MurNAc-péptidos (GlcNAc-1,6-anhidroMurNAc-tri o tetrapéptidos) son generados en el periplasma por la actividad de PBP4 y muchas otras enzimas. Estos productos son luego internalizados a través de la permeasa AmpG, y procesados en el citoplasma por β -N-acetilglucosaminidasa (NagZ) y N-acetil-anhidromuramyl-L-alanina amidasa (AmpD). *P. aeruginosa* sintetiza dos proteínas AmpD adicionales, AmpDh2 que aparentemente se encuentra localizada en membrana externa, y AmpDh3 cuya localización es aún desconocida. Los tripéptidos generados, posteriormente son incorporados al proceso de biosíntesis de mureina para producir UDP-MurNAc-pentapéptidos, que serán exportados al periplasma e incorporados al PG, para completar el reciclaje. En ausencia de antibióticos β -lactámicos, los UDP-MurNAc-pentapéptidos interactúan con AmpR, proteína que funciona como un regulador negativo de la expresión de *ampC*.

B. Crecimiento de cepa *wild-type* en presencia de β -lactámicos inductores de AmpC. Durante el crecimiento en presencia de ciertos β -lactámicos (inductores de AmpC), tales como cefoxitina o imipenem, AmpC es producida en altos niveles, confiriendo resistencia natural (intrínseca) a los antibióticos, siempre que éstos sean buenos sustratos para la enzima (como ocurre para cefoxitina pero no para imipenem); el mecanismo exacto, responsable de la inducción de AmpC en presencia de estos antibióticos, no está totalmente entendido. Uno de los factores que aparentemente desencadenan el proceso de inducción, corresponde a la saturación de AmpD, debido a la generación exagerada de su sustrato (1,6-anhidroMurNAc-tripéptidos). Se cree que los tripéptidos acumulados desplazan a UDP-MurNAc-pentapéptido desde AmpR, convirtiendo a este regulador en un activador de la transcripción de *ampC*. Se

sugiere que la inhibición de PBP4 por estos β-lactámicos inductores (reconocidos por ser los más potentes inhibidores para PBP4) desempeña un rol principal en el proceso de inducción de AmpC, y determina la activación del sistema regulador de dos componentes CreBC (BlrAB). La función precisa del transductor de señal AmpE, localizado en membrana interna, necesita ser clarificada, pero aparentemente interactúa con AmpD y PBP4.

C. Crecimiento de mutantes AmpD y/o PBP4 en presencia de β-lactámicos no inductores de AmpC (mayoría de cefalosporinas y penicilinas anti-*Pseudomonas*, tales como ceftazidima o piperacilina, respectivamente). La inactivación de PBP4 o de AmpD, produce una sobreexpresión de *ampC* muy similar, sin embargo, ambas vías pueden relevarse en la activación de AmpR, que modifica su actividad desde regulador negativo a regulador positivo para la expresión de *ampC*. Independientemente del mecanismo, la sobreexpresión de AmpC, por si sola, determina solo una moderada (bajo nivel) resistencia adquirida a β-lactámicos no inductores. Adicionalmente, la inactivación de PBP4 activa el sistema CreBC (BlrAB), el cual dirige, en asociación con la sobreexpresión de AmpC, la resistencia de alto nivel frente a antibióticos β-lactámicos (Moyá *et al.*, 2009).

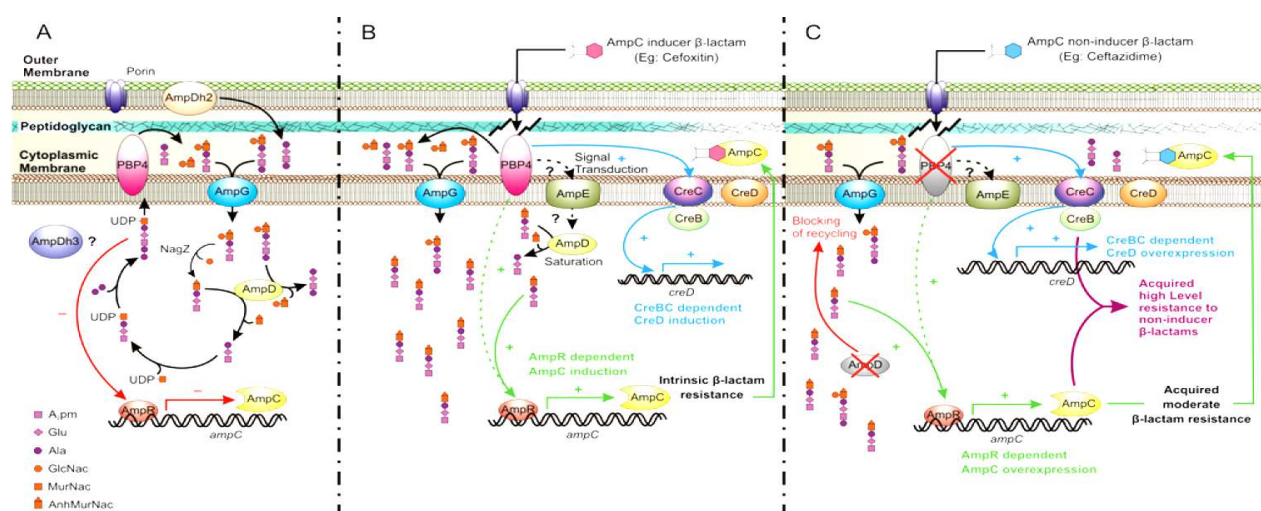


Figura 10 | Representación esquemática de la regulación de β-lactamasa cromosomal AmpC y reciclaje de peptidoglicano para el modelo *Pseudomonas aeruginosa* en diferentes condiciones (Moyá *et al.*, 2009)

Por lo anteriormente expuesto, es de gran importancia profundizar en la relación observada entre LMM-PBPs, procesos catabólicos del PG y expresión de determinantes de resistencia (como mecanismo adaptativo a situaciones de estrés). En *Pseudomonas aeruginosa*, la correspondencia entre los procesos de recambio y reciclaje de peptidoglicano, y las vías regulatorias para la hiperproducción constitutiva de β-lactamasa cromosomal AmpC, particularmente el mecanismo relacionado con la inactivación de PBP4, plantea la necesidad de realizar una investigación estructural y funcional muy detallada para esta LMM-PBP clase C, que permita establecer similitudes y diferencias definitivas con otras *Penicillin-Binding Proteins* de baja masa molecular en este modelo bacteriano, y entre ortólogos funcionales de especies relacionadas. Se requiere además, poder evaluar *in vivo* el efecto modulador de

este sistema de inducción de resistencia, sobre el metabolismo y la estructura del peptidoglicano, determinando si este mecanismo regulatorio o alguno de sus componentes, puede actuar como sensor de la integridad molecular de la pared celular.

Los resultados esperados supondrán una contribución significativa al conocimiento sobre tres procesos biológicos profundamente relacionados: i) la inducción y expresión de un nuevo mecanismo de resistencia frente a antibióticos β -lactámicos, ii) la adaptabilidad estructural del peptidoglicano frente a condiciones de estrés inducido, iii) la funcionalidad de LMM-PBPs en este proceso de adaptación, y en lo relativo a señalización y control del estado metabólico de la célula.

OBJETIVOS 2

2. Objetivo general - específicos

Objetivo general

Definir la naturaleza estructural y funcional de LMM-PBP4, analizando su participación en el metabolismo de la pared celular bacteriana y en la biología de la resistencia frente a antibióticos β -lactámicos para el modelo *Pseudomonas aeruginosa*

Objetivos específicos

1. Determinar la naturaleza acil-serina-transferasa y la actividad enzimática de LMM-PBP4 en el modelo *Pseudomonas aeruginosa*
2. Definir la funcionalidad de LMM-PBP4 en la estructura y en el metabolismo de la pared celular bacteriana
3. Identificar la localización subcelular de LMM-PBP4 y su distribución en el ciclo celular de *Pseudomonas aeruginosa*
4. Conocer la organización estructural para LMM-PBP4, precisando las propiedades conformacionales y funcionales de su centro catalítico activo
5. Investigar el impacto de mutaciones para LMM-PBP4 y proteínas del mecanismo regulatorio de inducción de AmpC, en el metabolismo y la estructura del peptidoglicano de *Pseudomonas aeruginosa*
6. Evaluar el efecto de complementación, sobreexpresión e inactivación antibiótica de LMM-PBP4 sobre la estructura del peptidoglicano para cepa *wild-type* y mutantes relacionados
7. Analizar el papel modulador de LMM-PBP4 en el sistema de inducción de resistencia (hiperproducción de β -lactamasa AmpC) y en el metabolismo del peptidoglicano, determinando su participación como sensor del estado molecular de la pared celular

MATERIALES Y METODOS

3

3. Materiales y métodos

3.1. Caracterización funcional y estructural de LMM-PBP4 para el modelo *Pseudomonas aeruginosa*

3.1.1. Cepas bacterianas, plásmidos, fagos, *primers* y constructos recombinantes

La descripción genética, secuencias nucleotídicas y características relevantes de cepas bacterianas, plásmidos, fagos, constructos recombinantes y *primers*, utilizados y generados durante la primera etapa de esta investigación, son presentados en las Tablas 4a, 4b y 4c. Fracciones de cultivo para cepas de referencia, mutantes de inserción, células competentes, transformantes, lisógenos y clones recombinantes, fueron incorporadas a criotubos, mezcladas en glicerol (concentración final 10%) y almacenadas en congelación a -70°C . *Pseudomonas aeruginosa* O1 (PAO1) fue la cepa utilizada para la extracción y purificación de ADN cromosomal, y amplificación genética; *E. coli* DH5 α y *E. coli* BI21(DE3) fueron cepas bacterianas empleadas en ensayos de clonación e inducción-expresión, respectivamente; *E. coli* DV900 y sus lisógenos respectivos, fueron necesarios para la purificación de muropéptidos y en la determinación de la actividad D,D-peptidasa sobre peptidoglicano macromolecular. UCBPP-PA14 y PA14::*dacB*, fueron la cepa de referencia y el mutante de inserción utilizados en ensayos de inmunolocalización.

3.1.2. Condiciones de crecimiento

Cultivos bacterianos fueron crecidos rutinariamente en medio LB (Luria-Bertani), la recuperación de células transformantes se realizó en medio de cultivo SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*), los estudios de susceptibilidad fueron desarrollados en medio Mueller Hinton (MH), y para ensayos de inmunolocalización se utilizó medio mínimo M63 suplementado con succinato 20 mM. Las condiciones de crecimiento fueron idénticas en cada situación, con una temperatura óptima de incubación de 37°C , una atmósfera de aerobiosis estricta y agitación permanente (200 rpm). Ampicilina (Normon), kanamicina (Sigma-Aldrich) y gentamicina (Normon), fueron incorporados al medio de cultivo como marcadores antibióticos de selección en las siguientes concentraciones: ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ para *E. coli*; gentamicina 30 $\mu\text{g/ml}$ para *Pseudomonas aeruginosa*; kanamicina 30 $\mu\text{g/ml}$ para cepas de *E. coli* y 200 $\mu\text{g/ml}$ para cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Materiales y métodos

Tabla 4a | Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Cepas bacterianas	Genotipo o características relevantes	Referencia o fuente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa de referencia completamente secuenciada	Stover <i>et al.</i> , 2000
UCBPP-PA14	Cepa de referencia completamente secuenciada	Rahme <i>et al.</i> , 1995
PA14:: <i>dacB</i>	Mutante de inserción por transposición en gen <i>dacB</i> (locus PA14_24690) GM ^R ID: 34428	Liberati <i>et al.</i> , 2006
PA14:: <i>ampE</i>	Mutante de inserción por transposición en gen <i>ampE</i> (locus PA14_58660) GM ^R ID: 28880	Liberati <i>et al.</i> , 2006
PA14:: <i>ampDh2</i>	Mutante de inserción por transposición en gen <i>ampDh2</i> (locus PA14_72400) GM ^R ID: 42715	Liberati <i>et al.</i> , 2006
PA Δ <i>dacB</i>	Mutante de delección para gen <i>dacB</i> en cepa de referencia PAO1 (PAO1 Δ <i>dacB</i> :: <i>lox</i>)	CBMSO (Lab. 108)
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> K-12 cepa RYC1000	<i>araD139</i> Δ (<i>lac</i>) <i>U169 rpsL</i> Δ <i>rib7 thiA gyrA recA56</i>	Genilloud <i>et al.</i> , 1984
<i>E. coli</i> CS802-2	CS109 Δ <i>ponB, dacA, dacB, dacC, dacD, pbpG, ampH, ampC</i>	Vega & Ayala, 2006
<i>E. coli</i> DV900	CS802-2 Δ <i>pbp4B</i>	Vega & Ayala, 2006
<i>E. coli</i> DH5 α	F- ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 deoR supE44</i> λ - <i>thi-1 endA1 gyrA96 hsdR17 recA1 relA1</i>	CBMSO
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B-m_B-</i>) <i>dcm gal</i> λ DE3	CBMSO
<i>E. coli</i> HMS174(DE3)	Control positivo en ensayo de lisogenización	Novagen
<i>E. coli</i> DV900(DE3)	CS802-2 Δ <i>pbp4B</i> lisogenizada con profago λ DE3	Este estudio

Tabla 4b | Plásmidos, fagos o constructos recombinantes, utilizados y generados en este estudio

Plásmidos, fagos o constructos	Características relevantes	Referencia o fuente
pGEM [®] -T Easy	AM ^R ; vector de clonaje para productos de PCR con MCS ^a	Promega
pET-28b(+)	K ^R ; vector de expresión inducible por IPTG con MCS	Novagen
pTP1	K ^R ER ^R ; vector de expresión pET-28a(+) con sitio de clivaje para proteasa TEV	Saleh <i>et al.</i> , 2013
pBTBxh-2	K ^R ; vector de expresión, promotor <i>P_{BAD}</i> , His-tag C-terminal	Prior <i>et al.</i> , 2010
pHERD26T	TE ^R ; vector <i>shuttle</i> de expresión con promotor <i>P_{BAD}</i>	Qiu <i>et al.</i> , 2008
pSEVA234	K ^R ; vector modular con sistema de expresión <i>lacI^q-P_{TCR}</i>	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013

Tabla 4b | Plásmidos, fagos o constructos recombinantes, utilizados y generados en este estudio

(continuación)

Plásmidos, fagos o constructos	Características relevantes	Referencia o fuente
Fago λDE3	Fago recombinante transportando el gen para ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> ; gen <i>int</i> interrumpido	Novagen
Fago Helper	Fago que proporciona la función <i>int</i> ausente en λDE3	Novagen
Fago de Selección	Fago que elimina mutantes λDE3 generados durante la infección	Novagen
Fago Testeador T7	Mutante de delección para RNA polimerasa T7, utilizado para la verificación de lisógenos	Novagen
pGEM-PBP4HNC/DH5α	pGEM-T conteniendo fusión <i>dacB</i> -His-tag NC-terminal	Este estudio
pGEM-PBP4HN/DH5α	pGEM-T conteniendo fusión <i>dacB</i> -His-tag N-terminal	Este estudio
pGEM-PBP4HC/DH5α	pGEM-T conteniendo fusión <i>dacB</i> -His-tag C-terminal	Este estudio
pGEM-PBP4(SPS)HN/DH5α	pGEM-T conteniendo fusión His-tag N-terminal- <i>dacB</i> (SPS) ^b	Este estudio
pGEM-PBP4/DH5α	pGEM-T conteniendo gen <i>dacB</i> para clonaje en pHERD26T	Este estudio
pGEM-PBP4(RBS)/DH5α	pGEM-T conteniendo gen <i>dacB</i> -RBS para clonaje en pSEVA234	Este estudio
pET-PBP4HNC/BL21(DE3)	Transformante pET- <i>dacB</i> His-tag NC-terminal / BL21(DE3)	Este estudio
pET-PBP4HN/BL21(DE3)	Transformante pET- <i>dacB</i> His-tag N-terminal / BL21(DE3)	Este estudio
pET-PBP4HC/BL21(DE3)	Transformante pET- <i>dacB</i> His-tag C-terminal / BL21(DE3)	Este estudio
pTP-PBP4(SPS)HN/BL21(DE3)	Transformante pTP- <i>dacB</i> (SPS) His-tag N-terminal / BL21(DE3)	Este estudio
pET-PBP4HNC/DV900(DE3)	Transformante pET- <i>dacB</i> His-tag NC-terminal / Lisógeno DV900	Este estudio
pET-PBP4HN/DV900(DE3)	Transformante pET- <i>dacB</i> His-tag N-terminal / Lisógeno DV900	Este estudio
pET-PBP4HC/DV900(DE3)	Transformante pET- <i>dacB</i> His-tag C-terminal / Lisógeno DV900	Este estudio
pBTBxh-PBP4HC/PA14WT	Transformante pBTBxh- <i>dacB</i> His-tag C-terminal / PA14WT	Este estudio
pBTBxh-PBP4HC/PA14:: <i>dacB</i>	Transformante pBTBxh- <i>dacB</i> His-tag C-terminal / PA14:: <i>dacB</i>	Este estudio
pHERD-PBP4/PA14WT	Transformante pHERD- <i>dacB</i> / PA14	Este estudio
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i>	Transformante pHERD- <i>dacB</i> / PA14:: <i>dacB</i>	Este estudio
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampE</i>	Transformante pHERD- <i>dacB</i> / PA14:: <i>ampE</i>	Este estudio
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i>	Transformante pHERD- <i>dacB</i> / PA14:: <i>ampDh2</i>	Este estudio
pSEVA-PBP4/PA14WT	Transformante pSEVA- <i>dacB</i> / PA14	Este estudio
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>dacB</i>	Transformante pSEVA- <i>dacB</i> / PA14:: <i>dacB</i>	Este estudio
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampE</i>	Transformante pSEVA- <i>dacB</i> / PA14:: <i>ampE</i>	Este estudio
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i>	Transformante pSEVA- <i>dacB</i> / PA14:: <i>ampDh2</i>	Este estudio

^a MCS: *multiple cloning site* ^b SPS: sin péptido señal

Materiales y métodos

Tabla 4c | Oligonucleótidos utilizados en ese estudio

Primer	Secuencia (5' - 3') ^a	Descripción primer	Proteína recombinante
PaePBP4-A	5'-CCCCATATGTTCAAGTCGCTGCGTACTC-3'	Forward <i>dacB</i> -NdeI	PBP4HNC - PBP4HN
PaePBP4-B	5'-TTCAAGCTTTTTCCGCGCGTGCAGGCTC-3'	Reverse <i>dacB</i> -HindIII	PBP4HNC-PBP4HC-PBP4
PaePBP4-C	5'-TTGCTAGCCAGGTCAACGCCACCCTGCC-3'	Forward <i>dacB</i> -NheI	PBP4(SPS)HN
PaePBP4-D	5'-CCCCATGTTCAAGTCGCTGCGTACTCTTG-3'	Forward <i>dacB</i> -NcoI	PBP4HC
PaePBP4-E	5'-CTCAAGCTTTTATTTCCGCGCGTGCAGG-3'	Reverse <i>dacB</i> -HindIIICT ^b	PBP4HN - PBP4(SPS)HN
PaePBP4-F	5'-TTTCCATGGCAATGTTCAAGTCGCTGCG-3'	Forward <i>dacB</i> -NcoI	PBP4HC en pBTBXh-2
PaePBP4-G	5'-TTTTCTAGATTTCCGCGCGTGCAGGCTC-3'	Reverse <i>dacB</i> -XbaI	PBP4HC en pBTBXh-2
PaePBP4-H	5'-TTCGAATTCGATGTTCAAGTCGCTGCGT-3'	Forward <i>dacB</i> -EcoRI	PBP4
PaePBP4-I	5'-CGAATTC AAGGAGATATACATACATGTTCAAGT-3'	Forward <i>dacB</i> -EcoRI(RBS) ^c	PBP4
pUC/M13 Fw	5'-CCCAGTCACGACGTTGAAAACG-3'	Forward M13	-
pUC/M13 Rv	5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3'	Reverse M13	-
T7 Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3'	Forward T7	-
T7 Terminator	5'-GCTAGTATTGCTCAGCGG-3'	Reverse T7	-
PA14Tn-Fw	5'-TACAGTTTACGAACCGAACAGGC-3'	Forward TnMAR2XT7	-
PA14Tn-PBP4-Rv	5'-GGCGCGGCATCTTCACCTGGTT-3'	Reverse <i>dacB</i>	-
PA14Tn-AmpE-Rv	5'-AGTCGGTATTCAGGCGCGGGCCG-3'	Reverse <i>ampE</i>	-
PA14Tn-AmpDh2-Rv	5'-GACTACCGCGAGCAGCAGCCCA-3'	Reverse <i>ampDh2</i>	-
pBTBXh-P _{BAD} -Fw	5'-GACTACCGCGAGCAGCAGCCCA-3'	Forward promotor P _{BAD}	-
pHERD-M13-Fw	5'-GTCACGACGTTGAAAACGACGGCCAG-3'	Forward pHERD26T	-
pSEVA-PS1-Fw	5-AGGGCGGCGGATTTGTCC-3'	Forward T1 pSEVA234	-

^a Sitios de restricción para endonucleasas se presentan subrayados en color negro

^b CT: codón de término (TAA) subrayado en color verde

^c RBS: *ribosome binding site* subrayado en color azul

3.1.3. Identificación de secuencias nucleotídica, aminoacídica y ambiente genético para LMM-PBP4. Predicción de péptido señal-estructura secundaria. Homología de secuencia entre proteínas ortólogas

Las secuencias nucleotídicas, aminoacídicas y el entorno genético para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* (gen *dacB*, locus PA3047 y PA14_24690), fueron investigados desde los genomas secuenciados para las cepas PAO1 y UCBPP-PA14, cuyo contenido se encuentra dispuesto y organizado en bases de datos no redundantes de acceso público: www.ncbi.nlm.nih.gov (NCBI), www.uniprot.org (EMBL-EBI, PIR, SIB) y www.pseudomonas.com (CFFT). Los antecedentes proteicos teóricos para LMM-PBP4 fueron obtenidos a través del análisis de su estructura primaria desde la plataforma ProtParam del servidor ExPASy (SIB), mientras que la búsqueda de proteínas ortólogas a LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* en el modelo bacteriano *E. coli*, se ejecutó mediante la aplicación BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). La predicción del péptido señal (sitio de clivaje) se realizó a través del programa SignalP v4.1 (Nordahl *et al.*, 2011), mientras que en el pronóstico de su estructura secundaria, el servidor Phyre2 v2.0 (Kelley & Sternberg, 2009) fue utilizado. Los programas liberados ClustalW2 v2.1, MUSCLE v3.8.31 (EMBL-EBI) y T-Coffee v10.00.r1613 (CRG) fueron empleados para el alineamiento de secuencias.

3.1.4. Diseño de constructos, clonaje, secuenciación e inducción de proteínas recombinantes

La extracción y purificación de ADN genómico desde la cepa de referencia PAO1 se realizó mediante el sistema Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), las muestras fueron rehidratadas en Tris-HCl 10mM pH 7.4, EDTA 1mM pH 8.0, cuantificadas en espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y almacenadas a 4°C. En el diseño y selección “*in silico*” de sitios de restricción adecuados para ensayos de clonación, la aplicación NEBcutter v2.0 (New England Biolabs) fue utilizada como herramienta para predecir sitios de digestión. Dada la variabilidad presentada en las T_m de los *primers* diseñados, el gen *dacB* fue amplificado por *touchdown PCR* en un equipo *MiniCycler™* PTC-150 (MJ Research), utilizando polimerasa *Pfu* (Promega) con actividad *proofreading*. Por el alto contenido G+C en la secuencia nucleotídica para *dacB* y *primers*, y la posible generación de estructuras secundarias durante la reacción de *PCR*, DMSO (Sigma-Aldrich) fue incorporado como aditivo en la mezcla de reacción. Productos de amplificación *dacB-NdeI-HindIII*; *dacB-NdeI-HindIII*CT; *dacB-NcoI-HindIII* (~1.5 Kb) fueron purificados con el *kit* comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, separados por electroforesis, purificados desde gel, cuantificados, tratados con dATP y ligados en vector pGEM®-T Easy de acuerdo al protocolo del fabricante (razón molar inserto:vector 3:1). Células competentes *E. coli* DH5 α (100 μ l) fueron transformadas por choque térmico con el producto de cada ligación (2-3 μ l), incubando esta mezcla en hielo por 30 min, y luego a 42°C por 45 s; seguidamente, las preparaciones fueron incubadas en medio SOC (37°C, 200 rpm), sembradas en placas de agar LB ampicilina 100 μ g/ml y LB ampicilina 100 μ g/ml/IPTG 0.5 mM/X-Gal 40 μ g/ml e incubadas *overnight* (ON) a 37°C. Clones transformantes (~4.5 Kb) fueron analizados mediante *colony PCR*, ensayos de digestión desde productos de *minipreps* (Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System) y secuenciación (*primers* pUC/M13; Tabla 4c), para evaluar el correcto tamaño del inserto y

confirmar su identidad nucleotídica. Para facilitar la expresión y purificación de LMM-PBP4, se diseñó un constructo truncado, removiendo la secuencia codificante 5'-3' para su péptido señal (aminoácidos 1-22); el producto de amplificación *dacB*(SPS)-*NheI*-*HindIII*CT (~1.4 Kb) fue procesado y confirmado como se describe anteriormente.

Luego de la verificación de cada inserto, se realizó el subclonaje de cada uno de éstos productos en vectores de expresión pET-28b(+) y pTP1 (vector utilizado exclusivamente en la producción de la forma soluble de LMM-PBP4), previamente digeridos y desfosforilados (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Promega), a través de procedimientos de ligación (T4 DNA Ligase, Promega) y transformación, en células electrocompetentes *E. coli* BL21(DE3). Clones positivos (pET28-inserto ~6.8 Kb y pTP1-inserto ~7.8 Kb) fueron recuperados desde colonias transformantes en placas de agar LB suplementadas con kanamicina 30 µg/ml, y comprobados finalmente por secuenciación (*primers* T7; Tabla 4c). El plásmido de expresión pTP1 corresponde a un vector pET-28a(+) (Novagen) modificado, en el que se reemplazó un sitio de clivaje para Trombina por una secuencia de reconocimiento para proteasa TEV, derivada desde el vector pProExHTa (Life Technologies) (Saleh *et al.*, 2013).

Las reacciones de secuenciación se desarrollaron mediante electroforesis capilar empleando el sistema BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), las secuencias fueron purificadas y analizadas en un equipo 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Los electroferogramas resultantes fueron visualizados mediante el programa Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty) y confirmados por BLAST. Las proteínas recombinantes generadas fueron nombradas como: PBP4HNC, PBP4HN, PBP4HC y PBP4(SPS)HN (Tabla 4b).

En ensayos preliminares de inducción para cada constructo, variables como: temperatura, DO₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm), concentración de agente inductor, tiempo y toxicidad celular, fueron consideradas y evaluadas, para definir condiciones experimentales óptimas de sobreexpresión.

3.1.5. Susceptibilidad antimicrobiana y microscopía de campo claro en cultivos no inducidos e inducidos

Para determinar posibles efectos sobre la susceptibilidad antimicrobiana y la morfología bacteriana para clones recombinantes en condiciones de no inducción e inducción, se realizó un ensayo de susceptibilidad mediante difusión en agar, además de la preparación de muestras celulares para su observación por microscopía óptica de campo claro. Para el método de difusión en agar se siguieron las recomendaciones técnicas descritas por el EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (EUCAST *Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 2010). De esta manera, placas de agar Mueller Hinton sin inductor y suplementadas con IPTG 1 mM, fueron sembradas con inóculos bacterianos preparados desde cultivos ON y ajustados a una DO₆₂₅ de 0.12; *E. coli* K-12 RYC1000 y *E. coli* BL21(DE3), fueron las cepas utilizadas como control. Los discos de antibióticos ensayados: TIC, PIP, AMC, TIM, CRO, CTX, FOX, CAZ, ATM, IPM, NN, C (Bio-discs™, BioMérieux®), fueron ubicados en la superficie del agar, las placas fueron invertidas e incubadas a 37°C por 16 h y el diámetro de las zonas de inhibición fue medido. Del mismo modo, la cepa transformante de *Pseudomonas aeruginosa* pSEVA-PBP4/PA14WT*, fue ensayada para

susceptibilidad antimicrobiana sobre placas de agar Mueller Hinton con IPTG 2 mM; UCBPP-PA14 fue la cepa de referencia utilizada como control. * Materiales y métodos, 3.2.4., 3.2.5., 3.2.7.

Para ensayos de microscopia óptica de campo claro, alícuotas obtenidas desde cultivos para clones recombinantes no inducidos e inducidos, fueron fijadas en formaldehído 0.1% e inmovilizadas en agarosa 1%. Portaobjetos limpios fueron sumergidos en agarosa fundida, retirados y dejados polimerizar a 4°C por 3 min, eliminándose el exceso de agarosa; las muestras (10 µl) fueron ubicadas sobre la fina capa de agarosa y cubiertas con su respectivo cubreobjetos. Las preparaciones fueron observadas en microscopio invertido Axiovert 200 M (Zeiss) a través de un objetivo alpha Plan-Fluar 100x/1.45 Oil (Zeiss), las imágenes fueron tomadas con una cámara digital acoplada EM-CCD C9100-02 (Hamamatsu) y procesadas en la plataforma Fiji (aplicación liberada basada en ImageJ).

3.1.6. Sobreexpresión, aislamiento y purificación para formas soluble e insoluble de LMM-PBP4

E. coli BL21(DE3) conteniendo pET-PBP4HNC (clonaje de proteína recombinante PBP4 con His-tag en extremo amino y carboxilo terminal), pET-PBP4HN (clonaje de proteína recombinante PBP4 con His-tag en extremo amino terminal), pET-PBP4HC (clonaje de proteína recombinante PBP4 con His-tag en extremo carboxilo terminal) y pTP-PBP4(SPS)HN (clonaje de proteína recombinante PBP4 sin péptido señal con His-tag en extremo amino terminal), fueron crecidas en fermentadores Biostat® Cplus y Biostat UD30 (B. Braun Biotech International), en medio LB suplementado con kanamicina 30 µg/ml, en aerobiosis, a 37°C y en agitación constante (200 rpm) por 2-3 h, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4. Para iniciar la expresión de proteínas recombinantes, se incorporó IPTG al medio de cultivo (concentración final 1 mM), continuando el crecimiento por 60 min (sobreexpresión), en las condiciones de incubación antes mencionadas. La masa celular generada fue obtenida por centrifugación desde un separador de cámaras KA 05-00-105 (Westfalia Separator AG), almacenada a -20°C y utilizada en los protocolos de aislamiento y purificación.

En el aislamiento y purificación de proteínas recombinantes insolubles para LMM-PBP4 (PBP4HNC, PBP4HN y PBP4HC), una fracción celular equivalente a 5 litros de cultivo (3 g de masa) fue descongelada, resuspendida en 30 ml de PBS 1X pH 8.0 y sometida a ruptura celular (20000 psi) en French® Pressure Cell Press (SLM AMINCO). El lisado resultante fue centrifugado (70000 rpm por 40 min a 4°C) en ultracentrífuga Optima™ L-100 XP (Beckman Coulter), el *pellet* obtenido fue resuspendido en un volumen final de 12 ml de PBS 1X pH 8.0 conteniendo 1% de detergente aniónico Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine, Sigma-Aldrich) y se mantuvo en rotación por 4 h a temperatura ambiente (TA). El material insoluble fue separado por ultracentrifugación (80000 rpm por 40 min a 20°C) en ultracentrífuga TL-100 (Beckman) y ~10 ml de sobrenadante (extracto soluble) fue dializado en sistemas de membrana VISKING® Dialysis Tubing 12-14 kDa MWCO (SERVA Electrophoresis), frente a PBS 1X, Triton™ X-100 0.2% pH 8.0 (*buffer* de diálisis), realizándose tres cambios de *buffer* cada 60 min a TA. La purificación se realizó mediante IMAC (cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados), y para ello, el material dializado fue mezclado con Imidazol (concentración final 20 mM) e incubado en 1.5 ml de resina de níquel Ni-NTA

Agarose (Qiagen) previamente equilibrada en PBS 1X, Triton™ X-100 0.2%, Imidazol 20 mM pH 8.0 (*buffer* de equilibración) por 4 h a TA y en rotación suave. La resina fue luego empaquetada, y fracciones de *flow-through* fueron colectadas; proteínas no unidas a resina fueron removidas mediante lavados realizados en PBS 1X, Triton™ X-100 0.2% pH 8.0, mientras que la proteína recombinante unida a resina fue recuperada con concentraciones crecientes de Imidazol (125 mM, 250 mM y 500 mM) en PBS 1X, Triton™ X-100 0.2% pH 8.0 (*buffers* de elución). Las muestras fueron dializadas nuevamente (*buffer* de diálisis), alicuotadas, cuantificadas mediante un ensayo colorimétrico basado en el método de Lowry (*DC Protein Assay*, Bio-Rad), concentradas en unidades Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter 10 kDa MWCO (Millipore) y almacenadas a -20°C.

En el aislamiento y purificación de la forma soluble para LMM-PBP4 [PBP4(SPS)HN], cultivos bacterianos (2000 ml) inducidos con IPTG (0.01mM, 0.1 mM, 1mM), fueron centrifugados a 7500 rpm por 15 min a 4°C (Avanti™ J-25, Beckman Coulter), el *pellet* total fue resuspendido en 20 ml de Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM pH 8.0 y sometido a una presión de 20000 psi en un homogeneizador PandaPLUS 2000 (GEA Niro Soavi). El producto lisado fue ultracentrifugado (70000 rpm por 40 min a 4°C) y el sobrenadante obtenido (fracción soluble) fue sometido a purificación en 1.5 ml de resina de níquel (Ni-NTA Agarose, Qiagen). Desde esta etapa, el protocolo de purificación se desarrolló de igual manera al mencionado anteriormente, solo la composición para los *buffers* de equilibración-lavado (Tris-HCl 20mM, NaCl 300mM, Imidazol 10mM pH 8.0), elución (Tris-HCl 20mM, NaCl 300mM, Imidazol 250 mM pH 8.0) y diálisis (Tris-HCl 20mM, NaCl 200mM pH 8.0), fue modificada.

3.1.7. Digestión de secuencia His-tag por proteasa TEV

La proteína recombinante purificada PBP4(SPS)HN fue digerida utilizando proteasa TEV (cedida por el Departamento de Cristalografía y Biología Estructural, IQFR-CSIC), una enzima que reconoce una secuencia de siete aminoácidos (ENLYFQG para el plásmido pTP1) y genera el clivaje del enlace peptídico entre glutamina-glicina, liberando la fusión His-tag incorporada en el extremo amino terminal del constructo. Proteasa TEV posee en su extremo N-terminal un HQ-tag, por lo que luego del tratamiento con la proteína de fusión, esta proteasa y el polipéptido His-tag liberado, pueden ser eliminados desde la mezcla de reacción a través de un proceso de purificación en resina de níquel, donde la proteína recombinante digerida estará contenida en el *flow-through* recuperado. La digestión se realizó utilizando una proporción determinada de proteasa y proteína de fusión (1:20), la mezcla generada fue incubada a 4°C ON, purificada como se describe y analizada mediante *western blot*.

3.1.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Transferencia e inmunodetección (*western blot*)

En ensayos de inducción, sobreexpresión y purificación, una fracción de cada muestra obtenida fue analizada mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes) y *western blot*. Para electroforesis en condiciones desnaturalizantes, las muestras fueron normalizadas y mezcladas en NuPAGE® LDS

Sample Buffer 1X con 2-mercaptoetanol 2% (Merck), calentadas (100°C por 10 min), centrifugadas (14500 rpm por 10 min) y cargadas en geles *pre-cast* NuPAGE® Novex® 10% Bis-Tris Mini Gel (Life Technologies), utilizándose como marcadores de masa molecular los estándares preteñidos SeeBlue® Plus2 (Life Technologies) y ProSieve® Color Protein Marker (Lonza Rockland); la separación electroforética se realizó en *buffer* MOPS SDS 1X (cámara XCell SureLock™ Mini-Cell, Life Technologies) y las bandas de proteínas fueron visualizadas luego de la tinción del gel en una solución de metanol 45% (Sigma-Aldrich), ácido acético glacial 10% (Panreac) y azul de *coomassie* 0.25 g (Coomassie Blue G-250, LKB Bromma). Además de unidades prefabricadas *pre-cast* (uso restringido a determinados ensayos), geles de poliacrilamida fueron preparados a través de un protocolo estándar utilizando el sistema Mini-PROTEAN® (Bio-Rad).

Para inmunodetección, un segundo gel fue electrotransferido a una membrana PVDF Immobilon® -P (Millipore) en una unidad Criterion™ Blotter (Bio-Rad), de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook *et al*, 1989, con modificaciones. El bloqueo de sitios libres de material transferido se realizó en una solución de leche en polvo (caseína) al 3% preparada en *buffer* TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween® 20 0.05% pH 7.5) por 60 min a TA y en agitación suave. Para la detección de proteínas fusionadas a His-tag, la membrana fue incubada con un anticuerpo primario IgG anti-histidina dilución 1:3000 [His-probe (H-15): sc-803, Santa Cruz Biotechnology] a 4°C ON y en agitación. Luego de tres lavados en TBS-T, se realizó la incubación con un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado a HRP (Goat Anti-Rabbit IgG, Bio-Rad) por 60 min a TA, que permitió detectar cada proteína recombinante a través de una reacción quimioluminiscente [tratamiento de membrana con una solución premezclada de Luminol 1.25 mM (Sigma-Aldrich), D(-)-Luciferin 37 µM (Roche) y peróxido de hidrógeno 0.018% (Sigma-Aldrich) en Tris-HCl 100 mM pH 8.0]. Mediante un procedimiento de autorradiografía en películas CURIX RP2 Plus (Agfa) y de revelado automático (procesador X-OMAT 2000, Kodak), se logró la captura de la señal producida.

3.1.9. Análisis proteómico de proteínas recombinantes purificadas. Espectrometría de masas

Para el análisis proteómico de constructos purificados, bandas recuperadas desde geles de poliacrilamida (conteniendo la proteína de interés) fueron desteñidas en una mezcla de acetonitrilo-agua (proporción 1:1), secadas mediante centrifugación al vacío, rehidratadas y digeridas en bicarbonato de amonio 50 mM-cloruro de calcio 5mM (*buffer* de digestión) con 12.5 ng/µl de tripsina, por 60 min en hielo. El sobrenadante fue eliminado y los geles fueron cubiertos nuevamente con *buffer* de digestión sin tripsina, e incubados por 12 h a 37°C; la digestión fue detenida por la incorporación de TFA 1%. Los péptidos resultantes fueron desalados (ZipTip® Pipette Tips, Millipore) y analizados en un espectrómetro de masa Autoflex™ (Bruker Daltonics) mediante MALDI-TOF. Los espectros generados (huella peptídica) y sus respectivas masas, asignadas a través del programa flexAnalysis™ v2.2 (Bruker Daltonics), fueron enfrentados a bases de datos experimentales para su identificación, empleando el motor de búsqueda Mascot Server (<http://www.matrixscience.com>) a través del *software* biotools™ v2.1 (Bruker Daltonics). Los procedimientos mencionados fueron realizados por personal científico de la Unidad de Proteómica del CBMSO.

3.1.10. Lisogenización de estirpe mutante *E. coli* DV900

Para la integración sitio específica del profago λ DE3 (fago recombinante conteniendo el gen codificante para la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*) en la estirpe mutante *E. coli* DV900, se utilizó el sistema de coinfección λ DE3 Lysogenization Kit (Novagen). En este método, la célula hospedadora (*E. coli* DV900) fue crecida en medio LB suplementado con maltosa 0.2% y $MgSO_4$ 10 mM, hasta una DO_{600} de 0.5, y mantenida a 4°C hasta su uso. Una mezcla de células bacterianas (10 μ l), fago λ DE3 (10^8 UFP), fago helper (10^8 UFP) y fago de selección (10^8 UFP), fue incubada por 20 min a 37°C (para permitir la adsorción del profago en la cepa hospedadora) y posteriormente sembrada sobre agar LB, incubando las placas de agar generadas a 37°C ON. Lisógenos resultantes fueron evaluados en su capacidad para favorecer el desarrollo de un fago testeador T7 (un mutante de delección que únicamente prolifera en células que contienen ARN polimerasa T7 activa), de acuerdo al protocolo propuesto por el fabricante. En presencia de IPTG 0.4 mM, auténticos lisógenos λ DE3 generaron placas de lisis de gran tamaño.

3.1.11. Células competentes para lisógenos *E. coli* DV900(λ DE3). Transformación, inducción y expresión de clones recombinantes

En la preparación de células competentes para lisógenos *E. coli* DV900(λ DE3), un cultivo bacteriano (200 ml) crecido hasta una DO_{600} ~0.5, fue centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 4°C (Avanti™ J-25, Beckman Coulter), el *pellet* resultante fue resuspendido cuidadosamente en 50 ml de $MgCl_2$ 100 mM (primer lavado) y centrifugado a 4000 rpm por 10 min a 4°C. El precipitado celular fue nuevamente mezclado en 100 ml de $MgCl_2$ 100 mM (segundo lavado) e incubado en hielo por 20 min. Posteriormente, la suspensión bacteriana fue centrifugada a 4000 rpm por 10 min a 4°C, las células fueron resuspendidas en 4 ml de $CaCl_2$ 85 mM, glicerol 15% y fracciones celulares de 250 μ l fueron almacenadas inmediatamente a -70°C. La transformación de cada clon recombinante (pET-PBP4HNC, pET-PBP4HN, pET-PBP4HC) en lisógenos competentes, se realizó mediante el protocolo de choque térmico antes mencionado. La inducción y sobreexpresión de proteínas recombinantes, incorporadas en la estirpe mutante lisogenizada *E. coli* DV900(λ DE3), se realizó en las condiciones descritas anteriormente para clones transformados en *E. coli* BL21(DE3).

3.1.12. Preparación de proteínas de membranas

Proteínas de membrana fueron preparadas desde cepas transformantes no inducidas e inducidas (en las condiciones descritas). Un volumen celular (100 ml) fue centrifugado a 10500 rpm por 10 min a 4°C (Avanti™ J-25, Beckman Coulter), el *pellet* obtenido fue resuspendido en 3 ml de PBS 1X pH 8.0 y tratado en un homogeneizador ultrasónico LABSONIC® M (Sartorius) aplicando 4 ciclos de sonicación de 60 s con una amplitud de 90%. El producto sonificado fue centrifugado a 80000 rpm por 40 min a 4°C en ultracentrífuga TL-100 (Beckman) y el *pellet* de cada muestra (conteniendo la fracción de membrana), fue resuspendido en 200 μ l de PBS 1X pH 8.0 y almacenado

a -20°C. La concentración de proteína total en cada preparación de membrana fue determinada a través de lecturas de absorbancia a 280 nm en espectrofotómetro NanoDrop 1000.

3.1.13. Ensayos de unión a penicilina fluorescente BOCILLIN™ FL

Los ensayos de afinidad para LMM-PBP4 en el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*, se basaron en la metodología propuesta por Spratt & Pardee, 1975. Para ensayos de unión a penicilina fluorescente (Zhao *et al.*, 1999), extractos de membrana (50 µg) y proteína purificada (6 µg) fueron incubadas con BOCILLIN™ FL Penicillin 10 µM (Life Technologies) a 37°C por 30 min, deteniéndose la reacción al incorporar 10 µl de NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X con agente reductor (2-mercaptoetanol), luego, las muestras fueron calentadas (100°C por 10 min), centrifugadas y separadas por SDS-PAGE en geles *pre-cast* (NuPAGE® Novex® 8% Bis-Tris Midi Gel).

3.1.14. Ensayos de competencia. Determinación de IC₅₀

Extracto de proteínas de membrana preparadas desde la cepa de referencia UCBPP-PA14 (50 µg) y concentraciones crecientes de antibióticos β-lactámicos cefoxitina (Normon), imipenem (Sigma-Aldrich), ceftazidima (GlaxoSmithKline) y aztreonam (Bristol-Myers Squibb), fueron preincubados por 30 min a 37°C, luego de lo cual se incorporó penicilina fluorescente 10 µM (BOCILLIN™ FL Penicillin), incubando finalmente las muestras por 30 min adicionales a 37°C. Para estudios de competencia entre proteína purificada (6 µg) y antibióticos β-lactámicos cefoxitina (Normon) e imipenem (Sigma-Aldrich), la mezcla de reacción fue preincubada por 30 min a 37°C, luego se agregó BOCILLIN™ FL (10 µM) y se dejó incubar por otros 30 min a 37°C. En cada tipo de experimento, las mezclas de reacción fueron desnaturalizadas como se indica anteriormente (utilización de NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X con agente reductor 2-mercaptoetanol) y cargadas en geles de poliacrilamida 10% para su separación por electroforesis. Los geles fueron lavados en agua, fijados en una solución de metanol 10%-ácido acético glacial 7% y escaneados en modo fluorescencia (longitud de onda de excitación 488 nm y filtro de emisión 520BP40) en un equipo Typhoon™ 9410 (Amersham Biosciences), las imágenes obtenidas fueron procesadas en el programa incorporado ImageQuant™ TL v2003.02 (Amersham Biosciences), y la cuantificación de la señal fluorescente se realizó en una unidad GS-800™ Calibrated Densitometer (Bio-Rad) utilizando el programa Quantity One® 1-D Analysis v4.6.3 (Bio-Rad). El índice de afinidad IC₅₀ (concentración de antibiótico necesaria para inhibir en 50% la unión de BOCILLIN™ FL Penicillin a una determinada PBP) fue calculado desde la representación gráfica que relaciona la concentración de antibiótico ensayada y el porcentaje de saturación de BOCILLIN™ FL obtenido, correspondiendo al valor promedio (± desviación estándar) de tres ensayos independientes.

3.1.15. Cuantificación de actividad β -lactamasa

La actividad β -lactamasa fue cuantificada espectrofotométricamente al determinar el cambio de absorbancia a 486 nm, utilizando la cefalosporina cromogénica nitrocefina (Oxoid) como sustrato de reacción. El protocolo desarrollado se fundamenta en un método publicado por O'Callaghan *et al.*, 1972. Se realizaron pruebas directas de determinación de actividad β -lactamasa para proteínas recombinantes previamente purificadas (PBP4HNC, PBP4HN, PBP4HC). En este ensayo, 10 μ l de una solución *stock* de nitrocefina 500 μ g/ml (preparada en DMSO y *buffer* fosfato 100 mM pH 7.0, concentración final de sustrato 96.8 μ M) fueron combinados con 10 μ g de proteína y PBS1X pH 7.5, generando un volumen final de reacción de 100 μ l, las muestras fueron incubadas a 37°C, realizándose lecturas de absorbancia cada 10 minutos durante 2 horas. Como control positivo se utilizó extracto purificado de β -lactamasa AmpC (0.1 μ g), mientras que preparaciones sin enzima fueron usadas como blanco de reacción. Las medidas de absorbancia a 486 nm fueron realizadas en espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y la actividad específica fue calculada utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) 20,500 M⁻¹ cm⁻¹ para nitrocefina hidrolizada en la longitud de onda antes indicada. La actividad β -lactamasa fue expresada como nmoles de nitrocefina hidrolizada a 37°C por min por μ g de proteína, desde experimentos realizados en triplicado.

3.1.16. Actividad D,D-carboxipeptidasa sobre sustrato tripéptido sintético

El método enzimático desarrollado para determinar la actividad D,D-carboxipeptidasa *in vitro*, a través de la cuantificación de D-alanina liberada desde un sustrato tripéptido sintético, corresponde a una modificación de la técnica descrita por Frère *et al.*, 1976. Mezclas de reacción conteniendo 15 μ l de sustrato N α ,N ϵ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (AcLAA) 25 mM (Sigma-Aldrich), 3 μ l de *buffer* 10X (Tris-HCl 100mM, MgCl₂ 30mM pH 7.5) y 12 μ l de cada proteína recombinante purificada (cantidad final 1 μ g), fueron incubadas a 37°C por 60 min. Inmediatamente, 5 μ l de una solución de o-Dianisidina 10 mg/ml (Sigma-Aldrich) preparada en metanol y 70 μ l de una mezcla enzimas/coenzimas, pirofosfato de potasio 0.1 M pH 8.3, FAD 0.3 mg/ml en *buffer* pirofosfato, peroxidasa 10 mg/ml (Sigma-Aldrich) y D-aminoácido oxidasa ~10 mg/ml (Fluka), combinadas en una proporción 20:10:5:1, fueron agregadas a cada muestra, las que nuevamente fueron incubadas a 37°C por 5 min. Finalmente se incorporó a cada mezcla de reacción 400 μ l de una solución metanol-agua (50%), las preparaciones continuaron en incubación por 2 min a 37°C, y las lecturas de absorbancia se realizaron a 460 nm en un espectrofotómetro U-2000 (Hitachi). Ensayos de actividad para cada constructo recombinante (PBP4HNC, PBP4HN, PBP4HC), controles de reacción conteniendo solo enzima y controles sin proteína recombinante (para determinar el nivel de degradación natural del sustrato tripéptido), fueron realizados en triplicado. La cantidad (nmoles) de D-alanina liberada en cada reacción fue calculada desde una curva patrón preparada con cantidades conocidas de D-Alanina (Sigma-Aldrich). Una unidad D,D-carboxipeptidasa cataliza la hidrólisis de 1 nmol de N α ,N ϵ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala, generando D-alanina y N α ,N ϵ -Diacetyl-Lys-D-Ala en 1 min a 37°C y en condiciones de saturación enzimática por sustrato.

3.1.17. Aislamiento de peptidoglicano

El peptidoglicano (mureina) fue preparado de acuerdo a un procedimiento estándar descrito por Glauner, 1988. El crecimiento bacteriano en fase exponencial para constructos recombinantes transformados en *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* DV900(DE3), en condiciones de no inducción e inducción, fue recuperado por centrifugación (8500 rpm por 15 min a 4°C), el sobrenadante fue descartado y el producto celular, resuspendido en 4.5 ml de PBS 1X pH 8.0; para lograr la completa solubilización de membranas celulares y la degradación de ADN, el *pellet* resuspendido fue incorporado gota a gota a un volumen equivalente de SDS 6% en ebullición, la mezcla se mantuvo a 100°C y en agitación constante durante 4 horas, para luego permanecer solo en agitación suave y a TA durante al menos 16 h. La fracción insoluble (peptidoglicano) fue recuperada por ultracentrifugación (80000 rpm por 30 min a 25°C) y resuspendida en 3 ml de agua Milli-Q templada, se realizaron sucesivos pasos de resuspensión y ultracentrifugación (80000 rpm por 20 min a 25°C) para eliminar completamente el SDS presente en la muestra, de esta manera, un *pellet* translucido fue resuspendido finalmente en 900 µl de Tris-HCl 10 mM, NaCl 0.06% pH 7.2. Glicógeno de alta masa molecular fue digerido con α -amilasa derivada de *Bacillus subtilis* 100 µg/ml (Merck) (solución *stock* 1 mg/ml en Tris-HCl 10 mM, NaCl 0.06% pH 7.2) a 37°C por 90 min. Lipoproteína unida covalentemente y proteínas contaminantes fueron digeridas con pronasa-E 100 µg/ml (Merck) a 60°C por 60 min (solución *stock* 1 mg/ml preparada en Tris-HCl 10 mM, NaCl 0.06% pH 7.2; posible contaminación por ADNasa/ARNasa es eliminada mediante autodigestión previa por 45 min a 60°C). Estas reacciones de digestión fueron interrumpidas (inactivación enzimática), a través de la incorporación de SDS 1% (concentración final) y su incubación a 100°C por 15 min; el SDS fue removido luego de 3-4 lavados realizados en agua Milli-Q como se ha mencionado anteriormente. La mureina purificada fue resuspendida en agua y almacenada a 4°C.

3.1.18. Preparación y separación de muropéptidos

El peptidoglicano macromolecular fue resuspendido en 500 µl de *buffer* fosfato 50 mM pH 4.9 y digerido con N,O-diacetilmuramidasa aislada desde *Streptomyces coelicolor*, Cellosyl 100 µg/ml (Hoechst AG) (solución *stock* 2 mg/ml) a 37°C por 16 h, deteniéndose la reacción enzimática al calentar la muestra durante 15 min a 100°C (Figura 11). Proteína coagulada y contaminación insoluble fue eliminada por centrifugación en *MiniSpin plus*® (Eppendorf) a 14500 rpm por 15 min y a TA. Muropéptidos contenidos en la fracción soluble fueron mezclados con 1/3 de volumen de *buffer* borato 0.5M pH 9.0 (concentración final 0.1M) y residuos de N-acetilmurámico fueron reducidos a muramitol con 1-2 mg de borohidruro de sodio (NaBH₄) por 30 min a temperatura ambiente. El exceso de borohidruro fue neutralizado con ácido ortofosfórico (dilución 1:10) hasta ajustar el pH a un valor de 3-4 (punto isoeléctrico de muropéptidos). Finalmente, las muestras fueron filtradas a través de unidades Millex®-GV Filter 0.22 µm (Millipore) y almacenadas a -20°C hasta su separación por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

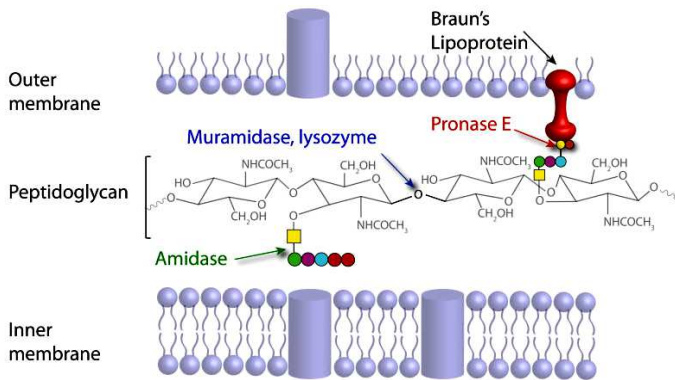


Figura 11 | Después del aislamiento del *sacculus* de mureina, el protocolo de preparación incluye tratamiento enzimático que digiere el PG en monómeros de muropéptidos u oligómeros entrecruzados. Flechas coloreadas indican el sitio de acción de las respectivas enzimas. Círculos amarillo y naranja representan un oligopéptido derivado de lipoproteína de Braun que permanece unido al muropéptido después del clivaje por pronasa-E (Desmarais *et al.*, 2013)

Muropéptidos reducidos fueron separados y analizados de acuerdo al método propuesto por Glauner *et al.*, 1988, utilizando un primer equipo para HPLC constituido por una bomba de alta presión 325 System (Kontron Instrumnets), un detector UV-1750 (Jasco) y una columna de fase reversa Hypersil™ ODS (C18) 3 µm 250 x 4.6 mm (Thermo Scientific). La separación de componentes individuales del peptidoglicano (de acuerdo a su hidrofobicidad), se realizó en un gradiente lineal de elución de 120 min, utilizando una fase móvil constituida por fosfato de sodio 50 mM con azida de sodio 2% pH 4.35 (*buffer A*) y fosfato de sodio 75 mM pH 4.95 con 15% de metanol grado HPLC (Scharlou) (*buffer B*), una tasa de flujo de 0.5 ml/min y una temperatura de equilibración para columna de 35.5°C. Compuestos eluidos fueron detectados a una longitud de onda de 204 nm; la identificación de cada muropéptido se realizó en base a su tiempo de retención y a la comparación con los tiempos de elución de muropéptidos conocidos. La abundancia relativa de muropéptidos presentes en cada muestra, fue determinada a través de la integración de sus respectivas áreas de absorción (programa Biocrom 2000 v3.0, Micron Analítica), y se expresó como fracción molar (mol%) en relación al contenido total (Figura 12).

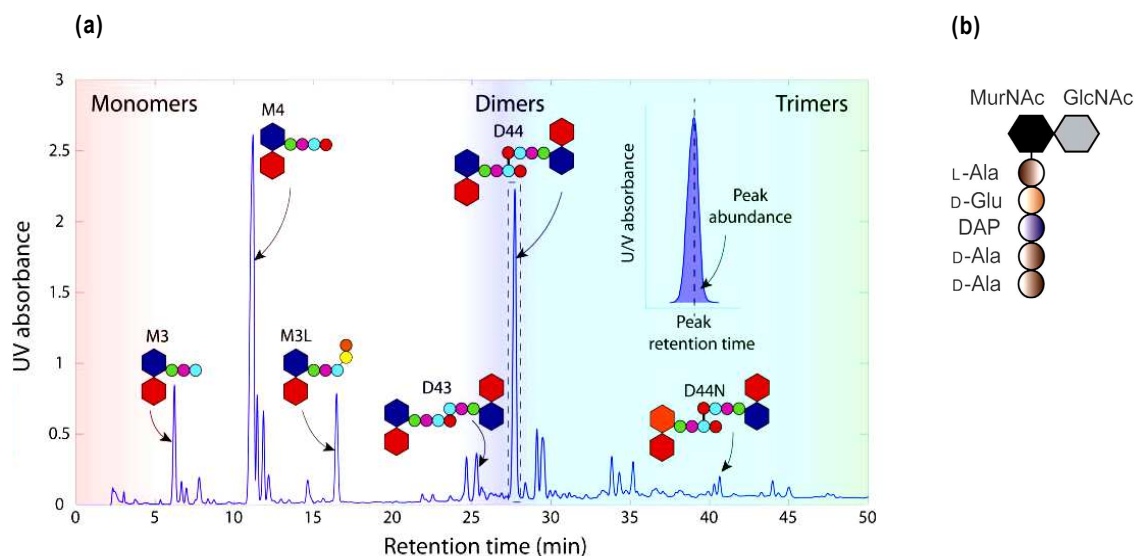


Figura 12 | (a) Ejemplo de análisis de peptidoglicano por HPLC, con picos característicos (monómeros, dímeros, trímeros, muropeptidos anhídrido) y esquemas para la estructura del muropeptido eluido (hexágonos: disacáridos; círculos: aminoácidos de cadena peptídica). Los aminoácidos de lipoproteína para M3L (disacárido tripéptido unido a lipoproteína), son simbolizados como círculos de color amarillo y naranja; la modificación anhídrido (término de cadena) sobre D44N está indicada en color naranja. Recuadro muestra una imagen ampliada para el dímero D44, con un sombreado que representa la abundancia en la especie y una línea segmentada que indica el tiempo de retención (Desmarais *et al.*, 2013) **(b)** Estructura canónica para muropeptido M5 (pentapéptido), ilustración del contenido glucídico y aminoacídico (GlcNAc: N-acetilglucosamina; MurNAc: N-acetilmurámico; L-Ala: L-alanina; D-Glu: D-glutámico; DAP: *mesoA*₂pm, ácido diaminopimélico; D-Ala: D-alanina)

3.1.19. Purificación y cuantificación de muropeptidos

Muropeptidos individuales M5 (monómero disacárido pentapéptido) y D45 (dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido), necesarios como sustrato natural para ensayos cinéticos de digestión enzimática, fueron recuperados y concentrados, a partir de la separación de muropeptidos (previamente identificados de acuerdo a su tiempo de retención-elución) desde la estirpe mutante *E. coli* DV900 (mutante de delección para 9 PBPs, carente de actividad D,D-carboxipeptidasa y D,D-endopeptidasa), realizada por HPLC; la concentración de cada muestra fue cuantificada en función del contenido de aminoácido *mesoA*₂pm (DAP) según la metodología descrita por Work, 1957. Para esto, muropeptidos aislados y contenidos en ampollas de cristal (Wheaton) con capacidad para 1 ml, fueron hidrolizados en HCl 6N a 100°C por 16 h, liofilizados en un sistema Freezemobile 5EL (VirTis Sentry™), rehidratados en agua Milli-Q y mezclados en una proporción 1:1:1 con ácido acético glacial y reactivo de ninhidrina [250 mg de Pierce™ Ninhydrin (Thermo Scientific), 4 ml de ácido fosfórico 6M y 6 ml de ácido acético glacial]. Se realizaron lecturas de absorbancia a 434 nm, y la cantidad de *mesoA*₂pm (DAP) se calculó en base a una curva estándar previamente realizada.

3.1.20. Actividad D,D-peptidasa sobre peptidoglicano macromolecular. Análisis por HPLC

Para evaluar las actividades D,D-peptidasa (D,D-carboxipeptidasa; D,D-endopeptidasa) de LMM-PBP4 sobre peptidoglicano macromolecular, cultivos bacterianos correspondientes a constructos recombinantes pET-PBP4HNC, pET-PBP4HN, pET-PBP4HC, transformados en la cepa *E. coli* DV900(DE3), no tratados y tratados con IPTG, fueron crecidos y utilizados en la preparación y separación de peptidoglicano (HPLC), de acuerdo a los protocolos antes descritos. Dada la abundancia relativa de monómero M5 y dímero D45 en el *sacculus* de mureína de la estirpe mutante *E. coli* DV900, la sobreexpresión de clones recombinantes para LMM-PBP4 transformados en lisógenos *E. coli* DV900(DE3), permitió investigar *in vivo* su funcionalidad D,D-CPasa (sobre M5) y D,D-EPasa-D,D-CPasa (sobre D45), estimando su actividad a través de la variación en la cantidad relativa de sustrato y producto, en relación a una muestra control sin inducir. Los resultados son entregados como el valor promedio de experimentos realizados en duplicado.

3.1.21. Actividad D,D-peptidasa sobre sustrato natural (muropéptidos purificados). Análisis por HPLC

Para el estudio cinético de actividad D,D-CPasa se utilizó como sustrato natural monómero disacárido pentapéptido (M5) previamente purificado y cuantificado. Mezclas de reacción conteniendo concentraciones crecientes de sustrato (desde 14.6 μM hasta 227.0 μM), enzima purificada PBP4HC (0.57 μM) y PBS 1X pH 8.0 para un volumen final de 200 μl , fueron incubadas por 150 min a 37°C; controles de reacción conteniendo solo enzima y solo sustrato fueron incubados paralelamente a las muestras procesadas. Las preparaciones fueron calentadas a 100°C por 2 min para detener la reacción, centrifugadas a 14500 rpm por 10 min, filtradas (Millex-GV Filter 0.22 μm , Millipore) y analizadas por HPLC (volumen de inyección 150 μl); la actividad enzimática fue evaluada por la generación de monómero disacárido tetrapéptido (M4), como producto de reacción. Parámetros cinéticos V_{max} y K_m fueron determinados desde la representación gráfica para la ecuación de Michaelis-Menten, realizada con los datos obtenidos desde los ensayos indicados; la constante catalítica k_{cat} fue calculada a partir de la relación $V_{max}/[E_0]$ (donde $[E_0]$ corresponde a la concentración micromolar de proteína purificada utilizada) (Núñez de Castro, 2001), y los resultados fueron presentados como el valor promedio \pm desviación estándar de experimentos realizados en triplicado. La actividad D,D-EPasa fue determinada, empleando concentraciones crecientes de sustrato natural disacárido tetrapéptido-pentapéptido (D45) (desde 8.3 μM hasta 137.3 μM), proteína recombinante purificada PBP4HC (0.59 μM) y PBS 1X pH 8.0, incubándose estas mezclas durante 110 min a 37°C. Muestras y controles de reacción fueron procesados de igual manera que en ensayos de actividad D,D-CPasa, y sus parámetros cinéticos fueron estimados como se ha descrito para el caso anterior. La investigación de la actividad D,D-peptidasa para la proteína PBP4(SPS) fue realizada sobre sustrato natural M5 y D45, de acuerdo a la metodología descrita para proteína insoluble (las reacciones de digestión sobre M5 fueron incubadas por 60 min y 240 min a 37°C, mientras que para sustrato D45, el tiempo de incubación fue de 60 minutos). El análisis gráfico y estadístico fue desarrollado utilizando el programa GraphPad Prism® v5.01 (GraphPad Software, Inc.).

3.1.22. Fraccionamiento celular. Localización subcelular

Para el fraccionamiento celular a través de la preparación de esferoplastos, se empleó un protocolo basado en el procedimiento descrito por Birdsell & Cota-Robles, 1967. Cultivos no inducidos e inducidos para cada clon recombinante (pET-PBP4HNC, pET-PBP4HN, pET-PBP4HC) transformado en células *E. coli* BL21(DE3), fueron preparados de acuerdo a las condiciones de crecimiento anteriormente descritas. Desde cada preparación, 1 ml de cultivo fue centrifugado a 8000 rpm por 10 min a 4°C, el *pellet* obtenido (FRACCION TOTAL) fue almacenado a -20°C hasta su utilización. Un volumen de 25 ml de material no inducido e inducido, fue centrifugado a 8000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue desechado y el exceso de medio de cultivo en el *pellet* obtenido fue eliminado, el *pellet* celular fue suavemente resuspendido (evitando lisis celular) en 1 ml de Tris-HCl 30 mM pH 8.0, sacarosa 20% (Merck) (*buffer* T-S). A continuación, se incorporaron 10 µl de EDTA 0.5 M (concentración final 5 mM) y 50 µl de lisozima preparada en *buffer* T-S (concentración final 250 µg/ml), la mezcla se incubó en hielo por 20 min, en agitación suave, y la formación de esferoplastos fue confirmada mediante observación microscópica y un prueba simple de fragilidad osmótica (lisis en medio hipotónico). Luego de la adición de CaCl₂ 20 mM y NaCl 100 mM en *buffer* T-S (soluciones estabilizantes), las muestras fueron centrifugadas a 18000 rpm por 15 min a 4°C en ultracentrífuga TL-100 (Beckman), y el sobrenadante obtenido (FRACCION PERIPLASMICA) fue almacenado a 4°C. Para favorecer la ruptura celular (esferoplastos), el *pellet* recuperado fue resuspendido en 500 µl de Tris-HCl 30 mM pH 8.0, MgCl₂ 5mM (*buffer* de baja fuerza osmótica) y desoxirribonucleasa I (Sigma-Aldrich) 1µg/ml, mezclado en agitador tipo vórtex y centrifugado a 18000 rpm por 40 min a 4°C; el sobrenadante (FRACCION CITOPASMATICA) fue almacenado a 4°C, mientras que el precipitado (FRACCION DE MEMBRANA TOTAL) fue resuspendido en 150 µl de Tris-HCl 30 mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0. El *pellet* correspondiente a la fracción total y obtenido desde material no inducido e inducido, fue descongelado y resuspendido en Tris-HCl 30 mM pH 8.0. Se determinó la concentración de proteínas totales para cada fracción celular (diluciones 1:5, 1:10.1:20 en Tris-HCl 20 mM pH 8.0) mediante el sistema colorimétrico DC Protein Assay (Bio-Rad). Del mismo modo, material celular recuperado desde cultivos no inducido e inducido [L(+)-arabinosa 0.2%], preparados en condiciones de crecimiento e incubación adecuadas para el clon recombinante pBTBxh-PBP4HC transformado en células de *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (*wild-type*), fue sometido a fraccionamiento celular a través de la metodología descrita; una cantidad equivalente a 30 µg de proteína total desde cada fracción recuperada, fue utilizada para su separación por SDS-PAGE (NuPAGE® Novex® 10% Bis-Tris Mini Gel, Life Technologies). Finalmente, la localización subcelular de proteínas PBP4HNC, PBP4HN, PBP4HC en *E. coli*, y del constructo recombinante PBP4HC en el modelo *Pseudomonas aeruginosa*, se realizó mediante transferencia e inmunodetección (*western blot*), de acuerdo a la metodología descrita.

El sistema pBTBxh-2 corresponde a un vector de expresión de amplio rango de huésped (entre microorganismos Gram negativos) conteniendo el gen *rep* (derivado de pBBR-1), una secuencia *rbs* mejorada (desde pBAD24), un promotor *P_{BAD}* (para la expresión de genes inducibles por arabinosa), además de un His-tag en su extremo C-terminal (Figura 13) (Prior *et al.*, 2010).

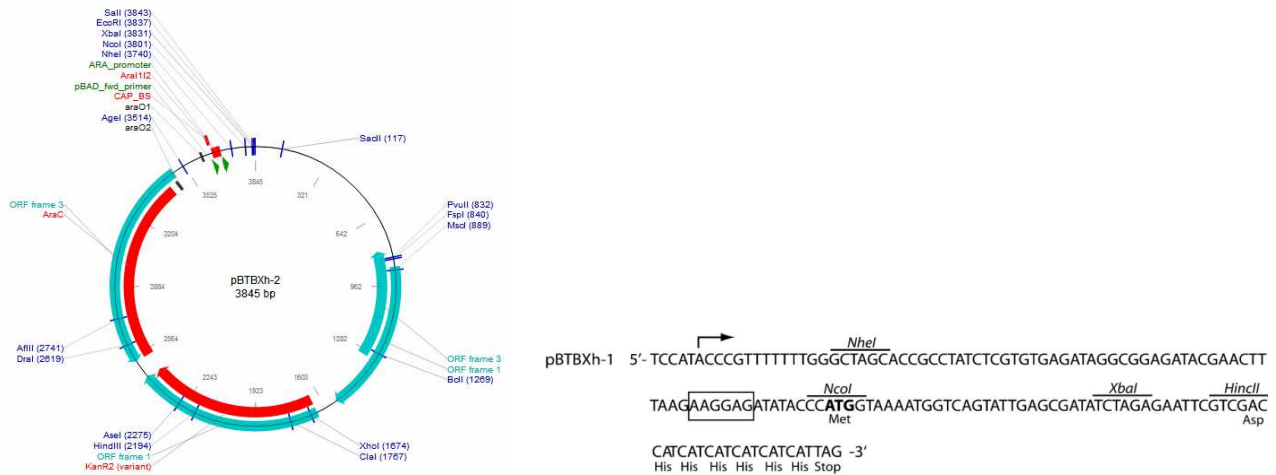


Figura 13 | Mapa circular vector pBTBxh-2 (3845 pb). Secuencia nucleotídica que destaca el sitio de inicio de la transcripción (flecha), el sitio de unión a ribosoma (recuadro), el sitio de restricción *NcoI* que permite la expresión *in-frame*, y el codón de inicio ATG destacado (negrita). Un gen sin codón de término insertado entre los sitios *NcoI* e *HincII* será expresado con His-tag en extremo C-terminal (Prior *et al.*, 2010)

3.1.23. Inmunización y producción de anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 (PAO1)

La producción de anticuerpos policlonales específicos para LMM-PBP4, se realizó a través de un esquema de inmunización experimental facilitado por personal directivo y técnico del gabinete veterinario de la Facultad de Medicina, en la Universidad Autónoma de Madrid. Los animales utilizados fueron 3 machos de conejo raza New Zealand White (peso aproximado de 1.8-2.0 kg), enviados a las instalaciones del animalario una semana antes del comienzo del protocolo de inmunización para una adecuada ambientación. Proteínas recombinantes purificadas fueron utilizadas como inmunógenos y mezcladas con un agente inmunopotenciador (adyuvante completo e incompleto de Freund, Sigma-Aldrich) previamente sonificado (2 ciclos de 30 s con una amplitud de 90%). El protocolo de inmunización se inició con la extracción de una muestra de sangre desde cada conejo (~15 ml) y la obtención de suero preinmune, el que fue ensayado por *western blot*. Para la primera inmunización, una solución de antígeno preparada con 750 µl de proteína recombinante en PBS 1X pH 8.0 (concentración final 1 mg/ml) y 750 µl de adyuvante completo de Freund, fue mezclada hasta lograr una emulsión homogénea, dispuesta en jeringas Einmal-Spritzen de 5 ml (Becton Dickinson) y mantenida en hielo; la inoculación de cada inmunógeno en su respectivo animal, marcados como 1258A (PBP4HNC), 1259B (PBP4HN), 1260C (PBP4HC), se realizó por vía intradérmica. Luego de 15 días se efectuaron nuevos procedimientos de extracción de sangre y obtención de suero inmune, material que permitió evaluar la presencia, pureza, título y especificidad de los anticuerpos generados, mediante *western blot*, además de ejecutar una segunda inmunización (primer refuerzo) por vía intramuscular, con una solución de antígeno (0.5 mg en un volumen final de 1.2 ml) preparada con adyuvante incompleto de Freund. Después de una tercera y cuarta inmunización (segundo y tercer refuerzo), y la determinación del título de anticuerpos específicos, se decidió realizar la sangría final y el sacrificio del animal (pentobarbital). Las muestras de sangre, como en los casos

anteriores, fueron incubadas a temperatura ambiente por 60 min y luego a 4°C ON, para favorecer la retracción del coágulo y la separación del suero inmune, el que posteriormente fue centrifugado a 3000 rpm por 5 min a 4°C, titulado, alicuotado y almacenado a -20°C.

3.1.24. Purificación de anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 por cromatografía de afinidad

Un paso previo al protocolo de purificación consistió en la determinación de la concentración de IgG total, para cada muestra de suero inmune recuperado, mediante lecturas de absorbancia realizadas a través del módulo UV/Vis (longitud de onda 280 nm) en espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), considerando el coeficiente de extinción y la masa molecular descrita para IgG (1.43 para 1 mg/ml a 280 nm; 150 kDa).

Para la purificación de anticuerpos policlonales anti-PBP4 por cromatografía de afinidad, 5 ml de antisuero, desde muestras 1258A, 1259B y 1260C, fueron centrifugados a 5000 rpm por 10 min a TA, filtrados en unidades Acrodisc® Syringe Filter 0.45 µm (Pall) y diluidos en PBS 10X pH 8.0 (concentración final 1X); el pH final fue ajustado a un valor de 8.0 con una solución de ácido ortofosfórico (dilución 1:10). A continuación, 1 ml de resina de níquel Ni-NTA Agarose (Qiagen) fue equilibrada con 5 volúmenes de PBS 1X, Triton™ X-100 0.2% pH 8.0, para luego ser puesta en contacto con 1mg de proteína purificada (PBP4-HNC) a TA por 2 h y en rotación suave; proteína no unida fue recuperada en *flow-through* y desde lavados en PBS 1X pH 8.0. Proteína recombinante unida a resina de níquel, fue incubada en rotación con la muestra de suero previamente preparada, por 60 min a TA. Nuevos pasos de lavado en PBS 1X pH 8.0 fueron realizados hasta lograr una lectura de 0 unidades de absorbancia a 280 nm, en el volumen recuperado. Anticuerpos policlonales fijados a la resina de níquel, fueron eluidos con 1 ml de glicina 0.1 M pH 2.7, este volumen se mezcló por inversión y se recuperó en un tubo *ependorf* de 1.5 ml conteniendo 200 µl de Tris-HCl 1 M pH 8.8 (neutraliza el pH ácido de la solución de elución, evitando la pérdida de actividad por desnaturalización), el procedimiento se ejecutó nuevamente hasta obtener un total de 5 volúmenes de material de elución. La cantidad de IgG total para cada muestra fue investigada, y las fracciones de mayor concentración se unieron para ser dializadas (tres cambios de *buffer* PBS 1X pH 8.0 cada 60 min a TA), cuantificadas, alicuotadas y almacenadas en congelación.

3.1.25. Ensayo de absorción para anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4

Para eliminar la posible reactividad cruzada de anticuerpos policlonales con otras LMM-PBPs, un volumen de anticuerpos anti-PBP4 (PAO1) previamente purificado por afinidad, fue absorbido frente al contenido total de proteínas de membrana preparado desde una cepa mutante de *Pseudomonas aeruginosa* incapaz de producir LMM-PBP4, mediante un procedimiento descrito por Potluri *et al.* 2010. Resumidamente, proteínas de membrana preparadas desde el mutante PA14::*dacB* [mutante de inserción por transposición para el gen *dacB* recuperado desde una librería de mutantes no redundantes PA14NR Set v1.0 (Liberati *et al.*, 2006)], fueron diluidas en PBS 1X pH 8.0, cuantificadas e incubadas en hielo por 5 min. Un volumen equivalente a 4 mg de proteína de membrana fue incorporado en 1 ml de acetona (Sigma-Aldrich) mantenida a -20°C, la muestra se mezcló por inversión y se dejó sedimentar en hielo por 30

min. El precipitado fue recuperado por centrifugación (12200 rpm por 10 min a 4°C), resuspendido en acetona fresca (-20°C), mezclado vigorosamente en agitador tipo vórtex, incubado nuevamente en hielo por 10 min y centrifugado a 13900 rpm por 5 min a 4°C. El material recuperado (proteína precipitada) fue transferido y extendido sobre papel 3MM Chr (Whatman®), el que posteriormente fue secado a temperatura ambiente e inmediatamente incubado con un volumen equivalente a 0.08 mg de anticuerpo purificado IgG anti-PBP4 (500 µl), a 4°C por 4 h en rotación suave. La mezcla anticuerpo policlonal-proteína precipitada (proporción 1:50) fue finalmente centrifugada a 14500 rpm por 5 min a 4°C, y el sobrenadante obtenido fue utilizado como fuente de anticuerpos IgG anti-PBP4 para ensayos de inmunolocalización.

3.1.26. Fijación, permeabilización e inmunomarcaje para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*

El protocolo de fijación, permeabilización e inmunomarcaje desarrollado en células de *Pseudomonas aeruginosa*, se sustentó en las metodologías propuestas previamente por Maddock & Shapiro, 1993 y Harry *et al.* 1995, con modificaciones. Las cepas bacterianas utilizadas fueron: UCBPP-PA14, cepa de referencia utilizada en el control de especificidad de anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 previamente purificados, PA14::*dacB*, mutante de inserción por transposición en gen *dacB*, utilizado como control negativo y pBTBXh-PBP4HC/PA14::*dacB*, constructo transformado en cepa mutante para LMM-PBP4, empleado para evaluar sistema de expresión y complementariedad, utilizando un anticuerpo primario comercial IgG anti-histidina His-probe (H-15): sc-803 (Santa Cruz Biotechnology). El crecimiento celular se desarrolló en las condiciones de incubación ya descritas y en medio mínimo M63 suplementado con MgSO₄·7H₂O 1 mM (Merck) y succinato 20 mM (Sigma Aldrich), como única fuente de carbono (Rojo, 2010), además de la incorporación de antibióticos gentamicina 30 µg/ml, kanamicina 200 µg/ml, o ambos. Para la expresión de la proteína recombinante PBP4HC en el sistema pBTBXh-2, la inducción se realizó a través de la incorporación de L(+)-arabinosa 0.02% al medio de cultivo (DO₆₀₀ ~0.3), durante 60 min a 37°C, para lograr una densidad celular equivalente a 10⁷-10⁸ UFC/ml.

Para inmunofluorescencia indirecta (IFI), 500 µl de material no inducido e inducido fue sometido a un protocolo previo de fijación débil, incorporando 97 µl de paraformaldehído grado microscopia electrónica 16% (concentración final 2.6%) y 0.24 µl de glutaraldehído grado microscopia electrónica 25% (concentración final 0.01%), las muestras fueron mezcladas por inversión suave, incubadas inicialmente a TA por 15 min y posteriormente en hielo por 30 min. Las células fueron centrifugadas a 7000 rpm por 5 min a TA, lavadas en PBS 1X pH 7.5 (3 lavados) y resuspendidas en 180 µl de solución GTE (glucosa 50 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 10 mM pH 7.5). Células fijadas fueron permeabilizadas por la incorporación de 20 µl de lisozima 0.5 mg/ml (Merck) preparada en GTE (concentración final 50 µg/ml), el volumen total de cada preparación (200 µl) fue depositado e incubado durante 1 min a TA sobre portaobjetos impresos previamente tratados*, el excedente fue retirado y las células adheridas a cada pocillo fueron lavadas en PBS 1X pH 7.5 (2 lavados) y secadas a TA. El protocolo de inmunomarcaje se inició con la hidratación de las células en PBS 1X pH 7.5 durante 5 min a TA y su posterior bloqueo en BSA 2% (en PBS 1X pH 7.5) durante 15

min, el volumen excedente fue aspirado y cada muestra se incubó con un primer anticuerpo (anti-PBP4 o anti-histidina comercial) diluido 1:50 en una solución de BSA 1%, PBS1X pH 7.5, a TA por 60 min en cámara húmeda. Después de lavados sucesivos en PBS 1X pH 7.5, un segundo anticuerpo Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Life Technologies) fue incorporado en dilución 1:500 (BSA 1%, PBS 1X pH 7.5) e incubado a TA por 60 min en cámara húmeda y en oscuridad. Lavados en PBS 1X pH 7.5 eliminaron el anticuerpo remanente no unido, y se concluyó con el montaje final para cada preparación (ProLong® Gold Antifade, Life Technologies). Para investigar el efecto de sustratos antibióticos sobre la localización de LMM-PBP4 en *Pseudomonas aeruginosa* (wild-type), cefoxitina 10 µg/ml; imipenem 1 µg/ml; ceftazidima 2 µg/ml (GlaxoSmithKline) y aztreonam 10 µg/ml (Bristol-Myers Squibb) fueron incorporados a cultivos bacterianos, continuando su crecimiento por 75 min (1 generación); finalizada esta etapa, las muestras fueron procesadas por IFI, como se ha detallado anteriormente. La evaluación de autofluorescencia mediante la incubación de cada preparación en ausencia de anticuerpos primario y secundario, además del tratamiento solo con anticuerpo primario, y solo con anticuerpo secundario, fueron procedimientos controles realizados paralelamente al desarrollo de los ensayos.

* Portaobjetos impresos de 8 pocillos (Thermo Scientific), fueron cubiertos con una solución de Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich) (su naturaleza policatiónica favorece la adherencia celular a la superficie tratada) diluida 1:10 en agua Milli-Q estéril por 20 min a TA, el excedente fue retirado y las láminas secadas a TA por 16 h. A continuación, los portaobjetos tratados fueron bloqueados con una solución de BSA 1% en PBS 1X pH 7.5 durante 15 min a TA

3.1.27. Microscopía y procesamiento de imágenes

La observación microscópica de las preparaciones fue realizada en un microscopio invertido Axiovert 200 M (Zeiss) con un controlador de filtros LAMBDA 10-2 (Sutter Instruments Co.), a través de un objetivo alpha Plan-Fluar 100x/1.45 Oil (Zeiss). Las imágenes de inmunolocalización para LMM-PBP4 en el modelo *Pseudomonas aeruginosa*, fueron obtenidas utilizando el filtro de fluorescencia GFP S473-498/S500-540, fotografiadas con una cámara digital monocroma de alta sensibilidad EM-CCD C9100-02 (Hamamatsu) y adquiridas con el programa MetaMorph® Imaging System v7.1r2 (Universal Imaging Corporation). Las imágenes fueron sometidas a deconvolución a través del algoritmo Tikhonov-Miller, contenido en la aplicación DeconvolutionLab (Biomedical Imaging Group), y tratadas en la plataforma Fiji (aplicación liberada basada en ImageJ) para el procesamiento y análisis de imágenes.

3.1.28. Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Identificación de secuencia aminoacídica con estructura conocida y de mayor similitud para simulación bioinformática

En la búsqueda y selección de la secuencia aminoacídica de estructura conocida con mayor similitud a LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* para su modelamiento bioinformático, se utilizó la aplicación WU-BLAST2 v2.0MP-WashU (www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wublast) frente a la base de datos para secuencias UniProtKB (www.uniprot.org/help/uniprotkb) y el repositorio de estructuras *Protein Structure Sequences* (Swiss-Prot), además de

los programas para el alineamiento de secuencias ClustalW2 v2.1 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) y T-Coffee v9.01 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee).

3.1.29. Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Modelado bioinformático por homología

El modelo de estructura tridimensional para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*, se generó mediante procedimientos de modelado por homología utilizando la estructura cristalográfica de PBP4a en *Bacillus subtilis* (Sauvage *et al.*, 2007) como molde (código estructura PDB: 2J9P; www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/2j9p), previo alineamiento secuencia-estructura mediante el servidor Phyre2 v2.0 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2) (Kelley & Sternberg, 2009). Las coordenadas del modelo fueron construidas utilizando la plataforma SWISS-MODEL (Guex *et al.*, 1999; Schwede *et al.*, 2003) disponible en <http://swissmodel.expasy.org>; la evaluación de la calidad local para la estructura predeterminada, se realizó a través de los programas de análisis proporcionados por el propio servidor (Anolea/GROMOS), mientras que la estimación de la calidad global para la simulación estructural se determinó mediante QMEAN4 *raw score* y QMEAN4 *Z-score* (Benkert *et al.*, 2011). Para optimizar su geometría y corregir posibles malos contactos, la estructura del modelo fue minimizada energéticamente en vacío sobre el campo de fuerza GROMOS96_43B1, aplicación incorporada en el programa DeepView v4.1 (Swiss-PdbViewer) (Guex & Peitsch, 1997), empleando 500 pasos de minimización por el método *steepest descent*, seguidos por otros 500 pasos de minimización a través del método de gradientes conjugados.

3.1.30. Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Distancias entre residuos catalíticos

Los programas de código abierto PyMOL v1.6 (www.pymol.org) y RasMOL v2.7.5.2 (<http://rasmol.org>), fueron utilizados para la visualización del modelado molecular de proteína-sustratos, y en la determinación de la disposición tridimensional para cada residuo atómico, a través de mediciones de distancia euclidiana entre átomos y la resta de sus respectivas coordenadas.

3.1.31. Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Interacción enzima-sustratos

Para la evaluación de la interacción enzima-sustrato, la estructura molecular de un fragmento de ligando pentapeptídico de naturaleza sintética (AMV-L-Ala-FGA-L-Lys-D-Ala-D-Ala), fue extraída desde el archivo PDB 3ITB (www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/3ITB) (Chen *et al.*, 2009) y modificada a través del uso combinado del programa generador de estructuras tridimensionales Corina v3.4 (www.molecular-networks.com/products/corina) y PyMOL v1.6, seguido de la edición manual de los archivos de coordenadas. En la formación de complejos enzima-sustrato antibiótico, el diseño molecular preliminar para los compuestos β -lactámicos cefoxitina e imipenem, fue desarrollado en los programas antes mencionados (Corina v3.4/PyMOL v1.6), continuando con la edición manual para los ajustes de interacción de mayor precisión.

3.1.32. Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Cálculo de energías de *binding* con sustratos inductores

El programa AutoDock v4.2 (<http://autodock.scripps.edu/>), aplicación que permite ajustar un determinado ligando al centro activo de la proteína investigada, minimizando la energía de interacción, fue utilizado para realizar el cálculo de energías de *binding* estimadas entre LMM-PBP4 y sustratos inductores (cefoxitina-imipenem).

* En los procedimientos y estudios bioinformáticos para el modelo estructural de LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*, se contó con la colaboración y supervisión del Dr. Paulino Gómez-Puertas (Grupo de Modelado Molecular, CBMSO)

3.2. Análisis del papel modulador de LMM-PBP4 en la integridad molecular del peptidoglicano para el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.1. Cepa de referencia y mutantes de inserción por transposición para *Pseudomonas aeruginosa*

Cepa bacteriana de referencia y estirpes mutantes utilizadas en esta segunda etapa de la investigación, son presentadas en la Tabla 4a. UCBPP-PA14, cepa de referencia *wild-type*, y mutantes de inserción para proteínas de membrana interna y externa, implicadas en el mecanismo regulatorio para la inducción de β -lactamasa cromosomal AmpC y en su hiperproducción constitutiva (PA14::*dacB*, PA14::*ampE* y PA14::*ampDh2*), fueron recuperados desde una librería de mutantes no redundantes (PA14NR Set v1.0) creada a través de mutagénesis por transposición y derivada de la incorporación del vector pMFLGM.GB-2xT7 (conteniendo el transposón *MAR2XT7*, elemento genético que presenta un *cassette* de resistencia a gentamicina con promotores T7 y repeticiones invertidas de 29 pb en cada extremo), que facilita el análisis en poblaciones de mutantes mixtos (Figuras 14 y 15) (Liberati *et al.*, 2006). Las cepas fueron mantenidas en glicerol 20% y almacenadas en congelación a -70°C.

Mutante PA14::*dacB* ID: 34428 PAMR_nr_mas_06_3:A5

Locus Name	Gene ID	PAO1 Homolog	Gene Name	Genome Sequence ID	Strand	Gene Start	Gene Stop	Gene Length
PA14_24690	GID895	PA3047		2	-	2159092	2157662	1431
Gene Description						Gene Status		
putative D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase						ACTIVE		
Mutant ID	Blast Bit Score	Bases From Gene Start	Genetic Background	Transposon	Genome Location	PA14 NR Set Plate Position	NR Set Comments	
34428	932.0	184	PA14	WT7	2138908	PAMR_nr_mas_06_3:A5		

Mutante PA14::*ampE* ID: 28880 PAMR_nr_mas_03_4:D4

Locus Name	Gene ID	PAO1 Homolog	Gene Name	Genome Sequence ID	Strand	Gene Start	Gene Stop	Gene Length
PA14_58660	GID2891	PA4521		2	-	5228483	5227647	837
Gene Description						Gene Status		
transmembrane protein						ACTIVE		
Mutant ID	Blast Bit Score	Bases From Gene Start	Genetic Background	Transposon	Genome Location	PA14 NR Set Plate Position	NR Set Comments	
28880	353.0	254	PA14	WT7	5206029	PAMR_nr_mas_03_4:D4		

Mutante PA14::*ampDh2* ID: 42715 PAMR_nr_mas_10_3:D6

Locus Name	Gene ID	PAO1 Homolog	Gene Name	Genome Sequence ID	Strand	Gene Start	Gene Stop	Gene Length
PA14_72400	GID2938	PA5485		2	-	6450206	6449427	780
Gene Description						Gene Status		
putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase family protein						ACTIVE		
Mutant ID	Blast Bit Score	Bases From Gene Start	Genetic Background	Transposon	Genome Location	PA14 NR Set Plate Position	NR Set Comments	
42715	280.0	76	PA14	WT7	6450126	PAMR_nr_mas_10_3:D6		

Figura 14 | Información genética para mutantes de inserción por transposición en *Pseudomonas aeruginosa* PA14, derivada desde librería genómica PA14NR Set v1.0 (<http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi>)

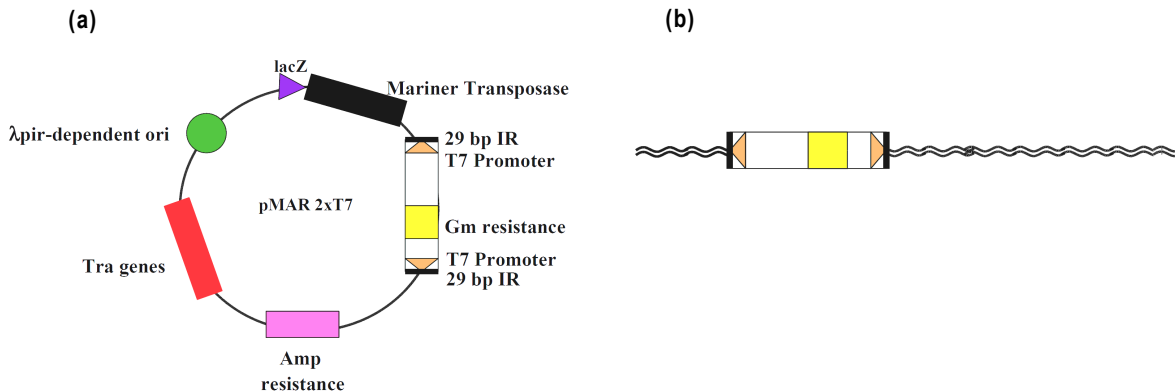


Figura 15 | (a) Vector pMFLGM.GB-2xT7 conteniendo el transposón *MAR2xT7* (b) Transposón *MAR2xT7* inserto en el genoma de PA14 (<http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi>)

3.2.2. Condiciones de crecimiento

Cultivos bacterianos fueron desarrollados rutinariamente en medio LB (Luria-Bertani) a 37°C, en aerobiosis y en agitación permanente (200 rpm). Fue necesario mantener una proporción adecuada entre la capacidad del recipiente para incubación (matraz) y el volumen de cultivo contenido, para disminuir la frecuencia en la formación de colonias variantes de tamaño reducido para PA14. Los antibióticos kanamicina y gentamicina fueron utilizados en las concentraciones antes descritas, mientras que el antibiótico tetraciclina (Sigma-Aldrich) fue ensayado a una concentración de 50 µg/ml para *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2.3. Confirmación de identidad para mutantes de inserción por transposición desde librería PA14NR

De acuerdo a las recomendaciones descritas por autores de la librería genómica PA14NR Set v1.0, mutantes recuperados y aislados en placas de agar LB suplementado con gentamicina 15 µg/ml, fueron confirmados por *PCR* y secuenciación. La extracción y purificación de ADN genómico desde las estirpes mutantes PA14::*dacB*, PA14::*ampE* y PA14::*ampDh2*, fue realizado mediante el sistema comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), las muestras fueron cuantificadas en espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y almacenadas a 4°C. Las reacciones de amplificación se efectuaron por *PCR* convencional en un equipo *MiniCycler*™ PTC-150 (MJ Research), utilizando *Pfu* polimerasa con actividad exonucleasa 3'-5' y un set de *primers* específicos (Tabla 4c). Los productos de amplificación para las cepas mutantes PA14::*dacB*, PA14::*ampE* y PA14::*ampDh2*, fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega) y secuenciados como se ha descrito anteriormente. Las secuencias resultantes fueron visualizadas en el programa Chromas Lite 2.1.1 y analizadas mediante BLAST frente al genoma de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (<http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/blast.cgi>). Estudios complementarios de identidad, fueron ejecutados a través de un ensayo de unión a penicilina fluorescente (BOCILLIN™ FL), realizado a partir de extracto de membrana para el mutante de inserción PA14::*dacB*; además de un análisis comparativo entre el

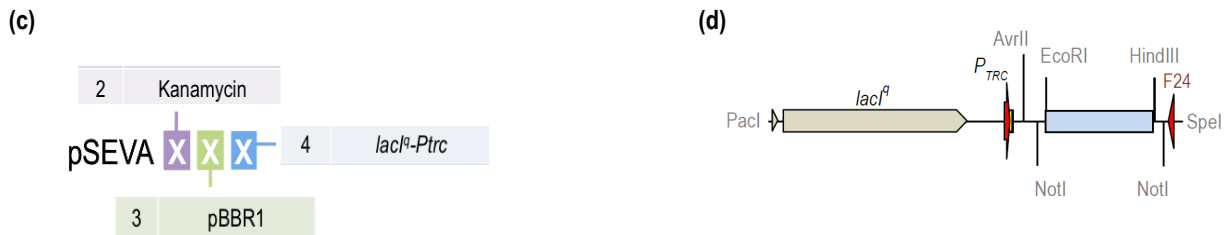


Figura 16 | (c) Nomenclatura y módulos funcionales para el plásmido pSEVA234 (4539 pb) (d) Representación estructural del sistema de expresión y sitio de clonaje para el vector pSEVA234 (<http://seva.cnb.csic.es>)

3.2.5. Constructos recombinantes para el modelo *Pseudomonas aeruginosa*

Para el clonaje en vectores de expresión compatibles con *Pseudomonas aeruginosa*, el gen codificante *dacB* (LMM-PBP4) fue amplificado mediante *touchdown PCR* en un equipo *MiniCycler™* PTC-150 (MJ Research), utilizando *primers* definidos (indicados en Tabla 4c), polimerasa *Pfu* (Promega) con actividad *proofreading*, DMSO y ADN genómico previamente extraído y purificado desde cepa de referencia PAO1, como templado. Los productos de amplificación *dacB-EcoRI-HindIII* y *dacB-EcoRI(rbs)-HindIII* (~1.5 Kb) fueron purificados con el *kit* comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, separados por electroforesis, purificados desde gel, cuantificados en NanoDrop, tratados con dATP, ligados en vector pGEM®-T Easy (razón molar inserto:vector 3:1) y transformados en células competentes *E. coli* DH5α. Transformantes positivos fueron verificados mediante *colony PCR*, ensayos de digestión a partir de productos de *minipreps* (Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System) y secuenciación (*primers* pUC/M13). Amplicones digeridos y purificados fueron subclonados en vectores de expresión pHERD26T y pSEVA234 previamente digeridos, purificados y desfosforilados, utilizando el *kit* de ligación T4 DNA Ligase (Thermo Scientific).

3.2.6. Células competentes para *Pseudomonas aeruginosa*. Transformación por electroporación

Células electrocompetentes para *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 y mutantes de inserción por transposición (PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2*), fueron preparadas mediante un protocolo descrito por Choi *et al.*, 2006. Cepas bacterianas de interés fueron crecidas a 37°C por 16 h en agitación (200 rpm), en medio LB (20 ml) suplementado con gentamicina 30 µg/ml (para estirpes mutantes). Un volumen aproximado de 6 ml desde cada cultivo fue distribuido en 4 tubos *ependorf* estériles (1.5 ml por cada tubo), los que fueron centrifugados a máxima velocidad (14500 rpm) por 2 min a TA (*MiniSpin plus®*, Eppendorf). El sobrenadante fue descartado, el exceso de medio de cultivo fue eliminado por aspiración, el precipitado celular fue resuspendido cuidadosamente en 1 ml de sacarosa 300 mM y las muestras fueron centrifugadas como se ha indicado. Los pasos de resuspensión y centrifugación fueron realizados nuevamente en las condiciones descritas; finalmente, los cuatro *pellets* celulares fueron resuspendidos en un volumen combinado de 100 µl de sacarosa 300 mM (~10⁹-10¹⁰ células/ml). Las alícuotas obtenidas fueron almacenadas a -70°C hasta su utilización.

Para el protocolo de transformación por electroporación, se siguieron las recomendaciones indicadas por Choi *et al.*, 2006. Una cantidad aproximada de 300 ng de ADN plasmidial conteniendo el gen *dacB* (constructos pHERD-PBP4, pSEVA-PBP4) fue incorporada en 100 μ l de células electrocompetentes previamente descongeladas, la mezcla se agitó suavemente y fue transferida a una cubeta de electroporación Gene Pulser® Cuvette 0.2 cm (Bio-Rad) incubada a -20°C. Después de aplicar un pulso eléctrico (25 μ F; 200 Ω ; 2.5 kV) desde un sistema GenePulser® II (Bio-Rad), 1 ml de medio de cultivo LB fue agregado a cada cubeta, las células fueron transferidas a un recipiente de mayor volumen (tubo estéril de 10 ml) e incubadas por 2 h a 37°C en agitación. Las células fueron recuperadas por centrifugación (7000 rpm por 2 min a TA) y 900 μ l de sobrenadante fue descartado, el *pellet* celular fue resuspendido en 100 μ l de medio residual y diseminado sobre placas de agar, las que fueron incubadas a 37°C por 24 h; controles positivos y negativos (evaluación de células competentes) fueron desarrollados paralelamente.

3.2.7. Selección de transformantes en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Transformantes positivos de *Pseudomonas aeruginosa* conteniendo clones recombinantes pHERD-PBP4, con un tamaño molecular ~7.7 Kb (pHERD-PBP4 contenido en PA14WT, PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2*) y pSEVA-PBP4, con un tamaño molecular ~6.1 Kb (pSEVA-PBP4 contenido en PA14WT, PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2*), recuperados desde colonias crecidas en placas de agar LB sin suplementar (para cepa de referencia) y suplementadas con gentamicina 30 μ g/ml (para estirpes mutantes), fueron purificados e identificados por secuenciación (*primers* pHERD-M13-Fw, pSEVA-PS1-Fw y PaePBP4-B; Tabla 4c). Debido al alto contenido en G+T de las secuencias investigadas, se indicó la aplicación de un *kit* de secuenciación alternativo dGTP BigDye® Terminator v3.0 (Applied Biosystems), en el cual el dITP (presente en la versión BigDye 3.1) es sustituido por dGTP, evitando la pérdida de señal. Como en los casos anteriores, las muestras fueron purificadas por un método de filtración con columnas (Performa® DTR Gel Filtration Cartridges, EdgeBio) y finalmente analizadas en un equipo 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems).

3.2.8. Inducción y sobreexpresión de clones recombinantes en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Los procesos de inducción y sobreexpresión para LMM-PBP4 a través del sistema pHERD26T, fueron optimizados mediante el ensayo de concentraciones crecientes de agente inductor L(+)-arabinosa (0.02%-0.2%), tiempos de exposición variable (60, 120 y 180 min) y una DO₆₀₀ de inicio ~0.4; las cepas bacterianas fueron crecidas en medio LB con tetraciclina 50 μ g/ml y gentamicina 30 μ g/ml (de acuerdo a sus requerimientos) a 37°C y en agitación permanente. Para definir las condiciones óptimas de expresión de LMM-PBP4 en el vector pSEVA234, se realizaron ensayos de inducción en cepas transformantes positivas, a través de la incorporación de IPTG 1 mM-2mM al medio de cultivo (DO₆₀₀ ~0.4), durante 60 y 120 min a 37°C. Fracciones obtenidas desde cada muestra fueron normalizadas para una cantidad equivalente a 80 μ g de proteína total, separadas mediante SDS-PAGE y analizadas por *western blot*.

3.2.9. Peptidoglicano de *Pseudomonas aeruginosa* en condiciones naturales y de sobreexpresión

Para conocer y evaluar el efecto de mutaciones en LMM-PBP4 y proteínas del mecanismo regulatorio de inducción de β -lactamasa AmpC, sobre la estructura del peptidoglicano, se realizó el aislamiento de este polímero desde estirpes mutantes PA14::*dacB*, PA14::*ampE* y PA14::*ampDh2*; el peptidoglicano derivado de la cepa de referencia UCBPP-PA14 fue utilizado como control. La relación entre complementación, sobreexpresión y organización del peptidoglicano, fue valorada a través del aislamiento de mureina desde cultivos no inducidos e inducidos con L(+)-arabinosa e IPTG, para cepa de referencia y mutantes de inserción (PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2*) transformadas con constructo recombinante pHERD-PBP4 y pSEVA-PBP4, respectivamente.

3.2.10. Peptidoglicano de *Pseudomonas aeruginosa* en condiciones de inactivación antibiótica

Para investigar el efecto de sustratos antibióticos definidos sobre la funcionalidad de LMM-PBP4 y determinar el papel de esta proteína moduladora de resistencia (hiperproducción constitutiva de β -lactamasa AmpC) sobre el metabolismo estructural del peptidoglicano (evaluación de un posible rol sensor en el estado molecular de la pared celular), se realizaron preparaciones de mureina a partir de cepas control (UCBPP-PA14 y mutantes sin transformar) y estirpes transformantes de *Pseudomonas aeruginosa*, sometidas a inducción [L(+)-arabinosa e IPTG] y posterior incubación con los siguientes antibióticos β -lactámicos: cefoxitina 10 $\mu\text{g/ml}$ (buen inductor y sustrato de AmpC; buen bloqueante de LMM-PBPs), imipenem 1 $\mu\text{g/ml}$ (buen inductor y mal sustrato de AmpC; regular bloqueante de LMM-PBPs), ceftazidima 2 $\mu\text{g/ml}$ (mal inductor y buen sustrato de AmpC; bloqueante intermedio de LMM-PBPs) y aztreonam 10 $\mu\text{g/ml}$ (mal inductor y mal sustrato de β -lactamasa AmpC; mal bloqueante para LMM-PBPs de *Pseudomonas aeruginosa*). El tratamiento antibiótico se desarrolló a 37°C por 42 min (1 generación).

3.2.11. Aislamiento de peptidoglicano

Cultivos bacterianos en fase de crecimiento exponencial (DO_{600} 0.7-0.9) y tratados en las condiciones antes indicadas, fueron recuperados por centrifugación (8500 rpm por 15 min a 4°C), el sobrenadante fue descartado y el producto celular resuspendido en 4.5 ml de PBS 1X pH 8.0. Desde este punto, las muestras fueron procesadas como se ha detallado para el protocolo de aislamiento de peptidoglicano utilizado en cepas de *E. coli*, indicándose de manera particular para cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, la necesidad de realizar una segunda incubación a 100°C por 16 h para la suspensión inicial tratada en SDS 6%.

3.2.12. Preparación y separación de muropéptidos

Muropéptidos reducidos fueron separados y analizados, utilizando un sistema de HPLC Breeze™ 2 constituido por una bomba 1525 Binary HPLC Pump Model Code 5CH (Waters), un detector UV/visible 2489 (Waters), un inyector manual modelo 7725i (Rheodyne) y una columna de fase reversa Aeris™ PEPTIDE XB-C18 3.6 μm 250 x

4.6 mm (Phenomenex®). La separación de componentes individuales del peptidoglicano se realizó en un gradiente lineal de elución de 70 min (flujo 1 ml/min), utilizando fosfato de sodio 50 mM con azida sódica 2% pH 4.35 (*buffer A*) y fosfato de sodio 75 mM pH 4.95 con 15% de metanol (*buffer B*), y una columna equilibrada a una temperatura de 45°C. Compuestos eluidos fueron detectados a una longitud de onda de 204 nm y la identificación de cada muropéptido se realizó de acuerdo al tiempo de retención obtenido, mediante un análisis comparativo con tiempos de elución de muropéptidos reconocidos. Finalmente, la abundancia relativa de muropéptidos presentes en cada muestra, fue determinada a través de la integración de sus respectivas áreas de absorción (programa Breeze 2, Waters), expresándose como fracción molar (mol%) en relación al contenido total. Los resultados fueron presentados como el valor promedio de experimentos realizados en duplicado.

3.2.13. Muropéptidos purificados. Análisis proteómico

Para favorecer la identificación y distinción entre picos eluidos con tiempos de retención muy próximos y posiblemente relacionados con el muropéptido M3L, se realizaron nuevas preparaciones de PG desde la cepa de referencia UCBPP-PA14 en tres condiciones: sin tratamiento con pronasa-E, digerida por 60 min y tratada con la enzima por 180 min. Muropéptidos no identificados (A, A.1, B, C, E y F), recuperados en sus respectivos tiempos de elución, fueron concentrados y liofilizados como se ha descrito anteriormente. Para el análisis proteómico, los muropéptidos fueron resuspendidos en TFA 0.1%, acetonitrilo 33% y digeridos en tripsina; los péptidos obtenidos fueron desalados y analizados en un espectrómetro de masa Autoflex™ (Bruker Daltonics) mediante MALDI-TOF. Los espectros generados y sus respectivas masas, asignadas a través del programa flexAnalysis™ v2.2 (Bruker Daltonics), fueron enfrentadas a una base de datos propia, e investigadas para su identificación estructural a través de la aplicación BMRB Metabolomics (<http://www.bmrwisc.edu/metabolomics>) y del programa ACD/ChemSketch v12.0 (<http://www.acdlabs.com>).

Tabla 5 | Esquema de trabajo para el aislamiento de peptidoglicano desde cepas transformantes de *Pseudomonas aeruginosa* en condiciones naturales, de sobreexpresión e inactivación antibiótica

	Sin tratamiento / NI *	L(+)-arabinosa 0.2	IPTG 2 mM	FOX 10 µg/ml	IPM 1 µg/ml	CAZ 2 µg/ml	ATM 10 µg/ml	L(+)-arabinosa - FOX	L(+)-arabinosa - IPM	L(+)-arabinosa - CAZ	IPTG - FOX	IPTG - IPM	IPTG - CAZ	IPTG - ATM
PA14WT	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PA14:: <i>dacB</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PA14:: <i>ampE</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PA14:: <i>ampDh2</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
pHERD-PBP4/PA14WT	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampE</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
pSEVA-PBP4/PA14WT	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>dacB</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampE</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● Peptidoglicano aislado

● Cepas bacterianas sin tratamiento

* Categoría que incluye cepas sin tratamiento antibiótico y no sometidas a inducción (NI)

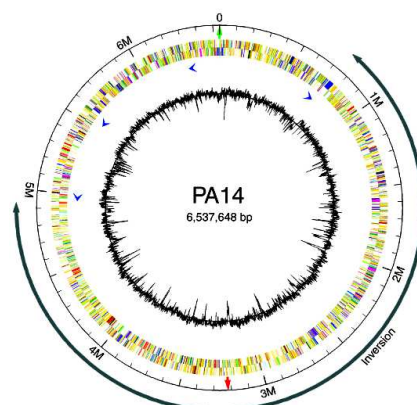
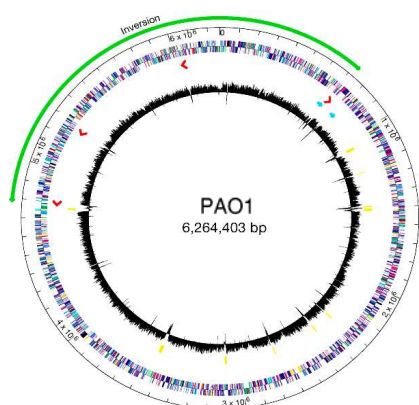
RESULTADOS

4

4. Resultados

4.1. Identificación de secuencias nucleotídica, aminoacídica y ambiente genético para LMM-PBP4. Predicción de péptido señal-estructura secundaria. Homología de secuencia entre proteínas ortólogas

4.1.1. Antecedentes genómicos para locus PA3047 y PA14_24690 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*



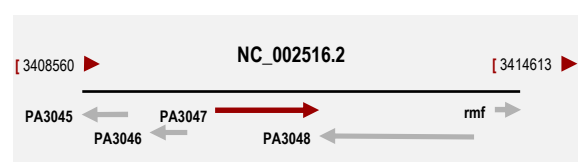
Información gen (ontología)

Organismo	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> O1
Nombre del gen	: <i>dacB</i>
Locus	: PA3047
Localización genómica	: 3410264-3411694 (hebra +)
Longitud	: 1431 pb
Acceso GenBank	: HC463454.1
Secuencia referencia	: NC_002516.2
Función molecular	: actividad carboxipeptidasa tipo serina
Proceso biológico	: proteólisis
Vía metabólica	: biosíntesis peptidoglicano

Información gen (ontología)

Organismo	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14
Nombre del gen	: -
Locus	: PA14_24690
Localización genómica	: 2157662-2159092 (hebra -)
Longitud	: 1431 pb
Acceso GenBank	: HC463514.1
Secuencia referencia	: NC_008463.1
Función molecular	: actividad carboxipeptidasa tipo serina
Proceso biológico	: proteólisis
Vía metabólica	: biosíntesis de peptidoglicano

Contexto genómico



Contexto genómico

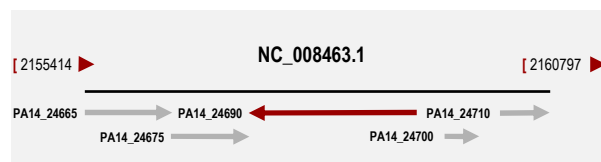


Figura 17 | Esquema con información genética para locus PA3047 y PA14_24690 en el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa* (cepas PAO1 y UCBPP-PA14)

La información disponible en base de datos de acceso público (NCBI, www.pseudomonas.com) para genes codificantes PA3047-PA14_24690 en cepas PAO1 y UCBPP-PA14, respectivamente, sugiere la correspondencia entre la funciones moleculares asignadas en ambos genes, así como la vinculación (teórica) con el proceso biológico de proteólisis y la vía metabólica de biosíntesis de peptidoglicano. En cuanto al ambiente genético, el gen *dacB* de PAO1 (locus PA3047) se presenta flanqueado por regiones intergénicas (tamaño molecular 68-310 pb), y relacionado *upstream-downstream* con una proteína de función desconocida (ORF PA3046), un sistema regulador de dos componentes [operón divergente constituido por los genes *rocA2* (regulador de respuesta; PA3045) y *rocS2* (sensor quinasa; PA3044)] implicado en virulencia a través de la expresión de genes fimbriales *cupC* (formación de *biofilms*) y genes *mexAB-oprM* para bomba de eflujo (resistencia antibiótica) (Sivaneson *et al.*, 2011), además de una metiltransferasa de ARNr 23S (*rmlL*; PA3048) y un factor de modulación ribosomal (*rmf*; PA3049). En PA14_24690, el entorno genético es muy semejante al de PA3047, ya que su secuencia nucleotídica se encuentra también limitada por regiones intergénicas de tamaño molecular equivalente (69-310 pb) y vinculada con secuencias codificantes para proteínas de naturaleza muy similar a las reconocidas para el locus anteriormente descrito, como: PA14_24675 (proteína no caracterizada, hipotética metiltransferasa dependiente de S-adenosil metionina), PA14_24665 (proteína no caracterizada, hipotética metiltransferasa), PA14_24650 (*rmf*, factor de modulación ribosomal), PA14_24700 (proteína de función desconocida), PA14_24710 (probable regulador de respuesta en sistema de dos componentes) y PA14_24720 (probable sensor quinasa en sistema regulador de dos componentes) (Figura 17). Por lo anterior, es posible concluir para ambas secuencias, que sus localizaciones genómicas no se encuentran relacionadas con grupos genéticos descritos y comprometidos con la vía metabólica asignada, una situación muy diferente a la descrita para proteínas de alta masa molecular en este modelo bacteriano, como por ejemplo, para el gen *pbpA* (HMM-PBP2; locus PA4003), cuya ubicación cromosomal le conecta directamente con genes implicados en el metabolismo del peptidoglicano (*rtpA*, *sltB1*, *rodA* y *dacA*); y a la indicada para el gen *ftsI* (HMM-PBP3; locus PA4418), que muestra una proximidad muy importante con *clusters* genéticos necesarios para la síntesis de precursores de mureina (ejemplo, *murE*, *murF*, *murD*), división celular y formación de *septum* bacteriano (*ftsW*, *ftsL*) (Legaree *et al.*, 2007; de León *et al.*, 2010).

4.1.2. Análisis de secuencias nucleotídicas PA3047 y PA14_24690 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa O1 es, sin lugar a dudas, la cepa de referencia utilizada en la mayoría de los ensayos descriptivos, razón por la cual fue utilizada con este fin en el presente trabajo, sin embargo, el considerar que 96% del genoma de PAO1 está contenido en UCBPP-PA14 (cepa *wild-type* homóloga), que esta última cepa corresponde a un aislado clínico primario que no ha sido sometido a manipulación excesiva en el laboratorio (en contraste a PAO1) y que representa al modelo de investigación en virulencia-patogenicidad para la especie, pone de manifiesto tres antecedentes fundamentales, que sustentan la decisión de abordar parte de nuestra investigación con mutantes generados para la estirpe *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14. Además, los resultados del alineamiento de secuencias nucleotídicas, realizado para locus genéticos PA3047-PA14_24690, demuestra un

porcentaje de identidad de 99.51% (1424/1431 nucleótidos) y 7 *mismatches* (polimorfismos de un solo nucleótido) (BLASTN, www.pseudomonas.com), que determinan mutaciones silentes para 6 de ellos y solo una mutación con cambio de aminoácido, que condiciona la sustitución conservativa del aminoácido glutamina (secuencia aminoacídica gen de referencia PA3047) por el aminoácido histidina (secuencia aminoacídica gen analizado PA14_24690) en posición 156 (Tabla 6), distante del centro activo y residuos catalíticos de la proteína (serina en posición 72). El aminoácido glutamina (Q) es de naturaleza polar no cargada, mientras que histidina (H) corresponde a un aminoácido polar (hidrófilo) con variaciones en su carga total (positiva o neutra) de acuerdo al valor de pH (pK_a cadena lateral 6.02), lo que permite inferir que en condiciones neutras (pH 7.4), la estructura secundaria para la proteína codificada por el gen PA14_24690 en *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14, se correspondería estructuralmente y funcionalmente con la organización proteica primaria del producto “probable D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa” para el gen *dacB* (locus PA3047) en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, una situación que refuerza la utilización de ambos genes de manera indiferenciada y el uso de mutantes de inserción por transposición (generados en *Pseudomonas aeruginosa* PA14; librería genómica PA14NR Set v1.0) para DacB y proteínas implicadas en el mecanismo regulatorio de inducción para β -lactamasa cromosomal AmpC.

Tabla 6 | Polimorfismos identificados en secuencia nucleotídica PA14_24690 de *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 respecto a gen de referencia PA3047

Cepa referencia/gen	Cepa analizada/gen	Polimorfismo (SNP)*	Mutación ADN	Tipo
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PA3047	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 PA14_24690	Transición	g.3410648C>T	Silente CTG (Leu) -> TTG (Lue)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PA3047	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 PA14_24690	Transición	g.3410656C>T	Silente CGC (Arg) -> CGT (Arg)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PA3047	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 PA14_24690	Transversión	g.3410728G>T	Silente CCG (Pro) -> CCT (Pro)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PA3047	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 PA14_24690	Transversión	g.3410731G>T	Cambio de sentido CAG (Gln) -> CAT (His)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PA3047	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 PA14_24690	Transición	g.3411046C>T	Silente CAC (His) -> CAT (His)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PA3047	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 PA14_24690	Transición	g.3411088G>A	Silente GAG (Glu) -> GAA (Glu)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PA3047	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 PA14_24690	Transición	g.3411265T>C	Silente AGT (Ser) -> AGC (Ser)

* SNP: Single Nucleotide Polymorphism

Resultados

4.1.3. Antecedentes proteómicos para DacB en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Predicción de péptido señal y estructura secundaria. Homología de secuencia entre proteínas ortólogas

Información proteína (PAO1)		A Información proteína (UCBPP-PA14)	
A Nombre	: probable D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa	A Nombre	: probable D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa
A Nombre alternativo	: DacB, probable PBP4	A Nombre alternativo	: DacB, probable PBP4
Familia	: peptidasa_S13	Familia	: peptidasa_S13
A COG	: COG2027	A COG	: COG2027
Secuencia referencia	: NP_251737.1	Secuencia referencia	: YP_790125.1
A Longitud secuencia	: 476 aa	A Longitud secuencia	: 476 aa
A Molecular mass	: 51860.6 Da	A Molecular mass	: 51869.6 Da
pl	: 9.69	pl	: 9.69
A Coeficiente extinción	: 61880 M ⁻¹ cm ⁻¹	A Coeficiente extinción	: 61880 M ⁻¹ cm ⁻¹

Figura 18 | Esquema con información proteómica para probable D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa (DacB, probable PBP4) en el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa* (cepas PAO1 y UCBPP-PA14)

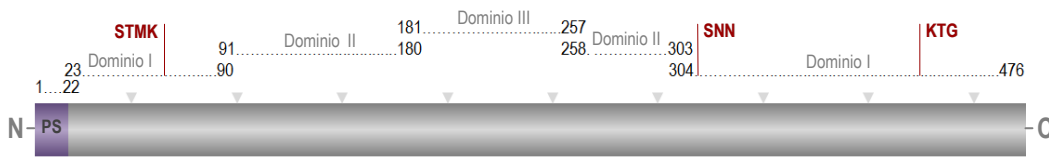


Figura 19 | Organización estructural para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1, indicando longitud del péptido señal (PS), delimitación para dominios I, II y III, y motivos conservados STMK, SNN y KTG (destacados en letras de color rojo)

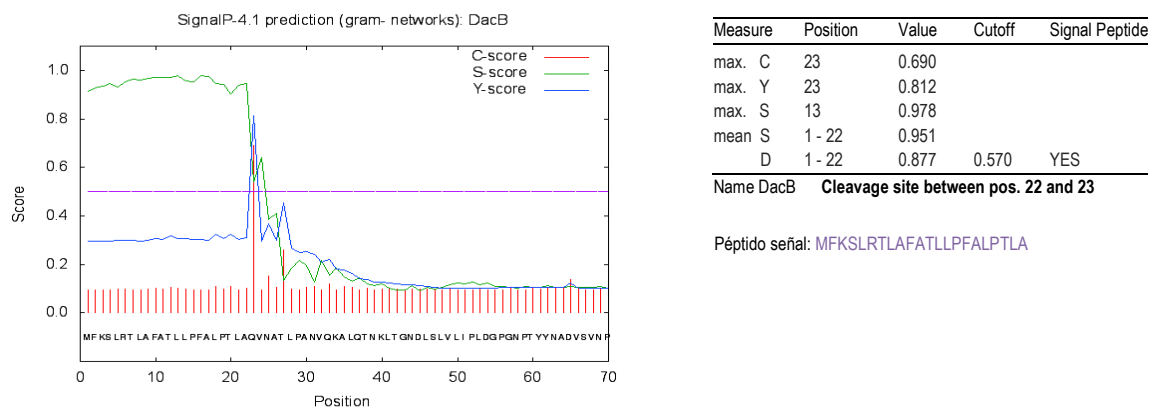


Figura 20 | Predicción de péptido señal y localización de sitio de corte en secuencia aminoacídica para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1 mediante el programa SignalP v4.1 (Nordahl et al., 2011)

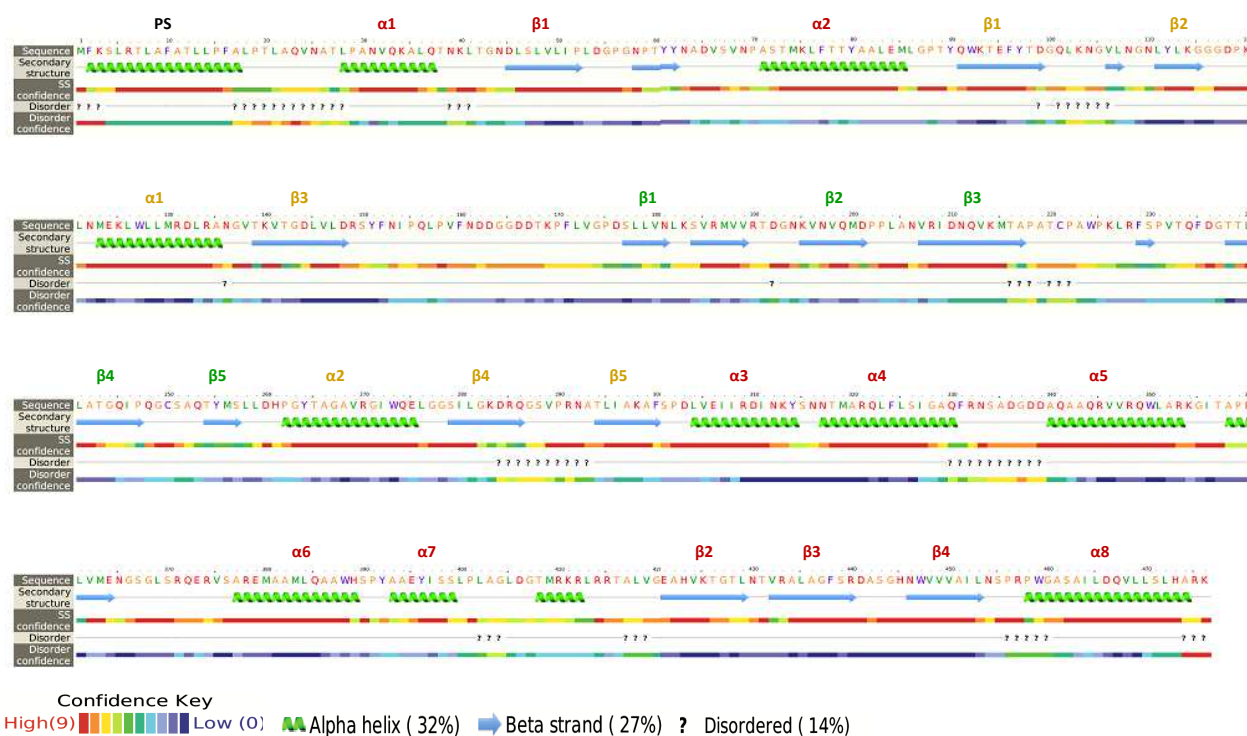


Figura 21 | Predicción de estructura secundaria desde secuencia aminoacídica para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1 a través del programa Phyre2 v2.0 (Kelley & Sternberg, 2009). Hélices α y láminas β se indican en colores rojo, marrón y verde, para los dominios I, II y III, respectivamente; PS, péptido señal

El enfrentamiento de información proteómica (teórica) recuperada desde bases de datos no redundantes [NCBI, UniProt (EMBL-EBI), www.pseudomonas.com (CFFT)] para proteína DacB de *Pseudomonas aeruginosa* en cepas PAO1 y UCBPP-PA14, además del análisis de parámetros químicos y físicos para cada secuencia, realizado a través de la aplicación ProtParam (ExPASy), demuestran un consenso absoluto para ambas proteínas, en cuanto a su naturaleza, estructura y probable funcionalidad. La proteína DacB de *Pseudomonas aeruginosa*, corresponde a una D,D-peptidasa integrante de la familia D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa 3 (S13) e incluida en el *cluster* de grupos ortólogos COG2027 [D-alanina-D-alanina carboxipeptidasa (*Penicillin-Binding Protein 4*)]. Posee una masa molecular de 51.8 kDa, y como la totalidad de PBPs y serina β -lactamasas, contiene tres secuencias conservadas, un motivo principal SxxK (STMK) que incluye al residuo catalítico S72 (serina catalítica en posición 72), además de las triadas SxN (SNN) y KTG, características de *Penicillin Binding Proteins*, y que en conjunto favorecen procesos de acilación-deacilación (Figuras 18 y 19). Estos antecedentes permiten reconocer y posicionar a DacB dentro de la categoría de LMM-PBPs de clase C, un grupo de proteínas que puede ser dividido en tres subclases: i) subclase C1 (PBPs-C1), con PBP4 de *E. coli* y D,D-peptidasa (R39) como miembros representativos, constituyen enzimas multimodulares con uno o dos dominios insertados en el dominio PB (*Penicillin-Binding*); ii) subclase C2 (PBPs-C2), incluye proteínas modulares y similares a β -lactamasas clase C. D,D-peptidasa de *Streptomyces* R61, una enzima estructuralmente muy bien estudiada, es una típica PBP-C2; iii) subclase C3 (PBPs-C3), corresponden a enzimas monomodulares o bimodulares. Ejemplos de enzimas bimodulares para esta categoría son PBP5 de *E. coli* y PBP3 de *Streptococcus*

pneumoniae, y como ejemplo de enzima monomodular para esta clase se reconoce a D,D-transpeptidasa de *Streptomyces* K15. De modo general, LMM-PBPs de clase C actúan como D,D-CPasa, D,D-transpeptidasa o D,D-EPasa, siendo bastante incierta aún, la actividad predominante (Sauvage *et al.*, 2007). El alineamiento realizado entre secuencias aminoacídicas para LMM-PBP4 de PAO1 (secuencia problema) y LMM-PBP4 de *E. coli* (ortólogo “funcional”, secuencia modelo), permitió reconocer la naturaleza multimodular para esta PBP (PBP4 de PAO1) e identificar (por convención con los residuos definidos para los dominios I, II y III en el modelo LMM-PBP4 de *E. coli*) los residuos aminoacídicos que establecen los límites para los tres dominios determinados. En PBP4 de PAO1, el dominio I se presenta establecido entre los residuos 1-90 y 304-476, el dominio II se extiende desde los aminoácidos 91-303 y el dominio III comprende los residuos 181-257. Es importante mencionar que esta delimitación de dominios, demuestra la organización estructural antes mencionada para LMM-PBPs clase C tipo 4 (modelo muñeca rusa), ya que el dominio I se representa conteniendo a los dominios II y III, además de incluir a la totalidad de grupos conservados (SxxK, SxN y KTG), necesarios para la activación del grupo hidroxilo de la serina catalítica y el correspondiente ataque nucleofílico (Figura 19). La predicción para el péptido señal en su extremo amino terminal, demuestra un sitio de corte para peptidasa señal tipo I (SPasa I) entre los aminoácidos alanina (A22) y glutamina (Q23) (posiciones 22▼23), definiendo una secuencia aminoacídica de 22 residuos con una organización tripartita característica: una región amino terminal con dos residuos cargados positivamente [aminoácidos lisina (K3) y arginina (R6)], una región central hidrofóbica de 9 aminoácidos con tendencia a la formación de α -hélices [aminoácidos leucina (L8, L13, L14, L18), alanina (A9, A11, A17) y fenilalanina (F10, F16)], y una región carboxilo terminal que porta la secuencia de reconocimiento A-X-A (triada TLA para PBP4 PAO1) (Figura 20). Con respecto al pronóstico realizado para definir la estructura secundaria de LMM-PBP4 de PAO1 (a partir de su secuencia primaria), el servidor utilizado permitió la predicción para el plegamiento regular local en hélices α , con altos niveles de confianza, y en donde destacan zonas de desorden (indicadas por un signo ?) que no se encuentran relacionadas con regiones funcionales, situación que favorece una aproximación bastante acertada para la localización estructural de residuos catalíticos conservados. La estructura secundaria obtenida para PBP4 de PAO1, permite destacar un gran inserto de 213 aminoácidos, entre las secuencias conservadas 1 (STMK) y 2 (SNN), y flanqueada por dos hélices α (α 2- α 3), que forma los dominios II y III. Se demuestra, para el dominio I (dominio PB) y la secuencia conservada STMK, que la serina activa en posición 72 se encuentra ubicada al inicio de una hélice α 2, el motivo SNN se posiciona en un *loop* entre hélices α 3 y α 4, mientras que la secuencia KTG forma parte de un ordenamiento en lámina β (β 2). El dominio II presenta una arquitectura conformada por una combinación de hélices α y láminas β , en donde destaca la presencia de un *loop* de longitud considerable, comprendido entre los residuos 148-177 (según estructura secundaria). El dominio III demuestra, como en otros casos, un ordenamiento en láminas β conectadas por cortos *loops* (del mismo modo que la organización de dominios y motivos conservados en PBP4a para el modelo *Bacillus subtilis*) (Figura 21). Las propiedades para el conjunto de residuos aminoacídicos en el extremo carboxilo terminal de PBP4 en PAO1 y su disposición estructural secundaria, solo permiten deducir una interacción electrostática y por polaridad, con la cara externa de la membrana interna, determinada por la presencia de al menos 4 residuos cargados positivamente (tres

de ellos integrando los últimos 4 aminoácidos de la secuencia), además de una importante presencia de residuos apolares (hidrofóbicos) en esta zona (11 residuos para una secuencia de 20 aminoácidos terminales en ordenamiento hélice α). Esto supone una relación débil con la membrana, pero superior a la descripción realizada para el extremo C-terminal (20 aminoácidos terminales en disposición hélice α) en PBP4 de *E. coli* (interacción electrostática) (Harris *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2008), donde la interacción por carga de solo 5 residuos aminoacídicos básicos (carga positiva), la presencia de una cantidad menor de aminoácidos hidrofóbicos (9/20 aminoácidos) y la existencia de 3 residuos hidrofílicos finales no cargados (tripleto QNN), condiciona esta diferencia. A partir de este pre-análisis, es posible inferir una mayor homología “estructural” entre LMM-PBP4 de PAO1 y LMM-PBP4a de *Bacillus subtilis*, que la demostrada entre LMM-PBP4 de PAO1 y LMM-PBP4 de *E. coli*, un antecedente importante al momento de definir la secuencia molde (templado) sobre la que se realizará el modelamiento bioinformático por homología para PBP4 de PAO1, estudio que permitirá la obtención de información trascendental respecto del ordenamiento tridimensional de sus dominios y residuos catalíticos. La vinculación estructural entre PBP4 de PAO1 y PBP4a de *Bacillus subtilis*, queda reflejada además, en los porcentajes de identidad obtenidos al realizar el alineamiento múltiple de secuencias entre PBP4 de PAO1 y el conjunto de LMM-PBPs [PBP5, PBP6, PBP6b, PBP7/8 y PBP4 (su ortólogo funcional)], definidas para el modelo *E. coli* (filogenéticamente relacionado), y por el alineamiento entre PBP4 de PAO1 y aquellas proteínas representantes de la categoría LMM-PBPs clase C tipo 4 (subclase C1): PBP4a de *Bacillus subtilis* 168 y D,D-Peptidasa de *Actinomadura* sp. R39. La Figura 22 y la Tabla 7, representa y resume la primera condición descrita, identificándose porcentajes de identidad superiores (desde 21.29-26.54%, de acuerdo al programa utilizado) entre DacB de PAO1 y PBP4 de *E. coli* K-12, destacándose la dificultad para precisar la proteína ortóloga de menor identidad con DacB (PBP4 de PAO1). La variabilidad en los porcentajes alcanzados, de acuerdo a la metodología aplicada, solo permite indicar la menor relación entre PBP4 de PAO1 y PBP6, PBP6b, PBP7 de *E. coli*. Sobre PBP6 y PBP6b, conviene precisar, que ambas proteínas forman parte del grupo funcional tipo 5 (LMM-PBPs clase C tipo 5) y corresponden a enzimas monofuncionales con actividad D,D-CPasa. Aunque la funcionalidad de estas PBPs se ha asumido como similar a PBP5, existen diferencias demostradas en sus actividades *in vitro*. La idea de que PBP6 y PBP6b puedan ejecutar, con baja eficiencia, algunas funciones descritas para PBP5, ha sido denominada “hipótesis de sustitución”, sin embargo, muchas observaciones argumentan contra la interpretación de que PBP6-PBP6b y PBP5 sean equivalentes funcionales *in vivo* (Ghosh *et al.*, 2008; Van Heijenoort, 2011). Por su parte, PBP7 (7/8) es una proteína monofuncional que presenta actividad D,D-EPasa, con un estricta preferencia por PG intacto como sustrato, careciendo de actividad D,D-CPasa. Como se ha sugerido para LMM-PBP clase C tipo 4, PBP7 de *E. coli* debería ser considerada una autolisina, pero su rol preciso aún no es claro (Sauvage *et al.*, 2008; Van Heijenoort, 2011).

Resultados

Multiple sequence alignment of amino acid sequences for "probable D-Ala-D-Ala CPasa, probable PBP4" from *Pseudomonas aeruginosa* O1 and orthologs defined as LMM-PBPs for the *Escherichia coli* (strain K-12) model using T-Coffee v10.00. The alignment shows conserved residues (SxxK, SxN, and KTG) highlighted in red boxes. Asterisks, dots, and dashes indicate identical, conserved, and semi-conserved residues, respectively. PA, *Pseudomonas aeruginosa* O1; EC, *Escherichia coli* K-12.

Tabla 7 | Porcentajes de identidad entre secuencias aminoacídicas DacB (PAO1) y LMM-PBPs (*E. coli* K-12), obtenidos desde programas de alineamiento MUSCLE v3.8, ClustalW2 v2.1 y T-Coffee v10.00.

PBB4 PAO1	MUSCLE v3.8.31	ClustalW2 v2.1	T-Coffee v10.00.r1613
PBP4 <i>E. coli</i> K-12	25.33 %	21.29 %	26.54 %
PBP5 <i>E. coli</i> K-12	15.98 %	13.28 %	20.91 %
PBP6 <i>E. coli</i> K-12	16.19 %	12.72 %	20.93 %
PBP6b <i>E. coli</i> K-12	16.54 %	13.66 %	18.50 %
PBP7 <i>E. coli</i> K-12	13.09 %	12.90 %	18.86 %

Figura 22 | Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas para “probable D-Ala-D-Ala CPasa, probable PBP4” de *Pseudomonas aeruginosa* O1 y ortólogos definidos como LMM-PBPs para el modelo *Escherichia coli* (cepa K-12), mediante T-Coffee v10.00. Se destaca en recuadros de color rojo la ubicación para las secuencias conservadas SxxK, SxN y KTG. Asteriscos, dos puntos y un punto, indican residuos idénticos, conservados y semiconservados, respectivamente. PA, *Pseudomonas aeruginosa* O1; EC, *Escherichia coli* K-12

Se demuestra una mayor correspondencia entre los alineamientos realizados para evaluar la homología de secuencias entre PBP4 de PAO1 y proteínas representantes de la categoría LMM-PBPs clase C tipo 4 (subclase C1), particularmente entre los motivos conservados (SNN, KTG) que definen y organizan el bolsillo catalítico de la proteína, con porcentajes de identidad (desde 25.48-29.13 %, de acuerdo al método utilizado) que superan, tanto con *Bacillus subtilis* 168 y *Actinomadura* sp. R39, los valores máximos obtenidos en el enfrentamiento con LMM-PBPs de *E. coli*. De modo particular, PBP4 de PAO1 presenta una identidad levemente mayor con D,D-Peptidasa de *Actinomadura* sp R39, que la obtenida con PBP4a de *Bacillus subtilis* 168, sin embargo, la diferencia es despreciable y constituye un antecedente más para distinguir a PBP4a de *Bacillus subtilis* 168, como candidato a modelo estructural para tratamientos de simulación bioinformática por homología en PBP4 de PAO1, modificando la concepción general y establecida, acerca de las relaciones de identidad “estructural” entre proteínas ortólogas para los modelos bacterianos *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Figura 23, Tabla 8).

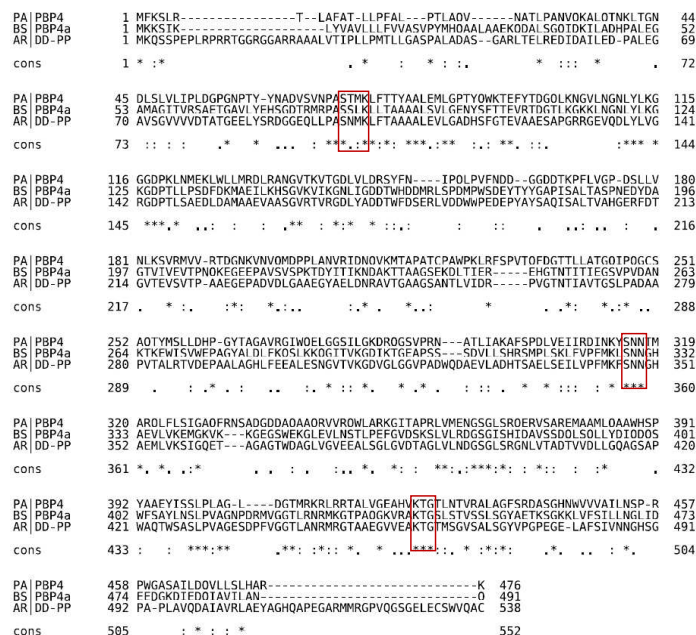
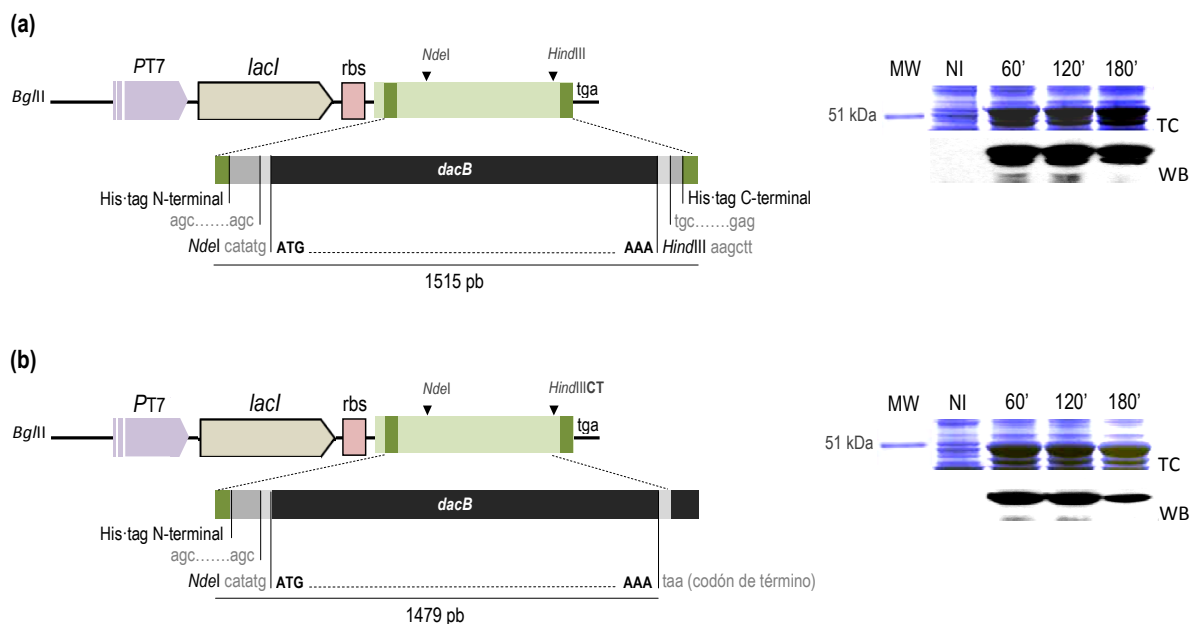


Tabla 8 | Porcentajes de identidad entre secuencias aminoacídicas DacB (PAO1), PBP4a *Bacillus subtilis* 168 y DD-Peptidasa *Actinomadura* sp. R39, obtenidos desde programas de alineamiento MUSCLE v3.8, ClustalW2 v2.1 y T-Coffee v10.00.

PBB4 PAO1	MUSCLE v3.8.31	ClustalW2 v2.1	T-Coffee v10.00.r1613
PBP4a <i>B. subtilis</i> 168	26.02 %	25.48 %	28.85 %
DD-Peptidasa <i>Actinomadura</i> sp. R39	27.74 %	25.59 %	29.13 %

Figura 23 | Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas para “probable D-Ala-D-Ala CPasa, probable PBP4” de *Pseudomonas aeruginosa* O1 (PAO1) e integrantes de la categoría LMM-PBPs clase C tipo 4 (PBP4a de *Bacillus subtilis* 168 y DD-Peptidasa de *Actinomadura* sp. R39), mediante T-Coffee v10.00. Se destaca en recuadros de color rojo la ubicación para las secuencias SxxK, SNN y KTG. Asteriscos, dos puntos y un punto, indican residuos idénticos, conservados y semiconservados, respectivamente. PA, *Pseudomonas aeruginosa* O1; BS, *Bacillus subtilis* 168; AR, *Actinomadura* sp R39

4.2. Constructos recombinantes. Inducción, sobreexpresión, aislamiento y purificación de formas soluble e insolubles para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*



Resultados

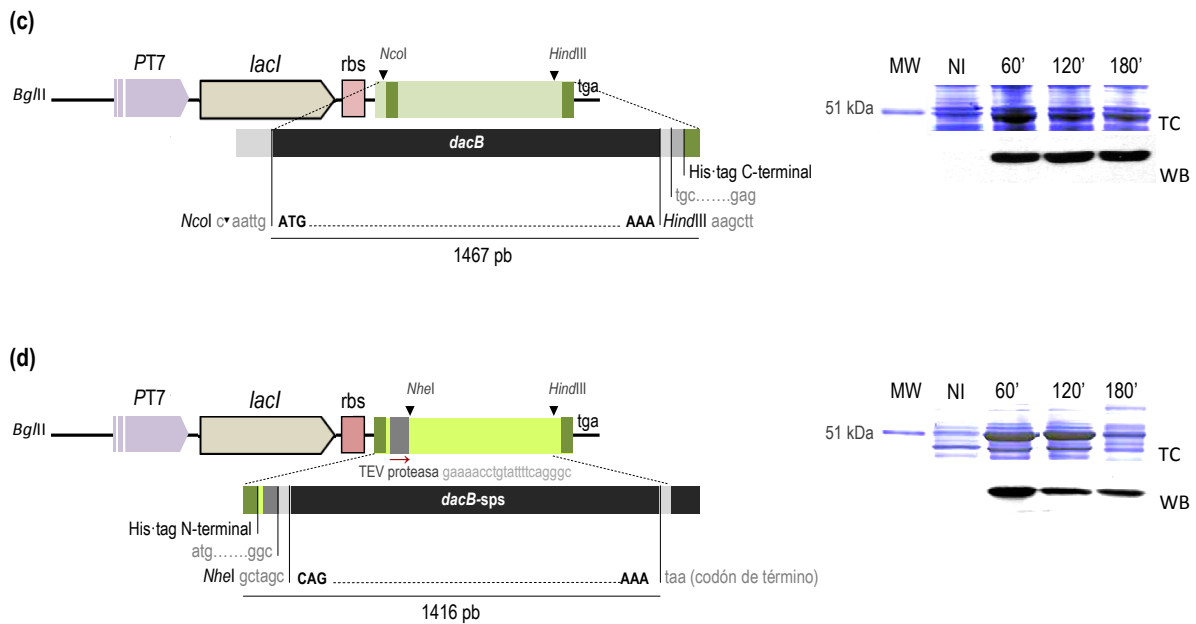


Figura 24 | Diseño de constructos recombinantes fusionados a His-tag y ensayos preliminares de inducción **(a)** Constructo recombinante pET-PBP4HNC y ensayo de inducción para proteína PBP4HNC **(b)** Constructo pET-PBP4HN e inducción de proteína recombinante PBP4HN **(c)** Clon recombinante pET-PBP4HC y ensayo de inducción para proteína de fusión PBP4HC **(d)** Constructo pTP-PBP4(SPS)HN y ensayo de inducción para proteína soluble PBP4HN. MW, molecular weight; NI, no inducido; TC, tinción *coomassie*; WB, *western blot*

Tabla 9 | Ensayo de inducción para constructos recombinantes transformados en *E. coli* BL21(DE3)

	pET-PBP4HNC/BL21(DE3) NO INDUCIDO	pET-PBP4HNC/BL21(DE3) INDUCIDO (IPTG)	pET-PBP4HN/BL21(DE3) NO INDUCIDO	pET-PBP4HN/BL21(DE3) INDUCIDO (IPTG)	pET-PBP4HC/BL21(DE3) NO INDUCIDO	pET-PBP4HC/BL21(DE3) INDUCIDO (IPTG)
Tiempo 0	0.402	0.402	0.392	0.392	0.412	0.412
Tiempo 60 min	1.189	0.140	1.089	0.117	1.071	0.487
Tiempo 120 min	1.396	0.118	1.388	0.122	1.392	0.377
Tiempo 180 min	1.399	0.132	1.399	0.200	1.417	0.493

Las construcciones realizadas para la inducción, sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante LMM-PBP4 de PAO1, incorporan la fusión a una secuencia His-tag a través del clonaje del gen *dacB* en sistemas de expresión pET-28b(+) y pTP1 (pET-28a con sitio de corte para proteasa TEV). Se decidió investigar las tres fusiones posibles a His-tag, para evaluar el rendimiento y comportamiento del producto recombinante “completo”, manteniendo la secuencia que define a su péptido señal, evitando alterar la naturaleza estructural de esta proteína y permitiendo su recuperación en condiciones funcionales y constitutivas muy próximas a las de su organización nativa. Un cuarto constructo “truncado o incompleto” (donde se elimina la secuencia correspondiente al péptido señal), se diseña y produce, con el objetivo de generar un producto recombinante para PBP4 de PAO1 que sea exportable y soluble en el periplasma bacteriano, y que favorezca una purificación más eficiente para propósitos cristalográficos (alta concentración y adecuado plegamiento, luego de la eliminación por digestión de la secuencia His-tag por proteasa TEV). Cepas transformantes de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo los clones recombinantes pET-PBP4HNC (PBP4HNC,

forma insoluble para proteína de fusión con His-tag en extremo amino y carboxilo terminal), pET-PBP4HN (PBP4HN, forma insoluble para proteína de fusión con His-tag en extremo amino terminal), pET-PBP4HC (PBP4HC, forma recombinante insoluble con His-tag en extremo carboxilo terminal) y pTP-PBP4(SPS)HN (forma soluble para proteína recombinante con His-tag en extremo amino terminal), fueron sometidas a inducción y evaluación de variables (densidad óptica de inicio de inducción, concentración de inductor, tiempo de exposición, toxicidad celular), para definir las condiciones experimentales óptimas de sobreexpresión.

Los resultados muestran un nivel de expresión adecuado en geles SDS-PAGE, y confirmado mediante inmunodetección (*western blot*), al iniciar el proceso de inducción en una DO_{600} de 0.4 (fase exponencial temprana), con una concentración de agente inductor IPTG 1 mM y por un tiempo de exposición de 60 minutos, para cada proteína recombinante estudiada. A pesar de haber ensayado diferentes concentraciones de IPTG, el tiempo de exposición a este inductor (60, 120 y 180 minutos) fue la variable que presentó diferencias significativas y determinó un tiempo de inducción final de 60 minutos, dado que la exposición a IPTG por tiempos superiores, redujo los niveles de expresión de manera proporcional, incrementado además, la toxicidad celular (Figuras 24a-24d). El rápido descenso de la densidad bacteriana (lisis celular), demostrada por la disminución en las medidas de absorbancia (DO_{600}) desde un valor inicial de 0.3 a uno final de ~ 0.1 , luego de 60 minutos de inducción, puso en evidencia la toxicidad que la expresión de LMM-PBP4 recombinante genera, particularmente, en cepas transformantes pET-PBP4HNC/BL21(DE3), pET-PBP4HN/BL21(DE3), y en menor medida, para el constructo transformante pET-PBP4HC/BL21(DE3) (Tabla 9), una situación que también se presentó (con menor intensidad) durante la sobreexpresión de la proteína de fusión PBP4(SPS)HN (forma soluble) (Tabla 10).

Tabla 10 | Ensayo de inducción para constructo recombinante pTP-PBP4(SPS)HN^a transformado en *E. coli* BL21(DE3)

	pTP-PBP4(SPS)HN/BL21(DE3) NO INDUCIDO	pTP-PBP4(SPS)HN/BL21(DE3) INDUCIDO (IPTG 1 mM)	pTP-PBP4(SPS)HN/BL21(DE3) NO INDUCIDO	pTP-PBP4(SPS)HN/BL21(DE3) INDUCIDO (IPTG 0.1 mM)	pTP-PBP4(SPS)HN/BL21(DE3) NO INDUCIDO	pTP-PBP4(SPS)HN/BL21(DE3) INDUCIDO IPTG (0.01 mM)
Tiempo 0	0.432	0.432	0.434	0.434	0.432	0.432
Tiempo 60 min	1.010	0.310	0.985	0.356	1.014	0.978
Tiempo 120min	0.996	0.279	1.188	0.411	1.115	0.743

^a SPS: sin péptido señal

La lisis celular, en cepas transformantes expresando la proteína recombinante, puede ser controlada a través de estrategias como el incremento en la concentración de NaCl para la formulación del medio de cultivo LB Miller; sin embargo, y para efectos de purificación, se optó por la producción en sistemas fermentadores Biostat® Cplus y Biostat UD30, para volúmenes finales de cultivo de 10 litros [cepa pET-PBP4HC/BL21(DE3)] y 30 litros [cepas transformantes pET-PBP4HNC/BL21(DE3) y pET-PBP4HC/BL21(DE3)], respectivamente. El aislamiento y purificación de cada proteína recombinante en su forma “insoluble”, presentó un rendimiento reducido en cuanto a las concentraciones de proteína obtenida, con valores en un rango comprendido entre 0.32-0.59 mg/ml, que se lograron concentrar por centrifugación (sistema Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter 10 kDa MWCO) hasta alcanzar concentraciones de 2.15-3.20 mg/ml de proteína funcional purificada. La proteína “soluble” PBP4(SPS)HN, generó una recuperación mayor, con una concentración de 1.88 mg/ml, que fue concentrada hasta alcanzar una concentración

Resultados

final de 6.75 mg/ml. Tanto en ensayos de inducción, sobreexpresión y posterior purificación, los análisis mediante SDS-PAGE y *western blot*, confirman que solo una proteína migró hacia la posición cercana a 51 kDa (referencia desde marcador de masa molecular SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard), en correspondencia con las masas moleculares esperadas y calculadas para los constructos pET-PBP4HNC (55.54 kDa), pET-PBP4HN (54.02 kDa), pET-PBP4HC (53.38 kDa) y pTP-PBP4(SPS)HN (51.56 kDa) (Figuras 25a-25e). En cada ensayo de purificación, es evidente la alta concentración de proteína en la fracción *flow-through* recuperada, lo que explica el bajo rendimiento en la concentración de proteína eluida; esta circunstancia, plantea la interrogante sobre la afinidad entre His-tag y los iones de Ni²⁺-IMAC, o la exposición de este *tag* para los sitios de *binding* disponibles. Se realizaron muchos intentos por mejorar las condiciones de purificación, modificando aspectos sensibles como la concentración de detergente Tritón™ X-100 incorporado al *buffer* de diálisis, la concentración de imidazol para la equilibración de resina y fracción dializada, además de realizar ensayos IMAC utilizando resina basada en cobalto (TALON® Metal Affinity Resin, Clontech Laboratories Inc.), una matriz, teóricamente más uniforme que la resina de níquel, sin embargo, solo se consiguió una leve mejoría al utilizar el sistema TALON® Metal Affinity Resin, sin lograr optimizar la unión con la secuencia de polihistidina. A pesar de que los productos finales para las proteínas de fusión desarrolladas son idénticos (PBP4HNC, PBP4HN y PBP4HC), las formas adoptadas durante su síntesis varían, pudiendo ser reconocida una variante no procesada, con una masa molecular algo superior a la de su forma madura (proteína procesada), en proteínas recombinantes PBP4HNC y PBP4HN. En ambos casos, el material inducido demuestra la presencia de dos bandas (banda superior, proteína no procesada; banda inferior, proteína procesada), mientras que para PBP4HC solo se identifica una banda, que corresponde a la forma madura de la proteína recombinante (Figura 26).

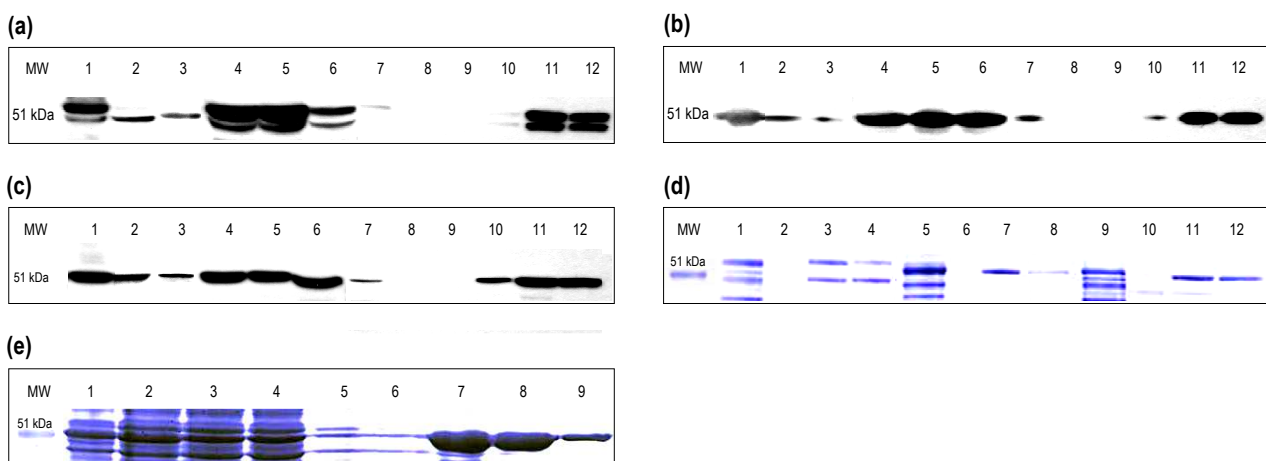


Figura 25 | (a) Inmunodetección (*western blot*) para proteína PBP4HNC desde ensayo de purificación (b) Purificación de proteína recombinante PBP4HN y detección mediante *western blot* (c) Inmunodetección para proteína recombinante PBP4HC. MW, *molecular weight* (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard); línea 1: *pellet French Press*, línea 2: sobrenadante *French Press*; línea 3: *pellet sarkosyl*; línea 4: sobrenadante *sarkosyl*; línea 5: sobrenadante *sarkosyl* dializado; línea 6: *flow-through* (FT); líneas 7-9: primer, segundo y tercer lavado; línea 10: elución 125 mM imidazol; línea 11: elución 250 mM imidazol; línea 12: elución 500 mM imidazol

Figura 25 | (d) Proteínas PBP4HNC, PBP4HN y PBP4HC separadas por electroforesis en sistema NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris Mini Gel (tinción *coomassie*); línea 1, FT para PBP4HNC; líneas 2-4, eluciones para PBP4HNC con concentraciones crecientes de imidazol; línea 5, FT para PBP4HN; líneas 6-8, eluciones para PBP4HN con concentraciones crecientes de imidazol; línea 9, FT para PBP4HC; líneas 10-12, eluciones para PBP4HC con concentraciones crecientes de imidazol (125, 250 y 500 mM, respectivamente) **(e)** Separación por SDS-PAGE (NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris Mini Gel) y tinción *coomassie* para extractos recuperados desde ensayo de purificación para proteína recombinante soluble PBP4(SPS)HN; línea 1: *pellet French Press*; línea 2: sobrenadante *French Press*; línea 3: *flow-through*; líneas 4-6: primer, segundo y tercer lavado; línea 7: elución 125 mM imidazol; línea 8: elución 250 mM imidazol; línea 9: elución 500 mM imidazol

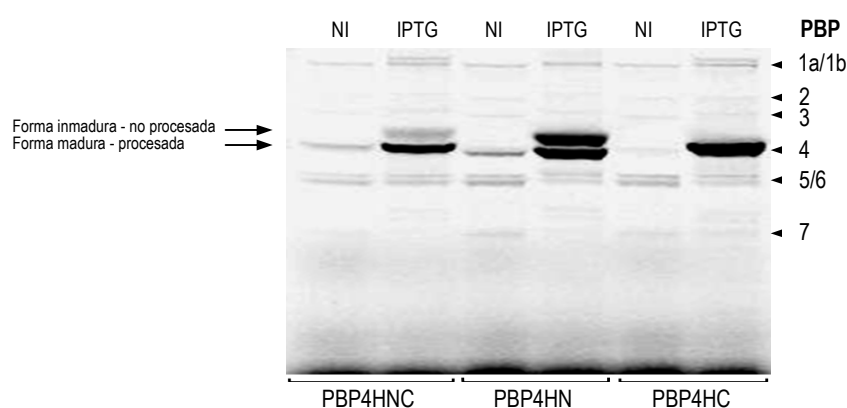


Figura 26 | Patrones de unión a Bocillin™ FL (penicilina fluorescente) en extractos de proteínas de membrana preparadas desde cepas transformantes pET-PBP4HNC/BL21(DE3), pET-PBP4HN/BL21(DE3), pET-PBP4HC/BL21(DE3) no inducidas y sometidas a inducción por IPTG. Se indican las formas no procesada y madura de la proteína expresada. PBPs identificadas para el modelo *E. coli* son destacadas a la derecha. NI, no inducido; IPTG, material inducido por IPTG

El producto recombinante recuperado desde ensayos de purificación, corresponde a la forma madura de la proteína para el clon pET-PBP4HC, y a las formas no procesada y procesada para los clones pET-PBP4HNC y pET-PBP4HN, esto último, permite especular sobre la presencia de His-tag unida al extremo amino terminal y la dificultad que esta configuración genera en la maduración de la proteína, retardando este proceso. Aunque las tres proteínas recombinantes obtenidas desde LMM-PBP4 de PAO1, parecen ser procesadas en su extremo hidrofóbico amino terminal (péptido señal), la proteína madura permanece asociada a la fracción de membrana después de su expresión, por una interacción aún no totalmente definida, condición que hemos precisado anteriormente. En el caso de la proteína inmadura (no procesada), derivada desde el clon recombinante pET-PBP4HNC y presente en una proporción importante para pET-PBP4HN (la cuantificación de señal fluorescente desde bandas obtenidas en ensayos de unión a Bocillin™ FL, demuestra un 57% de proteína no procesada frente a un 43% de proteína madura), es posible indicar que el péptido señal (N-terminal) podría ser utilizado como anclaje “transitorio” a la membrana citoplasmática durante el procesamiento.

4.3. Análisis de proteínas recombinantes purificadas mediante MALDI-TOF. Espectrometría de masas

Los estudios de espectrometría de masa, mediante MALDI-TOF, para proteínas recombinantes purificadas y recuperadas desde SDS-PAGE (bandas 1, 2, 3 y 4), identifican inequívocamente a las proteínas ensayadas como “probable D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1”, con un *protein score* de 112 para la banda 1, 104 para la banda 2, 100 para la banda 3 y 105 para la banda 4, que representan valores estadísticamente significativos (*proteins scores* superiores a 83 corresponden a resultados significativos, $p < 0.05$) (Figuras 27 y 28). Se comprobó además, que las secuencias de histidina (His-tag) están presentes en las bandas 1, 2 y 4, sin embargo, para la banda 3 no se logró detectar un péptido con la masa experimental correspondiente al extremo N-terminal con His-tag. A pesar de esto, a través de ensayos de inmunodetección utilizando un anticuerpo primario IgG anti-histidina [His-probe (H-15): sc-803], sabemos que His-tag se encuentra correctamente integrada en la proteína recombinante PBP4HN.

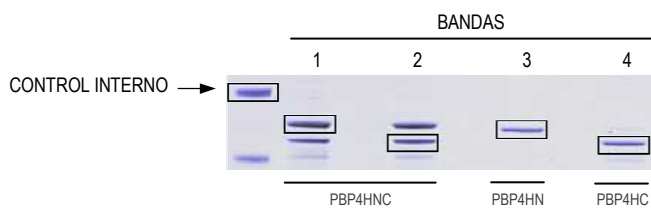


Figura 27 | Bandas recuperadas desde gel de poliacrilamida conteniendo proteína recombinante de interés. Banda para control interno (albumina de suero bovino, 66.2 kDa) recuperada desde marcador de masa molecular Unstained SDS-PAGE Protein Standards, Broad Range

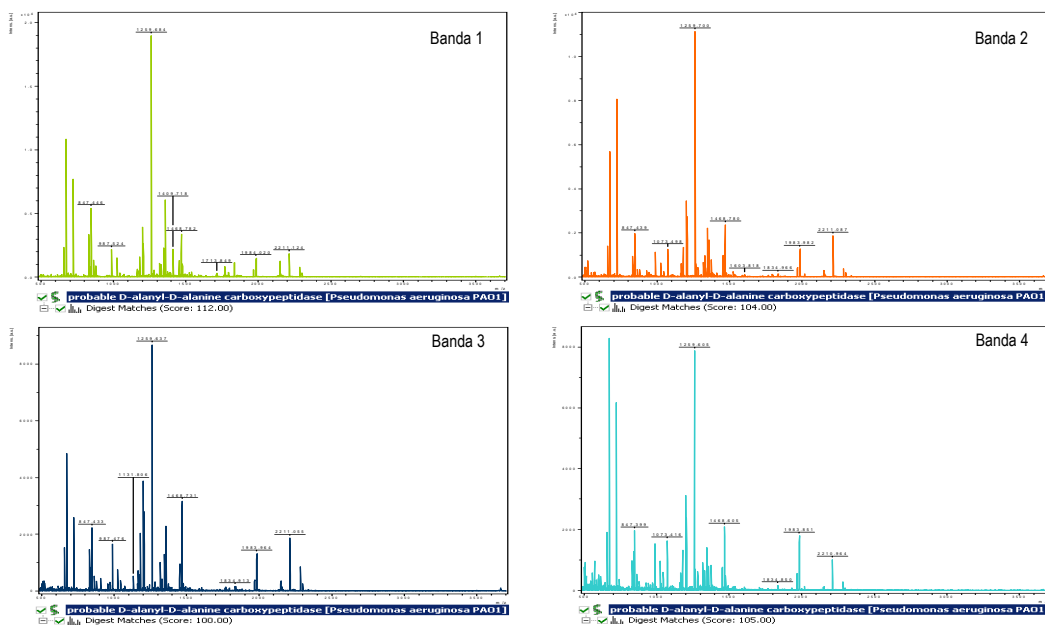
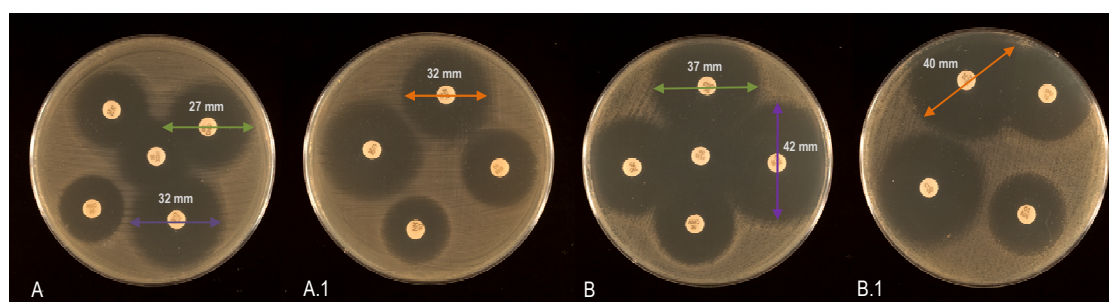


Figura 28 | Espectros generados mediante MALDI-TOF (espectrometría de masa) para proteína de fusión PBP4HNC (bandas 1 y 2), PBP4HN (banda 3) y PBP4HC (banda 4). Se destaca la identificación y el *protein score* obtenidos desde Mascot Server (<http://www.matrixscience.com>)

4.4. Susceptibilidad antimicrobiana y microscopía de campo claro para clones recombinantes transformados en *Escherichia coli* BL21(DE3) y *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14

Los ensayos de susceptibilidad, realizados mediante difusión en agar y de acuerdo a las recomendaciones técnicas del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (con algunas modificaciones), para cepas transformantes pET-PBP4HNC/BL21(DE3), pET-PBP4HN/BL21(DE3), pET-PBP4HC/BL21(DE3) y pSEVA-PBP4/PA14WT, sobreexpresando la proteína recombinante (inducción por IPTG incorporado al medio de cultivo) y en situación de no inducción, permitieron demostrar la ausencia de cambios (mantenimiento de la susceptibilidad sin generación de resistencia) para el material no inducido e inducido, y para sus respectivos controles. La Tabla 11 resume los valores de inhibición para las cepas estudiadas y los sustratos antibacterianos ensayados, que incluyen representantes para familias de antibióticos β -lactámicos (TIC, PIP, AMC, TIM, CRO, CTX, FOX, CAZ, ATM, IMP), aminoglicósidos (NN) y fenicoles (cloranfenicol). En estos resultados, es posible destacar, desde las mediciones del diámetro para las zonas de inhibición de la cepa transformante pET-PBP4HC/BL21(DE3) sometida a inducción, valores ligeramente superiores a los determinados para su contraparte no inducida y para cepas utilizadas como controles [*E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* K-12 RYC1000]. Este incremento en la susceptibilidad de la cepa transformante expresando la proteína recombinante LMM-PBP4 con fusión His-tag en extremo C-terminal, fue un efecto general y no una situación particular para una determinada familia de antibacterianos (Figura 29). En el caso de los ensayos de difusión realizados para evaluar la susceptibilidad de la cepa transformante pSEVA-PBP4/PA14WT en condiciones de inducción y no inducción, los resultados no reflejan cambios relacionados con susceptibilidad. Se infiere, por lo tanto, que la sobreexpresión de LMM-PBP4 desde constructos transformados en estirpe *E. coli* BL21(DE3) y cepa *wild-type* de *Pseudomonas aeruginosa* (UCBPP-PA14), no genera un estado de predisposición general en la bacteria hacia una condición de susceptibilidad o de resistencia, a pesar de la exposición a antibióticos anti-*Pseudomonas* y a representantes β -lactámicos definidos como sustratos “inductores” para enzima inactivante AmpC.



Resultados

Figura 29 | Ensayo de difusión en agar para estudio de susceptibilidad sobre transformante pET-PBP4HC/BL21(DE3) sin inductor (**A, A.1**) e inducido con IPTG 1 mM (**B, B.1**). El diámetro de los halos de inhibición se encuentra indicado y destacado en líneas de color verde, azul y naranja, para los antibióticos ceftriaxona, cefotaxima y aztreonam, respectivamente. AMC, amoxicilina/ácido clavulánico; TIC, ticarcilina; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; FOX, cefoxitina; NN, tobramicina; C, cloranfenicol; ATM, aztreonam; IMP, imipenem

Tabla 11 | Patrón de susceptibilidad para constructos recombinantes transformados en *Escherichia coli* BL21(DE3) y *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14

Antibióticos (potencia) ^a	TIC (75 µg)	AMC (20/10 µg)	CRO (30 µg)	CTX (30 µg)	FOX (30 µg)	ATM (30 µg)	IPM (10 µg)	NN (10 µg)	C (30 µg)
Constructos recombinantes/cepas									
pET-PBP4HNC/BL21(DE3) NI	26 mm	23 mm	29 mm	32 mm	24 mm	30 mm	26 mm	23 mm	29 mm
pET-PBP4HNC/BL21(DE3) IPTG	25 mm	23 mm	29 mm	32 mm	23 mm	33 mm	27 mm	24 mm	30 mm
pET-PBP4HN/BL21(DE3) NI	27 mm	23 mm	29 mm	31 mm	24 mm	30 mm	26 mm	22 mm	29 mm
pET-PBP4HN/BL21(DE3) IPTG	25 mm	23 mm	28 mm	32 mm	24 mm	31 mm	26 mm	23 mm	30 mm
pET-PBP4HC/BL21(DE3) NI	24 mm	22 mm	27 mm	32 mm	22 mm	32 mm	27 mm	20 mm	28 mm
pET-PBP4HC/BL21(DE3) IPTG	33 mm	28 mm	37 mm	42 mm	29 mm	40 mm	31 mm	27 mm	36 mm
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	25 mm	20 mm	26 mm	28 mm	27 mm	30 mm	29 mm	20 mm	26 mm
<i>E. coli</i> BL21(DE3) IPTG	25 mm	19 mm	27 mm	28 mm	26 mm	28 mm	29 mm	19 mm	27 mm
<i>E. coli</i> K-12 RYC1000	25 mm	21 mm	26 mm	27 mm	26 mm	28 mm	28 mm	18 mm	25 mm
<i>E. coli</i> K-12 RYC 1000 IPTG	24 mm	19 mm	26 mm	27 mm	25 mm	28 mm	27 mm	18 mm	25 mm
Antibióticos (potencia) ^a	TIC (75 µg)	TIM (75/10 µg)	PIP (100 µg)	CRO (30 µg)	CTX (30 µg)	CAZ (30 µg)	ATM (30 µg)	IPM (10 µg)	NN (10 µg)
Constructos recombinantes/cepas									
pSEVA-PBP4/PA14WT ^b NI	23 mm	23 mm	26 mm	26 mm	29 mm	22 mm	29 mm	24 mm	24 mm
pSEVA-PBP4/PA14WT IPTG	22 mm	21 mm	27 mm	26 mm	30 mm	21 mm	29 mm	25 mm	25 mm
UCBPP-PA14	20 mm	23 mm	25 mm	24mm	26 mm	23 mm	28 mm	22 mm	20 mm
UCBPP-PA14 IPTG	21 mm	24 mm	25 mm	23 mm	27 mm	20 mm	26 mm	22 mm	22 mm

^a TIC, ticarcilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; TIM, ticarcilina-ácido clavulánico; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; FOX, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; NN, tobramicina; C, cloranfenicol

^b PA14WT, UCBPP-PA14 cepa de referencia *wild-type*

Imágenes obtenidas por microscopía óptica de campo claro, a partir de preparaciones realizadas desde cultivos de cepas transformantes positivas (clones recombinantes pET-PBP4HNC, pET-PBP4HN y pET-PBP4HC), en condiciones de no inducción e inducción, demuestran la presencia de cuerpos de inclusión para la proteína sobreexpresada en los tres constructos recombinantes estudiados, además de una leve reducción en el tamaño celular para pET-PBP4HC/BL21(DE3). Estos agregados de proteína insoluble reflejan el estrés conformacional que la bacteria sufre, una situación que ya habíamos comentado, al destacar el rápido descenso de la densidad celular para nuestros cultivos tratados con agente inductor (IPTG). Los cuerpos de inclusión, descritos como agregados proteicos densos, citoplasmáticos o periplásmicos, refráctiles, levemente ovoides o cilíndricos y de medida variable (50-700 nm), han sido reconocidos recientemente como contenedores de grandes cantidades de proteína funcional, sin dejar de ser un problema importante para la síntesis de proteína recombinante desde diversas plataformas de producción (principalmente de naturaleza bacteriana) (Villaverde, *et al.* 2012). En nuestro caso, la observación microscópica de partículas proteináceas (solo una partícula por célula) de ubicación polar, confirma el depósito de agregados insolubles de proteína recombinante PBP4HNC, PBP4HN y PBP4HC (Figura 30). Esta condición explica, el bajo rendimiento alcanzado, durante la etapa de aislamiento de la proteína sobreexpresada desde el material de extracción

(solubilización de proteína recombinante mediante tratamiento con detergente aniónico sarkosyl desde fracción de membrana, recuperada por ultracentrifugación, luego de la ruptura celular en sistema French® Pressure Cell Press; *pellet French Press*), donde una proporción importante del producto recombinante generado se presenta organizado como cuerpos de inclusión precipitados, impidiendo su recuperación a través del procedimiento de solubilización antes descrito. Mediante inmunodetección (*western blot*), se demuestra la existencia de proteína recombinante en la fracción insoluble obtenida por ultracentrifugación luego del tratamiento con sarkosyl 1% (*pellet sarkosyl*, línea 3 en Figuras 25a, 25b, 25c), sin embargo, no se determinó si esta señal corresponde a producto recombinante no solubilizado desde membrana o a proteína agregada como cuerpos de inclusión, aunque creemos (en función de lo descrito) que la segunda opción, debería ser la de mayor probabilidad.

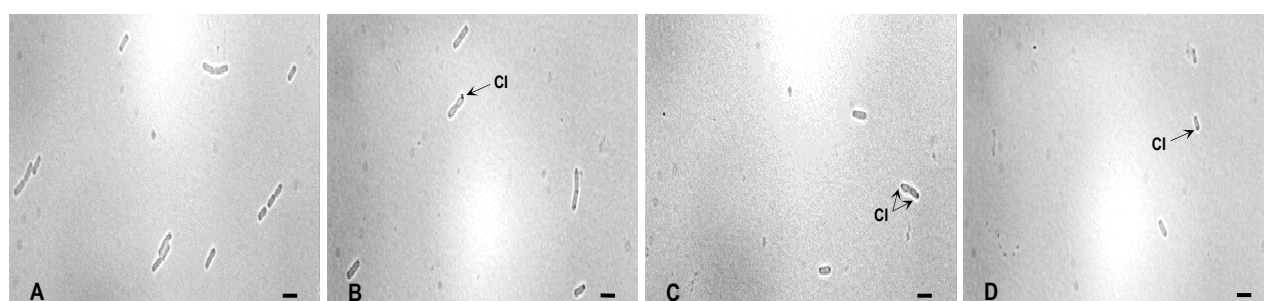


Figura 30 | Microscopia óptica de campo claro para transformantes pET-PBP4HNC/BL21(DE3), pET-PBP4HN/BL21(DE3) y pET-PBP4HC/BL21(DE3) (A) Imagen para constructo pET-PBP4HNC transformado en células *E. coli* BL21(DE3) no inducido (B) Imagen para transformante pET-PBP4HNC/BL21(DE3) sometido a inducción con IPTG 1 mM (C) Transformante pET-PBP4HN/BL21(DE3) inducido (IPTG 1 mM) (D) Transformante pET-PBP4HC/BL21(DE3) inducido (IPTG 1 mM). Barra 2 μ m. CI, cuerpo de inclusión

4.5. Lisogenización de estirpe mutante *E. coli* DV900. Transformación, inducción y expresión de proteínas recombinantes

La estirpe mutante *Escherichia coli* DV900 (Vega *et al.*, 2006), derivada desde la cepa *E. coli* CS802-2 (Δ *ponB*, *dacA*, *dacB*, *dacC*, *dacD*, *pbpG*, *ampH*, *AmpC*), que a su vez procede de *E. coli* CS109 (W1485 *glnV rpoS rph*) (Denome *et al.*, 1999), incorpora una novena mutación para la proteína PBP4b (Δ *pbp4B*), al conjunto de deleciones diseñadas para genes codificantes de proteínas PBP1b, PBP4, PBP5, PBP6, PBP6b, PBP7/8, AmpH y AmpC, en este modelo bacteriano. La importancia del trabajo con este mutante, radica en que las actividades D,D-CPasa y D,D-EPasa, son completamente eliminadas en esta bacteria, lo que modifica la composición de muropéptidos en su peptidoglicano, generando un incremento particular en la cantidad relativa (fracción molar) de monómero disacárido pentapéptido (M5) y dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido (D45), sustratos naturales necesarios para evaluar *in vivo*, la funcionalidad de la proteína sobreexpresada en un fondo genético desprovisto de actividades hidrolíticas, e *in vitro*, a través de ensayos cinéticos con proteína purificada. Para los primeros estudios (*in vivo*), es preciso modificar la naturaleza de *E. coli* DV900 hacia una condición de célula hospedadora que permita la expresión de la

Resultados

proteína recombinante de interés, incorporando ADN del bacteriófago λ DE3 (fago recombinante transportando el gen codificante para la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, cuya actividad se induce por IPTG) al cromosoma de la cepa mutante (*E. coli* DV900), a través de un proceso de coinfección-lisogenización con fago λ DE3, fago helper y fago de selección (material lisado en sistema λ DE3 Lysogenization Kit, Novagen). Cepas lisógenas positivas [*E. coli* DV900(DE3)] combinadas con un fago testeador T7 e IPTG, favorecieron el desarrollo del fago y la generación de placas de lisis de un diámetro superior al de la combinación lisógeno-fago testeador, crecidas sobre placas de agar sin IPTG (placas de lisis muy pequeñas que demuestra el nivel de expresión basal para ARN polimerasa T7). Células competentes para *E. coli* DV900(DE3) transformadas con cada constructo recombinante en estudio (pET-PBP4HNC, pET-PBP4HN, pET-PBP4HC), generados en el sistema de expresión pET (Materiales y métodos 3.1.11.), fueron inducidas de acuerdo a las condiciones descritas para clones transformados en *E. coli* BL21(DE3) (Tabla 12, Figura 31). Los niveles de expresión fueron muy similares a los obtenidos previamente desde clones recombinantes en sistema celular BL21(DE3), definiéndose un tiempo de 60 minutos, como periodo de inducción que permite un nivel de expresión adecuado, frente a una concentración de IPTG 1mM. Es posible identificar, nuevamente, el efecto de lisis bacteriana (toxicidad celular por sobreproducción de proteína recombinante) mencionado en el punto 4.2., particularmente para los constructos pET-PBP4HNC y pET-PBP4HC transformados en cepas lisógenas positivas, una situación que refuerza la decisión de exponer al agente inductor por el tiempo antes mencionado, considerando el objetivo final de estas preparaciones, que es el de recuperar un volumen adecuado de material celular expresando LMM-PBP4 de PAO1 para la adecuada preparación de peptidoglicano.

Tabla 12 | Ensayo de inducción para constructos recombinantes transformados en lisógenos *E. coli* DV900(DE3)

	pET-PBP4HNC/DV900(DE3) NO INDUCIDO	pET-PBP4HNC/DV900(DE3) INDUCIDO (IPTG)	pET-PBP4HN/DV900(DE3) NO INDUCIDO	pET-PBP4HN/DV900(DE3) INDUCIDO (IPTG)	pET-PBP4HC/DV900(DE3) NO INDUCIDO	pET-PBP4HC/DV900(DE3) INDUCIDO (IPTG)
Tiempo 0	0.397	0.397	0.382	0.382	0.394	0.394
Tiempo 60 min	0.835	0.198	0.898	0.876	0.781	0.446
Tiempo 120 min	0.996	0.163	1.188	1.163	1.115	0.244
Tiempo 180 min	1.098	0.308	1.260	0.963	1.229	0.188
Tiempo 240 min	1.198	0.452	1.268	0.556	1.258	0.194

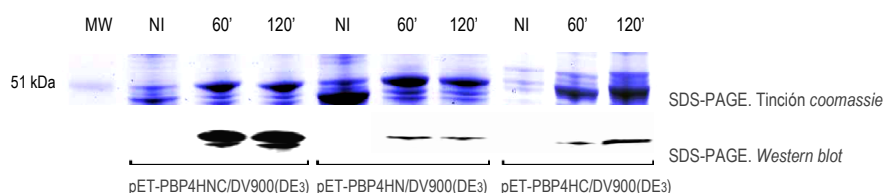


Figura 31 | Geles SDS-PAGE (tinción *coomassie* e inmunodetección mediante *western blot*) para proteína sobreexpresada en cepas lisogenizadas *E. coli* DV900(λ DE3). MW, *molecular weight* (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard); NI, no inducido

4.6. Digestión de secuencia His-tag por proteasa TEV para proteína recombinante PBP4(sps)HN y confirmación de su actividad enzimática

Los estudios de expresión para la proteína recombinante PBP4(sps)HN (forma soluble), se ejecutaron siguiendo las condiciones de crecimiento e inducción ensayadas para los constructos recombinantes de naturaleza insoluble ya descritos. Los resultados muestran un descenso de la DO_{600} , levemente inferior al presentado por las cepas transformantes pET-PBP4HNC/BL21(DE3) y pET-PBP4HN/BL21(DE3), durante la exposición a concentraciones crecientes de agente inductor (IPTG 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM). Los valores de absorbancia para el cultivo sometido a inducción frente a IPTG 0.01 mM, no se modificaron significativamente respecto de la medida obtenida para el material no inducido (tiempo 60 minutos), sin embargo, el nivel de expresión para esta proteína se redujo en el tiempo y en relación al ensayo de concentraciones mayores de agente inductor (Tabla 10, Figura 32). Con la finalidad de obtener el mejor rendimiento en términos de concentración durante el proceso de purificación para PBP4(sps)HN y generar el material adecuado para pruebas de cristalización, las condiciones finalmente utilizadas para la óptima expresión de esta proteína recombinante, fueron 60 minutos de tiempo de inducción frente a una concentración de IPTG 1 mM.

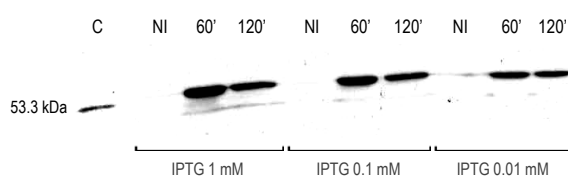


Figura 32 | Inmunodetección (*western blot*) de proteína recombinante PBP4(sps)HN (forma soluble) sobreexpresada frente a diferentes concentraciones de agente inductor (IPTG 1mM, 0.1 mM y 0.01 mM). C, control proteína purificada PBP4HC; NI, no inducido

La proteína purificada PBP4(sps)HN (Figura 25e), diseñada específicamente para ensayos preliminares de cristalización, fue sometida a digestión con proteasa TEV (dominio catalítico derivado de la proteasa Nla del Tobacco Etch virus); una enzima proteolítica altamente específica, que reconoce la secuencia aminoacídica EXXYXQ(G/S), comúnmente ENLYFQG, con un sitio de corte entre los residuos glutamina y glicina o serina. Su utilidad está definida por la capacidad de eliminar los *tags* de afinidad (secuencias His-tag) desde proteínas de fusión luego de su purificación y concentración. Reacciones de digestión utilizando proteasa TEV (1.40 mg/ml) y PBP4(sps)HN purificada (6.75 mg/ml), fueron ejecutadas ensayando cantidades crecientes de esta enzima proteolítica (proporciones proteasa TEV-proteína purificada 1:80, 1:40, 1:20), evaluando la proporción enzima-sustrato de máximo rendimiento. Una particularidad de esta proteasa hace referencia a la facilidad para su remoción desde la reacción de digestión, junto al polipéptido His-tag, luego del tratamiento con la proteína de fusión, utilizando un HQ-tag localizado en su extremo amino terminal, y a través del contacto de la mezcla de reacción con resina de níquel. El *flow-through* recuperado desde la etapa de purificación antes mencionada, y conteniendo la proteína recombinante PBP4(sps)HN digerida, fue

Resultados

analizado mediante *western blot* (utilización de anticuerpo primario anti-histidina). La ausencia de señal confirmó la eliminación total de la secuencia His-tag, y determinó como óptima una proporción 1:20 de proteasa TEV-proteína de fusión (Figura 33).

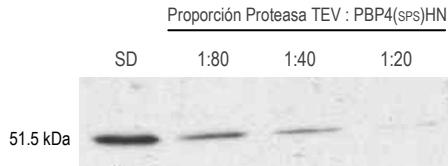


Figura 33 | Inmunodetección (*western blot*) de confirmación para corte total de secuencia His-tag por proteasa TEV desde proteína de fusión PBP4(SPS)HN (forma soluble purificada). SD, sin digerir (proteína purificada PBP4(SPS)HN utilizada como control)

La generación de esta forma soluble para LMM-PBP4 (libre de His-tag) fue ensayada *in vitro* sobre sustratos naturales [monómero disacárido pentapéptido (M5), dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido (D45)], recuperados y purificados desde la estirpe mutante *E. coli* DV900, para evaluar su funcionalidad D,D-CPasa y D,D-EPasa. Las pruebas de digestión enzimática para PBP4(SPS) sobre muropéptido M5-D45 purificado y concentrado (Material y métodos 3.1.19.), y la evaluación realizada mediante HPLC, confirmó la capacidad de esta enzima de desarrollar una actividad D,D-carboxipeptidasa, removiendo una D-alanina terminal desde la cadena peptídica para el sustrato M5, generando una disminución en la cantidad de este monómero y un incremento del producto monómero disacárido tetrapéptido (M4), en ensayos incubados durante 60 y 240 minutos (Figura 34). La actividad enzimática para la proteína estudiada sobre dímero disacárido D45, demostró su competencia como D,D-EPasa eficiente, siendo capaz de hidrolizar el enlace peptídico que mantiene la configuración dimérica de este sustrato, generando los productos monoméricos esperados M5 y M4, respectivamente. La cantidad de monómero disacárido tetrapéptido (M4) fue levemente superior a la cantidad recuperada de monómero disacárido pentapéptido (M5), situación que pone de manifiesto una actividad D,D-CPasa secundaria, a partir del producto M5 generado, funcionalidad que también se revela por la producción de dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido (D44) desde sustrato D45 original (Figura 35).

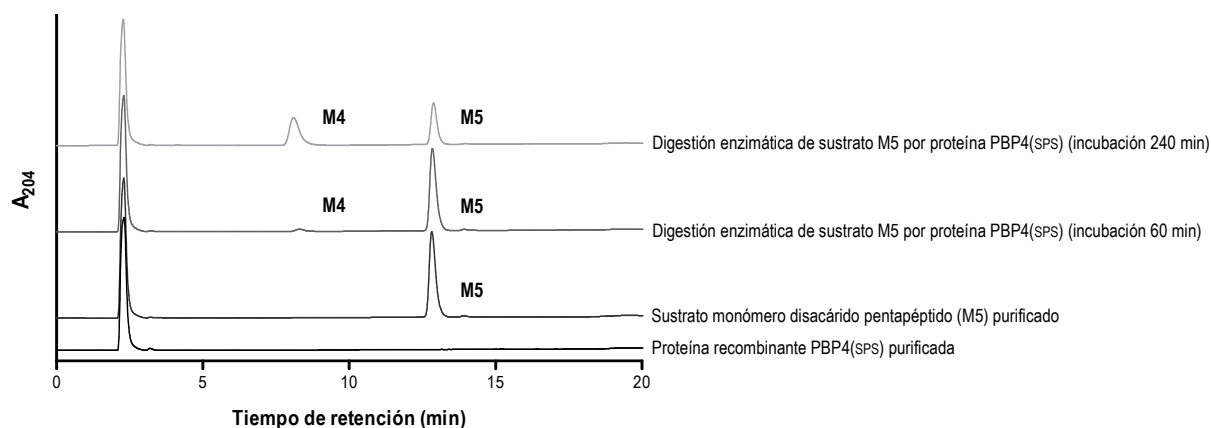


Figura 34 | Análisis por HPLC para ensayos de digestión de PBP4(sps) sobre sustrato monomérico M5, empleando un gradiente lineal de elución de 70 min. El tiempo de retención para el sustrato M5 utilizado fue de 12.89 min, mientras que el tiempo de elución para el producto obtenido se corresponde con el tiempo definido para monómero M4 (8.19 min). Se presenta la separación por HPLC para proteína purificada y sustrato natural (controles). A_{204} , absorbancia 204 nm; M5, monómero disacárido pentapéptido; M4, monómero disacárido tetrapéptido *

* Muro péptidos son abreviados de acuerdo a una nomenclatura, en donde la primera letra indica la presencia de un compuesto monomérico (M), un dímero entrecruzado (D) o un trímero entrecruzado (T); los números reflejan la longitud de la cadena peptídica asociada a N-acetilmurámico (MurNAc), donde 3 corresponde a una cadena formada por L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm(DAP), 4 representa una cadena peptídica constituida por L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm(DAP)-D-Ala y 5, una cadena pentapeptídica con residuos L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm(DAP)-D-Ala-D-Ala. Las últimas letras representan un entrecruzamiento entre muro péptidos por un puente peptídico (LD)-DAP-DAP (D), la unión a lipoproteína de membrana externa (L), o muro péptido con un residuo 1,6-anhidroMurNAc (N)

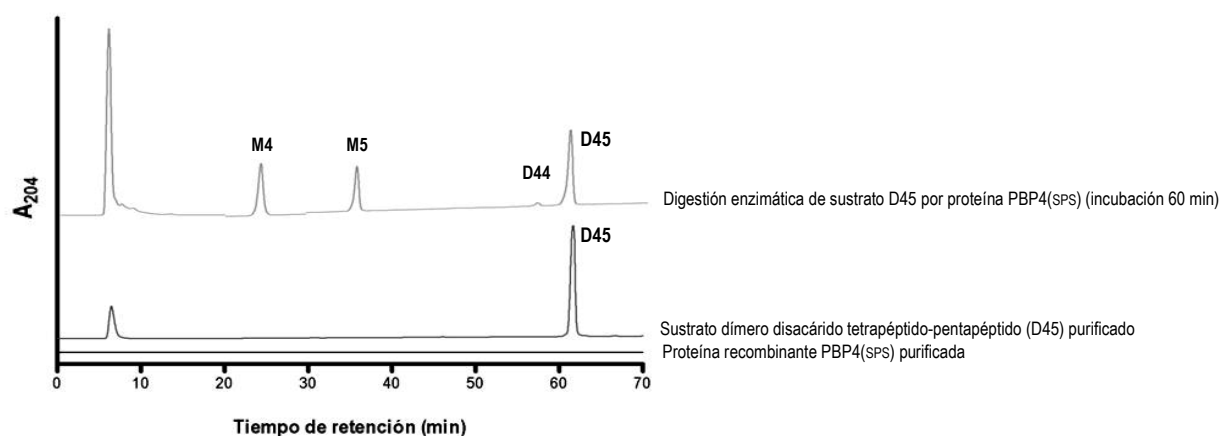


Figura 35 | Análisis por HPLC para ensayos de digestión de PBP4(sps) (4.69 μ g) sobre sustrato natural dimérico purificado D45 (10.68 μ g), utilizando un gradiente lineal de elución de 120 min. Los tiempos de retención para sustrato D45 y productos D44, M5, M4, fueron de 61.83 min, 57.84 min, 35.96 min y 24.17 min, respectivamente. La cantidad de sustrato remanente y producto generado (calculada como porcentaje desde el valor obtenido para el área de absorción integrada de cada muro péptido) fue de 47.48% (D45), 2.02% (D44), 21.08% (M5) y 29.42% (M4). Se presenta la separación por HPLC para proteína purificada y sustrato natural (controles). A_{204} , absorbancia 204 nm; D45, dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido; D44, dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido; M5, monómero disacárido pentapéptido; M4, monómero disacárido tetrapéptido

4.7. Afinidad para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1. Ensayos de competencia (IC₅₀)

Un estudio comparativo inicial, para estimar la afinidad de antibióticos β -lactámicos por PBPs de *Pseudomonas aeruginosa* O1 y *Escherichia coli*, realizado a través de mediciones de la inhibición competitiva del *binding* de penicilina G [¹⁴C], demostró que la mayoría de las cefalosporinas testeadas, tales como cefaloglicina, cefaloridina, cefalexina y cefalosporina C, mostraron alta afinidad por proteínas 1a y 1b en *Pseudomonas aeruginosa*, por su parte, cefsoludina, un antibiótico anti-*Pseudomonas*, mostró una afinidad mucho más alta por proteína 1b que por 1a, y la más alta competición por PBP3 para este modelo. La mayoría de estas cefalosporinas de primera generación mostró una baja afinidad por proteínas 2, 4 y 5/6, en ambas bacterias. Penicilinas como piperacilina, ampicilina y cloxacilina, demostraron alta potencia de competición por proteína 1a, y muy baja potencia para proteína 1b en PAO1, además de una alta afinidad por PBP2 y PBP3, en ambos modelos bacterianos. Mecilinam (amdinocilina), desarrolló una fuerte competencia por PBP2 en *P. aeruginosa* y en *E. coli*, sin demostrar una mayor afinidad por otras proteínas. Por el contrario, cefamicinas, tales como ceftixima y cefmetazol, mostraron una fuerte competición por todas las PBPs, excepto por PBP2, en ambas bacterias, reconociéndose que la afinidad de cefamicinas por proteínas 4 y 5 en *Pseudomonas aeruginosa*, y por PBPs 4, 5 y 6 en el modelo *E. coli*, se incrementó considerablemente, por la presencia de un grupo metoxi en posición 7- α para las cefalosporinas ensayadas. La mayoría de las penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas investigadas, mostraron una alta afinidad por PBP3 de *P. aeruginosa*, con las excepciones de mecilinam y cefalexina, que no revelaron una afinidad apreciable por esta proteína (Noguchi *et al.*, 1979). Esta primera aproximación, bastante detallada, puntualiza un patrón de afinidad para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*, que será importante en estudios relacionados con inactivación antibiótica (como mecanismo de resistencia), a través de la inducción de β -lactamasa cromosomal AmpC. Una segunda investigación, diseñada para evaluar la relación entre el *binding* de determinados antibióticos β -lactámicos (ampicilina, piperacilina, aztreonam, imipenem, ceftixima y cefotetan) por PBPs, y la potencia inductora para β -lactamasa cromosomal AmpC, concluyó que la principal diferencia entre buenos inductores, tales como imipenem, ceftixima y cefotetan, y pobres inductores, como ampicilina, piperacilina y aztreonam, fue la mayor afinidad por PBP1a, PBP4 y PBP7, para buenos inductores (en cepas inducidas de *E. coli* transformadas con un plásmido que transporta genes *ampR* y *ampC*, derivados de *Enterobacter cloacae*). La diferencia en afinidad, fue especialmente marcada para PBP4 y PBP7, sugiriendo, particularmente, que el *binding* por PBP4 puede iniciar la inducción de β -lactamasa cromosomal AmpC (Sanders *et al.*, 1997), una situación confirmada recientemente por Moyá *et al.*, 2009.

La afinidad de determinados β -lactámicos por PBPs específicas, permite establecer diferencias entre ellas, del mismo modo que favorece su identificación, por esta última razón, y en función de lo descrito anteriormente, los antibióticos β -lactámicos ceftixima e imipenem, reconocidos como buenos sustratos para PBP4 (además de ser reconocidos como potentes inductores de AmpC), fueron utilizados en ensayos de competencia frente a Bocillin™ FL (penicilina fluorescente), para determinar el índice de afinidad (IC₅₀) de estos antibióticos por LMM-PBP4 de PAO1 purificada y proteínas de membrana, derivadas desde cepa *wild-type* UCBPP-PA14. Proteínas recombinantes PBP4HNC, PBP4HN, PBPHC y extracto de membrana, fueron sometidos a un proceso de *binding* frente a

cefoxitina/Bocillin™ FL e imipenem/Bocillin™ FL, respectivamente, y la señal de fluorescencia en cada gel con su correspondiente cuantificación, permitió representar gráficamente la relación lograda entre la concentración de antibiótico ensayada y el porcentaje de saturación de Bocillin™ FL alcanzado (Figuras 36, 37 y 38). Los valores de IC₅₀ obtenidos (Tablas 13 y 14), representan y demuestran la alta afinidad de ambos antibióticos por LMM-PBP4 purificada y por PBP4 presente en membrana, condición que ha sido precisada en algunos trabajos previamente realizados (a partir de preparaciones de membrana). Los valores de IC₅₀ descritos para proteínas de membrana obtenidas desde PAO1 y ensayadas frente a imipenem (IMP), se ubican en el rango de 0.01-0.04 µg/ml, y entre 0.04-0.08 µg/ml, para proteínas de membranas recuperadas desde la cepa de referencia UCBPP-PA14 (Moyá *et al.*, 2010; Moyá *et al.*, 2012). Respecto del *binding* para el antibiótico cefoxitina (FOX), existen muy pocas referencias que den cuenta del valor estimado IC₅₀ de este β-lactámico por PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*. Uno de estos trabajos describe un valor de 0.3 µg/ml, para ensayos de competencia sobre proteínas de membrana (Noguchi *et al.*, 1979), mientras que un estudio posterior, reconoce un valor de 0.02 µg/ml, en membranas preparadas desde *E. coli* (Sanders *et al.*, 1997).

El índice de afinidad de imipenem por LMM-PBP4, que hemos obtenido desde ensayos de competencia con proteínas de membrana para la estirpe UCBPP-PA14, se ubica dentro del rango de valores reconocidos experimentalmente, por su parte, la afinidad de cefoxitina por la proteína, resultó ser muy similar a la confirmada para imipenem, situación que demuestra la correspondencia, en cuanto a calidad de sustrato, para ambos antibióticos. Las concentraciones de cefoxitina e imipenem, necesarias para lograr la inhibición del 50% del *binding* entre proteínas recombinantes purificadas y Bocillin™ FL, fueron equivalentes a las indicadas para ensayos basados en extracto de membrana. Se destaca una mayor precisión en los resultados, determinada por la menor variabilidad entre las repeticiones efectuadas, y la mayor facilidad en la cuantificación de la señal fluorescente (por ausencia de proteína inmadura, no procesada), para los ensayos realizados con proteína recombinante PBP4HC. Por lo anteriormente expuesto, es posible definir, que la afinidad de ambos antibióticos por esta PBP es muy alta, una condición que favorece la identificación de esta proteína como verdadera PBP4 para el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*, reforzando además, la conexión entre el *binding*, la inactivación de la proteína y la resistencia antibiótica (hiperproducción constitutiva de AmpC).

Resultados

Tabla 13 | Valores de IC₅₀ para antibióticos β-lactámicos cefoxitina e imipenem frente a proteínas recombinantes (LMM-PBP4) de *Pseudomonas aeruginosa* O1 purificadas

Proteína purificada	Promedio IC ₅₀ (μg/ml) ± S ^a	
	FOX	IMP
PBP4HNC	0.045 ± 0.006	0.098 ± 0.013
PBP4HN	0.049 ± 0.010	0.053 ± 0.015
PBP4HC	0.039 ± 0.007	0.088 ± 0.006

^a IC₅₀, concentración inhibitoria para el 50% de *binding*; S, desviación estándar. Valores calculados desde tres ensayos independientes

^b IMP, imipenem; FOX, cefoxitina

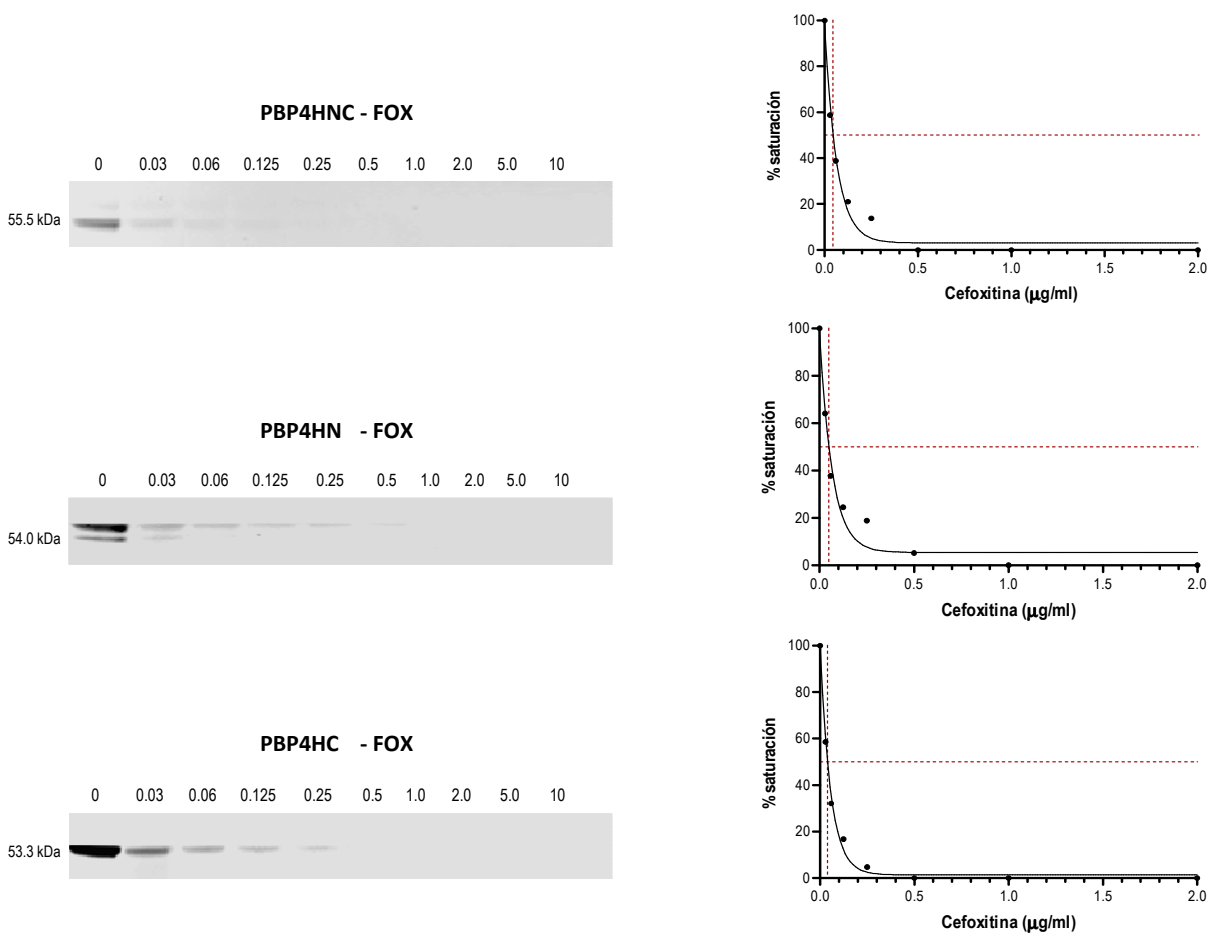


Figura 36 | Ensayos de competencia para proteínas PBP4HNC, PBP4HN y PBP4HC de PAO1 marcadas con BOCILLIN™FL e incubadas en presencia de concentraciones crecientes de cefoxitina (FOX) (desde 0.03-10 μg/ml). Se indica el peso molecular (kDa) de la proteína purificada investigada, y se presenta la curva de inhibición obtenida en cada ensayo

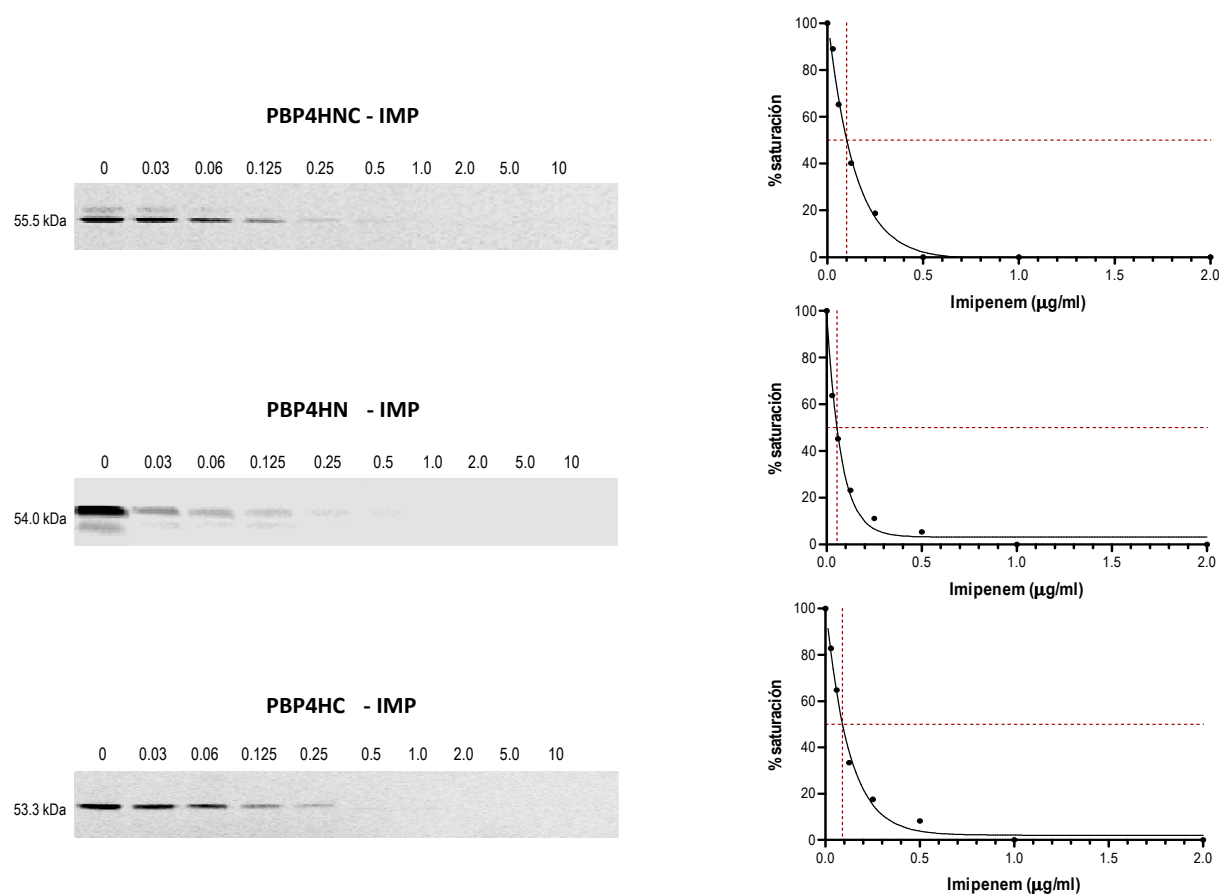


Figura 37 | Ensayos de competencia para proteínas purificadas PBP4HNC, PBP4HN y PBP4HC de *Pseudomonas aeruginosa* O1 (PAO1) marcadas con Bocillin™ FL e incubadas en presencia de concentraciones crecientes del carbapenémico imipenem (IMP) (desde 0.03-10 µg/ml). Se indica el peso molecular (kDa) de la proteína purificada investigada, y para cada ensayo se presenta la curva de inhibición obtenida

Tabla 14 | IC₅₀ para antibióticos β-lactámicos cefoxitina e imipenem frente a proteína de membrana LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (*wild-type*)

UCBPP-PA14 (PA14WT)	Promedio IC ₅₀ (µg/ml) ± S ^a	
	FOX	IMP
PBP4 UCBPP-PA14	0.062 ± 0.023	0.044 ± 0.017

^a IC₅₀, concentración inhibitoria para el 50% de *binding*; S, desviación estándar. Valores obtenidos desde tres ensayos independientes

^b FOX, cefoxitina; IMP, imipenem

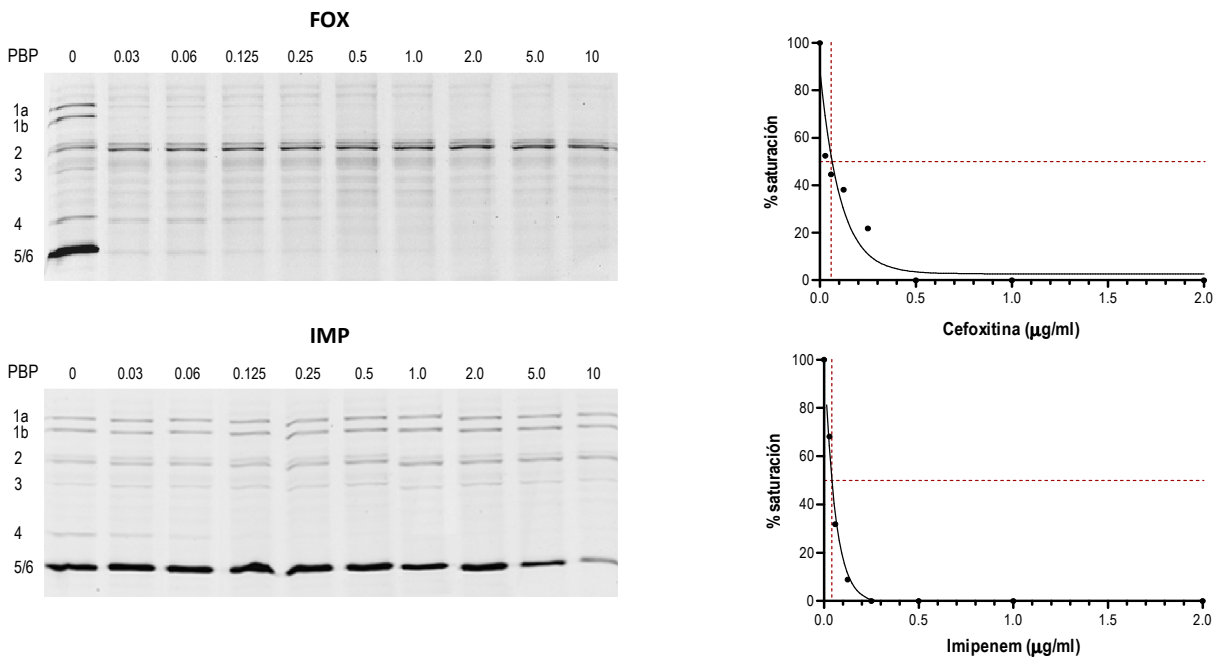


Figura 38 | Preparaciones de membrana (50 µg) para *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (*wild-type*) marcadas con BOCILLIN™FL e incubadas en presencia de (a) cefoxitina (FOX) y (b) imipenem (IMP). El rango de concentraciones ensayado fue: 0.03 a 10 µg/ml. El perfil de PBPs reconocidas se indica al lado izquierdo de cada gel. Para cada ensayo se presenta la curva de inhibición obtenida (IC₅₀)

4.8. Actividad β-lactamasa específica

Para LMM-PBP4 clase C tipo 4 en el modelo *Escherichia coli* (homólogo funcional de LMM-PBP4 en PAO1), se ha sugerido un ancestro común en β-lactamasas clase A, sin embargo, la presencia de una inserción de 218 residuos que componen el dominio II y III, ha determinado que su secuencia aminoacídica presente mayor similitud con las secuencias para β-lactamasas clase C (Kishida *et al.*, 2006; Ghosh *et al.*, 2008). Los ensayos tendientes a evaluar la posible actividad β-lactamasa para las proteínas recombinantes derivadas desde LMM-PBP4 en PAO1 (PBP4HNC, PBP4HN y PBP4HC), demuestran una baja pero significativa actividad frente al sustrato nitrocefina (cefalosporina cromogénica 87/312), con valores de actividad específica que presentaron una variación cercana a 400 veces la capacidad de hidrólisis de nitrocefina para β-lactamasa AmpC (Tabla 15, Figura 39). Un resultado similar ha sido descrito recientemente para LMM-PBP4 clase C tipo AmpH en el modelo *E. coli* (González-Leiza *et al.*, 2011), una PBP bifuncional con actividades reconocidas D,D-EPasa y D,D-CPasa, y que presentó una baja actividad de hidrólisis frente a nitrocefina (1.4×10^{-3} nmoles nitrocefina·min⁻¹·µg proteína⁻¹), con una medida ~1000 veces menor a la obtenida por la β-lactamasa utilizada como control (8.7×10^{-1} nmoles nitrocefina·min⁻¹·µg proteína⁻¹), concluyendo que la forma nativa de esta proteína no posee actividad de tipo β-lactamasa. Un estudio reciente, realizado sobre el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*, determina la actividad β-lactamasa específica para cepa *wild-type* PAO1 (6.9×10^{-3} nmoles nitrocefina·min⁻¹·µg proteína⁻¹), PA14 (4.9×10^{-3} nmoles·min⁻¹·µg proteína⁻¹), mutante PAO1Δ*dacB* (1.1×10^{-1} nmoles·min⁻¹·µg proteína⁻¹) y mutante complementado PAO1Δ*dacB* (pUCP27-*dacB*⁺)

(3.8×10^{-3} nmoles nitrocefina \cdot min $^{-1}\cdot\mu$ g proteína $^{-1}$) (Alvarez-Ortega *et al.*, 2010), resultados que demuestran la proximidad con los valores obtenidos en nuestros ensayos y la pobre actividad de hidrólisis para esta estirpe bacteriana y proteína en estudio, remarcando además, el estrecho vínculo entre la inactivación del gen *dacB* y el incremento en la actividad β -lactamasa (sobreexpresión), un efecto anteriormente mencionado y que sustenta parte de nuestra investigación. Desde el análisis de nuestros resultados, es posible reconocer dos situaciones: i) valores de menor actividad β -lactamasa específica y mínima variabilidad, en ensayos realizados con la proteína PBP4HC, condición que refuerza, nuevamente, la confiabilidad en la organización estructural de esta proteína recombinante, destacándose como el diseño más adecuado para la investigación de la funcionalidad en este tipo de proteínas, ii) la clara confirmación de la carencia de actividad β -lactamasa para LMM-PBP4 de PAO1.

Tabla 15 | Actividad β -lactamasa para proteínas recombinantes purificadas (LMM-PBP4 PAO1)

	Actividad β -lactamasa específica ^a	Variación en actividad β -lactamasa ^b
AmpC (control)	$5.90 \pm 1.15 \times 10^{-2}$	1
PBP4HNC	$1.70 \pm 0.45 \times 10^{-4}$	347
PBP4HN	$1.47 \pm 0.38 \times 10^{-4}$	401
PBP4HC	$1.40 \pm 0.10 \times 10^{-4}$	421

^a Expresada como nanomoles de nitrocefina hidrolizada \cdot min $^{-1}\cdot\mu$ g de proteína $^{-1}$. Valor promedio (\pm desviación estándar) obtenido desde tres ensayos independientes

^b Variación de la actividad enzimática en relación a la capacidad de hidrólisis de AmpC

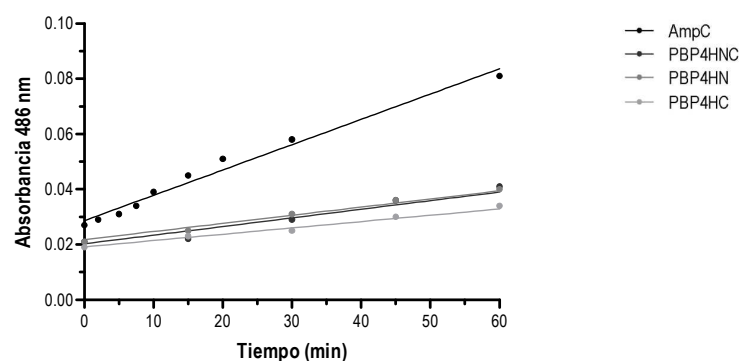


Figura 39 | Representaciones gráficas del cambio de absorbancia a 486 nm para el sustrato cromogénico nitrocefina por acción de proteínas recombinantes purificadas PBP4HNC, PBP4HC, PBP4HN y β -lactamasa AmpC (control positivo) obtenida (IC₅₀)

4.9. Actividad D,D-carboxipeptidasa *in vitro* sobre sustrato sintético

Ensayos de digestión *in vitro* sobre tripéptido sintético N α ,N ϵ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (AcLAA), demuestran la capacidad de proteínas recombinantes purificadas PBP4HNC, PBP4HN y PBP4HC, de cortar la unión D-alanina-D-alanina en el sustrato y permitir la liberación del residuo D-Ala terminal (posición 5 equivalente en la cadena

peptídica completa) (Tabla 16), situación que favorece el proceso natural de transpeptidación (entrecruzamiento) del peptidoglicano.

La actividad D,D-carboxipeptidasa para proteína recombinante fusionada a His-tag y derivadas desde LMM-PBP4 de PAO1, PBP4HC ($9.90 \pm 0.61 \times 10^{-2}$ nmoles D-Ala·min⁻¹·µg proteína⁻¹), fue superior a la funcionalidad D,D-CPasa descrita para AmpH de *E. coli* ($6.0 \pm 0.8 \times 10^{-3}$ nmoles D-Ala·min⁻¹·µg proteína⁻¹) (González-Leiza *et al.*, 2011), a la actividad determinada para LMM-PBPD2 (proteína Lmo2812) de *Listeria monocytogenes* (0.75×10^{-3} nmoles de D-Ala liberada·min⁻¹·µg proteína⁻¹) (Korsak *et al.*, 2010), y a la actividad D,D-CPasa señalada para LMM-PBP4b de *E. coli* (5.94 nanomoles de D-alanina liberados en 1 h a 37°C por PBP4HC contra 2.0 nanomoles de D-Ala liberados por PBP4b) (Vega & Ayala, 2006), frente a tripéptido sintético y en igualdad de condiciones experimentales. Estos resultados, sumados a la descripción de la actividad D,D-CPasa para proteína recombinante soluble PBP4(sps) sobre sustrato natural M5 (Figura 34), definen, inequívocamente, una funcionalidad de tipo D,D-carboxipeptidasa, para cada proteína recombinante diseñada y obtenida desde LMM-PBP4, en el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa* O1.

Tabla 16 | Actividad D,D-carboxipeptidasa para proteínas recombinantes purificadas (LMM-PBP4 PAO1) sobre sustrato sintético Nα,Nε-Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (AcLAA)

	Actividad D,D-carboxipeptidasa ^{a, b}
INC	$6.76 \pm 0.32 \times 10^{-2}$
IN	$9.18 \pm 0.37 \times 10^{-2}$
IC	$9.90 \pm 0.61 \times 10^{-2}$

^aada como nanomoles de D-alanina liberada·min⁻¹·µg de proteína⁻¹

^bo (± desviación estándar) obtenido desde tres ensayos independientes

4.10. Actividad D,D-peptidasa sobre peptidoglicano macromolecular. Análisis por HPLC

La disponibilidad de la estirpe mutante *E. coli* DV900 (CS802-2 Δ *pbp4B*) desarrollada en nuestro laboratorio (Vega & Ayala, 2006), y carente de toda actividad D,D-carboxipeptidasa y D,D-endopeptidasa, al presentar delecciones en genes codificantes para la totalidad de LMM-PBPs clase C reconocidas en este modelo bacteriano (PBP4, PBP4b, PBP5, PBP6, PBP6b, PBP7/8, AmpH), además de AmpC; permite disponer de una cepa con una organización estructural de su pared celular (peptidoglicano), particularmente favorable para la investigación de actividades enzimáticas que precisamente fueron eliminadas durante su generación. La abundancia relativa, dentro del perfil de muropeptidos reconocidos en esta bacteria mediante su separación por HPLC, para monómero disacárido pentapéptido (M5) [GlcNAc-MurNAc-L-Ala-(γ)-D-Glu-mesoA₂pm-D-Ala-D-Ala] y dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido (D45) [monómero tetrapéptido GlcNAc-MurNAc-L-Ala-(γ)-D-Glu-mesoA₂pm-D-Ala unido a monómero pentapéptido GlcNAc-MurNAc-L-Ala-(γ)-D-Glu-mesoA₂pm-D-Ala-D-Ala a través de enlace peptídico de tipo 4-3], constituye un sistema biológico con sustratos naturales adecuados para la evaluación *in vivo* de la funcionalidad D,D-carboxipeptidasa y D,D-endopeptidasa de una proteína determinada. La estrategia utilizada para transformar esta

estirpe bacteriana en una célula hospedadora con capacidad de expresar proteínas recombinantes, se fundamentó en la incorporación del gen codificante para la ARN polimerasa T7 en el cromosoma bacteriano, a través de la integración sitio específica del profago λ DE3, mediante un protocolo de coinfección (lisogenización). La selección de lisógenos positivos *E. coli* DV900(DE3) y el desarrollo de un estado de competencia adecuado para este modelo celular, permitió su transformación con clones recombinantes generados en un vector del sistema de expresión pET [pET28-b(+)] y la inducción de su expresión, una condición que produjo cambios en el *sacculus* de mureina, compatibles con las actividades enzimáticas investigadas.

Las variaciones en la cantidad relativa (fracción molar) de sustratos y productos, se encuentran indicadas en la Tabla 17, donde es posible identificar una disminución significativa de los sustratos M5 y D45, en cada transformante sometido a inducción, contra la ausencia de cambios en el perfil de muropéptidos para el material no inducido [una situación similar a la obtenida para los controles DV900(DE3) y DV900(DE3)/pET-28b(+) ensayados]. Los productos (muropéptidos) que determinan una funcionalidad D,D-EPasa, corresponden a los monómeros M5 y M4 generados a partir del sustrato D45. En este caso, resulta evidente la disminución del sustrato y, particularmente, el incremento en la cantidad de producto M4, un efecto determinado por la disposición del producto M5 como sustrato alternativo para la segunda actividad enzimática en evaluación (funcionalidad D,D-CPasa). La actividad D,D-CPasa expresada frente a los sustratos D45 y M5, favorece la síntesis de producto D44 (aumento menor) y M4, respectivamente, situación que amplifica directamente la cantidad final de producto monomérico M4, y de modo indirecto, a través del desarrollo de una nueva actividad D,D-EPasa sobre sustrato dimérico D44 recientemente generado. Lo anteriormente descrito demuestra, evidentemente, la doble funcionalidad D,D-peptidasa (D,D-CPasa y D,D-EPasa) sobre peptidoglicano macromolecular, para las proteínas recombinantes expresadas en el sistema *E. coli* DV900(DE3). Frente a esta condición, resulta fundamental poder precisar la actividad enzimática predominante, y para esto, el análisis de la información obtenida a través de la estimación de la variación (% diferencial) entre la cantidad relativa para un determinado muropéptido, desde material no inducido y sometido a inducción (IPTG), permite establecer que la disminución del sustrato dimérico principal D45, con variaciones estables comprendidas entre 25.48%-25.99% (para cepas sobreexpresando PBP4HN y PBP4HC, respectivamente), frente a la disminución de sustrato M5, que presenta variaciones estables comprendidas entre 37.98%-40.06% (para cepas sobreexpresando PBP4HC y PBP4HN, respectivamente), confirma un nivel de reducción para el sustrato original D45, equivalente al desarrollo de una menor actividad peptidasa de tipo D,D-EPasa, sobre este muropéptido, definiendo, por lo tanto, una mayor actividad D,D-CPasa. Sin embargo, para establecer una conclusión definitiva respecto de la funcionalidad dominante, será necesario considerar la abundancia y variabilidad de sustratos para la actividad D,D-EPasa, acción que supone un impacto sobre una variedad mayor de muropéptidos (a diferencia de los que sucede en la actividad D,D-CPasa) de tipo diméricos, triméricos y probablemente, tetraméricos, además de identificar una serie de parámetros cinéticos (V_{max} , K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) que determinarán el comportamiento individual de cada actividad, permitiendo deducir su relevancia colectiva.

Un esquema de trabajo similar, donde *sacculus* de mureina recuperado desde la estipe mutante *E. coli* DV900 se utilizó directamente como sustrato de reacción, siendo aceptado por la enzima LMM clase C tipo AmpH, permitió definir la doble funcionalidad D,D-EPasa y D,D-CPasa para esta PBP en el modelo *Escherichia coli*. Ensayos de digestión entre el peptidoglicano macromolecular y la proteína recombinante purificada, incubados a 37°C *overnight*, digeridos con muramidasa y posteriormente separados por HPLC, revelaron que la proporción de monómero disacárido pentapéptido (M5), compuestos diméricos (D45, D44 y D45N) y muropéptidos triméricos (T445 y T445N) disminuyó drásticamente cuando el peptidoglicano de *E. coli* DV900 fue incubado con AmpH. Se demostró además, que la abundancia relativa de muropéptidos entrecruzados por un puente peptídico (LD)-DAP-DAP también se redujo, evidenciando para esta proteína, una alta eficiencia de reacción sobre peptidoglicano macromolecular y una amplitud en la especificidad por el sustrato, para su actividad D,D-EPasa (González-Leiza *et al.*, 2011). Como en el caso anterior, en nuestros resultados también se destaca una reducción (reducción menor) para el dímero disacárido tripéptido-pentapéptido con entrecruzamiento (LD)-DAP-DAP (D35D), en el dímero tetrapéptido-pentapéptido anhidro (D45N) y para el trímero tetrapéptido-tetrapéptido-pentapéptido (T445), cambios que permiten inferir, dadas las funciones enzimáticas reconocidas, la producción de muropéptidos de tipo D44N, M5N, M4N, M5 y M4 para el primer caso, y productos de tipo T444, D45, D44, M5 y M4 para el sustrato trimérico, efectos que implican, una extensión importante en cuanto a la especificidad de sustrato en ambas actividades (particularmente, para la actividad D,D-EPasa). La posible actividad sobre sustratos tetraméricos no logró ser confirmada, debido a la falta de información, producto de la dificultad para recuperar cantidades apropiadas de estos muropéptidos.

La actividad D,D-EPasa no parece verse afectada por la presencia de un residuo de D-alanina en posición 5 para una cadena peptídica aceptora en muropéptidos diméricos. Sobre esto último, y a través de ensayos *in vitro* con sustrato natural purificado D45, realizados para evaluar la actividad enzimática de proteína recombinante sin péptido señal PBP4(SPS), se demuestra que la cantidad obtenida de producto D44 (2.02%) es mínima en relación a los productos finales M5 (21.08%) y M4 (29.42%) (porcentajes bastante similares) (Figura 35), situación que descarta la posibilidad de que PBP4 de PAO1 convierta, en primer lugar, D45 en D44, actuando posteriormente sobre este producto. Sin embargo, la presencia de un residuo 1,6-anhidroMurNAc, podría tener una implicancia significativa sobre esta reacción, dada la menor reducción descrita para sustratos D45N-T445N frente a muropéptidos normales (D45-T445). Esta última hipótesis, no parece ser del todo correcta, debido a la presencia de una cantidad menor pero detectable de producto M4N (procedente desde actividades D,D-EPasa para sustrato dimérico anhidro D45N y D,D-CPasa sobre monómero anhidro M5N), en cada perfil de muropéptidos generado desde material inducido [la cantidad de M4N aumenta desde 0.10% hasta 0.55% en transformante pET-PBP4HNC/BL21(DE3) inducido, desde 0.10% hasta 1.17% en transformante pET-PBP4HN/BL21(DE3) tratado con IPTG, y desde 0.54% hasta 1.77% para transformante pET-PBP4HC/BL21(DE3) sometido a inducción].

Las actividades D,D-peptidasas, confirmadas sobre peptidoglicano macromolecular, se representan gráficamente a través de los cambios producidos en las áreas de absorción para sustratos y productos, eluidos mediante HPLC. Cromatogramas obtenidos para lisógenos transformantes no inducidos e inducidos por IPTG,

demuestran claramente la bifuncionalidad D,D-endopeptidasa y D,D-carboxipeptidasa, para proteínas recombinantes PBP4HNC, PBP4HN y PBP4HC, derivadas desde LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1 (Figuras 40 y 41).

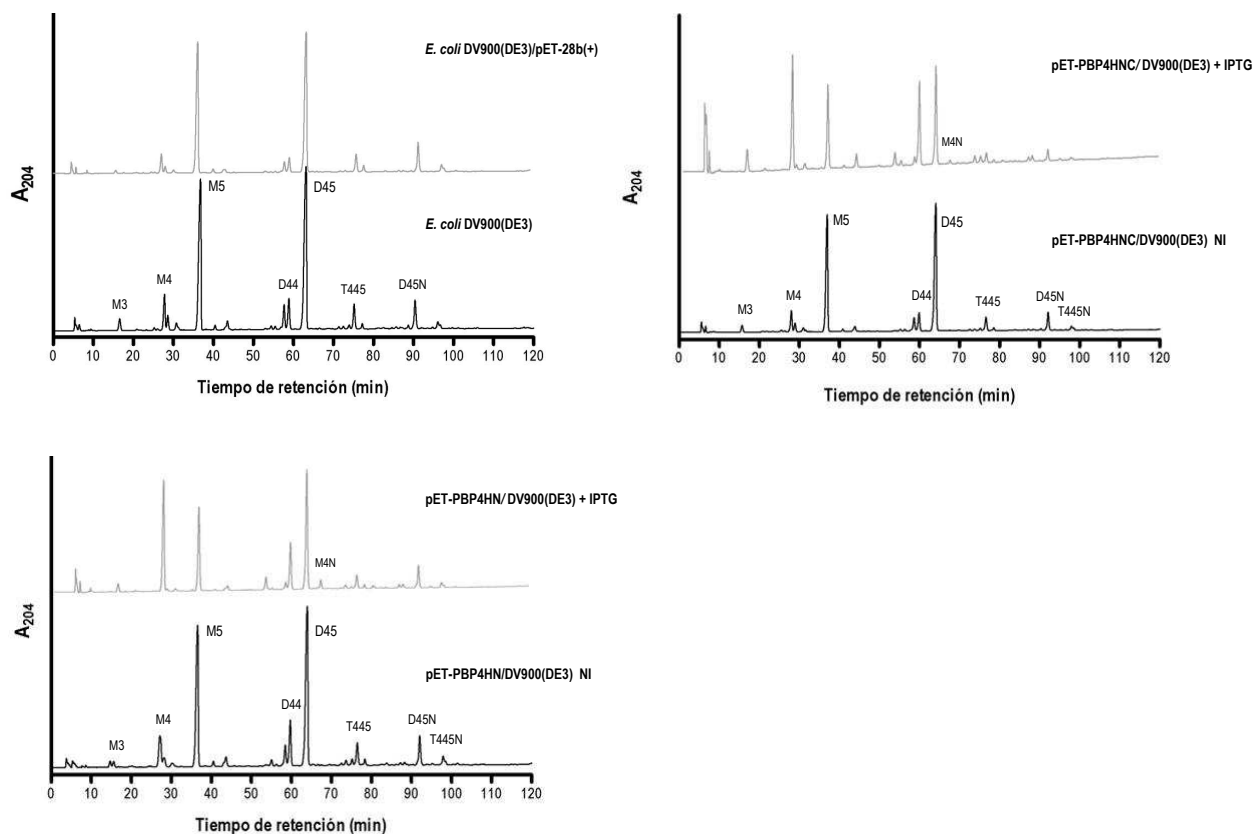


Figura 40 | Separación de peptidoglicano mediante HPLC (gradiente lineal de elución 120 min) para lisógenos transformantes pET-PBP4HNC/DV900(DE3) y pET-PBP4HN/DV900(DE3) no inducidos (NI) e inducidos por IPTG (sobreexpresión de proteínas recombinantes derivadas desde LMM-PBP4 de PAO1). Se presentan los cromatogramas para la estirpe mutante lisogenizada *E. coli* DV900(DE3) y transformada con el vector de expresión [*E. coli* DV900(DE3)/pET-28b(+)] como controles. A_{204} , absorbancia 204 nm; M3, monómero disacárido tripéptido; M4, monómero disacárido tetrapéptido; M5, monómero disacárido pentapéptido; D44, dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido; D45, dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido; D45N, dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido anhidro; T445, trímero tetrapéptido-tetrapéptido-pentapéptido; T445N, trímero tetrapéptido-tetrapéptido-pentapéptido anhidro

Resultados

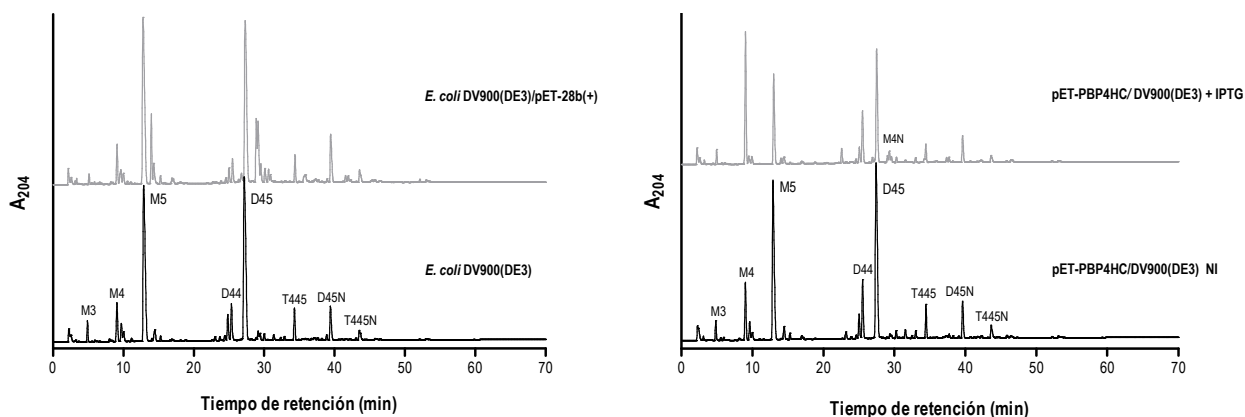


Figura 41 | Separación de peptidoglicano mediante HPLC (gradiente lineal de elución 70 min) para lisógeno transformante pET-PBP4HC/DV900(DE3) no inducidos (NI) e inducidos por IPTG (sobreexpresión de proteína recombinante Pbp4HC derivada desde LMM-PBP4 de PAO1). Se presentan los cromatogramas para la estirpe mutante lisogenizada *E. coli* DV900(DE3) y transformada con el vector de expresión [*E. coli* DV900(DE3)/pET-28b(+)] como controles. A₂₀₄, absorbancia 204 nm; M3, GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm; M4, GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm-D-Ala; M5, GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm-D-Ala-D-Ala; D44, dímero de M4 con entrecruzamiento (DD) DAP-D-Ala; D45, dímero de M4 y M5 con entrecruzamiento (DD) DAP-D-Ala; D45N, GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm-D-Ala-GlcNAc-1,6-anhidroMurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm-D-Ala-D-Ala; T445, trímero de M4-M4-M5; T445N, T445 con un residuo 1,6-anhidroMurNAc

Tabla 17 | Evaluación de actividad D,D-peptidasa sobre peptidoglicano macromolecular (fracción molar de muropéptidos) para clones recombinantes transformados en estirpe mutante lisógena *E. coli* DV900(DE3) en condiciones de inducción y no inducción

Muropéptidos ^d	Abundancia relativa (mol%) ^a											
	DV900(DE3) ^b	DV900(DE3)/pET-28b(+)	Dif.% ^c	pET-PBP4HNC/DV900(DE3) NI	pET-PBP4HNC/DV900(DE3) IPTG	Dif.%	pET-PBP4HN/DV900(DE3) NI	pET-PBP4HN/DV900(DE3) IPTG	Dif.%	pET-PBP4HC/DV900(DE3) NI	pET-PBP4HC/DV900(DE3) IPTG	Dif.%
Tetra (M4)	8.28	6.20	-25.12	7.73	35.26	+356.14	9.54	35.88	+276.10	10.58	35.84	+238.75
Penta (M5)	48.64	50.60	+4.03	49.05	27.44	-44.06	45.21	27.10	-40.06	45.52	28.23	-37.98
Tetra-tetra (D44)	3.60	1.61	-55.28	3.37	14.64	+334.42	5.03	7.56	+50.30	6.04	7.17	+18.71
Tetra-penta (D45)	27.60	28.73	+4.09	28.87	17.14	-40.63	26.96	20.09	-25.48	26.01	19.25	-25.99
Tetra-penta anh. (D45N)	3.67	4.28	+16.62	3.45	1.86	-46.09	4.56	3.66	-19.74	3.87	3.03	-21.71
Tri-penta DAP-DAP (D35D)	3.59	2.92	-18.66	3.28	1.44	-56.10	3.05	1.40	-54.10	2.95	2.30	-22.03
Tetra-tetra-penta (T445)	3.56	3.80	+6.74	3.26	1.68	-48.47	3.84	2.80	-27.08	3.21	2.60	-19.00
Tetra-tetra-penta anh. (T445N)	1.06	1.86	+75.47	0.99	0.54	-45.45	1.81	1.51	-16.57	1.82	1.58	-13.19
Total	100	100		100	100		100	100		100	100	

^a Fracción molar obtenida a partir de la integración de las áreas de absorción de cada muropéptido eluido (programas Biocrom 2000 v3.0 y Breeze 2)

^b Análisis de peptidoglicano para estirpes control *E. coli* DV900(DE3) y *E. coli* DV900(DE3) transformada con el vector de expresión pET-28b(+)

^c Diferencia establecida entre material no inducido e inducido en función de las cantidades relativas obtenidas para cada muropéptido (fracción molar para material NI es utilizado como valor 100%)

^d Monómero disacárido tetrapéptido (M4); monómero disacárido pentapéptido (M5); dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido (D44); dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido (D45); dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido anhidro (D45N); dímero disacárido tripéptido-pentapéptido con entrecruzamiento (LD)-DAP-DAP (D35D); trímero tetrapéptido-tetrapéptido-pentapéptido (T445) y trímero tetrapéptido-tetrapéptido-pentapéptido anhidro (T445N)

4.11. Estudio cinético para actividad D,D-peptidasa sobre muropéptidos purificados. Análisis por HPLC

El análisis cinético de la actividad D,D-CPasa/D,D-EPasa para LMM-PBP4 sobre muropéptidos purificados M5-D45, permitió conocer: i) la velocidad máxima alcanzable cuando la totalidad de la enzima investigada se encuentra en forma de complejo ES (enzima-sustrato) frente a concentraciones saturantes de sustrato (V_{max}), ii) la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} (constante K_m) y finalmente, iii) el número de cambio de la enzima (moles de sustrato transformado por mol de enzima en unidad de tiempo) o constante catalítica (k_{cat}) (Núñez de Castro, 2001). Las figuras 43a y 43c muestran los cromatogramas obtenidos mediante HPLC para ensayos de digestión con proteína recombinante purificada y sustrato natural pentapéptido (M5) y sustrato dimérico tetrapéptido-pentapéptido (D45), respectivamente. La cantidad de producto M4 para la evaluación de una actividad D,D-CPasa sobre sustrato M5, y de productos M4-M5 para la valoración de una actividad D,D-EPasa sobre sustrato D45, permitió la estimación de la velocidad de reacción para ambas actividades y su representación gráfica frente a concentraciones crecientes de sustrato (Figuras 43b y 43d). Valores de V_{max} y K_m fueron obtenidos a partir de las respectivas representaciones para el modelo de regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten, parámetros que posteriormente fueron utilizados para el cálculo de la constante catalítica (k_{cat}) (Tablas 18, 19 y 20). De acuerdo a los resultados obtenidos, queda absolutamente demostrada la bifuncionalidad de tipo D,D-CPasa/D,D-EPasa para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1, evidenciándose un menor valor de K_m entre esta proteína y el sustrato dimérico D45, frente a la relación de LMM-PBP4 y el sustrato monomérico M5 ($> K_m$). La actividad D,D-carboxipeptidasa, determinada inicialmente a través de la cuantificación de D-alanina liberada desde un sustrato tripéptido sintético (AcLAA), presenta un valor de $9.90 \pm 0.61 \times 10^{-5}$ micromoles D-Ala \cdot min $^{-1}$ \cdot μ g de PBP4HC $^{-1}$, comparable a la velocidad de $7.70 \pm 1.38 \times 10^{-5}$ micromoles M4 \cdot min $^{-1}$ \cdot μ g de PBP4HC $^{-1}$, obtenida al utilizar el muropéptido natural completo M5 como sustrato. Una constante K_m de 71.92 ± 2.11 μ M, para la funcionalidad D,D-carboxipeptidasa de LMM-PBP4 (PAO1) sobre sustrato natural M5, constituye un valor aparente mucho más bajo y que contrasta fuertemente con el valor de K_m para LMM-PBP5, la D,D-CPasa predominante en *Escherichia coli*, frente a sustratos N α ,N ϵ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (AcLAA) (K_m 8.98 ± 1.79 mM) y pentapéptido mimético L-Ala-(γ)-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (AGLAA) (K_m 1.38 ± 0.43 mM) (Chowdhury *et al.*, 2010), una circunstancia que también es evidente, en los valores estimados de K_m para una actividad D,D-CPasa de LMM-PBP5 (forma soluble) en *Pseudomonas aeruginosa* O1, sobre sustratos N α ,N ϵ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (K_m 8.7 ± 0.2 mM) y Metil-MurNAc-L-Ala-(γ)-D-Glu-mesoA $_2$ pm-D-Ala-D-Ala (K_m 6.1 ± 1.4 mM) (Smith *et al.*, 2013), sin embargo, la actividad D,D-carboxipeptidasa asociada a PBP4 en *Escherichia coli* (el arquetipo de LMM-PBPs clase C) sobre N-acetilmuramil-pentapéptido, un sustrato estructuralmente más cercano a M5, posee una constante K_m de 20.4 ± 1.65 μ M, equivalente a 1/3 (aproximadamente) del valor que hemos descrito para LMM-PBP4 de PAO1 (Clarke *et al.*, 2009). Sobre la actividad D,D-endopeptidasa, se reitera la situación demostrada para la reacción entre D45 y proteína recombinante soluble purificada PBP4(SPS), donde la ausencia (y su eventual presencia minoritaria) de producto D44 frente a la presencia de productos M4 y M5, elimina la probabilidad de que PBP4 (PAO1) ejecute una actividad D,D-CPasa inicial (Figura 43c, flechas de color rojo). Este antecedente, sumado a la preferencia de esta

Resultados

proteína por muropéptidos poliméricos, propiedad descrita en el estudio de actividad sobre PG macromolecular (Resultados, 4.10.); además de la obtención de valores de k_{cat} 15-17 veces más altos para la actividad sobre sustrato D45, respecto de la actividad demostrada sobre sustrato natural M5 (Tablas 18, 19 y 20), confirman una funcionalidad de tipo D,D-endopeptidasa como la actividad predominante para LMM-PBP4 en el modelo *Pseudomonas aeruginosa* O1. Para una mayor comprensión de las propiedades D,D-CPasa y D,D-EPasa de LMM-PBP4 (PAO1), la actividad enzimática sobre derivados anhidros (sustrato monomérico pentapeptídico anhidro M5N y dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido anhidro D45N), evidenció un comportamiento muy similar al de sustratos muropéptidos sin residuos terminales de cadena, aunque con un perfil de productos minoritarios (la dificultad en la obtención de una cantidad adecuada de sustratos de naturaleza anhidra, condicionó la escasa recuperación de productos e imposibilitó la realización de un estudio cinético en las condiciones descritas para muropéptidos M5 y D45). A pesar de lo anterior, es posible identificar actividad D,D-CPasa sobre sustrato M5N, por presencia de producto M4N, además de bifuncionalidad de tipo D,D-EPasa/D,D-CPasa frente a sustrato dimérico D45N, por recuperación de muropéptidos M5, M4N, M5N (productos indicativos de actividad D,D-EPasa) y monómero M4 (producto derivado de una actividad D,D-EPasa directa sobre sustrato natural D45N y de una actividad D,D-CPasa ejercida sobre el producto monomérico M5) (Figuras 42a y 42b).

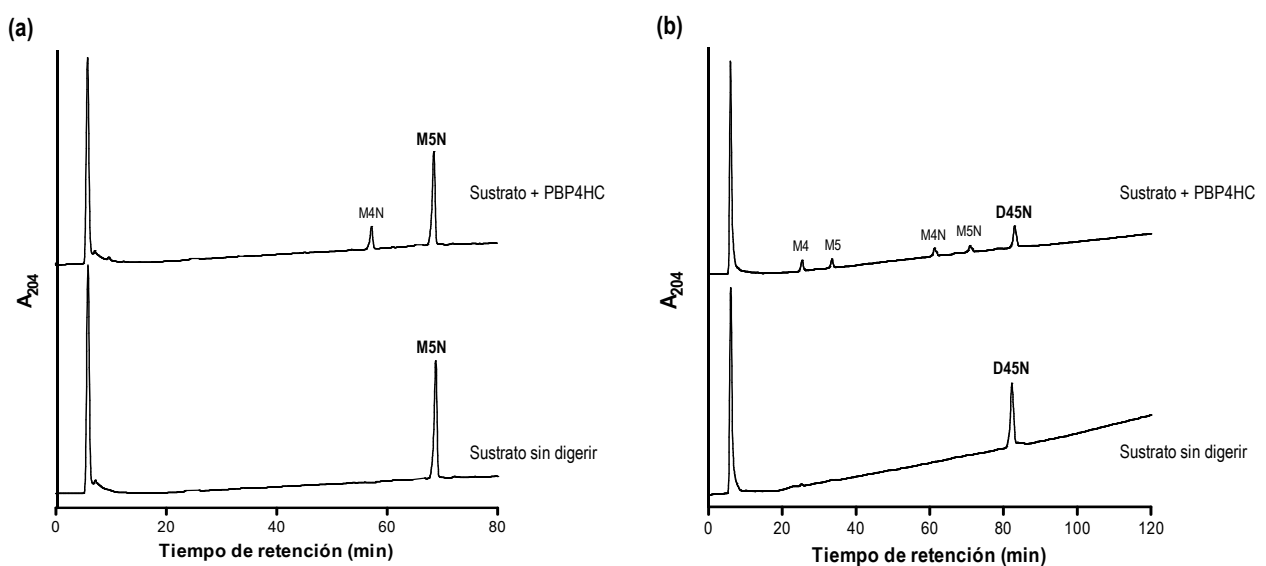
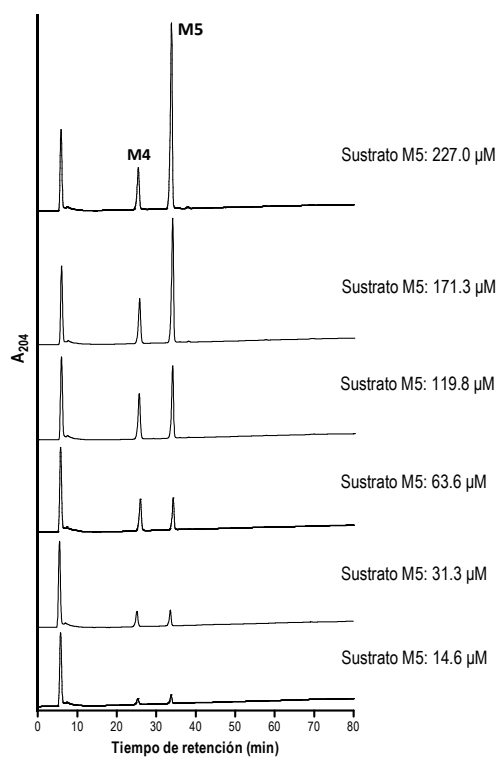
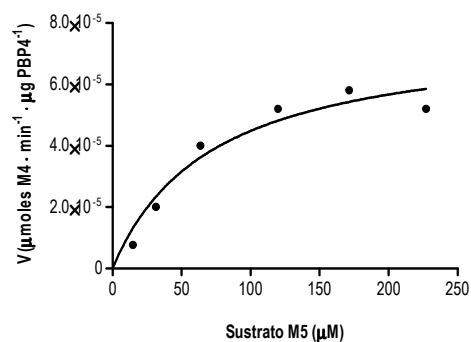


Figura 42 | (a) Análisis por HPLC (gradiente lineal de elución 120 min) para ensayo de digestión con proteína recombinante purificada PBP4HC sobre monómero disacárido pentapéptido anhidro (M5N; tiempo de retención: 68.84 min). Se indica el sustrato sin digerir (control) y el producto M4N (tiempo de retención: 57.48 min) (b) Análisis por HPLC para ensayo de digestión con proteína recombinante purificada PBP4HC sobre dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido anhidro (D45N; tiempo de retención: 83.81 min). Se indica el sustrato sin digerir (control) y los productos M5N (tiempo de retención: 71.19 min), M4N (tiempo de retención: 61.39 min), M5 (tiempo de retención: 33.17 min) y M4 (tiempo de retención: 24.80 min)

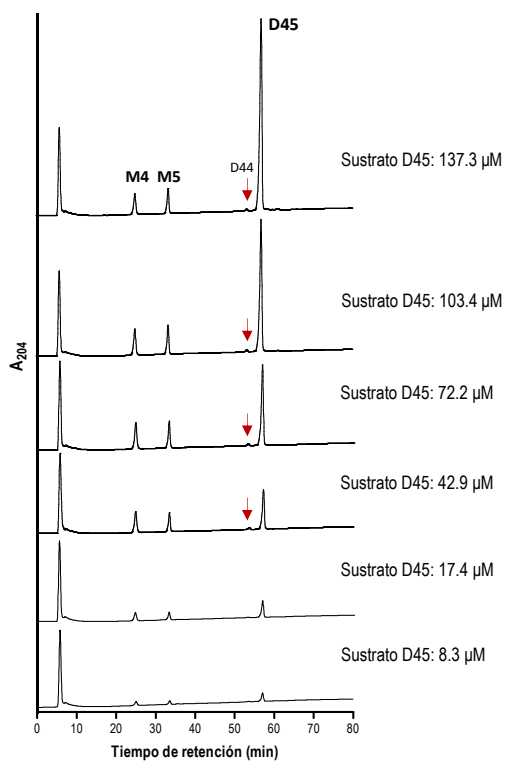
(a)



(b)



(c)



(d)

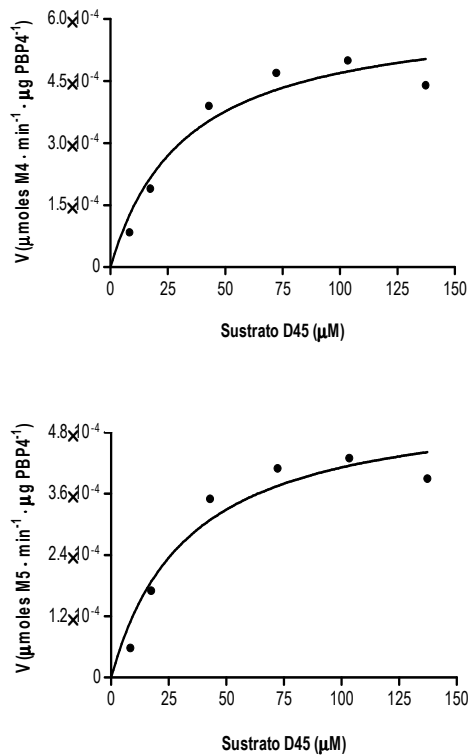


Figura 43 | (a) Análisis por HPLC (gradiente lineal de elución 120 min) para ensayo de digestión con proteína recombinante purificada PBP4HC (0.57 μM) sobre monómero disacárido pentapéptido (M5, tiempo de retención: 33.78 min). Se indica el producto generado (M4, tiempo de retención: 25.49 min) y las concentraciones de sustrato ensayadas (b) Gráfica de velocidad de producción de M4 dependiente de una actividad D,D-carboxipeptidasa para PBP4HC, frente a concentraciones crecientes de sustrato (c) Análisis mediante HPLC para ensayo de digestión con proteína recombinante purificada PBP4HC (0.59 μM) sobre sustrato dimérico tetrapéptido-pentapéptido (D45, tiempo de retención: 56.98 min). Se señalan los productos generados (M4, tiempo de retención: 24.97 min; M5, tiempo de retención: 33.50 min; D44, tiempo de retención: 53.23 min) y las concentraciones de sustrato ensayadas. Flechas de color rojo indican la presencia de producto D44 (d) Representación gráfica de la velocidad de reacción para una actividad D,D-endopeptidasa de PBP4HC (PAO1) sobre sustrato dimérico D45

Tabla 18 | Parámetros cinéticos (V_{max} , K_m , k_{cat}) para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1 sobre sustrato M5*

Enzima	Sustrato M5		
	V_{max} ($\mu\text{mol M4} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g PBP4}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
LMM-PBP4	$7.70 \pm 1.38 \times 10^{-5}$	71.92 ± 2.11	$1.19 \pm 0.28 \times 10^{-4}$

* Todas las constantes cinéticas deben ser consideradas como aparentes debido a la imposibilidad de calcular la velocidad enzimática inicial mediante HPLC. Los resultados corresponden al valor promedio \pm desviación estándar desde tres experimentos independientes

Tabla 19 | Parámetros cinéticos (V_{max} , K_m , k_{cat}) para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1 sobre sustrato D45*

Enzima	Sustrato D45		
	V_{max} ($\mu\text{mol M4} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g PBP4}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
LMM-PBP4	$6.24 \pm 0.73 \times 10^{-4}$	32.82 ± 3.09	$2.11 \pm 0.43 \times 10^{-3}$

* Todas las constantes cinéticas deben ser consideradas como aparentes debido a la imposibilidad de calcular la velocidad enzimática inicial mediante HPLC. Los resultados corresponden al valor promedio \pm desviación estándar desde tres experimentos independientes

Tabla 20 | Parámetros cinéticos (V_{max} , K_m , k_{cat}) para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1 sobre sustrato D45*

Enzima	Sustrato D45		
	V_{max} ($\mu\text{mol M5} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g PBP4}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
LMM-PBP4	$5.50 \pm 1.08 \times 10^{-4}$	33.45 ± 1.88	$1.83 \pm 0.14 \times 10^{-3}$

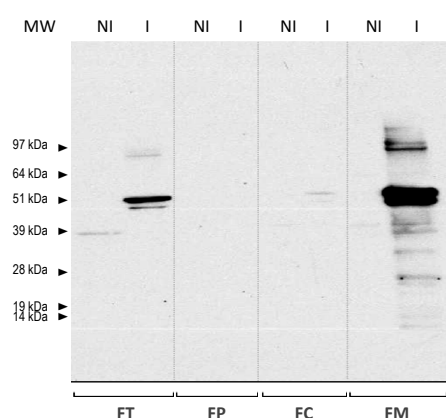
* Los resultados corresponden al valor promedio \pm desviación estándar desde tres experimentos independientes

4.12. Fraccionamiento celular. Localización subcelular

De acuerdo a los antecedentes estructurales teóricos para LMM-PBP4 de PAO1, a su proceso de maduración (translocación al espacio periplásmico y procesamiento de péptido señal N-terminal) y a las predicciones realizadas para su proteína homóloga “funcional” (PBP4) en el modelo *Escherichia coli*, respecto de la interacción de este tipo de D,D-peptidasa con la membrana interna, a través de una disposición estructural en hélice α (anfipática) para su extremo C-terminal, y a un mecanismo interactivo que implicaría, predominantemente, una asociación superficial débil de naturaleza electrostática, en contraste al mecanismo de anclaje para un ordenamiento en hélice α del extremo C-terminal en LMM-PBP5, definido por un gradiente de hidrofobicidad que facilitaría su penetración en orientación

oblicua hasta la región central de la membrana (Harris *et al.*, 2002; O'Daniel *et al.*, 2010), resultó relevante la profundización en la determinación de la ubicación subcelular de esta proteína, a partir de una metodología de fraccionamiento de compartimentos celulares basada en la generación de esferoplastos, que permite un estudio proteómico orientado al reconocimiento de la abundancia y localización de proteínas nativas o recombinantes (Thein *et al.*, 2010).

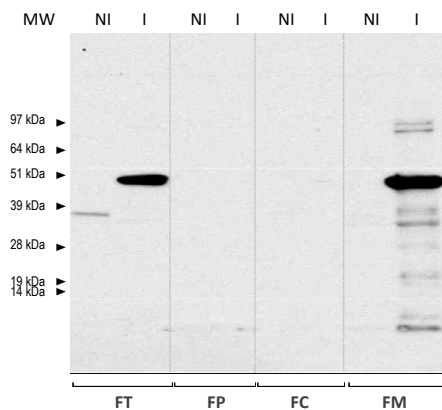
Los estudios de fraccionamiento celular, realizados sobre cepas transformantes de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo constructos recombinantes pET-PBP4HNC, pET-PBP4HN y pET-PBP4HC, y crecidas en situación de no inducción e inducción por IPTG, demuestran que la proteína de fusión a His-tag PBP4HNC, se presenta localizada, exclusivamente, en la fracción de membrana, en sus formas inmadura (proteína no procesada) y madura (proteína procesada), respectivamente. Es posible puntualizar, para PBP4HNC, que el anclaje a membrana para su forma no procesada, cuya cantidad parece ser levemente superior a la de su contraparte procesada, está determinado por la presencia de una secuencia peptídica de naturaleza hidrofóbica (péptido señal) en su extremo amino terminal; mientras que para la forma madura de esta proteína, se confirma un proceso de corte efectivo para esta secuencia señal, luego de su translocación al espacio periplásmico, y su permanencia en asociación a membrana (Figura 44). Para la proteína recombinante PBP4HN, la inmunodetección realizada a partir de las fracciones celulares recuperadas, revela su presencia solo en la fracción de membrana (Figura 45). El ensayo exhibe una señal concordante, en cuanto a abundancia y masa molecular, con un producto inmaduro-no procesado, una condición descrita en ensayos de sobreexpresión-purificación (Figura 25b), y particularmente, en un ensayo de unión a Bocillin™ FL utilizando extractos de proteínas de membrana preparados a partir de las estirpes transformantes antes mencionadas [pET-PBP4HNC/BL21(DE3), pET-PBP4HN/BL21(DE3), pET-PBP4HC/BL21(DE3) no inducidas y sometidas a inducción (IPTG)] (Figura 26), donde la unión a membrana está definida por la presencia de un péptido señal no procesado.



Clon pET-PBP4HNC/*E. coli* BL21(DE3)

Figura 44 | Fracciones celulares obtenidas desde la preparación de esferoplastos para constructo recombinante transformado PBP4HNC/BL21(DE3) en condiciones de inducción y no inducción. MW, *molecular weight* (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard), NI, no inducido; I, inducido; FT, fracción total; FP, fracción periplásmica; FC, fracción citoplasmática; FM, fracción membrana

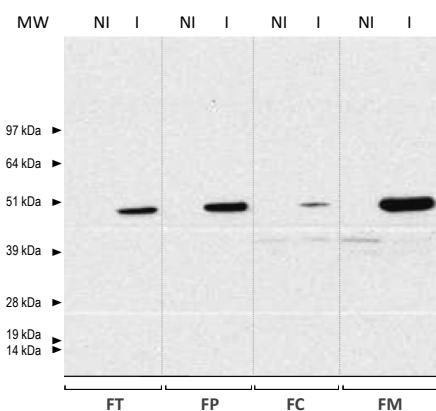
Resultados



Clon pET-PBP4HN/*E. coli* BL21(DE3)

Figura 45 | Fracciones celulares obtenidas desde la preparación de esferoplastos para constructo recombinante transformado PBP4HN/BL21(DE3) en condiciones de inducción y no inducción. MW, *molecular weight*, NI, no inducido; I, inducido; FT, fracción total; FP, fracción periplásmica; FC, fracción citoplasmática; FM, fracción membrana

En cuanto a los resultados obtenidos, desde los ensayos de fraccionamiento realizados para el clon recombinante pET-PBP4HC/BL21(DE3), es posible indicar la presencia de solo proteína en su conformación madura-procesada [demostrado por la masa molecular estimada para el producto de expresión obtenido, y a través de ensayos de purificación y afinidad por antibiótico fluorescente, previamente mencionados (Figura 25c y 26)], tanto en la fracción de membrana como en el espacio periplásmico (Figura 46). La intensidad de la señal quimioluminiscente, identificada para la fracción periplásmica, es suficientemente intensa para demostrar una cantidad adecuada de proteína soluble en este compartimento celular, sin superar la abundancia reconocida para la proteína insoluble asociada a membrana. La situación descrita para la proteína de fusión PBP4HC (diseño recombinante de mayor estabilidad y confiabilidad experimental para la totalidad de ensayos realizados durante esta investigación, lo que supone una alta proximidad a su organización fisiológica activa), comprueba la débil interacción entre esta LMM-PBP4 de PAO1 y la cara externa de la membrana interna, en el modelo bacteriano, condición que valida, el análisis realizado sobre el extremo carboxilo terminal de esta proteína (propiedades para 20 residuos aminoacídicos terminales) y que identifica mecanismos de interacción a membrana de naturaleza electrostática y por polaridad.



Clon pET-PBP4HC/*E. coli* BL21(DE3)

Figura 46 | Inmunodetección (*western blot*) a partir de fracciones celulares obtenidas desde la preparación de esferoplastos para constructo recombinante transformado PBP4HC/BL21(DE3) en condiciones de inducción y no inducción. MW, *molecular weight*, NI, no inducido; I, inducido; FT, fracción total; FP, fracción periplásmica; FC, fracción citoplasmática; FM, fracción membrana

La confirmación del resultado descrito para la localización subcelular de la proteína recombinante PBP4HC, sobreexpresada en el sistema bacteriano *Escherichia coli* BL21(DE3), fue ejecutada a través de la fusión del extremo C-terminal para LMM-PBP4 de PAO1 a una secuencia His-tag presente en un vector de expresión compatible con

Pseudomonas aeruginosa (sistema de amplio rango de hospedador pBTBxh-2 para la expresión regulada de genes inducibles por arabinosa) (Figuras 47 y 48), que permitió la sobreexpresión modulada de la proteína en este modelo bacteriano y su procesamiento por fraccionamiento celular; logrando, de esta manera, equilibrar las condiciones experimentales, para una adecuada interpretación.

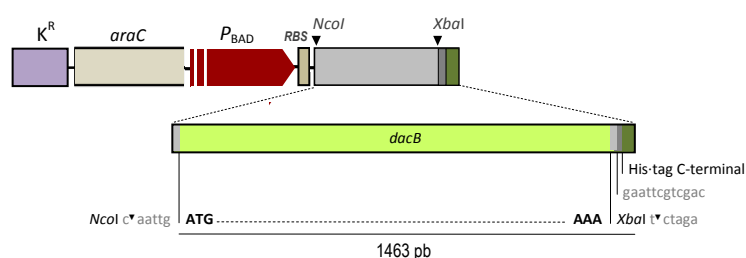


Figura 47 | Diseño de constructo recombinante fusionado a His-tag en extremo C-terminal (pBTBxh-PBP4HC) a partir de vector de expresión pBTBxh-2 inducible por arabinosa (promotor P_{BAD})

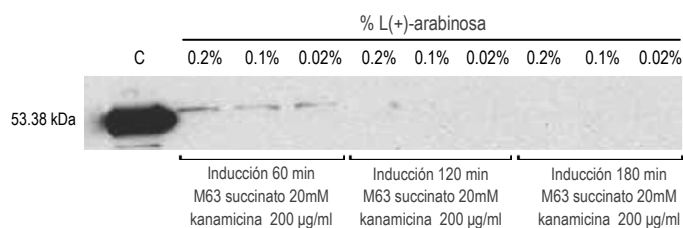


Figura 48 | Inmunodetección (*western blot*) para ensayo de inducción de clon recombinante pBTBxh-PBP4HC transformado en *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (*wild-type*). Se indican las condiciones de cultivo: medio mínimo M631X, succinato 20 mM y kanamicina 200 µg/ml. C, control de proteína purificada PBP4HC (masa molecular 53.38 kDa)

El ensayo de inmunodetección (*western blot*) para la proteína PBP4HC, sobreexpresada en el sistema bacteriano *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (cepa *wild-type*), permite corroborar la localización de esta proteína en el compartimento periplásmico y en fracción de membrana, además de su ausencia en la fracción citoplasmática recuperada (Figura 49). Una diferencia presentada, respecto del resultado obtenido en el modelo *Escherichia coli*, lo constituye la menor intensidad de señal demostrada para PBP4HC en el espacio periplásmico de *Pseudomonas aeruginosa*, lo que podría estar relacionado con el sistema de expresión utilizado; la expresión génica a partir de plásmidos conteniendo un regulador-promotor $araC$ - P_{BAD} , puede ser controlada por la concentración de inductor [L(+)-arabinosa] en el medio de cultivo (Guzman *et al.*, 1995). Evidentemente, el nivel de expresión alcanzado para el constructo recombinante pBTBxh-PBP4HC/UCBPP-PA14 (con una concentración de inductor de 0.2%), y demostrado mediante ensayos de inducción-*western blot* (Figura 48), es bastante menor al exhibido por el clon recombinante pET-PBP4HC/BL21(DE3) en pruebas similares (Figura 24c). A pesar de lo anterior, la ubicación de esta proteína, esencialmente asociada a membrana, pero también liberada al espacio periplásmico, es indudable, lo que constituye un antecedente nuevo y favorable, al argumento que la propone como potencial hidrolasa-autolisina de

Resultados

peptidoglicano, desarrollando sus actividades D,D-CPasa/D,D-EPasa (recientemente confirmadas) en procesos asociados a la maduración y el recambio-reciclaje de este polímero.

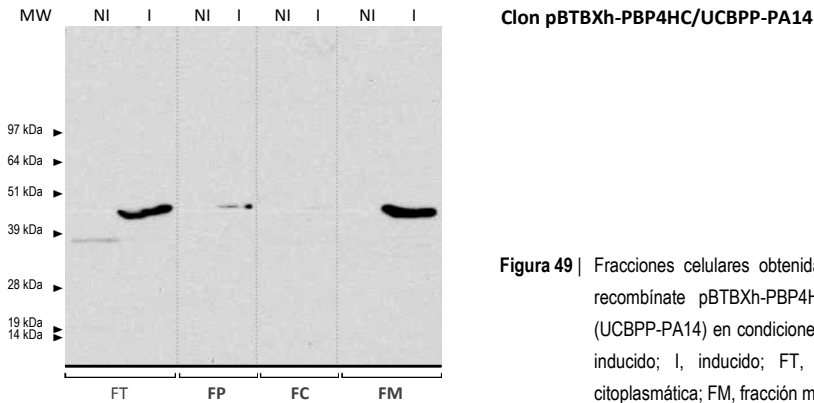


Figura 49 | Fracciones celulares obtenidas desde la preparación de esferoplastos para constructo recombinante pBTBXh-PBP4HC transformado en *Pseudomonas aeruginosa wild-type* (UCBPP-PA14) en condiciones de inducción y no inducción. MW, *molecular weight*, NI, no inducido; I, inducido; FT, fracción total; FP, fracción periplásmica; FC, fracción citoplasmática; FM, fracción membrana

4.13. Producción y purificación de anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1

Para el objetivo de desarrollar estudios de inmunolocalización, que permitan conocer el patrón de distribución celular de esta proteína (LMM-PBP4 de PAO1) durante el crecimiento bacteriano exponencial y en condiciones de estrés antibiótico, se genera la necesidad de contar con anticuerpos específicos anti-PBP4 (PAO1). La generación de anticuerpos policlonales de tipo IgG anti-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*, permitirá además, a través de la metodología de fraccionamiento celular, la inmunodetección para la localización subcelular de proteínas recombinantes PBP4NHC, PBP4HN y PBP4HC, expresadas en el sistema bacteriano *E. coli*, y del clon recombinante pBTBXh-PBP4HC, transformado y sometido a inducción en el modelo *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14.

Las pruebas de inmunodetección realizadas mediante *western blot* y orientadas a evaluar la presencia, pureza, especificidad y título de los anticuerpos policlonales generados frente a LMM-PBP4 de PAO1, revelan una respuesta positiva a la inmunización inicial (segundo paso de inmunización-primer refuerzo) en los modelos animales 1258A y 1260C (Figura 50). Luego de un cuarto paso de inmunización (tercer refuerzo), los animales fueron sacrificados y la totalidad del suero inmune recuperado. Los análisis efectuados determinan la presencia de una concentración importante de anticuerpos policlonales anti-PBP4 de tipo IgG (desarrollados en modelo animal conejo), con un buen nivel de pureza (Figura 51).

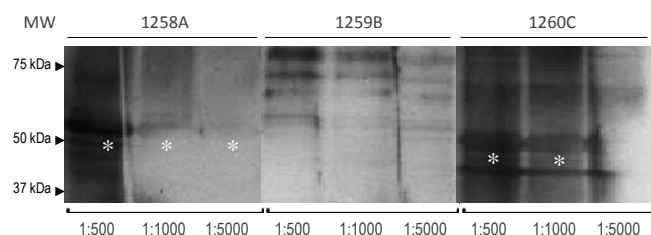


Figura 50 | Titulación de anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 (PAO1) recuperados desde sueros inmunes 1258A, 1259B y 1260C, luego de un segundo paso de inmunización (primer refuerzo), mediante inmunodetección (*western blot*). Se indican las diluciones realizadas (1:500, 1:1000 y 1:5000) y la reactividad positiva para los antisueros ensayados (asteriscos). MW, *molecular weight* (Precision Plus Protein™ All Blue Standards)

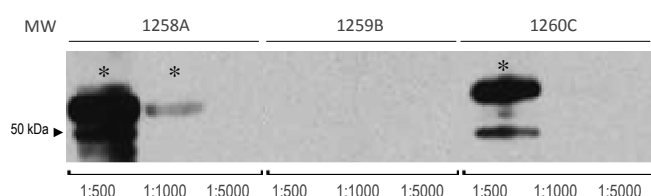


Figura 51 | Titulación de anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 (PAO1) recuperados desde sueros inmunes 1258A, 1259B y 1260C, luego de un cuarto paso de inmunización (tercer refuerzo), mediante inmunodetección (*western blot*). Se indican las diluciones realizadas (1:500, 1:1000 y 1:5000) y la reactividad positiva para los antisueros ensayados (asteriscos). MW, *molecular weight* (Precision Plus Protein™ All Blue Standards)

El ensayo de purificación de anticuerpos policlonales por cromatografía de afinidad, y particularmente, la aplicación de un protocolo de absorción para anticuerpos IgG anti-PBP4, utilizando contenido total de proteínas de membrana, derivadas desde una estirpe mutante de *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 incapaz de sintetizar LMM-PBP4 (PA14::*dacB*, mutante de inserción por transposición para el gen *dacB*), permitió eliminar, eficientemente, la probable reactividad cruzada de estos anticuerpos con otras LMM-PBPs. Lo anteriormente descrito, permite la obtención de anticuerpos policlonales con atributos de alta pureza y adecuada concentración, características que fueron valoradas desde un procedimiento de inmunodetección para proteína recombinante PBP4HC, empleando el producto purificado 1258A y 1260C (en diluciones 1:3000-1:2000) como anticuerpo primario dentro de un protocolo de *western blot*, reconociéndose una mejor detección durante la utilización de una dilución 1:3000 (Figura 52). La determinación de la concentración final para las dos series de anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 de PAO1 generados, se efectuó mediante lecturas de absorbancia a 280 nm, considerando el coeficiente de extinción molar y la masa molecular para IgG (Tabla 21).

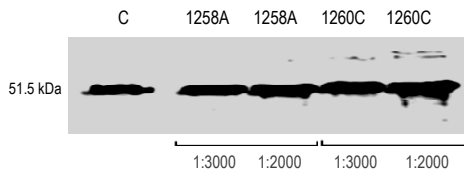


Figura 52 | Anticuerpos policlonales IgG anti-PBP4 (PAO1) purificados por afinidad y absorción, y utilizados como primer anticuerpo frente a proteína PBP4HC en ensayos de inmunodetección (anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a HRP). Se indican las diluciones estudiadas (1:3000-1:2000) para cada antisuero (1258A-1260C). C, control proteína purificada PBP4HC (51.5 kDa)

Tabla 21 | Concentraciones de anticuerpo policlonal purificado IgG anti-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1

Anticuerpo policlonal IgG anti-PBP4	Concentración (µg/ml)
Anticuerpo 1258A	159
Anticuerpo 1260C	169

4.14. Inmunolocalización de LMM-PBP4 en el modelo *Pseudomonas aeruginosa*

Experimentos clásicos para el reconocimiento de los procesos de síntesis y recambio de peptidoglicano, han involucrado el uso de precursores marcados, y han conducido a variados e importantes avances sobre el modo de generación de mureina en organismos de morfología bacilar. Un sistema diferente para identificar el lugar donde el peptidoglicano es sintetizado, sucede mediante la investigación de la localización celular para las principales enzimas que participan en este proceso, las *Penicillin-Binding Proteins* (PBPs) (Scheffers & Pinho, 2005). Previamente, en modelos bacilares *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, se han realizado estudios individuales de localización para HMM-PBPs asociadas a división celular, mediante ensayos de inmunofluorescencia y a través de fusiones a proteína fluorescente verde (GFP) (Scheffers *et al.*, 2004), sin embargo, existe información bastante limitada sobre el patrón posicional para LMM-PBPs clase C, una categoría de proteínas particularmente importante durante las etapas de separación celular, maduración y reciclaje de peptidoglicano. La realización de un primer estudio sistemático, orientado a precisar la localización de proteínas involucradas en la síntesis de pared celular para el modelo bacteriano *Bacillus subtilis*, y que incorporó un total de 11 proteínas implicadas en su crecimiento vegetativo, pertenecientes a las diferentes clases de PBPs (HMM-PBPs clase A y B, LMM-PBPs clase C) (Scheffers *et al.*, 2004), permitió evaluar nuestros resultados de inmunolocalización, a partir de los patrones de fluorescencia determinados para LMM-PBP4a, una PBP clase C con actividad D,D-CPasa, que presenta alta homología estructural con LMM-PBP4 de PAO1 (Figura 23, Tabla 8). Los ensayos de inmunolocalización para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*, ejecutados mediante protocolos de fijación, permeabilización e inmunomarcaje, utilizando anticuerpos policlonales específicos IgG anti-PBP4 (previamente sintetizados) y cepa bacteriana *wild-type* (*Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14), mutante de inserción generado por transposición (*Pseudomonas aeruginosa* PA14::*dacB*) y constructo recombinante pBTBXh-

PBP4HC/PA14::*dacB*), permitieron reconocer patrones posicionales similares a los confirmados para determinadas *Penicillin-Binding Proteins* en el modelo *Bacillus subtilis*.

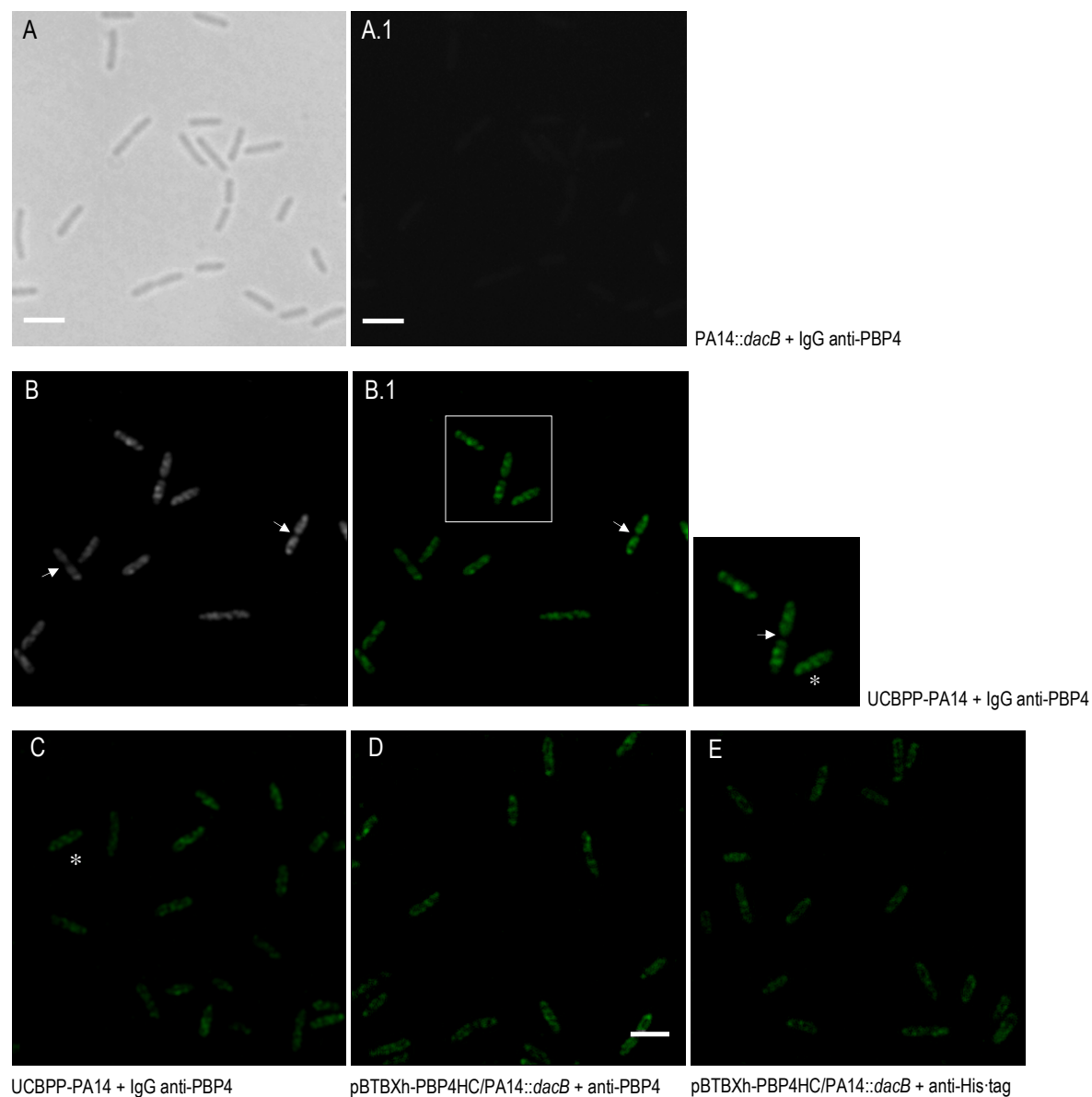


Figura 53 | Localización para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* (**A y A.1**) Imágenes de campo claro y microscopía de fluorescencia (inmunodetección utilizando anticuerpo primario IgG anti-PBP4) para estirpe mutante *Pseudomonas aeruginosa* PA14::*dacB* (control negativo) (**B, B.1 y C**) Inmunolocalización para LMM-PBP4 en cepa *wild-type* UCBPP-PA14, presentando focos de fluorescencia de naturaleza puntiforme (*spot-like pattern*) de distribución aleatoria y localización periférica (asteriscos). Flechas indican puntos de división celular (**D y E**) Patrón de fluorescencia en células complementadas expresando LMM-PBP4, reconocido mediante la utilización de anticuerpo policlonal IgG anti-PBP4 y anticuerpo primario IgG anti-histidina [His-probe (H-15): sc-803]. Todas las imágenes tienen el mismo aumento y la barra de escala es igual a 3 μm

Ensayos de inmunolocalización para LMM-PBP4, realizados sobre cepa *wild-type* UCBPP-PA14 y utilizando un anticuerpo primario de tipo IgG anti-PBP4, identifican tres situaciones destacables y que se relacionan con la falta de señal fluorescente en un sector celular determinado, el patrón puntiforme de localización adoptado por esta proteína y el planteamiento de su distribución celular en el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*. Con respecto al primer punto, nuestros resultados confirman la ausencia de esta proteína en el sitio de división celular (Figuras 53B, B.1), lo que implicaría la no conexión de esta LMM-PBP4 con proteínas septales (FtsZ) y del divisoma bacteriano, una característica compartida por su homólogo estructural LMM-PBP4a de *Bacillus subtilis*, al describirse un descenso en fluorescencia para el *septum* de división en células expresando la fusión GFP-PBP4a (Scheffers *et al.*, 2004).

Luego de reconocer una bifuncionalidad de tipo D,D-CPasa/D,D-EPasa, para nuestra proteína en estudio, resulta interesante reparar en la localización demostrada para LMM-PBP5 en el modelo *Escherichia coli*, la principal LMM-PBP clase C con actividad D,D-CPasa en esta bacteria, ya que recientemente se han descrito las razones que condicionan su ubicación en el sitio de división celular, y que explicarían además, su distribución en el espacio periplásmico. El estudio demuestra que PBP5 se posiciona en la pared celular cilíndrica, en sitios de división celular continua y en zonas nacientes de división previo a una constricción visible, y detalla los mecanismos que condicionan esta situación, vinculados a la localización de sustrato pentapeptídico (particularmente en sitios de síntesis activa de peptidoglicano, *septum* bacteriano), a una dependencia directa o indirecta con la proteína septal FtsZ y a una interacción con la cara externa de la membrana interna (dominio anfipático de anclaje a membrana C-terminal), permitiendo un acceso eficiente a su sustrato y un mejor desempeño funcional (Potluri *et al.*, 2010). Lo anteriormente descrito no es aplicable exactamente para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*, ya que esta proteína no es reconocida en el sitio de división, sin embargo, la funcionalidad D,D-CPasa para LMM-PBP4 de PAO1, la constatación experimental de que la localización de LMM-PBP5 en *E. coli* es dependiente de la presencia de sustrato pentapéptido, y el modo disperso en que se describe la inserción de nuevas unidades pentapeptídicas en el PG para la porción cilíndrica de la célula [propuesta de nuevo sistema de crecimiento celular, regulado por la arquitectura del peptidoglicano, donde la incorporación sucedería en zonas de alta porosidad (arquitectura permisiva)] (Potluri *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2013), permite explicar el patrón puntiforme (*spot-like pattern*) de la señal de fluorescencia identificada para LMM-PBP4 [Figuras 53B.1 y 53C (asteriscos)]. Este patrón fluorescente de localización (indicativo de una reacción antígeno-anticuerpo positiva y, por lo tanto, de la presencia de la proteína en estudio en un *spot* particular), corresponde a un modelo posicional diferente al descrito para HMM-PBPs, y muy poco reconocido dentro la categoría de LMM-PBPs, con focos de fluorescencia distribuidos alrededor de la célula, y que presentan una tendencia hacia una posición periférica (lateral), sin presentar una abundancia sobresaliente en un sector específico de la célula. HMM-PBP3 (PBP clase B con función transpeptidasa) y LMM-PBP4a (PBP clase C con actividad D,D-CPasa), corresponden a las proteínas del modelo bacteriano *Bacillus subtilis*, que han sido identificadas adoptando un patrón de localización granular sin enriquecimiento en el sitio de división (Scheffers *et al.*, 2004), con una distribución muy similar a la presente en nuestros resultados (Figura 54). Esta semejanza posicional entre proteínas funcionalmente y estructuralmente relacionadas (PBP4a de *B. subtilis* y PBP4 de PAO1), implica una

correspondencia que da una consistencia significativa a los resultados obtenidos, además de validar un aspecto experimental muy importante, relacionado con el buen desempeño de la metodología de inmunolocalización utilizada en nuestros ensayos, frente a los resultados obtenidos en la expresión celular de proteínas fusionadas a GFP (proteína fluorescente verde) en *Bacillus subtilis*. Esto último es relevante, ya que existe una tendencia a considerar que el inmunomarcaje con anticuerpos primario y secundario, es un procedimiento de localización de menor sensibilidad respecto de métodos basados en la visualización de fluorescencia producida por proteínas fusionadas a GFP en células vivas, circunstancia que solo ha sido demostrada en casos donde el protocolo de fijación ha alterado o destruido los patrones de localización de proteínas relacionadas al divisoma (Peters *et al.*, 2007; Tarry *et al.*, 2009).

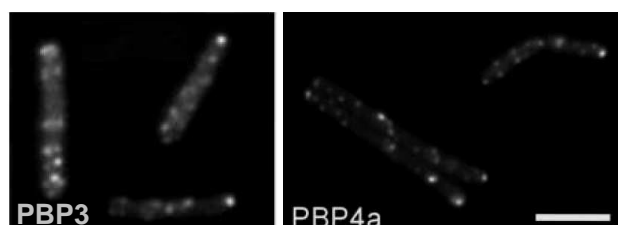


Figura 54 | Localización para HMM-PBP3 (PBP clase B, D,D-transpeptidasa) y LMM-PBP4a (D,D-carboxipeptidasa). Micrografías de fluorescencia para células expresando GFP-PBP3 y GFP-PBP4, respectivamente. La barra de escala es equivalente a 5 μm (Scheffers *et al.*, 2004)

Los estudios de inmunolocalización para estirpe mutante (PA14::*dacB*) expresando la proteína PBP4HC ectópicamente desde el vector pBTB-Xh2 (pBTBXh-PBP4HC/PA14::*dacB*), comprueban la detección directa de LMM-PBP4 en este sistema, mediante el uso de anticuerpo policlonal IgG anti-PBP4, y de un modo indirecto, a través de la utilidad de la fusión a secuencia His-tag y el uso de un anticuerpo comercial IgG anti-histidina [His-probe(H-15) sc:803]. Los resultados permiten evaluar positivamente ambos sistemas de detección, destacando la especificidad del anticuerpo policlonal anti-PBP4 generado para este propósito, y el buen desempeño del sistema de expresión antes mencionado, además de destacar el efecto de complementariedad que estos ensayos pretendían demostrar (Figuras 53D y 53E).

Experimentos efectuados con la finalidad de investigar el efecto de sustratos antibióticos sobre la localización de LMM-PBP4 en cepa *wild-type* de *Pseudomonas aeruginosa* (UCBPP-PA14), no revelaron cambios en el patrón fluorescente que define la propuesta posicional para esta proteína. Los ensayos de inmunomarcaje, ejecutados a partir de cultivos bacterianos tratados con cefoxitina e imipenem, no presentaron resultados apropiados para un análisis más preciso del tercer y último aspecto en este estudio de inmunolocalización, y que corresponde a la propuesta de distribución celular que sucede en *Pseudomonas aeruginosa* para el patrón fluorescente en *spots* de LMM-PBP4 que ha sido reconocido, sin embargo, las pruebas realizadas con ceftazidima y especialmente los resultados obtenidos con aztreonam, favorecieron éste último objetivo. Ceftazidima y aztreonam corresponden a antibióticos β -lactámicos con alta afinidad por HMM-PBP3 en *Pseudomonas aeruginosa* (ceftazidima presenta alta

afinidad por HMM-PBP3 y HMM-PBP1a, en este orden), una propiedad demostrada por sus bajos índices de inhibición IC_{50} (Moyá, *et al.*, 2010; Moyá *et al.*; 2012). La inactivación de esta proteína impide el proceso de división celular, favoreciendo la generación de células alargadas (filamentación bacteriana). Desde las imágenes recuperadas para estos ensayos, se destaca un ordenamiento disperso y cercano a la pared celular lateral del patrón puntiforme de fluorescencia establecido, distinguiéndose una ubicación alternante entre los *spots* de cada pared lateral, que genera un efecto helicoidal en la célula completa (Figuras 55A, 55A.1, 55B y 55B.1, recuadros), una situación que ha sido reconocida en proteínas de *Bacillus subtilis*. El ordenamiento del patrón fluorescentes para PBP3 y PBP4a (*Bacillus subtilis*), se asemeja fuertemente al patrón de localización previamente observado para las proteínas del citoesqueleto MreB y Mbl (proteínas homólogas a actina, organizadas a modo de parches de longitud variable, perpendiculares al eje longitudinal de la célula y con movilidad bidireccional). La reconstrucción tridimensional de la señal fluorescente para GFP-PBP3 y GFP-PBP4a, individualmente y en combinación, demostró la presencia de cortos arcos en la periferia celular, sin llegar a adoptar una conformación helicoidal completa para la circunferencia celular. Inicialmente se pensó, en la posibilidad de que PBP3 y PBP4a pudieran colocalizarse, parcialmente, con la proteína Mbl (necesaria para la inserción helicoidal de precursores de PG en la pared lateral), no obstante, en ensayos con cepas *knock-out* para *mbl*, PBP3 y PBP4a no mostraron cambios en su localización (situación similar demostrada en una cepa carente de MreB), manteniéndose ubicadas a lo largo de la pared lateral, lo que excluye la posibilidad de que desarrollen una trayectoria asociada al citoesqueleto bacteriano interno. Finalmente, las pruebas de inhibición por bacitracina para la síntesis de precursores de PG, eliminaron el modelo de disposición helicoidal, sin afectar la localización de GFP-PBP3 y GFP-PBP4a (Scheffers *et al.*, 2004). La señal que recluta a las proteínas PBP3-PBP4a en *Bacillus subtilis*, en dirección a su pared lateral, permanece aún sin conocerse, sólo se ha hipotetizado que PBP3 y PBP4a parecen localizarse exclusivamente en la pared celular lateral, siendo activamente dirigidas hacia esa ubicación. El planteamiento experimental antes descrito para PBP3 y PBP4a en *B. subtilis*, no ha sido ejecutado para PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*, formando parte, sin duda, de las proyecciones que genera esta primera aproximación a la localización de LMM-PBP4 en su modelo bacteriano.

Las imágenes de fluorescencia, capturadas desde células tratadas con el antibiótico β -lactámico aztreonam, muestran un efecto relacionado con la afinidad del antibiótico por PBP3 y la inhibición de su actividad. En *E. coli* se ha demostrado que la presencia de aztreonam detiene la actividad de HMM-PBP3, pero permite que la proteína permanezca en el punto medio de la célula por al menos 2 generaciones, luego de lo cual, un pequeño porcentaje celular desarrolla puntos de división (divisomas) en posiciones comprendidas entre el primer y el tercer cuarto (1/4-3/4) del cuerpo celular filamentado. La estabilización de PBP3 en presencia de inhibidor, no es una característica exclusiva de esta proteína, sino que corresponde a una propiedad demostrada para FtsZ y FtsW, que probablemente esté integrada en la totalidad de proteínas que forman parte de la maquinaria de división celular (Den Blaauwen *et al.*, 2003; Potluri *et al.*, 2010). Nuestros resultados muestran la generación de este efecto, luego del contacto con antibiótico aztreonam por 75 minutos (tiempo requerido para un doblaje de masa en medio mínimo), identificándose puntos nuevos de división sin señal fluorescente en las posiciones descritas y para un reducido número de células

(Figura 55A.1, flechas). Lo descrito anteriormente, ratifica la no participación de LMM-PBP4 de *P. aeruginosa* como componente del sistema proteico de división bacteriana.

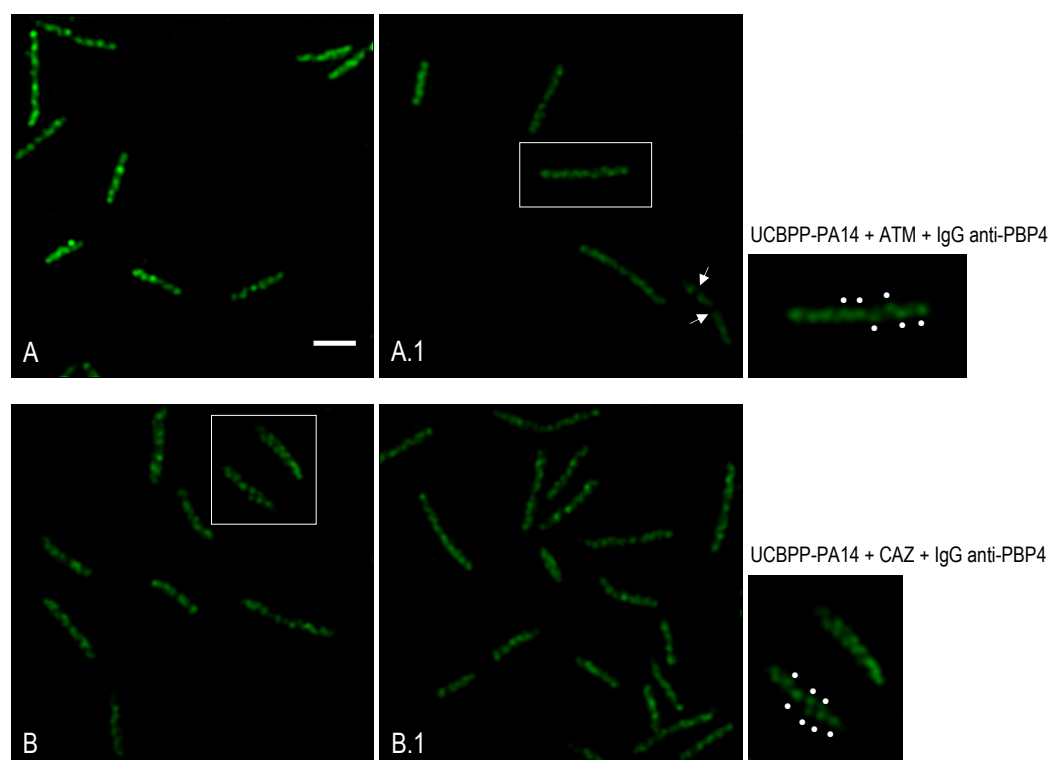


Figura 55 | (A y A.1) Inmunolocalización para LMM-PBP4 en cepa *wild-type* UCBPP-PA14 luego de su crecimiento en medio mínimo (M63 suplementado) y en presencia de antibiótico β -lactámico aztreonam (un doblaje de masa); flechas indican nuevos puntos de división. Un imagen levemente ampliada demuestra un patrón de fluorescencia en *spots* de localización lateral (el ordenamiento adoptado por los *spots* de fluorescencia se señala mediante puntos de color blanco) **(B y B.1)** Localización para LMM-PBP4 en cepa de referencia UCBPP-PA14 luego de su crecimiento (una generación) en medio mínimo M63 suplementado, y en presencia de antibiótico β -lactámico ceftazidima. Imagen ampliada muestra focos de fluorescencia en disposición periférica. Todas las imágenes tienen el mismo aumento y la barra de escala es equivalente a 3 μ m

4.15. Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Identificación de secuencias aminoacídicas con estructura conocida y de mayor similitud para modelado bioinformático

A pesar de haber efectuado el diseño, clonaje y purificación de 3 fusiones diferentes para la proteína en estudio, además del trabajo realizado con una variante truncada (sin péptido señal), del rendimiento aceptable en términos de concentración y pureza del producto recombinante, del tratamiento realizado para eliminar posibles interferencias asociadas a la presencia de secuencias His-tag (digestión con proteasa TEV) y de los ensayos de estabilidad utilizando muropéptidos purificados, no fue posible lograr el desarrollo de un cristal que permita, a través de un proceso de difracción, determinar la estructura de LMM-PBP4 en PAO1 a un nivel atómico de resolución. La

Resultados

colaboración entre nuestro laboratorio y el Departamento de Cristalografía y Biología Estructural (IQFR-CSIC), permitirá la continuación de este trabajo, realizando nuevas aproximaciones experimentales orientadas a la generación de condiciones cristalográficas adecuadas para esta proteína y nuevos representantes de naturaleza insoluble que nuestro grupo ha trabajado, y de los cuales se desconoce su estructura molecular. Por lo anterior, hemos optado por realizar un análisis bioinformático para determinar la estructura tridimensional de LMM-PBP4 (PAO1), a través de un proceso de modelado por homología, utilizando como referencia la secuencia y estructura cristalográfica de LMM-PBP4a de *Bacillus subtilis* (cepa 168). La etapa inicial de reconocimiento de la(s) secuencia(s) aminoacídica(s) para proteína(s) con estructura conocida, de mayor similitud a la secuencia de consulta (número de acceso Q9HZG1) y depositada(s) en repositorio de dominio público UniProtKB/Swiss-Prot, se desarrolló a través del programa de alineamiento WU-BLAST2, e identificó 4 secuencias aminoacídicas de proteínas estructuralmente relacionadas: PBP4a de *Bacillus subtilis* cepa 168 (nombre de entrada DACC_BACSbU, número de acceso P39844), D,D-Peptidasa de *Actinomadura* sp. cepa R39 (DAC_ACTSP, P39045), PBP4 de *Haemophilus influenzae* (DACB_HAEIN, P45161) y PBP4 de *Escherichia coli* cepa K-12 (DACB_ECOLI, P24228), respectivamente (Figura 56). El score mal alto obtenido fue de 368, para la secuencia de PBP4a de *B. subtilis*, que presentó además un porcentaje de identidad de 27% (Figura 57), una situación que ratifica la descripción previamente realizada sobre la homología establecida entre secuencias ortólogas (Figura 23, Tabla 9).

Query= Q9HZG1_PSEAE (476 letters)			
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Probability P(N)	N
SP:DACC_BACSU P39844 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase ...	368	1.1e-33	1
SP:DAC_ACTSP P39045 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase O...	362	6.6e-33	1
SP:DACB_HAEIN P45161 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase ...	339	1.3e-30	1
SP:DACB_ECOLI P24228 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase ...	338	1.6e-30	1
SP:PSCA_DICDI Q86I79 Penicillin-sensitive carboxypeptidas...	227	9.3e-16	1
SP:CITD_HAEIN P44461 Citrate lyase acyl carrier protein O...	72	0.24	1
SP:CITD_HAEI8 Q4QPM0 Citrate lyase acyl carrier protein O...	69	0.44	1
SP:CITD_HAEIG A5UFJ6 Citrate lyase acyl carrier protein O...	69	0.44	1
SP:H11_CAEEL P10771 Histone H1.1 OS=Caenorhabditis elegan...	86	0.54	1
SP:HRPA_PSESY Q52420 Hrp pili protein HrpA OS=Pseudomonas...	67	0.76	2
SP:UBIC_CHRSO Q1QSG3 Probable chorismate--pyruvate lyase ...	80	0.94	1
SP:ARGC_LEIXX Q6AGD3 N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate re...	80	0.9999	1
SP:CITD_HAEIE A5UBB4 Citrate lyase acyl carrier protein O...	65	0.99991	1

Figura 56 | Identificación de secuencia aminoacídica con estructura conocida y de mayor similitud a LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* para simulación bioinformática, mediante la aplicación WU-BLAST2 frente a la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot. Q9HZG1, número de acceso en base de datos UniProtKB para secuencia de consulta (*query*) correspondiente a probable D-alanina-D-alanina carboxipeptidasa (LMM-PBP4 de PAO1)


```

>SP:DACC_BACSU P39844 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase Dacc OS=Bacillus
subtilis (strain 168) GN=dacc PE=1 SV=1
Length = 491

Score = 368 (134.6 bits), Expect = 1.1e-33, P = 1.1e-33, Group = 1
Identities = 113/410 (27%), Positives = 199/410 (48%)

Query:   62 YNADVSVNPASTMKLFTTYAAEMLGPTYQWKTEFYTDGQLKNGVLNGNLYLKGGDPKL 121
      ++ D + PAS++KL T AAL +LG Y + TE TDG LK  LNGNLYLKG GDP L
Sbjct:   71 HSGDTRMRPASSSLLLTAAALSVLGENYSFTTEVRTDGLKGGKLNGLYKGGKDPTL 130

Query:   122 NMEKLLWLMRDLRANGVTKVTGDLVLDRSYFN----IPQLPVFNDDG---GDDTKPFLVG 174
      + L + +G+V + G+L+ D ++ + P +P ++D+ G
Sbjct:   131 LPSDFDKMAEILKHSGKVIKGNLIGDDTWHDDMRLSPDMP-WSDEYTYYGAPISALTAS 189

Query:   175 PDSLLVNLKSVRMVV---RTDGNKVNVQMDPPLANVRIDNQVKMTAPATCPAWPKLRFSP 231
      P+ + + +V + V + +G + V + P + I N K TA + +
Sbjct:   190 PNEDY-DAGTVIVEVTPNQKEGEEPAVSVSPKTDYITIKNDAKTTAAGS-----EKDLT 242

Query:   232 VTQFDGT-TLLATGQIPOGCS-AQTYSLLDHPGYTAGAVRGIWQELGGSILGKDROGSV 289
      + + GT T+ G +P + + ++S+ + GY + + + G + + G
Sbjct:   243 IEREHGNTNTITIEGSPVVDANKTKEWISVWEPAGYALDLFKQSLKKQGITVKGDIKTGEA 302

Query:   290 PRNATLIAKAFSPDLVEIIRDINKYSNNTMARQLFLSIGAQFRNSADGDDAQAQRVVRQ 349
      P ++ ++ S L ++ K SNN A L +G +G + + + V+
Sbjct:   303 PSSSDVLLSHRSMPLSKLFVPMKLSNNGHAEVLVKEMGKV--KKGEGSWEKGLG-VLNS 359

Query:   350 WLARKGITAPRLVMENSGLSRQERVSAREMAAMLQAAWHSPYAAEYISSLPLAG----- 404
      L G+ + LV+ +GSG+S + VS+ +++ +L + + Y++SLP+AG
Sbjct:   360 TLPEFGVDSKSLVLRDGSISHIDAVSSDQLSQLLYDIQDQSWFSAYLNSLPVAGNPDRM 419

Query:   405 LDGTMKRRLRRTALVGEAHVKTGTLNTVRALAGFSRSDASGHNVVAILN 454
      + GT+R R++ T G+ KTG+L+TV +L+G++ SG V +LN
Sbjct:   420 VGGTLRNRMGTPAQGKVRKTGSLSTVSSLSGYAETKSGKLVFSILLN 469

```

Figura 57 | Alineamiento entre la secuencia *query* Q9HZG1 (Q9HZG1_PSEAE) y la secuencia *subject* P39844 (DACC_BACSU), que presentó el mayor score para la búsqueda realizada. P39844, corresponde al número de acceso en base de datos (UniProtKB), para la secuencia aminoacídica de la proteína LMM-PBP4a en el modelo *Bacillus subtilis* (cepa 168). Se destacan en recuadros de color rojo los motivos conservados SxxK, SxN y KTG, en ambas proteínas

4.16. Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Modelado bioinformático por homología

El alineamiento entre la secuencia Q9HZG1 y la estructura PDB 2J9P (estructura cristalográfica para PBP4a de *B. subtilis*) mediante la aplicación Phyre2 v2.0 y la determinación de las coordenadas para esta simulación a través del servidor SWISS-MODEL, generaron un modelo estructural para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1, que presentó parámetros de calidad global QMEAN4 *raw score* 0.525 y QMEAN4 *Z-score* -4.04, valores ubicados en la categoría de aceptables para predicciones bioinformáticos estructurales basadas en homología (Tabla 22).

Tabla 22 | Parámetros de calidad del modelo por homología para LMM-PBP4 de PAO1 mediante aplicación QMEAN (QMEAN4 *global scores*)

Scoring function term	Raw score	Z-score
C_beta interaction energy	-89.60	-1.07
All-atom pairwise energy	-6174.63	-1.87
Solvation energy	-10.32	-2.58
Torsion angle energy	-54.83	-2.87
QMEAN4 score	0.525	-4.04

La optimización de su geometría mediante minimización energética y su representación a través del sistema gráfico PyMOL (v1.6), define finalmente la imagen para la simulación por homología de la proteína LMM-PBP4 de PAO1 (Figura 58a, 58b), en la que es posible distinguir claramente los tres módulos (dominios) que la definen como LMM-PBP clase C subclase C1. Como en el caso de sus homólogos estructurales PBP4a de *Bacillus subtilis*,

D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39 y su homólogo funcional PBP4 de *Escherichia coli* (proteína dimérica), para la unidad monomérica de LMM-PBP4 en *Pseudomonas aeruginosa* O1, se confirma la presencia de un inserto de 213 aminoácidos que constituye los dominios II y III (con el dominio III contenido en el dominio II), y que se encuentra flanqueado por hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ del dominio I. La longitud de este inserto es menor a la reconocida en PBP4 de *E. coli* (218 aminoácidos), PBP4a de *B. subtilis* (221 aminoácidos) y D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39 (229 aminoácidos). Los 3 dominios estructurales de LMM-PBP4 (PAO1), presentan una orientación relativa muy similar a la que ha sido descrita para sus proteínas homólogas, exhibiendo, cada uno de ellos, ordenamientos en láminas β que se disponen en ángulo recto (aproximado) con respecto a las del siguiente dominio (Sauvage *et al.*, 2005; Kishida *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2007).

El dominio I (dominio PB) se encuentra constituido por un conjunto de 5 láminas β , en orientaciones antiparalelas, y cubiertas desde ambos lados por un total de 8 hélices α ; un planteamiento estructural que ha sido reconocido en todas las *Penicillin-Binding Proteins* y serina β -lactamasas, conteniendo además, los extremos terminales amino y carboxilo de la proteína, ubicados muy próximamente. El modelo tridimensional, diseñado desde los residuos A26-K476, y que por lo tanto, no incluye un primer ordenamiento en hélice α correspondiente a la secuencia señal amino terminal (M1-A22), permite identificar un primer segmento del dominio I ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 2$), que contiene a la serina catalítica (S72) de la secuencia STMK en un plegamiento hélice $\alpha 2$, y un segmento posterior, con una organización $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ y $\alpha 8$, muy similar a la demostrada en la predicción efectuada para la estructura secundaria (Figura 21), y que confirma las localizaciones para la segunda secuencia conservada SNN, ubicada en un *loop* entre hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$, y para el motivo KTG, en lámina $\beta 2$. La estructura secundaria para este segmento 2 en el dominio I, define una disposición en láminas $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$, que difiere de lo resuelto desde el modelo por homología, debido a que $\beta 3$ (residuos V432-A436) se presenta dividida por un residuo G437, generando una lámina $\beta 4$ menor (residuos F438-R440) que antecede a una lámina $\beta 5$ terminal.

Del mismo modo que PBP4a de *B. subtilis* y D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39, el dominio II para LMM-PBP4 de PAO1 (residuos 91-180 y 258-303), contiene 5 láminas β y 2 hélices α , con un ordenamiento paralelo entre $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 5$, y una lámina $\beta 1$ antiparalela. La lámina $\beta 2$ es seguida por hélice $\alpha 1$, mientras que $\beta 3$ es continuada por hélice $\alpha 2$; por lo tanto, la organización tridimensional del subdominio formado por $\beta 2$ - $\alpha 1$ - $\beta 3$ - $\alpha 2$ - $\beta 4$, se corresponde con un plegamiento de Rossmann. Como en PBP4a de *B. subtilis* (*loop* entre residuos 130-156) y D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39 (*loop* entre aminoácidos 126-153), un extenso *loop* se extiende desde los residuos R149-V185 (longitud superior a la informada preliminarmente desde el análisis de estructura secundaria), sobre el dominio de unión a penicilina, con residuos N161, D162 y L179, siendo parte integral de un bolsillo específico en el sitio activo. En la cara posterior del dominio II, opuesta a la superficie de contacto con el dominio de unión a penicilina, tres residuos de lisina y cuatro de arginina (K103, R131, R134, K140, R291, K298, R332) sobresalen desde el centro de la proteína y exponen un área cargada positivamente (Figura 59b), determinando un mecanismo de unión a membrana interna, que representa una alternativa a las interacciones electrostáticas y por polaridad, definidas para el extremo carboxilo terminal en esta proteína. Sobre esto último, es importante precisar, que una situación mucho más evidente

se describe para el dominio II de PBP4a, con 7 residuos de lisina (K83, K85, K86, K114, K119, K122, K165) ubicados muy próximamente (Sauvage *et al.*, 2007). Debido a la variabilidad entre las secuencias para LMM-PBPs clase C (subclase C1) en esta región, una zona positiva puede incluir otros residuos cargados, como sucede en D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39, con 4 residuos de arginina y un residuo de lisina (R81, R82, R116, R119, K261), definiendo una superficie similar (Sauvage *et al.*, 2005). La exposición de residuos de esta naturaleza, no ha sido reconocida para PBP4 en el sistema bacteriano *Escherichia coli*.

El modelo estructural para el dominio III (residuos 181-257), un subdominio insertado en el dominio II, demuestra estar integrado por una unidad de 5 láminas β orientadas de modo antiparalelo, en donde la organización $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ se presenta separada de $\beta 4$, $\beta 5$, por un *loop* de longitud considerable (N212-V231). Se confirman diferencias importantes entre este dominio y los equivalentes para las proteínas PBP4a y D,D-Peptidasa, en las que se define un dominio III constituido por un total de 6 láminas β antiparalelas, con longitudes superiores (6-12 residuos formando lámina β en dominio III de PBP4a, contra 4-5 residuos formando lámina β en proteína modelada) y conectadas por cortos *loops*; entre los residuos Q245-C250, se advierte un breve ordenamiento en hélice α . La menor cantidad y reducida longitud de láminas β , la presencia de un *loop* con una extensión de 19 residuos y un breve ordenamiento en hélice α , condiciona una arquitectura de menor rigidez y con diferencias destacables, particularmente, con la descripción realizada para la organización del dominio III en D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39. Se concluye además, que el *loop* conector entre láminas $\beta 3$ - $\beta 4$ del dominio III, forma parte integral de la superficie de entrada al sitio activo de la proteína (Figura 58b).

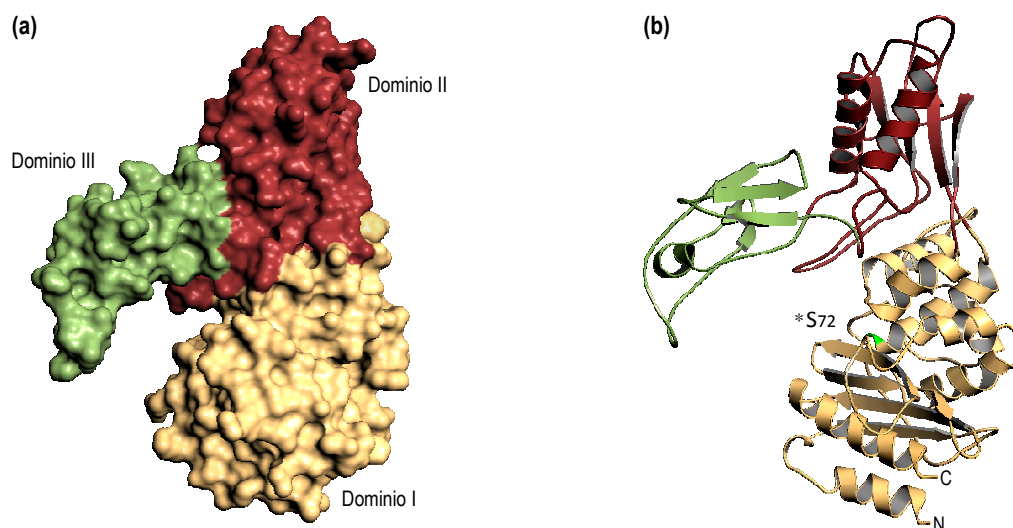


Figura 58 | (a) Modelado por homología para monómero de LMM-PBP4 en PAO1 (representación en superficie). Los diferentes dominios son presentados en color marrón (dominio I, PB), rojo (dominio II) y verde (dominio III) (b) Modelo tridimensional para LMM-PBP4 de PAO1 destacando la organización estructural secundaria mediante hélices α , láminas β y *loops*. Se indica en color verde la posición para el residuo S72 (serina catalítica) en el dominio I, además de los extremos amino y carboxilo terminal

El sitio activo de la proteína está localizado en el dominio I, en la interfaz entre 5 láminas β y un grupo de hélices α . Se encuentra constituido por el segmento inicial de hélice $\alpha 2$ (S72-K75), que integra la secuencia STMK [que a su vez incluye la serina catalítica en posición 72 (*S72)], la cadena lateral de una lámina $\beta 2$ (V424-L429) que contiene el motivo conservado KTG, y un pequeño *loop* que conecta hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ (Y314-N317), y que incorpora una tercera secuencia conservada SNN (Figura 59a). Dos segmentos (Q156-D167 y D176-V180) del dominio II, constitutivos de un extenso *loop* ubicado entre láminas $\beta 3$ (dominio II) y $\beta 1$ (dominio III), además de residuos del dominio I S367-L369, T428-T431, W459-G460 (formando parte de *loops* entre $\alpha 5$ - $\alpha 6$, $\beta 2$ - $\beta 3$ y hélice $\alpha 8$), de la secuencia L402-R412 (integrando un *loop* ubicado entre $\alpha 7$ - $\beta 2$) y de un residuo Y314, definen los límites superiores y laterales para las secuencias conservadas y constitutivas del sitio catalítico. Adicionalmente, una secuencia A219-R228, localizada en un *loop* entre láminas $\beta 3$ - $\beta 4$ (III), y residuos A252-S257 componiendo un nuevo *loop* entre lámina $\beta 5$ (III) y hélice $\alpha 2$ (II), determinan el techo de una cavidad que comunica, en profundidad, hacia la serina catalítica interior. Esta hendidura en forma de U en la superficie de la proteína, generada a través de la organización estructural del conjunto de residuos antes mencionados, posee dimensiones estimadas (24.6 Å de profundidad, 19.6 Å de amplitud y 16.8 Å de altura) (Figura 60b) de profundidad y amplitud, muy cercanas a las descritas para la hendidura del sitio activo en su homólogo funcional PBP4 de *E. coli* (20Å de profundidad, 15Å de amplitud) (Kishida *et al.*, 2006). Esto último, favorecería el acceso de moléculas pequeñas (antibióticos) y sustratos de mayor longitud, una situación ya descrita en otros miembros de esta subclase de proteínas. La simulación molecular para el acoplamiento de un sustrato pentapeptídico mimético AMV-L-Ala-FGA- L-Lys-D-Ala-D-Ala, en la cavidad del sitio activo para LMM-PBP4 de PAO1 (Figura 60a), valida su capacidad (espaciosidad) y tolerancia por ligandos de mayor tamaño, siendo un precedente que sustenta, constitutivamente, el reconocimiento de una actividad de tipo D,D-EPasa en esta proteína. Nuestro modelo tridimensional destaca la orientación y el ordenamiento de residuos del dominio III en la entrada de la hendidura al sitio activo, lo que parece reforzar la idea acerca de la funcionalidad de este dominio en el control estérico para el acceso del sustrato, una competencia que no ha sido confirmada pero sí deducida para la proteína homóloga trimodular PBP4 de *E. coli* (Kishida *et al.*, 2006).

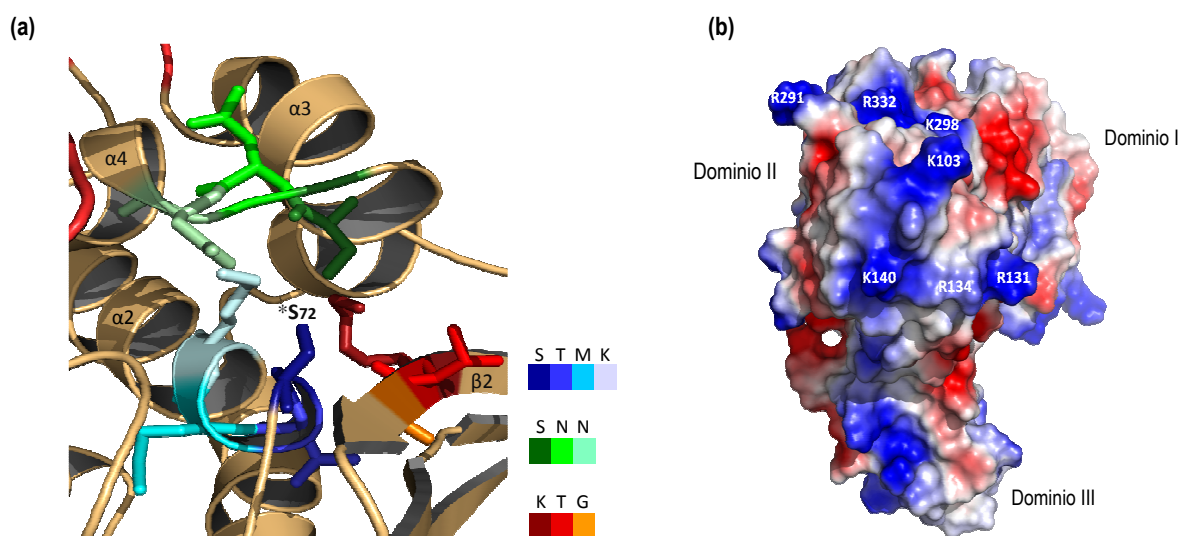


Figura 59 | (a) Dominio PB y motivos conservados en el sitio activo de LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1. Para la primera secuencia conservada SxxK, los residuos aminoacídicos *STMK están representados por una coloración azul intensa, azul, cian y celeste, respectivamente, y ubicados al inicio de una hélice $\alpha 2$. Un gradiente de colores derivados del verde ha sido utilizado para representar a la segunda secuencia conservada SxN (SNN), ubicada en un corto *loop* entre $\alpha 3$ - $\alpha 4$. Tonalidades rojo oscuro, rojo y naranja, representan los residuos aminoacídicos que definen el tercer motivo conservado KTG, y que forma parte de un ordenamiento en lámina β ($\beta 2$). Se indican los motivos conservados y la coloración asignada para su interpretación en el modelo (b) Potencial electrostático (rojo, carga negativa; azul, carga positiva) para LMM-PBP4 de PAO1, demostrando una superficie básica en el dominio II. Se identifican los residuos aminoacídicos expuestos y con carga positiva (R131, R134, R291, R332, K103, K140, K298), además de la disposición para los dominios I, II, III y el sitio activo de la proteína

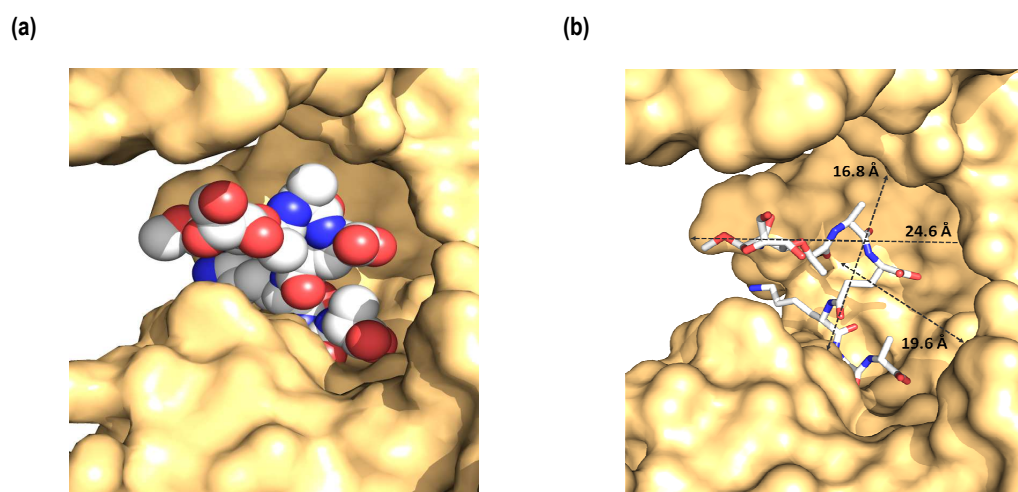


Figura 60 | (a) Representación en superficie para la cavidad del sitio activo y la disposición del sustrato mimético AMV-L-Ala-FGA-L-Lys-D-Ala-D-Ala (representación en esferas; átomos de carbono se presentan en color gris, átomos de oxígeno en color rojo y átomos de nitrógeno en color azul) (b) Ubicación para el péptido sintético AMV-L-Ala-FGA-L-Lys-D-Ala-D-Ala (representación lineal) dentro del sitio activo modelado para LMM-PBP4 de PAO1, indicándose las distancias estimadas para profundidad, altura y amplitud en esta cavidad

La simulación estructural para LMM-PBP4 de PAO1, por su condición predictiva, no permite efectuar análisis comparativos concluyentes sobre la conservación de residuos implicados en el mecanismo catalítico de esta enzima, como los realizados entre estructuras cristalográficas, solo es posible inferir, desde la descripción realizada para proteínas altamente relacionadas (homólogos estructurales), la correspondencia topológica entre determinados aminoácidos. La confrontación con enzimas relacionadas, determina que el dominio I para LMM-PBP4 de PAO1, contiene los grupos necesarios para activar la serina catalítica (STMK, SNN, KTG) y desarrollar el ataque nucleofílico en el sustrato. La secuencia STMK, incluye la serina del sitio activo (S72), y un residuo de lisina en posición muy próxima a ésta (K75), ejerciendo un rol importante en la organización de los residuos cercanos, como también, en la reducción del valor de la constante pK_a para el grupo hidroxilo de la serina activa, funcionalidades que han sido deducidas en residuos similares K65 de PBP4 en *E. coli*, K55 de PBP4a en *B. subtilis* y K52 de D,D-Peptidasa en *Actinomadura* R39. Del mismo modo, se ha demostrado la equivalencia entre los residuos K425, T426 (del motivo conservado KTG), S315 (en SNN) y los aminoácidos K417, T418, S306 para PBP4 en *E. coli*, los que a su vez se ubican en posiciones idénticas a las de su contraparte en *B. subtilis* y *Actinomadura* R39 (información obtenida mediante el solapamiento de estructuras cristalográficas), formando una red de enlaces de hidrógeno con S72 y K75 (Kishida *et al.*, 2006). En la Figura 61, se representa esquemáticamente el centro catalítico para una acil-serina transferasa (D,D-peptidasa) y se demuestra que las distancias promedio entre la mayoría de los átomos de las cadenas laterales para los residuos que definen este sitio activo, difieren en menos de 1 Å. Variaciones mayores fueron observadas en la zona superior e inferior de la hendidura superficial (Goffin & Ghuysen, 1998).

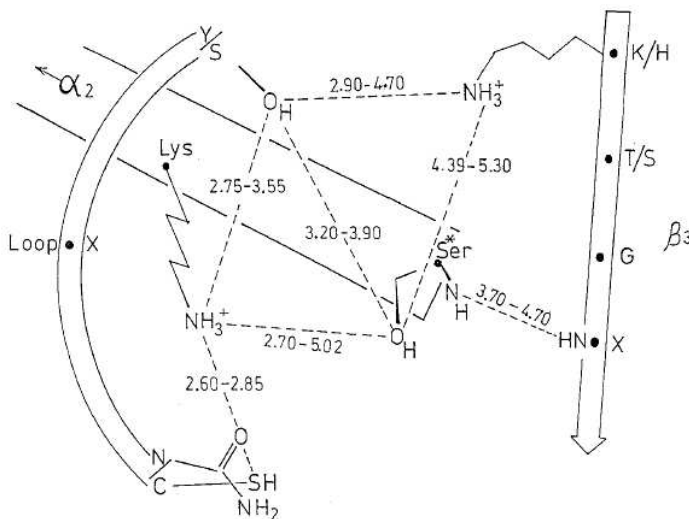


Figura 61 | Representación esquemática del centro catalítico para una acil-serina transferasa, indicando la distancia promedio en ångström (Å) entre los átomos O-O, O-N, S-N y N-N de las cadenas laterales para las secuencias conservadas (SxxK, SxN y KTG, y sus variantes) que lo definen (Goffin & Ghuysen, 1998)

La disposición tridimensional de cada residuo atómico constituyente del sitio activo para la proteína modelada, y la determinación de sus distancias de interacción, confirman valores que se encuentran en el rango de tolerancia definido para residuos conservados (Figura 62a), y cuyas medidas se detallan en el modelo enzimático de referencia antes mencionado (Figura 61 y 62b). Como en el caso de PBP4 en *E. coli*, un residuo de asparagina en posición 317 (N317) para LMM-PBP4 de PAO1, forma un puente de hidrogeno con lisina 75 (K75) (2.82 Å de longitud para el modelo, contra 2.6 Å para la medición en PBP4 de *E. coli*), a través de un átomo de oxígeno (cadena lateral); la importancia y conservación del aminoácido asparagina ha sido destacada en muchas PBPs (Kishida *et al.*, 2006). Un aspecto particularmente interesante, tiene relación con la determinación de la distancia de ataque entre la serina catalítica S72 y el átomo de carbono de un grupo carbonilo en un enlace peptídico entre residuos D-alanina-D-alanina, con un valor de 2.53 Å, una longitud levemente inferior a la medición de 3.2 Å, descrita entre un grupo amina en un residuo D-alanina y el átomo de oxígeno de la serina activa (S52) para PBP4a en *Bacillus subtilis* (Sauvage *et al.*, 2007). Se comprueba además, la estrecha interacción entre los grupos NH de los aminoácidos treonina en posición 428 y serina catalítica en posición 72 (S72), un enlace determinante de la cavidad oxianión en el sitio activo con una distancia estimada de 4.21 Å. La reactividad entre los residuos mencionados, podría desempeñar una funcionalidad estabilizante en intermediarios tetraédricos aniónicos, una propiedad que ha sido sugerida para residuos equivalentes S49-T413 en D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39 (Nemmara *et al.*, 2013). Conviene destacar además, el rol estabilizante de un enlace de hidrógeno entre esta treonina (T413) y el grupo carboxilato del sustrato, una condición que podría explicar las diferencias entre las tasas de acilación por β -lactámicos para D,D-Peptidasa R39 (con un eficiente proceso de acilación) y PBP5 en *E. coli*, una proteína con un sitio activo estructuralmente muy similar al de D,D-Peptidasa, pero que presenta la sustitución de una treonina por el aminoácido histidina en la posición equivalente (H216). El modelo estructural para el sitio activo de PBP4 en PAO1, solo permite reconocer una proximidad importante entre T428 y el sustrato D-alanina-D-alanina, lo que supone que este último antecedente podría ser también constitutivo en esta proteína.

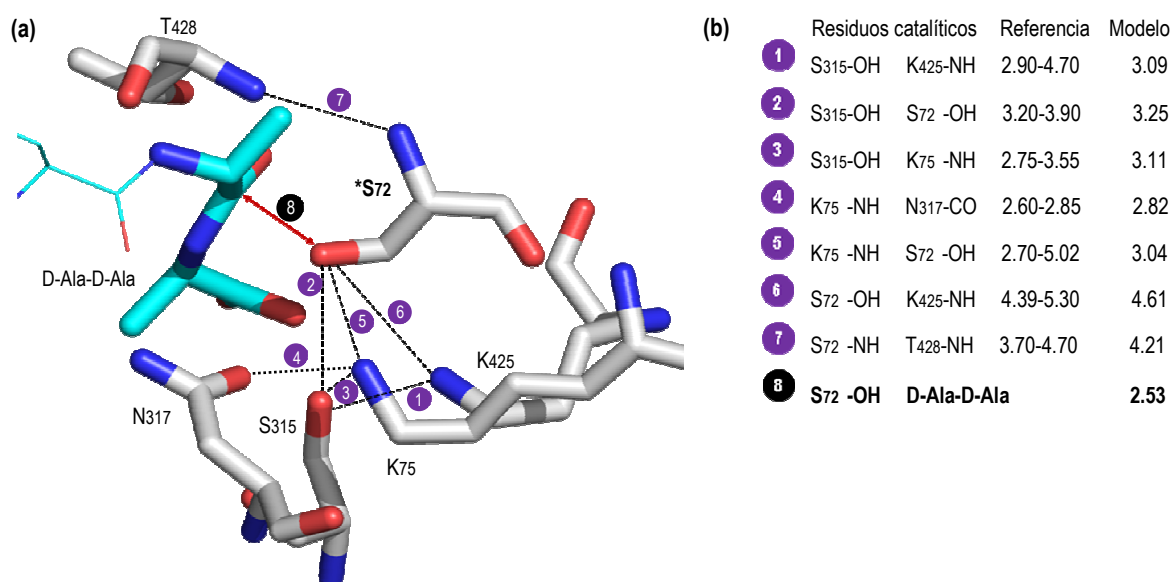


Figura 62 | (a) Modelo estructural para residuos constituyentes del entro activo de LMM-PBP4 (S72, K75, S315, N317, K425). Se representan las distancias atómicas de interacción (líneas segmentadas), además de la trayectoria de ataque de la serina catalítica (S72) hacia residuos terminales D-Ala-D-Ala en el sustrato sintético AMV-L-Ala-FGA-L-Lys-D-Ala-D-Ala (flecha) (b) Medidas de distancia entre residuos (medidas de referencias tomadas desde Goffin & Ghuyesen, 1998)

Como se especifica para PBP4 de *E. coli* y otras LMM-PBPs clase C (PBP4a de *B. subtilis* y D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39), existe un subsitio en el bolsillo catalítico, con residuos involucrados en la especificidad por el sustrato, a través del reconocimiento y acomodación del grupo terminal $\text{NH}_3^+\text{-CH-COO}^-$ para el aminoácido *meso*A₂pm en la cadena peptídica. La importancia de estos residuos en la actividad enzimática no es clara, debido a las diferencias en la cinética para el proceso de D,D-carboxipeptidación, catalizada por esta clase de PBPs, igualmente, la trascendencia de este grupo de aminoácidos sobre la actividad D,D-EPasa, es completamente desconocida (Clarke *et al.*, 2009). Los residuos para PBP4 en PAO1, que probablemente formen parte de este subsitio en el fondo de la zona catalítica, podrían corresponder a D162, L369, T428, L429 y N430 (Figura 63), destacándose la equivalencia posicional para residuos de ácido aspártico en posición 162 (D162) y asparagina en posición 430 (N430), con aminoácidos conservados y definidos como constituyentes de este bolsillo específico en proteínas homólogas, PBP4 de *E. coli* (D155, Q422), PBP4a de *B. subtilis* (D145, S416) y D,D-Peptidasa en *Actinomadura* R39 (D142, S415) (Sauvage *et al.*, 2005; Kishida *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2007). Se ha indicado, que el reconocimiento de un residuo en posición 3 en la cadena peptídica, podría reflejar las diferencias en cuanto a requerimientos de sustrato para proteínas bifuncionales con actividades D,D-CPasa/D,D-EPasa, comparado con proteínas monofuncionales y actividades D,D-CPasa o D,D-transpeptidasa. Se ha propuesto, que la ausencia de reconocimiento para residuos particulares de peptidoglicano por HMM-PBPs y LMM-PBPs clase C subclase C3 (PBPs monofuncionales con actividad D,D-CPasa, con PBP5 de *E. coli* como principal representante), correspondería a un mecanismo de defensa, para contrarrestar una potencial inhibición. Se sugiere, por lo tanto, que esta propiedad podría solo estar presente en miembros de la clase C subclase C1 para LMM-PBPs, constituyendo un requisito esencial para una actividad enzimática eficiente (Clarke *et al.*, 2009).

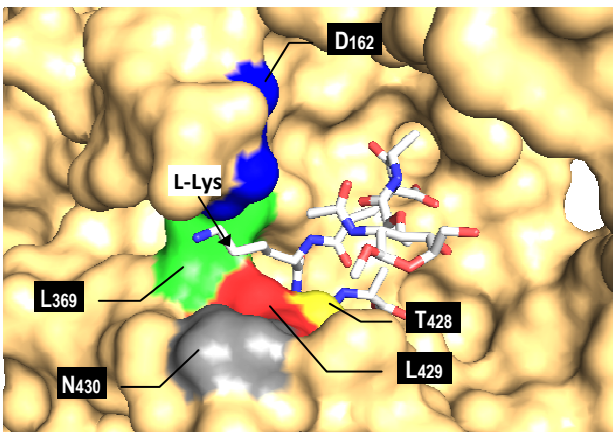


Figura 63 | Residuos constituyentes “probables” para el subsitio específico en el sitio activo de LMM-PBP4 en PAO1. Se indica la ubicación del aminoácido lisina (L-Lys) para el sustrato sintético AMV-L-Ala-FGA-L-Lys-D-Ala-D-Ala, equivalente al residuo *meso*A₂pm. Cada aminoácido se presenta rotulado y destacado por un color (ácido aspártico 162, color azul; leucina 369, color verde; treonina 428, amarillo; leucina 429, color rojo; asparagina 430, coloración gris)

4.17. Estructura tridimensional de LMM-PBP4. Interacción enzima-sustratos

Los residuos involucrados en los mecanismos de acilación y deacilación por PBPs no están claramente identificados, sin embargo, para el proceso de acilación, el rol de lisina en posición 75 (K75), probablemente corresponda a la base general del mecanismo. Este residuo de lisina necesita ser desprotonado para sustraer un nuevo protón desde el grupo hidroxilo (OH) de la serina catalítica (S72), reconociéndose en muchas estructuras cristalográficas para PBPs, la cercanía entre estos aminoácidos (3.04 Å para nuestro modelo por homología), lo que soporta esta teoría. Alternativamente, se ha considerado la posibilidad de un proceso concertado en un solo paso, donde la formación de un enlace covalente entre la penúltima D-alanina y la serina activa, es concomitante a la transferencia directa de un protón desde el grupo hidroxilo de este aminoácido (S72) a un residuo de serina en posición 315 (S315). A través de la acción de serina 315, que forma parte de la secuencia conservada SNN, el protón puede, posteriormente, ser devuelto a un grupo amina en el residuo D-alanina saliente (Sauvage *et al.*, 2007; Sauvage *et al.*, 2008). Las Figuras 64 y 65 muestran los modelos tridimensionales para sustrato mimético pentapeptídico y sustratos antibióticos (cefotixina e imipenem), utilizados en la simulación realizada para la interacción enzima-sustrato. Es posible advertir, la orientación de la serina catalítica (S72) en el sitio activo y su trayectoria de ataque hacia el átomo de carbono (grupo carbonilo) en el enlace peptídico entre residuos terminales D-alanina-D-alanina para el sustrato sintético AMV-L-Ala-FGA-L-Lys-D-Ala-D-Ala (Figura 66). Se logró representar además, la hidrólisis del enlace amida en el anillo β -lactámico para sustratos antibióticos y la generación de un compuesto acil-enzima estable en los modelos de interacción entre LMM-PBP4 de PAO1 (serina catalítica S72) y cefotixina e imipenem, respectivamente (Figura 67A, B, C).

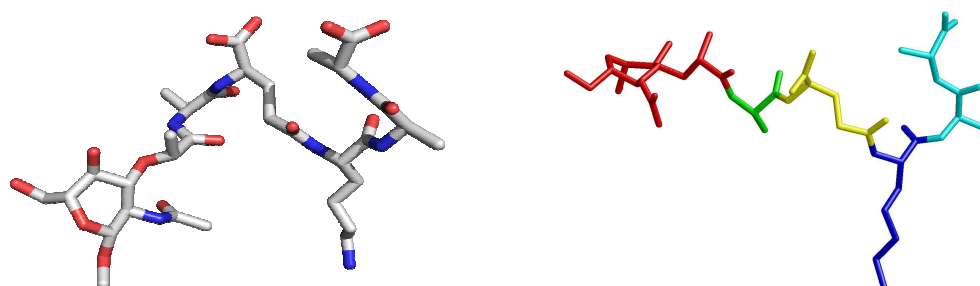


Figura 64 | La imagen izquierda muestra el modelo tridimensional para el sustrato sintético AMV-L-Ala-FGA-L-Lys-D-Ala-D-Ala utilizado. El esquema de la derecha permite la identificación de cada residuo componente de este ligando pentapeptídico mimético; un grupo AMV [metil 2-(acetilamino)-3-O-[(1R)-1-carboxietil]-2-deoxi- β -D-glucopiranosido] se destaca en color rojo, un residuo L-alanina en color verde, FGA [ácido (γ)-D-glutámico] en color amarillo, L-lisina en color azul y los aminoácidos D-alanina-D-alanina en coloración cian

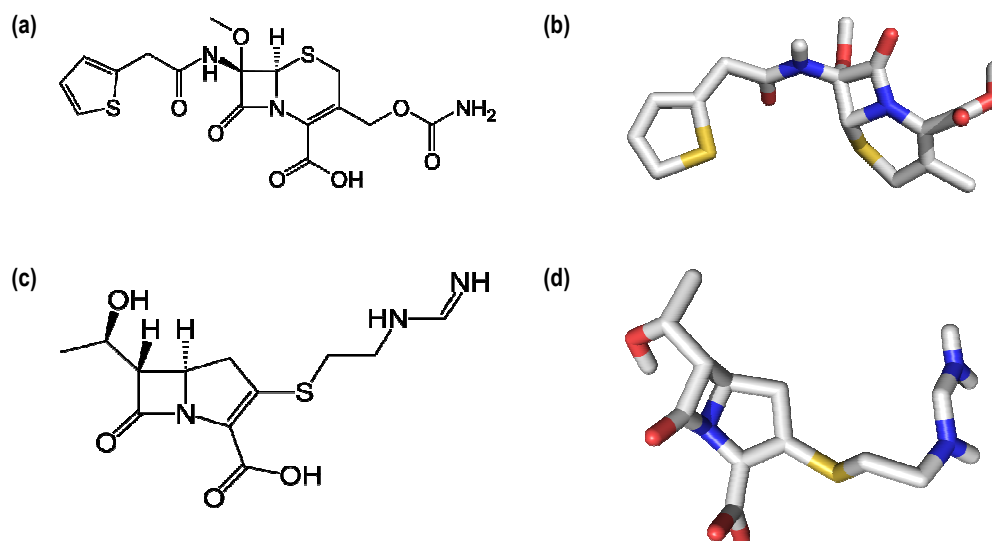


Figura 65 | (a, b) Estructura química y tridimensional para sustrato β -lactámico cefoxitina (c, d) Estructura química y representación tridimensional para ligando antibiótico imipenem (carbapenémico). Átomos de carbono se presentan de color gris, átomos de oxígeno en color rojo, átomos de nitrógeno en color azul y átomos de azufre en color amarillo

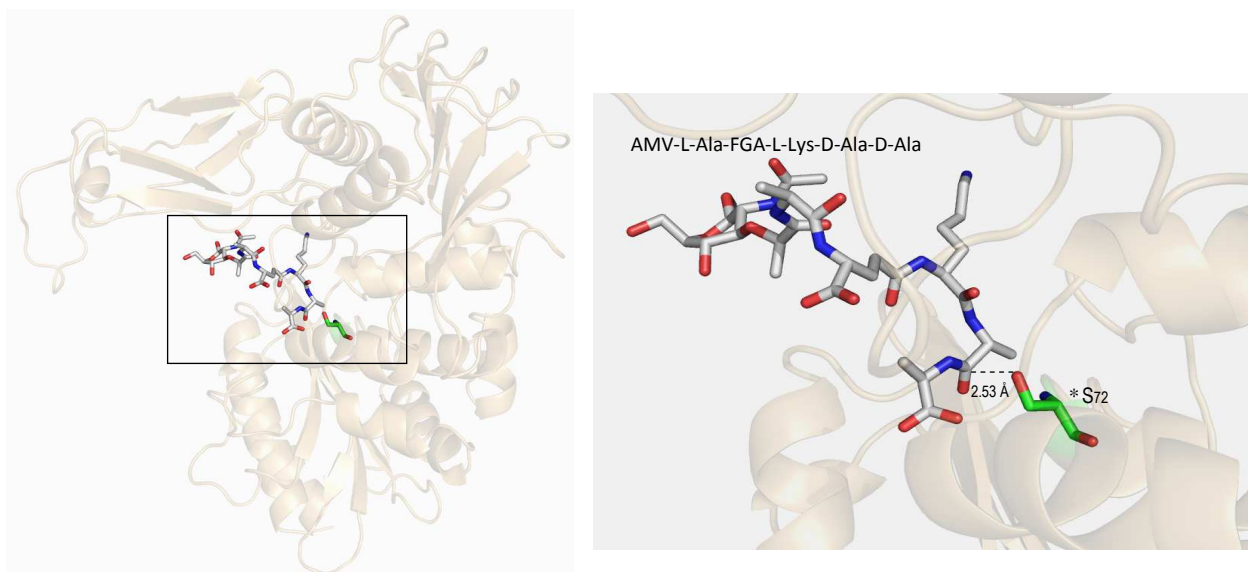


Figura 66 | Representación tridimensional de la interacción enzima (LMM-PBP4)-sustrato pentapéptido sintético (AMV-L-Ala-FGA-L-Lys-D-Ala-D-Ala). Imagen ampliada del modelo molecular que muestra la orientación de la serina catalítica (S72) en el sitio activo y su distancia de ataque al átomo de carbono de un grupo carbonilo en el enlace peptídico entre residuos D-alanina-D-alanina (línea segmentada)

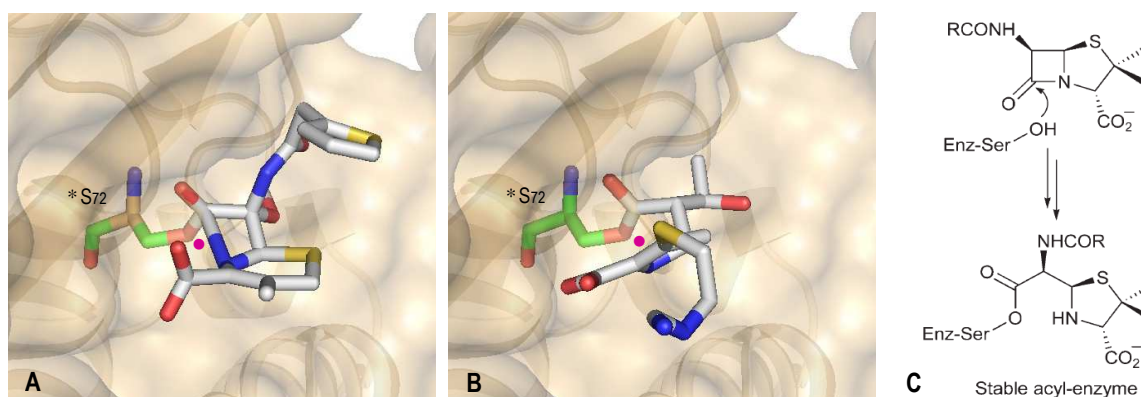


Figura 67 | (A) Modelado molecular de la interacción entre la serina catalítica (S72) del sitio activo de LMM-PBP4 (PAO1) y el sustrato antibiótico cefoxitina (B) Complejo acil-enzima entre LMM-PBP4 e imipenem. En ambos casos se representa la apertura del anillo β -lactámico del antibiótico por hidrólisis de su enlace amida (punto de color rojo) y la generación de un compuesto enzima-sustrato estable (C) Esquema de inhibición para D,D-transpeptidasa por un antibiótico β -lactámico (Kershaw *et al.*, 2005)

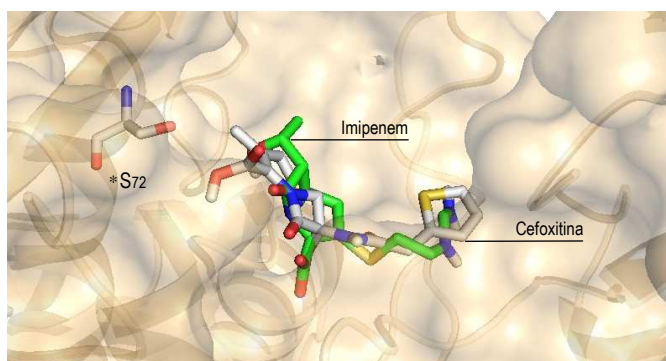
Para la etapa de deacilación, un protón del aceptor debe ser retirado para permitir al grupo activado, atacar el átomo de carbono carbonilo del enlace éster en el complejo acil-enzima. El residuo de D-alanina no unido y presente en el sitio activo, constituye el aceptor para la etapa de deacilación en una reacción de transpeptidación (una molécula de agua en una reacción de carboxipeptidación). Un protón no puede, directamente, ser retirado desde el grupo amina del aceptor por K75, debido a que este residuo se encuentra demasiado distante, por lo tanto, su extracción podría ser ejecutada por un aminoácido lisina formando parte del tercer motivo conservado (K425) o por el aminoácido serina de la segunda secuencia conservada (S315), con la ayuda del residuo K425. Como en el proceso de acilación, el modelado del sitio activo para LMM-PBP4 en PAO1 y su interacción con residuos terminales D-Ala-D-Ala (sustrato AMV-L-Ala-FGA-L-Lys-D-Ala-D-Ala), solo permite la identificación de los “potenciales” residuos, implicados en la etapa de deacilación, y sus correspondientes ubicaciones, una situación que valida, aunque de un modo muy limitado, la propuesta teórica que se ha considerado para la descripción de este proceso, y que ha sido generada a partir de ensayos de cristalización para LMM-PBP5 de *E. coli* en complejo con Boc- γ -D-Glu-L-Lys(Cbz)-D-boroAla (un sustrato sintético con un grupo boronil de características miméticas al estado de transición en una reacción de deacilación catalizada por PBP) (Nicola *et al.*, 2005).

Algunas PBPs, como LMM-PBP5 en *E. coli*, desempeñan una funcionalidad D,D-CPasa estricta, y se presentan desprovistas de actividades endopeptidasa o transpeptidasa, una condición que podría estar relacionada con la dificultad para acomodar una cadena lateral de tamaño superior. Para PBP4a de *B. subtilis*, el aminoácido treonina en posición 394 (T394) corresponde a un residuo con capacidad para establecer un puente de hidrógeno con T412 (motivo conservado KTG), contribuyendo a la red de enlaces de este tipo que fortalece el sitio activo. Este aminoácido ha sido reconocido en una posición equivalente en otros representantes de la categoría LMM-PBPs clase C subclase C1 (T393 en D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39, T389 en PBP3 de *Neisseria gonorrhoeae*), mientras que

Resultados

en PBP5, PBP6 y PBP6b de *E. coli* (proteínas con actividad D,D-carboxipeptidasa y ausencia de actividad D,D-endopeptidasa), un residuo de arginina ocupa esta posición, y podría impedir el posicionamiento de un sustrato mayor al grupo metilo de la última D-alanina en la cadena peptídica. La presencia de un residuo pequeño como la treonina, deja un espacio libre que permitiría acomodar la cadena peptídica de una segunda hebra de peptidoglicano. Esta característica estructural y antecedente estérico, podría explicar porqué LMM-PBPs clase C subclase C1 pueden actuar como D,D-endopeptidasas, mientras que PBP5 de *E. coli* exhibe preferencialmente una actividad D,D-CPasa (Sauvage *et al.*, 2007). Para LMM-PBP4 en PAO1, un aminoácido treonina en posición 386 (T386) se corresponde con la ubicación de T394 en *Bacillus subtilis*, condición que sustentaría estructuralmente el desarrollo de una función D,D-EPasa, actividad enzimática que hemos definido y confirmado a partir de un planteamiento cinético-experimental (Puntos 4.9., 4.10., 4.11.); desafortunadamente, las actividades D,D-CPasa, D,D-transpeptidasa y D,D-EPasa, para la mayoría de las PBPs, no se encuentran lo suficientemente documentadas para asumir esta hipótesis como absoluta y concluyente.

En un intento por establecer la similitud o la diferencia entre los antibióticos β -lactámicos cefoxitina e imipenem (confirmados recientemente como potentes inductores para el mecanismo de sobreproducción de β -lactamasa cromosomal AmpC en el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*, a través de su rol inactivamente sobre LMM-PBP4), en relación al modo de unión con su proteína aceptora, se ha decidido realizar una aproximación teórica mediante la aplicación AutoDock, para valorar sus interacciones, a partir de las especificaciones estructurales de la proteína, la información sobre la libertad de rotación para los enlaces del sustrato y una conformación de mínima energía. La estimación del incremento en la energía libre de unión (ΔG) para cada sustrato antibiótico en asociación al sitio activo de LMM-PBP4 (PAO1), se realizó mediante la sumatoria del incremento de cada fuerza intermolecular participante (energías de Van der Waals, energías de enlaces de hidrógeno, energía electrostática, energía de solvatación y energía torsional del ligando), cuyos valores fueron obtenidos a través de observaciones físicas y simulaciones de dinámica molecular. Finalmente, la evaluación de las “energías libres de AutoDock” (energías libres de *binding*) estiman que el antibiótico cefoxitina (-6.59 Kcal/mol) es capaz de formar un complejo con PBP4 0.13 Kcal/mol más estable que imipenem (-6.46 Kcal/mol) (Figura 68), una diferencia menor, que claramente se relaciona con valores experimentales de afinidad (índice IC₅₀), obtenidos desde ensayos de competencia para proteína purificada-proteína de membrana y sustratos antibióticos (Figuras 36, 37 y 38).



Parámetros	Cefoxitina	Imipenem
Energía libre de <i>binding</i> estimada (Kcal/mol)	-6.59	-6.46

Figura 68 | Estimación de la energía libre de *binding* entre LMM-PBP4 (serina catalítica) y sustratos antibióticos cefoxitina (FOX) e imipenem (IMP). Cefoxitina se representa con átomos de carbono de color gris mientras que imipenem presenta átomos de carbono en color verde (átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre se representan de acuerdo a la coloración convencional)

4.18. Análisis del papel modulador de LMM-PBP4 en la integridad molecular de la pared celular para el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*. Confirmación de identidad para mutantes de inserción por transposición desde librería genómica PA14NR

Para la etapa de evaluación *in vivo* del efecto modulador de LMM-PBP4 de PAO1 y de componentes del sistema de inducción de resistencia asociado a la inactivación de *dacB*, sobre el metabolismo y la estructura del peptidoglicano para el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*, fue necesario confirmar la identidad para los mutantes de inserción por transposición PA14::*dacB* (ID: 34428), PA14::*ampE* (ID: 28880), PA14::*ampDh2* (ID: 42715), recuperados desde la librería genómica PA14NR Set v1.0 y utilizados como estirpes transformantes para constructos recombinantes pSEVA-PBP4/pHERD-PBP4. Este reconocimiento fue realizado inicialmente mediante PCR y secuenciación. La Figura 69 muestra productos de amplificación de 645 pb, 819 pb y 489 pb, para cepas mutantes PA14::*dacB*, PA14::*ampE* y PA14::*ampDh2*, respectivamente, amplicones que fueron purificados, secuenciados y confirmados mediante BLAST frente al genoma de *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14. Un ensayo de afinidad entre proteínas de membrana para estirpe de referencia UCBPP-PA14 (cepa *wild-type* utilizada como control), cepa mutante PA14::*dacB* (numeración placa: PAMR_nr_mas_06_3:A5) y penicilina fluorescente Bocillin™ FL, complementario al protocolo de amplificación recomendado, permite comprobar en el mutante de inserción, la ausencia de LMM-PBP4 en el perfil de PBPs reconocidas para el modelo *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 70). Finalmente, la preparación de peptidoglicano desde el mutante de inserción por transposición PA14::*dacB* (ID: 34428; PAMR_nr_mas_06_3:A5) y para PA Δ *dacB*, un mutante por delección de LMM-PBP4 generado desde la cepa de referencia PAO1, permitió efectuar un análisis comparativo entre los perfiles de muropéptidos recuperados por HPLC, demostrando total correspondencia en la composición del *sacculus* de mureina para cada estirpe mutante investigada (Figura 71).

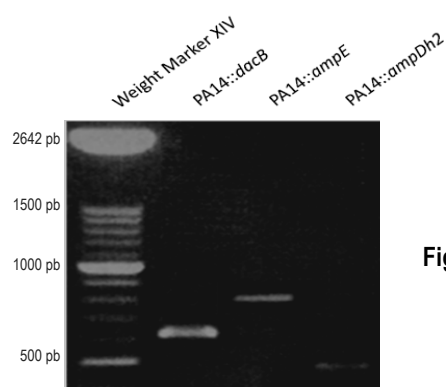


Figura 69 | Productos de amplificación por PCR para la confirmación de cepas mutantes PA14::*dacB* (645 pb), PA14::*ampE* (819 pb) y PA14::*ampDh2* (489 pb) (librería genómica PA14NR set v1.0). Marcador de tamaño molecular 100 pb (DNA Molecular Weight Marker XIV)

Resultados

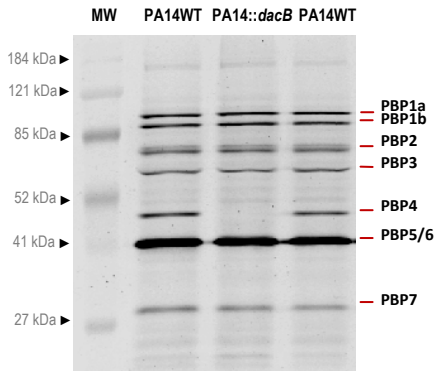


Figura 70 | Ensayo de afinidad (unión a penicilina fluorescente Bocillin™ FL) para proteínas de membrana preparadas desde cepas UCBPP-PA14 (*wild-type*) y estirpe mutante PA14::*dacB* (ID: 34428; PAMR_nr_mas_06_3:A5). Al lado derecho de la figura se indica el total de PBPs reconocidas para el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*. MW, *molecular weight* (ProSieve® Color Protein Marker)

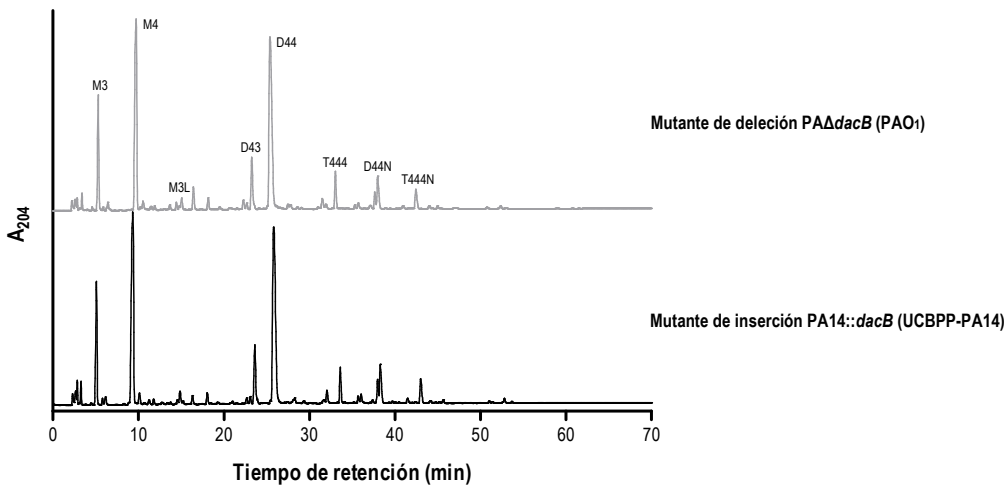


Figura 71 | Separación de peptidoglicano mediante HPLC (gradiente lineal de elución 70 min) para mutante de inserción PA14::*dacB* (ID: 34428; PAMR_nr_mas_06_3:A5) y mutante de delección PAΔ*dacB* (generado desde cepa *wild-type* PAO1). Monómero disacárido tripéptido (M3); monómero disacárido tetrapéptido (M4); monómero disacárido tripéptido asociado a lipoproteína (M3L); dímero disacárido tetrapéptido-tripéptido (D43); dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido (D44); dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido anhidro (D44N); trímero tetrapéptido-tetrapéptido-tetrapéptido (T444) y trímero tetrapéptido-tetrapéptido-tetrapéptido anhidro (T444N)

4.19. Análisis del papel modulador de LMM-PBP4 en la integridad molecular de la pared celular. Constructos recombinantes para el modelo *Pseudomonas aeruginosa* y ensayos de inducción

El clonaje del gen codificante *dacB* de PAO1 en vectores de expresión compatibles con el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*, permitió la generación de constructos recombinantes necesarios para materializar estudios de complementación, inducción-sobreexpresión y preparación de peptidoglicano. Los sistemas plasmidiales seleccionados, fueron el sistema de expresión pHERD26T y el vector modular pSEVA234 (Materiales y métodos 3.2.4.). Los constructos pSEVA-PBP4 (~6.1 Kb) y pHERD-PBP4 (~7.7 Kb) (Figura 72a, 72b), fueron confirmados mediante *colony* PCR, *minipreps*, doble digestión y secuenciación. La Figura 73 muestra la separación electroforética de los productos de digestión (vector-inserto) para cada clon recombinante (*minipreps* realizadas desde transformantes positivos en *E. coli* DH5α).

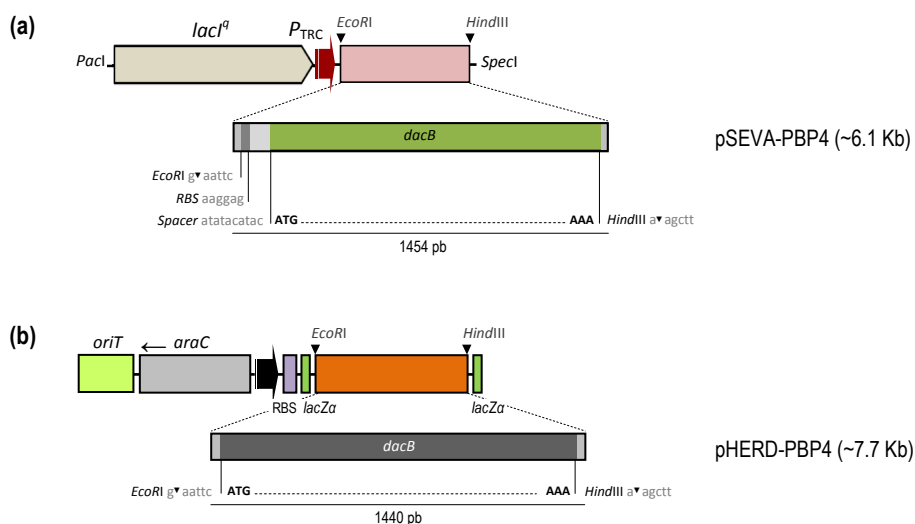


Figura 72 | Diseño de constructos recombinantes para LMM-PBP4 de PAO1 en vectores de expresión (a) pSEVA234 y (b) pHERD26T con sistemas reguladores/promotores *lacI^q/P_{TRC}* y *araC/P_{BAD}*, respectivamente

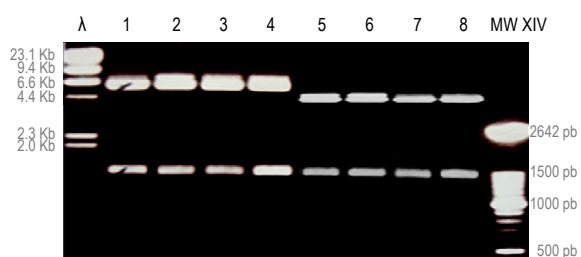


Figura 73 | Confirmación de clonajes positivos mediante ensayos de doble digestión a partir de productos de *minipreps* recuperados desde células transformantes (clonaje inicial en cepa *E. coli* DH5α). Líneas 1-4 contienen los productos de digestión para clones pHERD-PBP4 (vector: 6166 pb, inserto: 1428 pb), y las líneas 5-8 contienen los productos de digestión para pSEVA-PBP4 (vector: 4539 pb, inserto: 1428 pb). Marcador de tamaño molecular λ (Kb) y DNA Molecular Weight Marker XIV (100 pb)

Resultados

La generación de células competentes para estirpes *wild-type* UCBPP-PA14 y mutantes de inserción (PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2*), permitió mediante electroporación, la incorporación de cada clon recombinante en las cepas mencionadas. La selección de transformantes positivos pHERD-PBP4/PA14WT, pHERD-PBP4/PA14::*dacB*, pHERD-PBP4/PA14::*ampE*, pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2*, pSEVA-PBP4/PA14WT, pSEVA-PBP4/PA14::*dacB*, pSEVA-PBP4/PA14::*ampE*, pSEVA-PBP4/PA14::*ampDh2*, proporcionó el material adecuado para estudios de inducción-sobreexpresión de LMM-PBP4 desde el sistema pHERD26T y pSEVA234. Los resultados obtenidos para las diferentes condiciones experimentales ensayadas, relacionadas con la concentración de agente inductor y el tiempo de exposición a éste, determinan que la incubación con IPTG 2 mM para estirpes transformadas con el clon pSEVA-PBP4 (Figura 74) y la inducción con L(+)-arabinosa 0.2% en cepas transformantes con constructo pHERD-PBP4 (Figura 75), con un período de exposición en cultivo de 60 min a 37°C, produce un adecuado nivel de expresión para la proteína de interés. Esto último, promueve el abordaje experimental para identificar la relación entre complementación-expresión y proceder a la valoración estructural del peptidoglicano en condiciones naturales, de sobreexpresión e inactivación antibiótica, respectivamente.

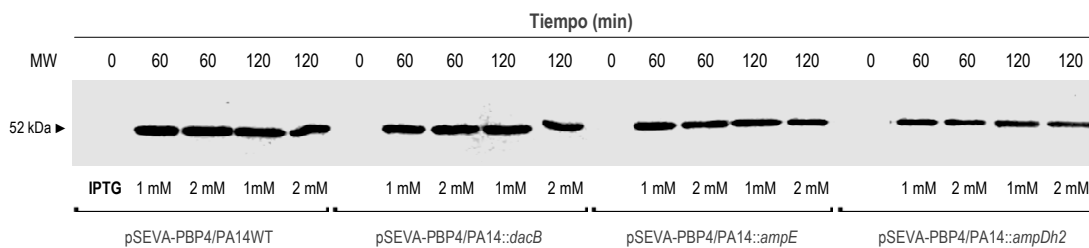


Figura 74 | Ensayo de inducción para clon recombinante pSEVA-PBP4 transformado en *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (*wild-type*) y estirpes mutantes PA14::*dacB* (ID: 34428), PA14::*ampE* (ID: 28880), PA14::*ampDh2* (ID: 42715). Inmudetección (*western blot*) utilizando anticuerpo policlonal IgG anti-PBP4 (1258A 1:3000). MW, *molecular weight* (ProSieve® Color Protein Marker)

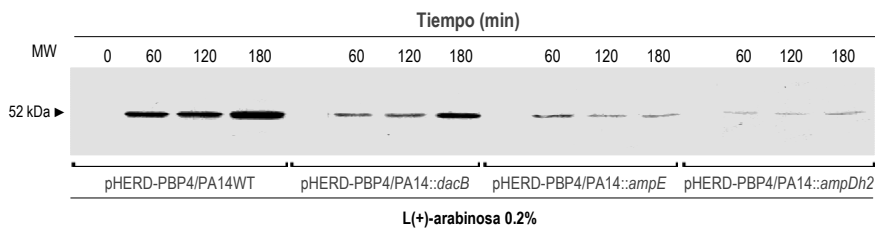


Figura 75 | Ensayo de inducción para clon recombinante pHERD-PBP4 transformado en *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (*wild-type*) y estirpes mutantes PA14::*dacB* (ID: 34428), PA14::*ampE* (ID: 28880), PA14::*ampDh2* (ID: 42715). Inmudetección (*western blot*) utilizando anticuerpo policlonal IgG anti-PBP4 (1258A 1:3000). MW, *molecular weight* (ProSieve® Color Protein Marker)

4.20. Análisis del papel modulador de LMM-PBP4 en la integridad molecular de la pared celular. Peptidoglicano de *Pseudomonas aeruginosa* en condiciones naturales, de complementación, sobreexpresión e inactivación antibiótica

El impacto en mutaciones para LMM-PBP4 y proteínas participantes del mecanismo regulatorio de inducción de β -lactamasa cromosomal AmpC (estirpes PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2*) sobre el metabolismo y estructura del peptidoglicano para el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 en condiciones naturales, de complementación, sobreexpresión e inactivación antibiótica, fue valorado en función de la cantidad relativa de muropéptidos globales (fracción molar para constituyentes monoméricos, diméricos y triméricos), componentes unitarios (lipoproteína, formas anhidras, monómero disacárido pentapéptido, enlaces DAP-DAP) y parámetros relacionados (longitud de cadena, D-D Total y entrecruzamiento), descritos en las Tablas 23, 24, 25 y 26. Fueron consideradas significativas, diferencias superiores a 10% en los valores estructurales obtenidos para estirpes sometidas a experimentación respecto de las cantidades determinadas en cepas de referencia.

En condición de no expresión del gen *dacB* (codificante de LMM-PBP4) y ausencia de tratamiento antibiótico β -lactámico (cefoxitina, imipenem, ceftazidima, aztreonam), la composición del peptidoglicano para el mutante de inserción PA14::*dacB* respecto de la composición de la mureína para la cepa de referencia PA14WT, muestra un leve aumento en los valores de dímeros (34.06 mol%) y entrecruzamiento (39.05 %), y como consecuencia una disminución proporcional en la cantidad de monómeros (62.27 mol% frente a 63.90 mol%), además de un leve incremento en los niveles de monómero disacárido pentapéptido (0.53 mol% frente a 0.44 mol%). La ausencia de actividades de tipo D,D-coxipeptidasa y, particularmente, D,D-endopeptidasa en PA14::*dacB*, explica las ligeras diferencias descritas, sin embargo, y a pesar de estar en situación de sobreexpresión de *ampC* (producto de la inactivación del gen *dacB*), es evidente que la mutación en LMM-PBP4 no genera variaciones importantes en la composición global del peptidoglicano de *Pseudomonas aeruginosa*, debido fundamentalmente a que LMM-PBP5/6 y LMM-PBP7, proteínas presentes en este mutante y con actividades enzimáticas D,D-CPasa y D,D-EPasa, respectivamente, retienen estas funciones. La estructura del PG para los mutantes PA14::*ampE* y PA14::*ampDh2*, no presenta cambios significativos respecto de la cepa modelo PA14WT. La ausencia de cambios constitutivos importantes en el PG de los mutantes para las proteínas AmpE (transductor de membrana interna propuesto como modulador de la actividad de AmpD e imprescindible para la inducción de AmpC) y AmpDh2 (amidasa de membrana externa con una importancia relativamente menor en la expresión de *ampC*, en relación a sus homólogos AmpD-AmpDh3), da cuenta de la imposibilidad de establecer alguna relación entre estas proteínas, participantes del mecanismo regulatorio para la producción de AmpC y efectores estructurales implicados en el mecanismo de inducción para esta β -lactamasa (Figura 76).

Un constructo recombinante pHERD-PBP4 (del mismo modo que pSEVA-PBP4) contenido en células competentes PA14WT, PA14::*ampE* y PA14::*ampDh2* y en condiciones naturales (no inducción), genera un peptidoglicano donde destaca la caída en el nivel de dímeros, trímeros, DAP-DAP y D-D Total (porcentaje de entrecruzamientos DAP-DAP respecto del total), que definen un aumento en la cantidad de monómeros y un menor

porcentaje de entrecruzamiento, además de un descenso en formas anhidras que explica un moderado incremento en la longitud de sus cadenas, efectos que podrían interpretarse como la consecuencia de un nivel basal de expresión para el gen *dacB* en estas construcciones. En la cepa transformante pHERD-PBP4/PA14::*dacB* sin inducir, la ausencia de modificaciones relevantes respecto de la estructura descrita para el peptidoglicano de la cepa control PA14::*dacB*, permite inferir que el plásmido (vector de expresión pHER26T) en sí mismo no afecta la configuración estructural de la mureina, y que la expresión basal de *dacB* no es suficiente para producir los efectos demostrables por actividades de tipo D,D-endopeptidasa (disminución en dímeros y trímeros, aumento de monómeros) y D,D-carboxipeptidasa (disminución acentuada en la cantidad relativa de monómero disacárido pentapéptido), propias de LMM-PBP4 (Figura 77).

El peptidoglicano para cepas transformantes pHERD-PBP4/PA14WT y pHERD-PBP4/PA14::*ampE* en situación de inducción [L(+)-arabinosa 0.2% e IPTG 2 mM], muestra una organización que permite distinguir un descenso significativo en la cantidad de constituyentes diméricos y triméricos (pHERD-PBP4/PA14WT, dímeros: 21.93 mol% frente a 29.42 mol%, trímeros: 1.21 mol% frente a 1.91 mol%; pHERD-PBP4/PA14::*ampE*, dímeros: 21.01 mol% frente a 27.77 mol%, trímeros: 0.97 mol% frente a 1.73 mol%) que conduce a un incremento proporcional en la abundancia relativa de monómeros (pHERD-PBP4/PA14WT, monómeros: 76.85 mol% frente a 67.58 mol%; pHERD-PBP4/PA14::*ampE*, monómeros: 77.02 mol% frente a 70.50 mol%) y a una disminución considerable en los niveles de entrecruzamiento (pHERD-PBP4/PA14WT, entrecruzamiento: 24.36 % frente a 33.49 %; pHERD-PBP4/PA14::*ampE*, entrecruzamiento: 23.95 % frente a 31.23 %), destacando además, la reducción en la cantidad de formas anhidras (pHERD-PBP4/PA14WT, formas anhidras: 4.49 frente a 8.14; pHERD-PBP4/PA14::*ampE*, formas anhidras: 5.12 frente a 7.36), que a su vez define una mayor longitud de cadenas (pHERD-PBP4/PA14WT, longitud de cadena: 22.25 frente a 13.65; pHERD-PBP4/PA14::*ampE*, longitud de cadena: 19.51 frente a 17.57), respecto de la composición en muropeptidos para la mureina de sus respectivas cepas control sin inducir. Niveles de DAP-DAP y lipoproteína no presentan cambios relevantes, los porcentajes para D-D Total se reconocen levemente aumentados (lo que supone la inducción de una actividad contraria a una funcionalidad de tipo L,D-transpeptidasa que evita la formación de estructuras diméricas a través de enlaces 4-3 [D-alanina-*mesoA*₂pm]), mientras que los valores asignados para monómero disacárido pentapéptido solo exhiben una reducción menor (pHERD-PBP4/PA14WT, pentapéptido: 0.34 frente a 0.40; pHERD-PBP4/PA14::*ampE*, pentapéptido: 0.33 frente a 0.42). Las modificaciones anteriormente expuestas, resultan coherentes con el desarrollo de una actividad principal de tipo D,D-endopeptidasa y una actividad secundaria de tipo D,D-carboxipeptidasa, como producto de la sobreexpresión de LMM-PBP4 en los sistemas estudiados, circunstancia demostrada en un estudio previo, donde el efecto de sobreproducción de LMM-PBP4 sobre la mureina sintetizada *in vivo* para el modelo *Escherichia coli*, presentó resultados en la dirección descrita, con un bajo nivel de entrecruzamiento en puentes peptídicos de tipo (DD)-D-Ala-DAP [el descenso en la cantidad relativa de cadenas pentapeptídicas donadoras no permite un incremento mayor en la generación de enlaces D-alanina-*mesoA*₂pm, efecto parcialmente compensado por un incremento en el *cross-linkage* de tipo (LD)-DAP-DAP], un aumento en la cantidad de monómeros y una reducción en el número de dímeros, trímeros y tetrámeros,

composición que da cuenta de las funcionalidades exclusivas de tipo D,D-endopeptidasa/D,D-carboxipeptidasa ejercidas por LMM-PBP4 de *E. coli* e involucradas en el recambio del entrecruzamiento peptídico de su peptidoglicano (Korat *et al.*, 1991), actividades sugeridas preliminarmente por Goodell & Schwarz, 1983. La composición del peptidoglicano para la estirpe pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2* sometida a inducción [L(+)-arabinosa 0.2%], enfrentada a la de su respectiva cepa control (transformante sin inducir), da cuenta de una tendencia similar a la descrita para las cepas pHERD-PBP4/PA14WT y pHERD-PBP4/PA14::*ampE*, con cambios menores en cada parámetro estructural examinado, sin embargo, destaca un descenso en la cantidad de lipoproteína, efecto que podría sugerir un grado de correspondencia entre la amidasa AmpDh2 (anclada a membrana externa) y la unión de lipoproteína a membrana externa, sin poder inferir el mecanismo determinante de la disminución de este constituyente en un *background* carente de AmpDh2 y con sobreexpresión de LMM-PBP4. La arquitectura de la mureína para la cepa pHERD-PBP4/PA14::*dacB* inducida, demuestra cambios similares a los mencionados para las cepas pHERD-PBP4/PA14WT y pHERD-PBP4/PA14::*ampE*, con la salvedad de que la caída en dímeros (28.66 mol% frente a 32.28 mol%) y el aumento en monómeros (67.85 mol% frente a 63.94 mol%) presentó un orden menor de magnitud (4 puntos) respecto de la intensidad en los cambios identificados (orden de magnitud de 7-9 puntos) al inducir *dacB* en cepa *wild-type* (PA14WT) y en un mutante de inserción por transposición para la proteína AmpE (PA14::*ampE*), diferencia que podría ser explicada por el hecho de complementar la carencia de *dacB* en la cepa transformante pHERD-PBP4/PA14::*dacB* (alcanzando posiblemente, un cierto nivel de expresión) *versus* el efecto directo de sobreexpresión en presencia del gen (Figura 78).

Frente al tratamiento antibiótico con cefoxitina (FOX), PA14WT y las cepas mutantes PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2*, demostraron una composición estructural de su peptidoglicano muy similar, en que destaca un marcado incremento en la cantidad relativa de monómero disacárido pentapéptido (M5) (PA14WT, pentapéptido: 3.70 mol% frente a 0.44 mol%; PA14::*dacB*, pentapéptido: 3.40 mol% frente a 0.53 mol%; PA14::*ampE*, pentapéptido: 4.10 mol% frente a 0.48 mol%; PA14::*ampDh2*, pentapéptido: 2.88 mol% frente a 0.43 mol%), que estimula la formación de dímeros y trímeros con enlaces 4-3 (al no verse afectados los niveles DAP-DAP) (PA14WT, dímeros: 37.38 mol% frente a 32.61 mol%; PA14::*dacB*, dímeros: 38.72 mol% frente a 34.06 mol%; PA14::*ampE*, dímeros: 38.20 mol% frente a 33.23 mol%; PA14::*ampDh2*, dímeros: 36.99 mol% frente a 33.86 mol%), y como consecuencia de este aumento sucede una reducción en monómeros (PA14WT, monómeros: 59.09 mol% frente a 63.90 mol%; PA14::*dacB*, monómeros: 57.05 mol% frente a 62.27 mol%; PA14::*ampE*, monómeros: 57.99 mol% frente a 64.23 mol%; PA14::*ampDh2*, monómeros: 59.48 mol% frente a 63.30 mol%) y un fortalecimiento en el porcentaje de entrecruzamiento. La consecuencia del eficiente bloqueo que el β -lactámico cefoxitina ejerce en todas las LMM-PBPs, interrumpiendo funcionalidades de tipo D,D-carboxipeptidasa y D,D-endopeptidasa, genera una condición favorable para los resultados descritos (Figura 79). En situación de inducción para LMM-PBP4 [L(+)-arabinosa 0.2% e IPTG 2 mM] y tratamiento con cefoxitina, la arquitectura del peptidoglicano para las cepas pHERD-PBP4/PA14WT, pHERD-PBP4/PA14::*dacB*, pHERD-PBP4/PA14::*ampE* y pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2*, enseña parámetros estructurales muy próximos a los informados en el estado natural *wild-type* (cefcoxitina inhibe la

funcionalidad de LMM-PBP5/6 y LMM-PBP7, pero no es capaz de bloquear la cantidad de proteína expresada), hecho que confirma un proceso de reversión donde nuevamente se eleva el nivel de monómeros y desciende el entrecruzamiento, y que se encuentra definido por la expresión de una actividad de tipo D,D-endopeptidasa. La restitución en el valor de pentapéptido (M5) no resulta del todo eficiente, ya que LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* es mejor D,D-endopeptidasa que D,D-carboxipeptidasa (Figura 80).

Los cambios que produce el tratamiento con imipenem (IMP) en el PG de PA14WT, PA14::*dacB*, PA14::*ampE* y PA14::*ampDh2*, respecto de sus estirpes control (sin tratamiento antibiótico), son menores a los desarrollados por cefoxitina, sin embargo, es posible destacar un leve aumento en formas anhidras, una reducción en la longitud de cadenas y una cantidad importante de monómero disacárido pentapéptido para las estirpes PA14WT+IMP (pentapéptido: 1.57 mol% frente a 0.44 mol%), PA14::*dacB*+IMP (pentapéptido: 2.10 mol% frente a 0.53 mol%), PA14::*ampE*+IMP (pentapéptido: 1.58 mol% frente a 0.48 mol%) y PA14::*ampDh2* tratada con imipenem (pentapéptido: 1.64 mol% frente a 0.43 mol%), junto a la ligera reducción en valores DAP-DAP y D-D Total. La mayor afinidad que imipenem exhibe por HMM-PBPs de PAO1 (Moyá *et al.*, 2010), define a este β -lactámico como mal agente bloqueante para LMM-PBPs, y por lo tanto, de sus actividades D,D-EPasa/D,D-CPasa, situación que condiciona las sutiles variaciones estructurales presentadas. La excepción la constituye, evidentemente, el parámetro correspondiente a monómero disacárido pentapéptido, con niveles altos en la totalidad de cepas estudiadas, aunque en magnitudes bastante menores (~50%) a las recuperadas luego del tratamiento con cefoxitina. A pesar de la deficiente relación demostrada entre LMM-PBP5/6 e imipenem, la alta afinidad entre este carbapenémico y LMM-PBP4 (confirmada en estudios previos realizados a partir de extractos de membrana, y durante el desarrollo de esta investigación a través de ensayos sobre proteína purificada y de membrana), permite inferir que la inhibición de la bifuncionalidad D,D-EPasa/D,D-CPasa (particularmente la actividad D,D-carboxipeptidasa) en esta proteína, condiciona niveles significativos de constituyente pentapéptido (M5), particularmente en el mutante PA14::*dacB* (Figura 81). En estado de inducción para LMM-PBP4 [L(+)-arabinosa 0.2% e IPTG 2 mM] y tratamiento con imipenem, la estructura de la mureína para las cepas pHERD-PBP4/PA14WT, pHERD-PBP4/PA14::*dacB*, pHERD-PBP4/PA14::*ampE* y pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2*, muestra una composición general muy similar a la determinada en estirpes no inducidas-no tratadas con IMP, y en cepas inducidas-tratadas con FOX. Sin desatender lo anterior, conviene precisar que pHERD-PBP4/PA14WT+L(+)-arabinosa 0.2%+IMP, pHERD-PBP4/PA14::*dacB*+L(+)-arabinosa 0.2%+IMP y pHERD-PBP4/PA14::*ampE*+L(+)-arabinosa 0.2%+IMP, presentan un ligero descenso en los niveles de DAP-DAP, D-D Total, y una reversión menor en la cantidad de M5 frente a su control no inducido-tratado con IMP (pHERD-PBP4/PA14WT+IMP, pentapéptido: 1.07 mol% frente a 1.57 mol%; pHERD-PBP4/PA14::*dacB*+IMP, pentapéptido: 1.27 mol% frente a 2.10 mol%; pHERD-PBP4/PA14::*ampE*+IMP, pentapéptido: 1.16 mol% frente a 1.58 mol%), situación que confirma, nuevamente, la expresión de una funcionalidad D,D-endopeptidasa por sobre una actividad D,D-carboxipeptidasa para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* (ya que la recuperación de la cantidad relativa de monómero disacárido pentapéptido a niveles *wild-type*, aún no es total). En la composición del PG para la cepa pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2*+IMP, se distingue un aumento significativo en formas anhidras que se relaciona

directamente con una disminución en longitud de cadena (formas anhidras: 10.22 frente a 7.81 y 8.12; longitud de cadena: 9.78 frente a 12.80 y 12.31), cambios demostrados frente a cepas de referencia PA14::*ampDh2*+IMP (no inducidas-tratadas con IMP) y PA14::*ampDh2* (no inducida-no tratada), respectivamente, destacándose además, la reversión en la abundancia relativa de M5 a niveles muy cercanos al presentado en condiciones naturales de no inducción y no tratamiento antibiótico (pentapéptido: 0.66 mol% frente a 0.43 mol%), un efecto igualmente desarrollado en situación de inducción y tratamiento con FOX (pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2*+L(+)-arabinosa 0.2%+FOX) (pentapéptido: 0.43 mol% frente a 2.88 mol%) que permite sugerir, que la ausencia de AmpDh2 tendría un impacto mucho más profundo sobre la corrección del tratamiento inhibitorio de ceftaxitina, que la inducción de LMM-PBP4 en un fondo carente de DacB y AmpE (Figura 82).

La estructura de PG para la cepa PA14WT incubada en ceftazidima (CAZ) frente a su control sin antibiótico, presenta modificaciones menores en los niveles DAP-DAP y D-D Total, una disminución de formas anhidras (que explica la mayor longitud de cadena presentada), además de un incremento en la cantidad de pentapéptido (pentapéptido: 0.98 mol% frente a 0.44 mol%) bastante inferior al demostrado en la pared celular de esta estirpe luego del tratamiento de incubación con ceftaxitina e imipenem, respectivamente (PA14WT+IMP, pentapéptido: 1.57 mol%; PA14WT+FOX, pentapéptido: 3.70 mol%). En situación de inducción de *dacB* y tratamiento con ceftazidima, la mureina de pHERD-PBP4/PA14WT mantiene la reducción indicada para la cantidad relativa de anhidros, muestra una recuperación en niveles DAP-DAP/D-D Total, revierte el nivel de M5 a valores normales, y exhibe un significativo descenso en formas diméricas acompañado de un aumento en componente monomérico. En el tratamiento del mutante de inserción PA14::*dacB* con ceftazidima, destacan cambios muy sutiles para las cantidades de DAP-DAP/D-D Total, además de un incremento en la abundancia de monómero disacárido pentapéptido. El estado de complementación y sobreexpresión de LMM-PBP4 para la cepa tratada con CAZ (pHERD-PBP4/PA14::*dacB*+CAZ) genera un descenso moderado en dímeros (30.83 mol% frente a 32.95 mol%) y trímeros (2.63 mol% frente a 3.17 mol%), un aumento leve en monómeros (66.42 mol% frente a 62.87 mol%) y un efecto de reversión de M5 a valores normales (0.38 mol% frente a 0.53 mol%). La composición del peptidoglicano para el mutante PA14::*ampE* tratado con CAZ, demuestra solo un incremento en la cantidad de muropéptido pentapeptídico respecto de la cepa control sin tratamiento antibiótico (pentapéptido: 1.11 mol% frente a 0.48 mol%); pHERD-PBP4/PA14::*ampE* en condiciones de inducción [L(+)-arabinosa 0.2% e IPTG 2 mM] e incubación con CAZ, muestra una organización estructural de su peptidoglicano en que se confirma una reducción menor para DAP-DAP, D-D Total y entrecruzamiento, un descenso significativo en componentes diméricos y triméricos (efecto que condiciona un aumento moderado en el nivel de constituyentes monoméricos) y una valoración de la fracción molar para monómero disacárido pentapéptido (M5), equivalente a la descrita para la cepa de referencia PA14::*ampE* (pentapéptido: 0.39 mol% frente a 0.48 mol%). Una situación similar se presenta en el mutante PA14::*ampDh2* tratado con ceftazidima, donde destaca una reducción menor en terminales de cadena anhidros (formas anhidras: 6.59 mol% frente a 8.12 mol%), cambio que condiciona un incremento en longitud de cadena, además de un aumento en la cantidad de muropéptido M5 (pentapéptido: 1.03 mol% frente a 0.43 mol%). La sobreexpresión de LMM-PBP4 y el tratamiento antibiótico en esta cepa (pHERD-

PBP4/PA14::*ampDh2*+L(+)-arabinosa 0.2%+CAZ) determina un descenso de formas anhidras (mayor longitud de cadena), en la cantidad de lipoproteína (efecto demostrado en cada situación de inducción de *dacB* para esta cepa) y en el nivel de dímeros (27.78 mol% frente a 31.15 mol%) y trímeros (1.88 mol% frente a 2.63 mol%), del mismo modo, que un aumento en monómeros (70.26 mol% frente a 66.11 mol%) y la restitución de M5 a valores de referencia (pentapéptido: 0.34 mol% frente a 0.43 mol%). Los valores de IC₅₀ descritos para proteínas de membrana recuperadas desde PAO1 y ensayadas frente a ceftazidima (CAZ), confirman una afinidad reducida por HMM-PBP1b, HMM-PBP2, LMM-PBP4 y LMM-PBP5/6, moderada para HMM-PBP1a y alta frente a HMM-PBP3 (Moyá *et al.*, 2010; Moyá *et al.*, 2012), lo anterior condiciona un bloqueo de LMM-PBPs menos eficiente que el ejecutado por el antibiótico cefoxitina, situación que favorece, junto a la inducción de *dacB*, cambios estructurales y de reversión de menor intensidad para componentes del peptidoglicano, que dan cuenta, del mismo modo que en el tratamiento con cefoxitina e imipenem, del desarrollo de funcionalidades de tipo D,D-EPasa y D,D-CPasa *in vivo* para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* (Figuras 83a, 83b, 83c y 83d).

El tratamiento de cepas PA14WT, PA14::*dacB*, PA14::*ampE* y PA14::*ampDh2* con monobactámico aztreonam (ATM), reconocido como mal bloqueante de LMM-PBPs, origina cambios en la organización del PG que continúan la tendencia demostrada en el tratamiento antibiótico con imipenem y ceftazidima, respectivamente, y en donde predomina un incremento menor, pero significativo, en el nivel de muropéptido pentapeptídico (PA14WT, pentapéptido: 0.91 mol% frente a 0.44 mol%; PA14::*dacB*, pentapéptido: 1.32 mol% frente a 0.53 mol%; PA14::*ampE*, pentapéptido: 1.04 mol% frente a 0.48 mol%; PA14::*ampDh2*, pentapéptido: 0.99 mol% frente a 0.43 mol%). La inducción de *dacB* y el tratamiento antibiótico con ATM en cepas *wild-type* y mutantes, genera la reducción en dímeros y trímeros, con el consiguiente aumento de monómeros (modificación estructural evidente en estirpes sometidas a inducción y tratadas con FOX e IMP), además de la disminución en los valores de M5 a niveles descritos para cepas de referencia en condiciones naturales (no inducidas-no tratadas con ATM) (pHERD-PBP4/PA14WT+L(+)-arabinosa 0.2%+ATM, pentapéptido: 0.47 mol% frente a 0.44 mol%; pHERD-PBP4/PA14::*dacB*+L(+)-arabinosa 0.2%+ATM, pentapéptido: 0.41 mol% frente a 0.53 mol%; pHERD-PBP4/PA14::*ampE*+L(+)-arabinosa 0.2%+ATM, pentapéptido: 0.40 mol% frente a 0.48 mol%; pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2*+L(+)-arabinosa 0.2%+ATM, pentapéptido: 0.36 mol% frente a 0.43 mol%) (Figuras 84a, 84b, 84c y 84d).

Modelos actuales consideran que los efectos específicos sobre la pared celular, producidos por concentraciones subinhibitorias de ciertos β -lactámicos, tales como cefoxitina e imipenem, determinan la acumulación citoplasmática de residuos 1,6-anhidroMurNAc, muropéptidos que reemplazan al represor UDP-MurNAc-pentapéptido desde el regulador AmpR, determinando la activación del gen *ampC* (Johnson *et al.*, 2013). Estudios preliminares han demostrado una correlación entre la potencia de inducción de AmpC por β -lactámicos y la afinidad de estos antibióticos por ciertas LMM-PBPs en *Escherichia coli* (Sanders *et al.*, 1997), situación recientemente reconocida en el modelo *Pseudomonas aeruginosa*, a través del hallazgo de la inactivación de *dacB* (gen codificante de enzima centinela LMM-PBP4, utilizada en la detección de la presencia de antibióticos β -lactámicos) como principal mecanismo de sobreexpresión de β -lactamasa AmpC (Moyá *et al.*, 2009; Cavallari *et al.*, 2013). Lo descrito supone un

papel importante de LMM-PBPs en la inducción de AmpC, sin embargo, los efectos específicos sobre pared celular al desencadenar la respuesta de inducción de esta β -lactamasa, son desconocidos. Utilizando *Aeromonas hydrophila* como organismo modelo, se logró demostrar que la inactivación de PBP4 conduce a la sobreexpresión de β -lactamasas, hallazgo que fue correlacionado con el incremento en los niveles de pentapéptido de su peptidoglicano, un efecto presumiblemente causado por una actividad D,D-carboxipeptidasa reducida (Tayler *et al.*, 2010). Un trabajo ejecutado recientemente por nuestro grupo y parte del equipo de investigación en Resistencia Antibiótica y Patogenia de las Infecciones Bacterianas del Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa), Palma de Mallorca, con la intención de evaluar el papel de las principales LMM-PBPs de *Pseudomonas aeruginosa* [DacB (LMM-PBP4), DacC (LMM-PBP5) y PbpG (LMM-PBP7)] en la estructura del peptidoglicano y en la regulación de *ampC*, en condiciones basales y de tratamiento con cefoxitina, concluye que la mutación en *dacB* genera un nivel de expresión importante para *ampC* sin modificar considerablemente el nivel de muropeptido pentapeptídico, que la mutación en *dacC* presenta un nivel de expresión menor para *ampC* con un incremento significativo en el nivel de M5, y que la doble mutación en *dacB-dacC* condiciona un efecto sinérgico en la expresión de *ampC* (expresión de alto nivel) vinculado a un aumento considerable en la cantidad relativa de monómero disacárido pentapéptido, resultados que favorecen la correlación entre los niveles de pentapéptido en peptidoglicano y la expresión de *ampC*, y hacen posible sugerir la intervención de este muropeptido en el mecanismo molecular que conecta la sobreexpresión de AmpC y la mutación en el gen *dacB* (inactivación de LMM-PBP4 por antibiótico β -lactámico), sin lograr determinar el efecto preciso de LMM-PBP4 en la inducción de esta β -lactamasa (Ropy *et al.*, 2014; AAC04236-14). Esta información se condice con la interpretación que actualmente Fisher & Mobashery, 2014 realizan sobre la identidad estructural del muropeptido efector para la inducción de AmpC, postulando al producto 1,6-anhidroMurNAc-pentapéptido como el co-inductor que desreprime *ampC*, sin embargo, y de manera contraria a lo documentado, nuestro análisis sobre el papel de LMM-PBP4 en el mecanismo de inducción de resistencia (hiperproducción de β -lactamasa AmpC) y en la integridad estructural del peptidoglicano, en condiciones de complementación, sobreexpresión e inactivación antibiótica de esta proteína, para estirpe *wild-type* y cepas mutadas en proteínas DacB, AmpE y AmpDh2, no demuestra cambios en la composición estructural de su mureina correspondiente con un incremento en la cantidad de M5, que permita sugerir un sistema de activación para *ampC* dirigido por el nivel de este muropeptido, por lo que la resistencia frente a antibióticos β -lactámicos desencadenada por la producción de β -lactamasa AmpC producto de la inactivación de *dacB*, parece no depender de un efector derivado de pentapéptido. La divergencia y el carácter presuntivo de los resultados, confirma claramente que el abordaje de este tema a partir del análisis cromatográfico de la pared celular en relación a su composición en muropeptidos (con una utilidad demostrada en el entendimiento de la arquitectura y ensamblaje del peptidoglicano, y de los mecanismos enzimáticos que actúan sobre este polímero) no es aplicable en estudios con la intencionalidad de definir la configuración estructural exacta del efector intracelular final que activa la expresión de *ampC* en el modelo *Pseudomonas aeruginosa* (sólo se ha logrado inferir la probable naturaleza constitutiva para este anhidro-muropeptido), por lo tanto, lo que corresponde es lograr la purificación de muropeptidos solubles a través de estrategias de afinidad en soporte sólido, concepto experimental que nuestro grupo ha

desarrollado de modo preliminar, para la detección y cuantificación de precursores de peptidoglicano en un solo paso, mediante un sistema de cromatografía de afinidad por vancomicina inmovilizada (compuestos con dipéptido terminal D-Ala-D-Ala). Dado que el conocimiento actual confirma que *ampR* induce la expresión de *ampC* mediante la unión a uno de los miembros de la familia 1,6-anhidroMurNAc-péptidos, que tanto especies tripeptídicas como pentapeptídicas podrían actuar a este nivel en el modelo *Citrobacter freundii* (Balcewich *et al.*, 2010), que en *Pseudomonas aeruginosa* se predice (con cierta discrepancia) una naturaleza pentapeptídica para este ligando activador interno, y que sólo algunos muropéptidos poseen el terminal D-Ala-D-Ala necesario para lograr afinidad con vancomicina, se hace necesario el desarrollo de una metodología de mayor universalidad, probablemente basada en la identificación de residuos conservados de tipo GlcNAc (N-acetilglucosamina) o MurNAc (N-acetilmurámico), a través de un nuevo procedimiento de afinidad para el reconocimiento de glúcidos por lectinas o el empleo de anticuerpos anti-peptidoglicano (fracción sacárida), que permita la captura de efectores citoplasmáticos de interés (independientemente de la longitud de su cadena peptídica) para su posterior separación e identificación.

Tabla 23 | Composición de peptidoglicano para *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (*wild-type*) en condiciones naturales y de sobreexpresión e inactivación antibiótica para LMM-PBP4^a

Abundancia Relativa (mol%)										
Muestra	Monómeros	Dímeros	Trímeros	DAP-DAP ^b	Lipoproteína ^c	Formas Anhidras ^d	Pentapéptido ^e	Entrecruzamiento (%)	D-D Total (%) ^f	Longitud Cadena
PA14WT	63.90	32.61	2.40	1.14	1.68	8.14	0.44	37.66	3.06	12.29
pHERD-PBP4/PA14WT No Inducido	67.58	29.42	1.91	1.02	1.96	7.33	0.40	33.49	2.86	13.65
pHERD-PBP4/PA14WT + Arabinosa 0.2%	76.85	21.93	1.21	1.10	1.93	4.49	0.34	24.36	3.53	22.25
PA14WT + FOX	59.09	37.38	3.41	0.98	1.29	8.62	3.70	44.57	2.05	11.60
pHERD-PBP4/PA14WT + Arabinosa 0.2% + FOX	65.84	31.75	2.32	1.15	1.72	8.18	2.17	36.67	3.14	12.22
PA14WT + IMP	65.71	31.93	2.25	1.08	1.50	9.37	1.57	36.75	2.94	10.67
pHERD-PBP4/PA14WT + Arabinosa 0.2% + IMP	65.16	32.74	1.99	0.83	1.85	8.29	1.07	37.04	2.24	12.06
PA14WT + CAZ	66.14	31.49	2.30	0.68	1.65	6.19	0.98	36.29	1.88	16.15
pHERD-PBP4/PA14WT + Arabinosa 0.2% + CAZ	70.46	27.69	1.77	1.18	1.96	6.68	0.38	34.48	3.74	14.97
PA14WT + ATM	64.61	32.76	2.55	0.93	1.61	6.62	0.91	38.10	2.45	15.12
pHERD-PBP4/PA14WT + Arabinosa 0.2% + ATM	70.80	27.45	1.69	0.95	1.80	6.56	0.47	36.02	3.07	15.25

^aValores promedio obtenidos desde dos ensayos independientes. FOX, ceftixima; IMP, imipenem; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam

^dFormas anhidras: muropéptido con un residuo 1,6-anhidro/muNac

^ePentapéptido, muropéptido con una cadena pentapéptídica

^fD-D Total, entrecruzamientos DAP-DAP respecto del total

Tabla 24 | Composición de peptidoglicano para mutante de inserción PA14::*dacB* en condiciones naturales y de complementación-sobreexpresión e inactivación antibiótica para LMM-PBP4

Abundancia Relativa (mol%)										
Muestra	Monómeros	Dímeros	Trímeros	DAP-DAP	Lipoproteína	Formas Anhidras	Pentapéptido	Entrecruzamiento	D-D Total (%)	Longitud Cadena
PA14:: <i>dacB</i>	62.27	34.06	2.23	1.15	1.84	9.19	0.53	39.05	2.69	10.89
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> No Inducido	63.94	32.28	1.82	1.33	2.07	9.47	0.46	41.51	3.02	10.56
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + Arabinosa 0.2%	67.85	28.66	1.46	1.13	2.09	8.20	0.36	36.78	3.08	12.19
PA14:: <i>dacB</i> + FOX	57.05	38.72	3.04	1.47	1.61	9.36	3.40	47.38	3.11	10.69
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + Arabinosa 0.2% + FOX	63.15	33.91	2.86	0.98	1.82	9.08	1.09	39.87	2.00	11.01
PA14:: <i>dacB</i> + IMP	60.95	35.45	3.01	1.13	1.77	9.51	2.10	42.73	2.66	10.52
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + Arabinosa 0.2% + IMP	61.39	35.71	2.81	0.70	1.73	9.59	1.27	41.59	1.68	10.42
PA14:: <i>dacB</i> + CAZ	62.87	32.95	3.17	0.82	2.12	9.03	1.34	41.52	1.97	11.03
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + Arabinosa 0.2% + CAZ	66.42	30.83	2.63	0.85	1.99	9.07	0.38	40.44	2.32	11.02
PA14:: <i>dacB</i> + ATM	60.61	35.61	3.07	1.18	1.67	8.64	1.32	43.26	2.73	11.57
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + Arabinosa 0.2% + ATM	65.60	31.37	2.91	0.94	1.91	8.78	0.41	38.54	2.49	11.38

Tabla 25 | Composición de peptidoglucano para mutante de inserción PA14::ampE en condiciones naturales y de complementación-sobreexpresión e inactivación antibiótica para LMM-PBP4

Muestra	Abundancia Relativa (mol%)									
	Monómeros	Dímeros	Trímeros	DAP-DAP	Lipoproteína	Formas Anhidras	Pentapéptido	Entrecruzamiento	D-D Total (%)	Longitud Cadena
PA14::ampE	64.23	33.23	2.45	1.16	1.60	7.36	0.48	38.42	3.03	13.59
pHERD-PBP4/PA14::ampE No Inducido	70.50	27.77	1.73	0.39	1.74	5.69	0.42	31.23	1.26	17.57
pHERD-PBP4/PA14::ampE + Arabinosa 0.2%	77.02	21.01	0.97	0.49	1.78	5.12	0.33	23.95	2.06	19.51
PA14::ampE + FOX	57.99	38.20	3.71	1.56	1.41	8.78	4.10	45.92	3.39	11.22
pHERD-PBP4/PA14::ampE + Arabinosa 0.2% + FOX	62.21	35.26	2.47	0.98	1.89	7.88	1.18	40.39	2.42	12.68
PA14::ampE + IMP	63.38	33.99	2.51	1.15	1.54	8.19	1.58	39.36	2.91	12.22
pHERD-PBP4/PA14::ampE + Arabinosa 0.2% + IMP	62.54	35.01	2.37	0.74	1.75	8.99	1.16	39.96	1.86	11.12
PA14::ampE + CAZ	65.20	32.17	2.51	1.16	1.59	7.07	1.11	37.56	3.09	14.15
pHERD-PBP4/PA14::ampE + Arabinosa 0.2% + CAZ	69.73	28.45	1.83	0.80	1.70	6.94	0.39	33.10	2.49	14.41
PA14::ampE + ATM	64.23	32.96	2.70	1.20	1.50	7.08	1.04	38.70	3.09	14.13
pHERD-PBP4/PA14::ampE + Arabinosa 0.2% + ATM	69.12	29.05	1.78	0.96	1.86	6.79	0.40	35.77	2.62	15.08

Tabla 26 | Composición de peptidoglucano para mutante de inserción PA14::ampDh2 en condiciones naturales y de complementación-sobreexpresión e inactivación antibiótica para LMM-PBP4

Muestra	Abundancia Relativa (mol%)									
	Monómeros	Dímeros	Trímeros	DAP-DAP	Lipoproteína	Formas Anhidras	Pentapéptido	Entrecruzamiento	D-D Total (%)	Longitud Cadena
PA14::ampDh2	63.30	33.86	2.74	1.34	1.75	8.12	0.43	37.63	3.38	12.31
pHERD-PBP4/PA14::ampDh2 No Inducido	70.39	27.62	1.90	0.83	1.49	6.66	0.39	31.70	2.22	15.01
pHERD-PBP4/PA14::ampDh2 + Arabinosa 0.2%	71.16	26.89	1.85	1.06	1.26	5.99	0.37	30.79	3.34	16.71
PA14::ampDh2 + FOX	59.48	36.99	3.36	1.45	1.62	8.32	2.88	44.23	3.28	12.02
pHERD-PBP4/PA14::ampDh2 + Arabinosa 0.2% + FOX	62.93	34.18	2.77	1.28	1.39	8.88	0.43	40.07	3.21	11.27
PA14::ampDh2+ IMP	63.67	33.72	2.50	1.04	1.96	7.81	1.64	39.04	2.67	12.80
pHERD-PBP4/PA14::ampDh2 + Arabinosa 0.2% + IMP	63.85	33.07	2.97	1.45	1.57	10.22	0.66	39.37	3.69	9.78
PA14::ampDh2 + CAZ	66.11	31.15	2.63	1.26	1.83	6.59	1.03	36.72	3.42	15.18
pHERD-PBP4/PA14::ampDh2 + Arabinosa 0.2% + CAZ	70.26	27.78	1.88	1.13	1.46	6.53	0.34	35.79	3.56	15.32
PA14::ampDh2 + ATM	62.72	34.14	3.05	1.66	1.74	7.59	0.99	40.52	4.10	13.18
pHERD-PBP4/PA14::ampDh2 + Arabinosa 0.2% + ATM	69.92	28.15	1.86	1.20	1.51	6.47	0.36	33.07	3.23	15.45

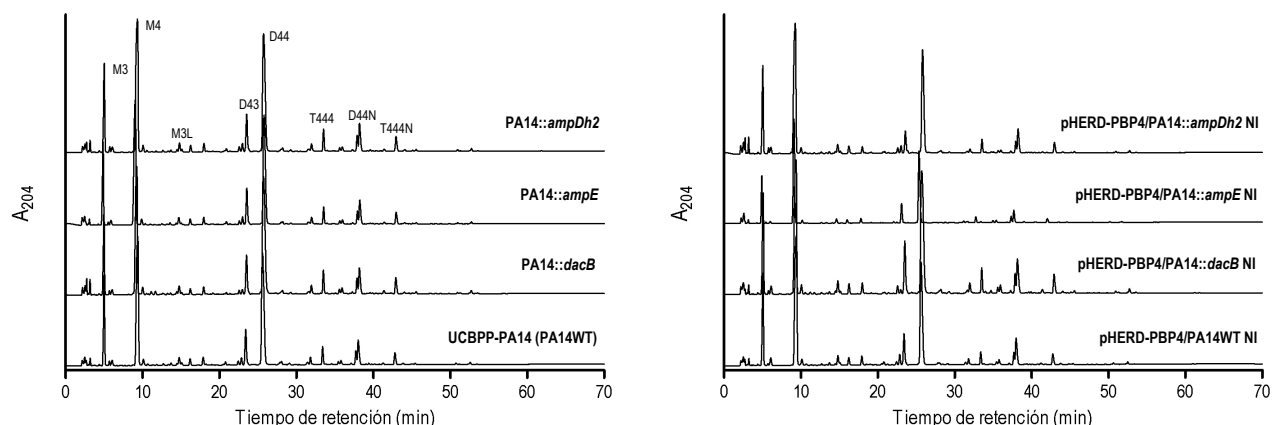


Figura 76 | Peptidoglicano para cepa de referencia UCBPP-PA14 (PA14WT), mutante por transposición PA14::*ampDh2*, mutante PA14::*ampE* y mutante PA14::*ampDh2*. Monómero disacárido tripéptido (M3); monómero disacárido tetrapéptido (M4); monómero disacárido tripéptido asociado a lipoproteína (M3L); dímero disacárido tetrapéptido-tripéptido (D43); dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido (D44); dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido anhidro (D44N); trímero tetrapéptido-tetrapéptido-tetrapéptido (T444) y trímero tetrapéptido-tetrapéptido-tetrapéptido anhidro (T444N)

Figura 77 | Estructura de peptidoglicano para cepas transformantes pHERD-PBP4/PA14WT, pHERD-PBP4/PA14::*dacB*, pHERD-PBP4/PA14::*ampE* y pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2* sin inducir. NI, No Inducido

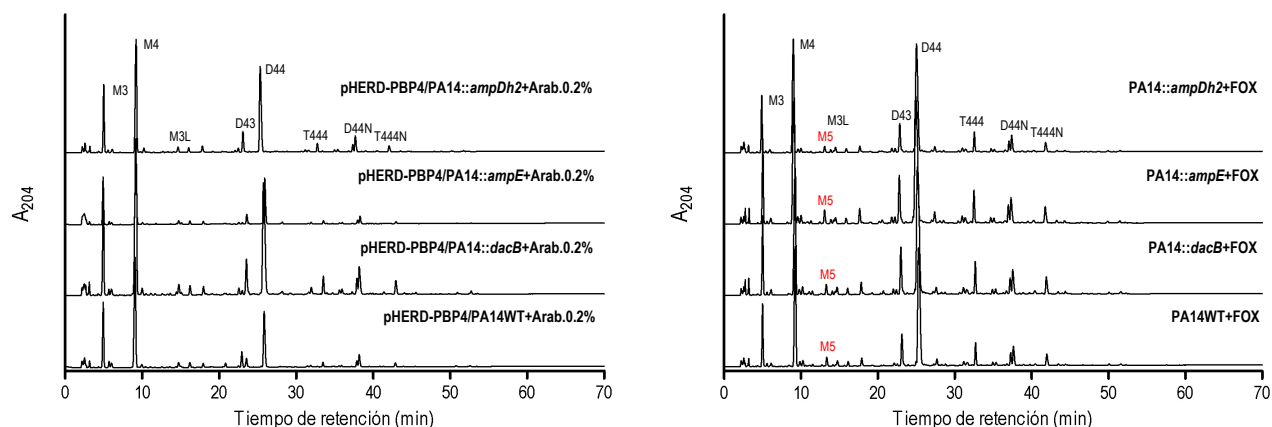


Figura 78 | Composición de peptidoglicano para cepas transformantes pHERD-PBP4/PA14WT, pHERD-PBP4/PA14::*dacB*, pHERD-PBP4/PA14::*ampE* y pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2* inducidas con L(+)-arabinosa 0.2%. Arab., Arabinosa

Figura 79 | Peptidoglicano para cepa de referencia UCBPP-PA14 (PA14WT) y mutantes por transposición PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2* tratados con cefoxitina (FOX). Se indica en color rojo la abreviatura asignada para la representación cromatográfica de la cantidad relativa de monómero disacárido pentapéptido (M5)

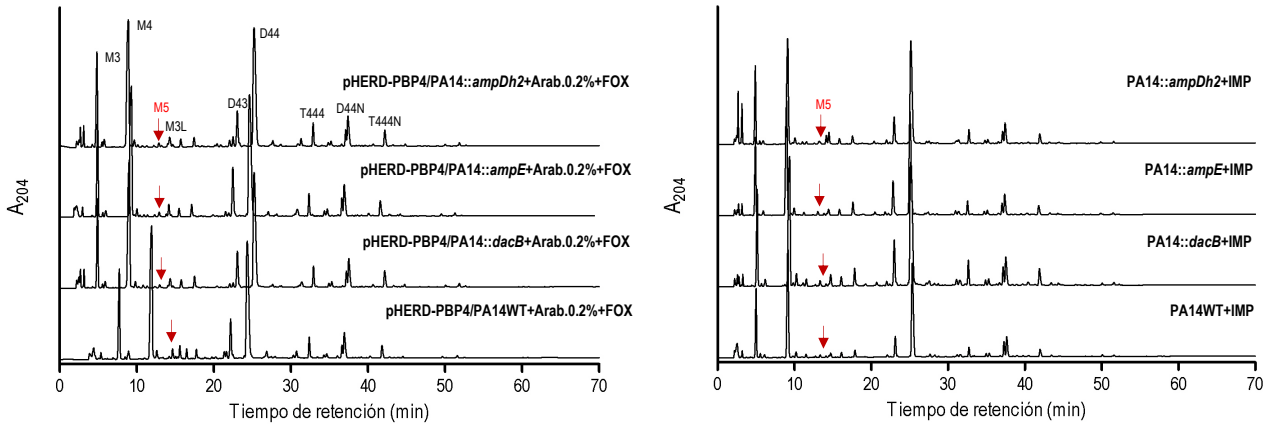


Figura 80 | Composición de peptidoglicano para cepas transformantes pHERD-PBP4/PA14WT, pHERD-PBP4/PA14::*dacB*, pHERD-PBP4/PA14::*ampE* y pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2* inducidas con L(+)-arabinosa 0.2% y tratadas con cefoxitina (FOX). Flechas de color rojo indican la representación cromatográfica para la cantidad relativa de monómero disacárido pentapeptídico (M5). Arab., Arabinosa

Figura 81 | Estructura de peptidoglicano para cepa de referencia UCBPP-PA14 (PA14WT) y mutantes por transposición PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2* tratados con imipenem (FOX). Flechas de color rojo indican la representación cromatográfica para la cantidad relativa de monómero disacárido pentapeptídico (M5)

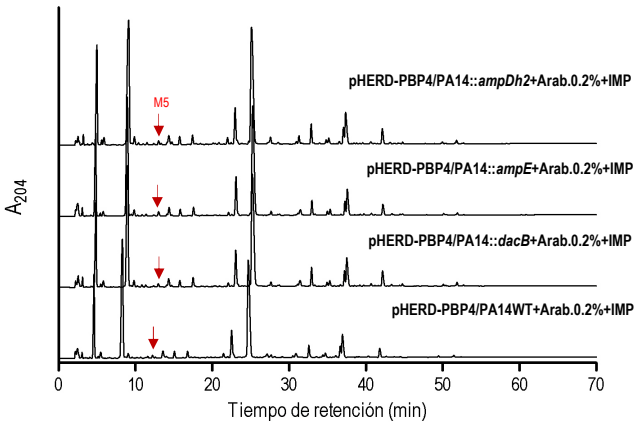


Figura 82 | Peptidoglicano para cepas transformantes pHERD-PBP4/PA14WT, pHERD-PBP4/PA14::*dacB*, pHERD-PBP4/PA14::*ampE* y pHERD-PBP4/PA14::*ampDh2* inducidas con L(+)-arabinosa 0.2% y tratadas con imipenem (IMP). Flechas de color rojo indican la representación cromatográfica para la cantidad relativa de monómero disacárido pentapeptídico (M5). Arab., Arabinosa

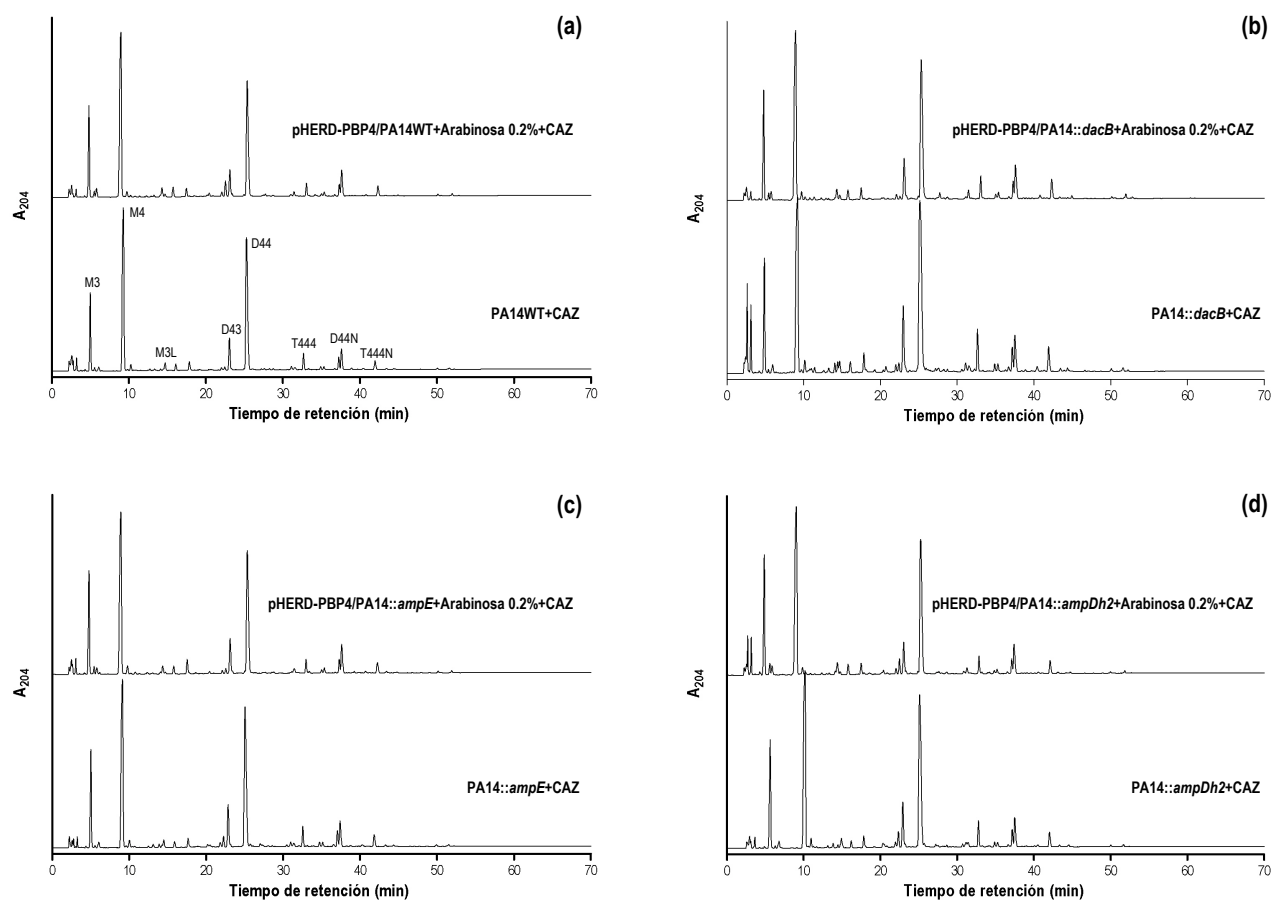


Figura 83 | (a) Peptidoglicano para cepa de referencia UCBPP-PA14 (PA14WT) tratada con ceftazidima (CAZ). Estructura de peptidoglicano para cepa *wild-type* UCBPP-PA14 en situación de inducción de *dacB* y tratamiento con CAZ (b) Organización de peptidoglicano para mutante por transposición PA14::*dacB* tratado con ceftazidima. Estructura de peptidoglicano para cepa PA14::*dacB* en situación de complementación-sobreexpresión de LMM-PBP4 y tratamiento con ceftazidima (c) Composición de muropéptidos para mutante por transposición PA14::*ampE* tratado con ceftazidima. Estructura de peptidoglicano para estirpe PA14::*ampE* en situación de inducción de *dacB* y tratamiento con ceftazidima (d) Organización de mureína en mutante PA14::*ampDh2* tratado con ceftazidima. Mureína para mutante PA14::*ampDh2* sobreexpresando DacB y tratado con ceftazidima

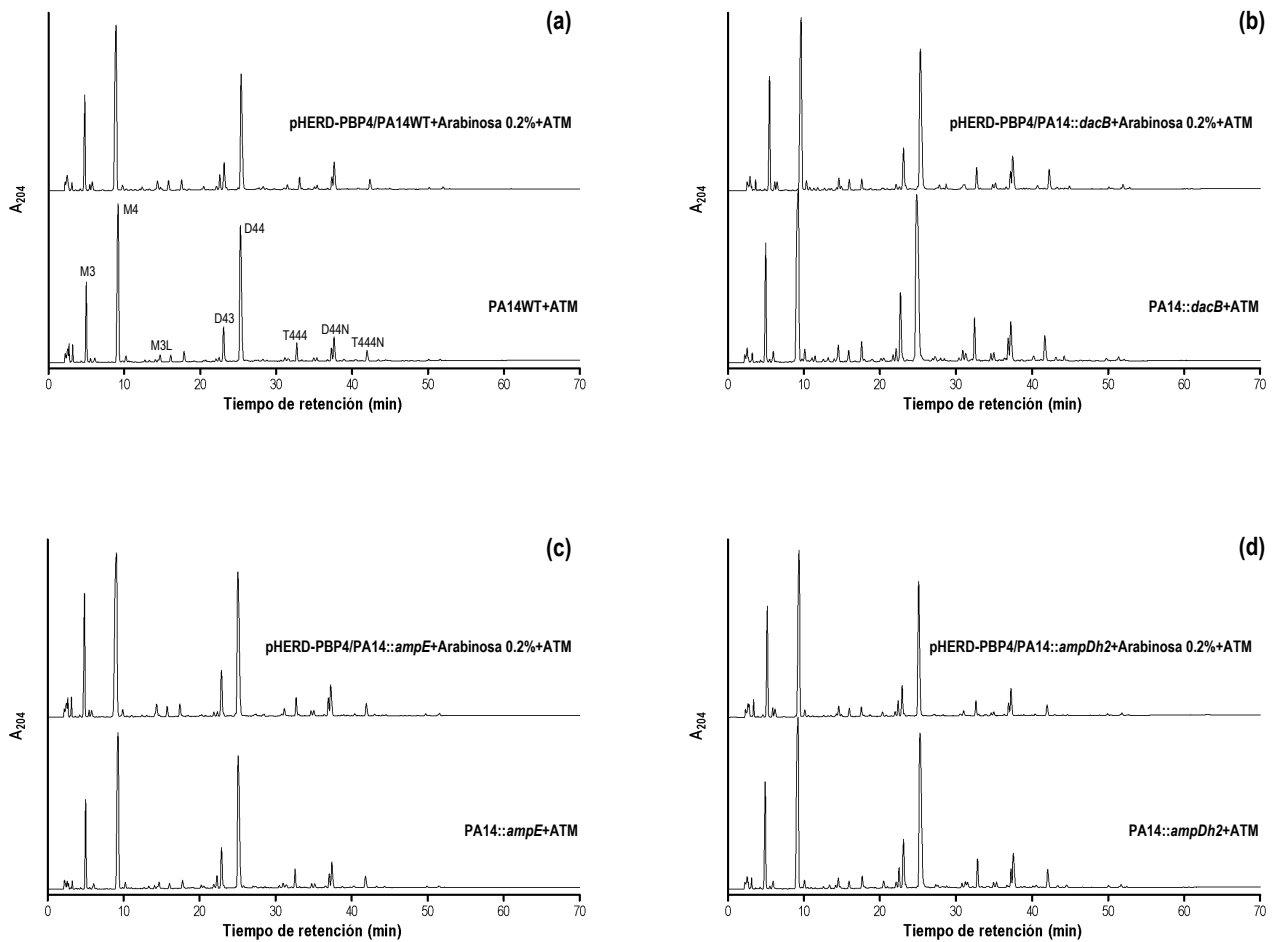


Figura 84 | (a) Peptidoglicano para cepa de referencia UCBPP-PA14 (PA14WT) tratada con aztreonam (ATM). Estructura de peptidoglicano para cepa *wild-type* UCBPP-PA14 en situación de inducción de *dacB* y tratamiento con ATM (b) Organización de peptidoglicano para mutante por transposición PA14::*dacB* tratado con aztreonam. Estructura de peptidoglicano para cepa PA14::*dacB* en situación de complementación-sobreexpresión de LMM-PBP4 y tratamiento con aztreonam (c) Composición de muropeptidos para mutante por transposición PA14::*ampE* tratado con aztreonam. Estructura de peptidoglicano para estirpe PA14::*ampE* en situación de inducción de *dacB* y tratamiento con aztreonam (d) Organización de mureina en mutante PA14::*ampDh2* tratado con aztreonam. Mureina para mutante PA14::*ampDh2* sobreexpresando *DacB* y tratado con aztreonam

4.21. Muropeptidos purificados. Análisis proteómico

El perfil de muropeptidos recuperado por HPLC para la cepa de referencia UCBPP-PA14 (*wild-type*) y estirpes mutantes PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2*, transformadas con clones recombinantes pHERD-PBP4/pSEVA-PBP4 e investigadas en condiciones naturales y de complementación-sobreexpresión e inactivación antibiótica de LMM-PBP4, presentaron un conjunto de muropeptidos de naturaleza monomérica que no logró ser identificado a través del análisis comparativo frente a tiempos de elución para muropeptidos conocidos. Los productos obtenidos (con tiempos de retención para cepa WT) fueron nombrados como muropeptido A (tiempo de retención 16.19 min),

A.1 (tiempo de retención 17.89 min), B (tiempo de retención 5.70 min), C (tiempo de retención 11.87 min), D (tiempo de retención 14.51 min), D.1 (tiempo de retención 15.11 min), E (tiempo de retención 12.71 min) y F (tiempo de retención 11.39 min) (Figura 85a, 85b). Las cantidades relativas para cada producto de elución se indican en las Tablas 27, 28, 29 y 30; donde es posible destacar la mayor abundancia para muropéptidos A-A.1, posiblemente relacionados con el complejo lipoproteína-peptidoglicano M3L (monómero disacárido tripéptido unido a lipoproteína). Un estudio previo, orientado a determinar la variabilidad estructural del peptidoglicano en bacterias Gram negativas, informó de un componente desconocido para el peptidoglicano de *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*, sin equivalencia con algún muropéptido conocido en el modelo *E. coli*, con una abundancia relativa significativa (2.0%, 1.4% y 1.9%, respectivamente) y un tiempo de retención similar al indicado para el muropéptido A que hemos indicado. Los autores de esta investigación sugirieron la correspondencia de este producto con un muropéptido modificado, sin lograr establecer su naturaleza estructural (Quintela *et al.*, 1995).

Un análisis preliminar basado en la preparación de peptidoglicano para la cepa *wild-type* (UCBPP-PA14) en condiciones de no tratamiento con pronasa-E y de digestión por un período de tiempo de 60 min y 180 min, demuestra la conexión entre el muropéptido A y lipoproteína (Figura 86), probablemente OprL, la segunda lipoproteína más abundante en *Pseudomonas aeruginosa*, equivalente a la lipoproteína asociada a peptidoglicano (PAL) en el modelo *Escherichia coli* y con un rol en la mantención de la integridad estructural de la célula (Remans *et al.*, 2010). Los resultados confirman la ausencia de M3L y del muropéptido A en el PG de la muestra no sometida a digestión con pronasa, y la presencia de estos productos en aquellas muestras sometidas a digestión por 60-180 min, además de la permanencia del muropéptido A.1 en cada condición investigada, circunstancia que propone la no asociación de este producto (A.1) a lipoproteína OprL.

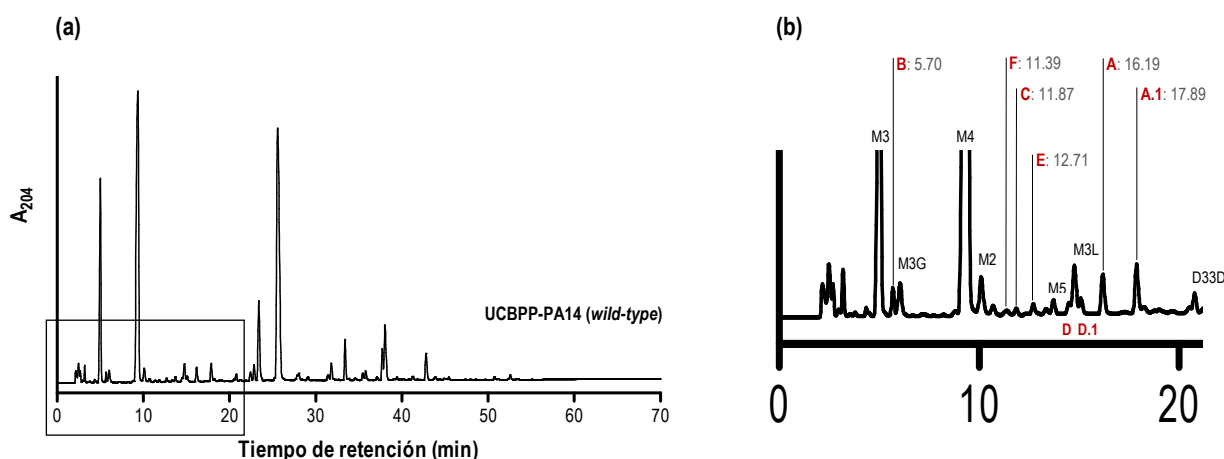


Figura 85 | (a) Separación de peptidoglicano mediante HPLC para cepa de referencia UCBPP-PA14 (b) Imagen ampliada de la zona de elución para muropéptidos monoméricos desconocidos. La ubicación de cada producto se indica mediante letras mayúsculas (rotulación asignada), especificando su tiempo de retención en minutos. M3, GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm; M3G, GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm-glicina; M4, GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm-D-Ala; M2, GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu; M5, GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*A₂pm-D-Ala-D-Ala; M3L, monómero M3 unido a lipoproteína; D33D, dímero de M3 con entrecruzamiento de estereoquímica L-D

Resultados

Tabla 27 | Cantidad relativa (mol%) de muropéptidos desconocidos en la composición de peptidoglicano para cepa de referencia UCBPP-PA14 (*wild-type*) transformada con clones recombinantes pHERD-PBP4/pSEVA-PBP4, sometida a inducción (sobrexpresión de LMM-PBP4) y tratamiento antibiótico inactivante

Muestra ^a	Abundancia Relativa (mol%) ^b							
	A	A.1	B	C	D	D.1	E	F
PA14WT	0.83	1.08	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14WT No Inducido	1.12	1.31	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14WT + Arabinosa 0.2%	1.39	1.06	1.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PA14WT + FOX	0.69	1.31	0.35	0.31	0.22	0.90	0.00	0.31
pHERD-PBP4/PA14WT + Arabinosa 0.2% + FOX	1.00	1.02	0.23	0.00	0.00	0.00	1.14	0.00
PA14WT + IMP	0.97	1.46	0.63	0.60	0.30	0.90	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14WT + Arabinosa 0.2% + IMP	1.05	1.14	0.26	0.00	0.00	0.00	0.48	0.00
PA14WT + CAZ	0.93	1.43	0.38	0.00	0.23	1.25	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14WT + Arabinosa 0.2% + CAZ	1.32	1.13	0.64	0.00	0.15	0.40	0.00	0.00
PA14WT + ATM	0.91	1.55	0.42	0.00	0.31	1.05	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14WT + Arabinosa 0.2% + ATM	1.30	1.35	0.63	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00
pSEVA-PBP4/PA14WT + IPTG 2mM + FOX	0.75	1.00	0.26	0.35	0.00	0.00	0.00	0.31
pSEVA-PBP4/PA14WT + IPTG 2mM + IMP	1.14	1.55	0.25	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00
pSEVA-PBP4/PA14WT + IPTG 2mM + CAZ	0.94	1.52	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pSEVA-PBP4/PA14WT + IPTG 2mM + ATM	0.86	1.36	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

^a PA14WT, UCBPP-PA14; FOX, cefoxitina; IMP, imipenem; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam

^b Valor promedio obtenido desde dos ensayos independientes

Tabla 28 | Cantidad relativa (mol%) de muropéptidos desconocidos en la composición de peptidoglicano para estirpe mutante PA14::*dacB* transformada con clones recombinantes pHERD-PBP4/pSEVA-PBP4, sometida a inducción (complementación-sobrexpresión de LMM-PBP4) y tratamiento antibiótico inactivante

Muestra ^a	Abundancia relativa (mol%) ^b							
	A	A.1	B	C	D	D.1	E	F
PA14:: <i>dacB</i>	0.74	0.87	0.41	0.44	0.41	0.30	0.00	0.43
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> No Inducido	1.06	1.16	0.28	0.19	0.00	0.00	0.00	0.25
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + Arabinosa 0.2%	1.18	1.05	0.58	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00
PA14:: <i>dacB</i> + FOX	0.78	1.33	0.25	0.41	0.38	0.90	0.00	0.54
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + Arabinosa 0.2% + FOX	1.01	1.60	0.42	0.26	0.00	0.00	0.00	0.37
PA14:: <i>dacB</i> + IMP	1.06	2.10	0.26	0.75	0.23	1.37	0.00	0.51
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + Arabinosa 0.2% + IMP	0.89	1.42	0.32	0.29	0.00	0.00	0.00	0.34
PA14:: <i>dacB</i> + CAZ	0.79	1.36	0.20	0.38	0.61	0.85	0.00	0.32
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + Arabinosa 0.2% + CAZ	1.08	1.20	0.62	0.35	0.19	0.55	0.00	0.27
PA14:: <i>dacB</i> + ATM	0.87	1.43	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41
pHERD-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + Arabinosa 0.2% + ATM	1.04	1.13	0.71	0.28	0.21	0.41	0.00	0.24
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + IPTG 2mM + FOX	0.76	1.00	0.80	0.31	0.00	0.00	0.00	0.43
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + IPTG 2mM + IMP	1.43	1.41	1.27	0.25	0.42	0.00	0.00	0.29
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + IPTG 2mM + CAZ	1.24	1.39	1.92	0.28	0.00	0.00	0.00	0.47
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>dacB</i> + IPTG 2mM + ATM	1.36	1.51	1.85	0.30	0.00	0.00	0.00	0.53

^a PA14WT, UCBPP-PA14; FOX, cefoxitina; IMP, imipenem; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam

^b Valor promedio obtenido desde dos ensayos independientes

Tabla 29 | Cantidad relativa (mol%) de muropéptidos desconocidos en la composición de peptidoglicano para estirpe mutante PA14::*ampE* transformada con clones recombinantes pHERD-PBP4/pSEVA-PBP4, sometida a inducción (sobreexpresión de LMM-PBP4) y tratamiento antibiótico inactivante

Muestra ^a	Abundancia relativa (mol%) ^b							
	A	A.1	B	C	D	D.1	E	F
PA14:: <i>ampE</i>	0.88	1.00	0.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampE</i> No Inducido	0.94	1.38	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampE</i> + Arabinosa 0.2%	1.25	1.10	0.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PA14:: <i>ampE</i> + FOX	0.55	1.51	0.21	0.31	0.40	0.66	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampE</i> + Arabinosa 0.2% + FOX	0.93	1.37	0.42	0.22	0.00	0.00	0.00	0.27
PA14:: <i>ampE</i> + IMP	0.95	2.26	0.18	0.49	0.29	1.04	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampE</i> + Arabinosa 0.2% + IMP	0.99	1.41	0.39	0.27	0.00	0.00	0.00	0.25
PA14:: <i>ampE</i> + CAZ	0.71	1.18	0.22	0.00	0.37	0.98	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampE</i> + Arabinosa 0.2% + CAZ	1.03	2.02	0.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PA14:: <i>ampE</i> + ATM	0.69	1.22	0.18	0.00	0.36	0.91	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampE</i> + Arabinosa 0.2% + ATM	1.00	1.46	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampE</i> + IPTG 2mM + FOX	0.92	1.14	0.42	0.31	0.00	0.00	0.00	0.47
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampE</i> + IPTG 2mM + IMP	1.27	1.42	0.59	0.44	0.00	0.00	0.00	0.00
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampE</i> + IPTG 2mM + CAZ	1.07	1.37	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampE</i> + IPTG 2mM + ATM	1.08	1.38	0.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

^a PA14WT, UCBPP-PA14; FOX, cefoxitina; IMP, imipenem; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam

^b Valor promedio obtenido desde dos ensayos independientes

Tabla 30 | Cantidad relativa (mol%) de muropéptidos desconocidos en la composición de peptidoglicano para estirpe mutante PA14::*ampDh2* transformada con clones recombinantes pHERD-PBP4/pSEVA-PBP4, sometida a inducción (sobreexpresión de LMM-PBP4) y tratamiento antibiótico inactivante

Muestra ^a	Abundancia relativa (mol%) ^b							
	A	A.1	B	C	D	D.1	E	F
PA14:: <i>ampDh2</i>	0.80	1.02	0.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i> No Inducido	1.13	0.97	0.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i> + Arabinosa 0.2%	1.00	1.40	0.47	0.00	0.00	1.36	0.00	0.00
PA14:: <i>ampDh2</i> + FOX	0.63	1.15	0.25	0.23	0.43	0.91	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i> + Arabinosa 0.2% + FOX	0.89	1.09	0.48	0.18	0.00	0.00	0.47	0.00
PA14:: <i>ampDh2</i> + IMP	0.84	1.28	0.40	0.39	1.14	0.00	0.00	0.38
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i> + Arabinosa 0.2% + IMP	0.98	1.13	0.43	0.29	0.00	0.00	0.50	0.00
PA14:: <i>ampDh2</i> + CAZ	0.70	1.25	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i> + Arabinosa 0.2% + CAZ	1.10	1.20	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PA14:: <i>ampDh2</i> + ATM	0.75	1.18	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pHERD-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i> + Arabinosa 0.2% + ATM	1.08	1.18	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i> + IPTG 2mM + FOX	0.88	1.10	0.78	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i> + IPTG 2mM + IMP	1.21	1.47	1.23	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i> + IPTG 2mM + CAZ	1.04	1.47	1.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pSEVA-PBP4/PA14:: <i>ampDh2</i> + IPTG 2mM + ATM	1.18	1.54	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

^a PA14WT, UCBPP-PA14; FOX, cefoxitina; IMP, imipenem; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam

^b Valor promedio obtenido desde dos ensayos independientes

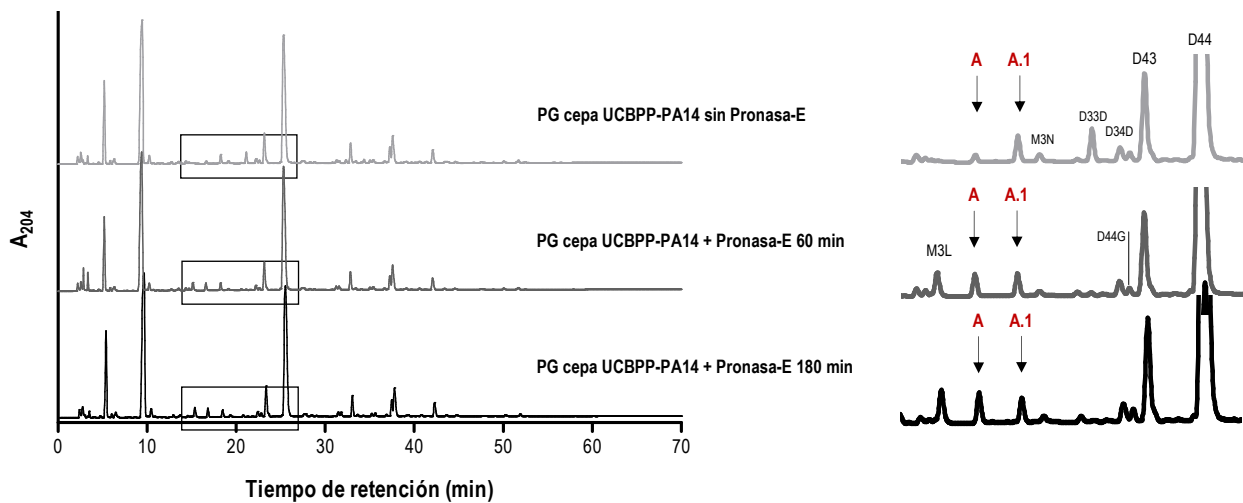


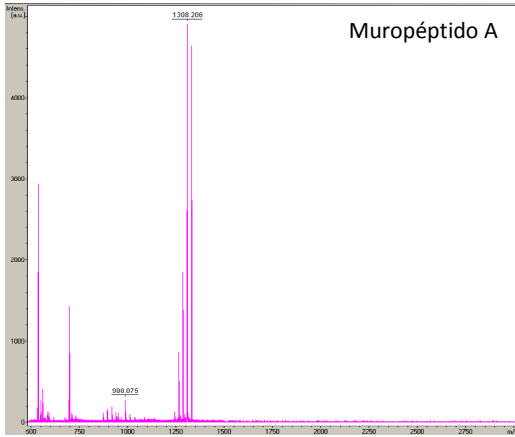
Figura 86 | Perfil de muropéptidos recuperados por HPLC para cepa de referencia UCBPP-PA14 sin tratamiento con pronasa-E y sometida a digestión por 60 y 180 min. A la derecha, imágenes amplificadas indican el comportamiento de muropéptidos A-A.1. Monómero disacárido tripéptido unido a lipoproteína (M3L); monómero disacárido tripéptido anhidro (M3N); dímero disacárido tripéptido-tripéptido con entrecruzamiento de estereoquímica L-D (D33D); dímero disacárido tripéptido-tetrapéptido con entrecruzamiento (LD)-DAP-DAP (D34D); disacárido tetrapéptido-tetrapéptido-glicina (D44G); disacárido tetrapéptido-tripéptido (D43); dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido (D44). PG, peptidoglicano; A_{204} , absorbancia 204 nm

El análisis de espectrometría de masa mediante MALDI-TOF y la identificación estructural de cada producto generado (en función de su ubicación dentro del perfil de muropéptidos para cepa *wild-type* UCBPP-PA14) para muropéptidos A, A.1, B, C, E, F (monómeros D, D.1 fueron descartados de este estudio, debido a la cercanía con M3L y a la dificultad en sus recuperaciones), entregó información cualitativa y conformacional muy precisa, sobre la naturaleza de cada monómero investigado. El espectro de masas para muropéptido A, identifica un producto con una masa experimental de 1242.19 Da, equivalente a la masa teórica de un monómero disacárido tripéptido con un segmento C-terminal KRS ($[M+H]^+$: 1242.60 Da) (Figuras 87a y 87a.1), derivado desde la lipoproteína de membrana externa OprI (locus PA2853 en cepa PAO1, lipoproteína no determinada para cepa de referencia UCBPP-PA14), homóloga a lipoproteína de Braun en *Escherichia coli*, y una de las más abundantes en *Pseudomonas aeruginosa* (Remans *et al.*, 2010). Ciertamente, este resultado invalida la interpretación elaborada desde ensayos preliminares de no digestión-digestión con pronasa-E, que relaciona al muropéptido A con la lipoproteína asociada a PG OprL en UCBPP-PA14 (locus PA14_51710). El análisis del espectro de masas para muropéptido A.1, no permitió reconocer la compatibilidad del producto con elementos constitutivos de pared celular, sugiriéndose la realización de MS/MS (*tandem mass spectrometry*) para su adecuada identificación (un ensayo de especial importancia, dada la frecuencia con que el producto A.1 es recuperado desde las estirpes UCBPP-PA14 *wild-type* y mutantes). Para el muropéptido B se describen 2 productos con masas experimentales de 940.28 Da y 999.08 Da, compatibles con masas teóricas para un monómero disacárido tetrapéptido sin reducir (podría tratarse de trazas de M4 sin reducir) (940.39 Da) y M4G ($[M+H]^+$: 999.43 Da), respectivamente (Figuras 87b, 87b.1, 87b.2). El monómero predominante, identificado por masa

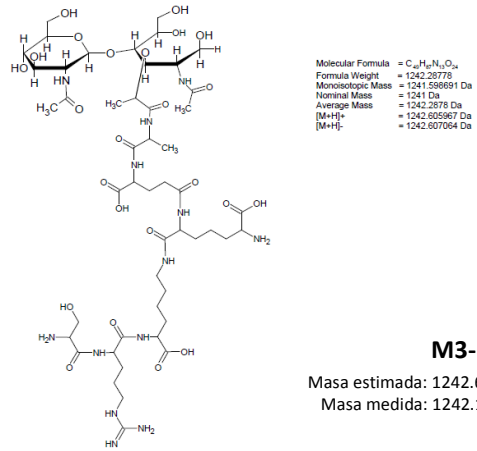
como M4G, presenta un tiempo de retención diferente al de un muropéptido M4G normal (M4G normal aparece detrás de M4), lo que permite sugerir que este producto correspondería a un isómero de M4G, donde la presencia de glicina y su ubicación deberían ser definidas mediante MS/MS. El espectro de masa para el muropéptido C establece la presencia de un producto monomérico de masa experimental 1185.26 Da, concordante con la masa estimada para un monómero disacárido tetrapéptido-D-alanina-mesoA₂pm (M4-D-Ala-DAP) ([M+H]⁺: 1185.53 Da) (Figuras 87c, 87c.1); muropéptido que derivaría de un precursor dimérico D44, sobre el cual actuaría un ortólogo funcional de MpaA (*Murein peptide amidase A*), una metaloproteína dimérica y citoplasmática asociada al recambio de mureina, reconocida en el modelo *Escherichia coli* (pero no en *Pseudomonas aeruginosa*) y que ha demostrado alta eficiencia de hidrólisis sobre el enlace amida γ -D-Glu-mesoA₂pm (actividad γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelato peptidasa) (Uehara & Park, 2003; Maqbool *et al.*, 2012). El análisis por espectrometría para el muropéptido E, define un primer producto con una masa estimada de 1013.36 Da, coincidente con la masa teórica para un monómero disacárido pentapéptido M5 ([M+H]⁺: 1013.45 Da, y un producto secundario con una masa experimental de 928.03 Da, valor equivalente a la masa definida para un monómero disacárido tripéptido más glicina ([M+H]⁺: 928.39 Da) (Figuras 87d, 87d.1, 87d.2). La figura del monómero M3G, recuperado en una posición desplazada respecto de la ubicación para un producto M3G normal (M3G normal es recuperado inmediatamente después de M3) dentro del perfil de muropéptidos para el PG en UCBPP-PA14, corresponde a un evento que ha sido observado y continúa siendo investigado en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium intracelular, sin lograr precisar aún la posición del aminoácido glicina en este producto, situación que ayudaría a comprender su presencia (Dr. Miguel Ángel de Pedro Montalbán, comunicación personal). Finalmente, el análisis del espectro de masas para el muropéptido F identifica dos productos con masas experimentales de 1013.71 Da y 1185.13 Da, compatibles con masas teóricas para un monómero disacárido pentapéptido M5 ([M+H]⁺: 1013.45 Da) y M4-D-Ala-DAP ([M+H]⁺: 1185.53 Da), correspondiendo éste último al muropéptido prioritario (Figuras 87e, 87e.1, 87e.2). El reconocimiento de los productos monoméricos antes descritos, contribuye al conocimiento sobre la composición estructural del peptidoglicano para la cepa de referencia UCBPP-PA14, sin presentar una relación directa con ensayos previamente ejecutados y tendientes a evaluar el rol modulador de LMM-PBP4 en la integridad molecular de la pared celular. Se destaca la necesidad de realizar procedimientos analíticos de MS/MS en aquellos casos que se requiera mayor información.

Resultados

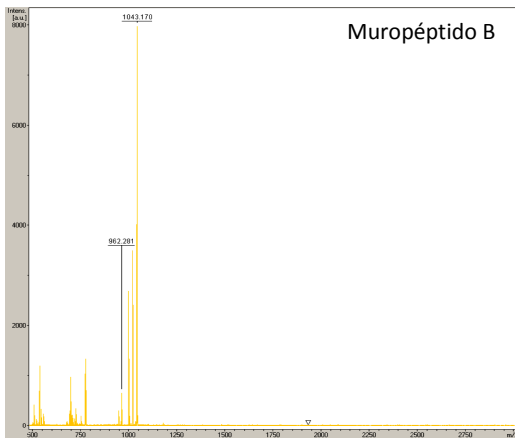
(a)



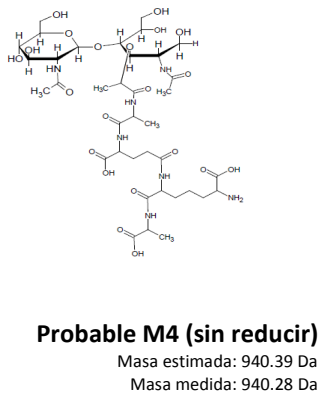
(a.1)



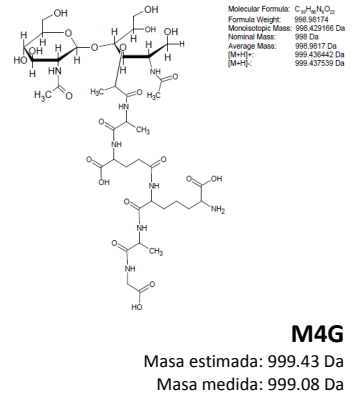
(b)



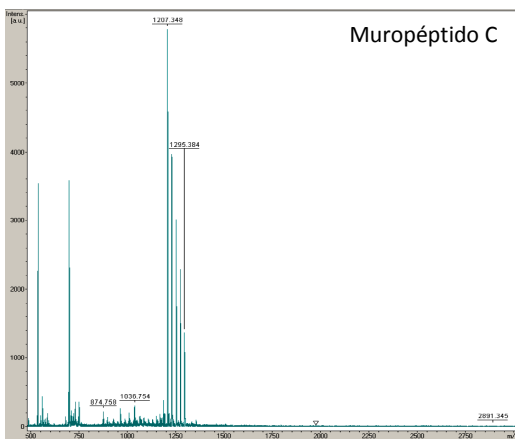
(b.1)



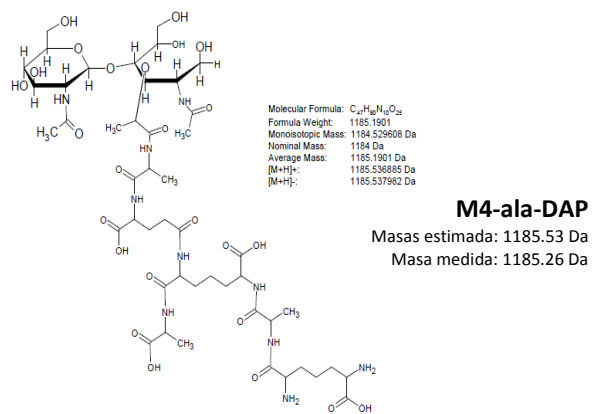
(b.2)



(c)



(c.1)



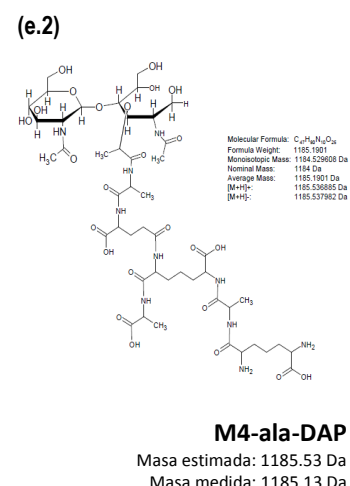
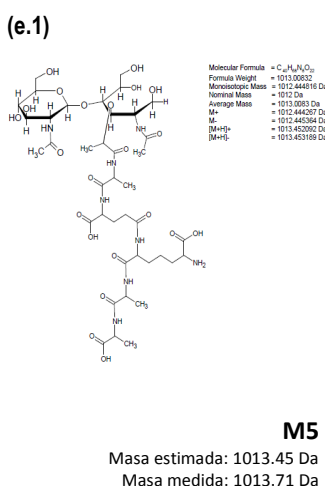
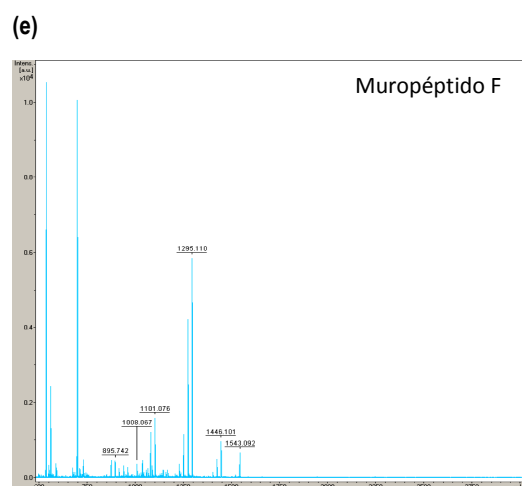
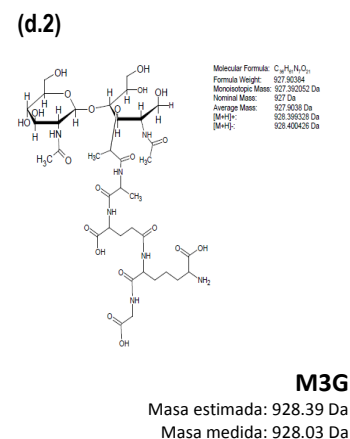
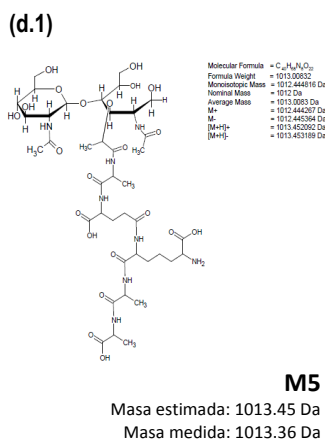
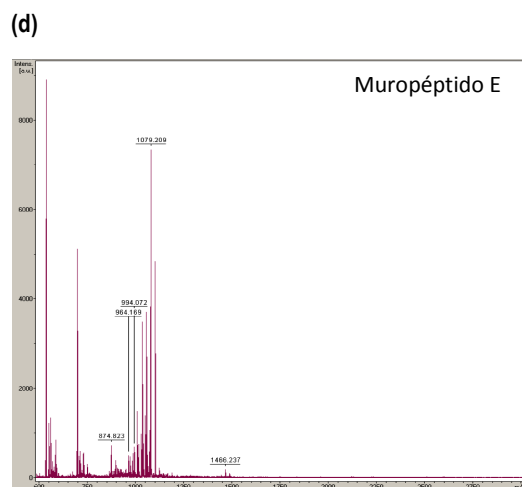


Figura 87 | Análisis de muropéptidos purificados mediante espectrometría de masa (MALDI-TOF) y diseño estructural de cada producto recuperado (programa ACD/ChemSketch v12.0) con sus respectivas masas teóricas y experimentales (a) Espectro de masa para muropéptido A (a.1) Estructura química para producto M3-KRS (b) Espectro de masa para muropéptido B (b.1) Estructura química para probable monómero M4 sin reducir (b.2) Estructura para M4G (c) Espectro de masa para muropéptido C (c.1) Estructura química para producto M4-alanina-DAP (d) Espectro para muropéptido E (d.1) Estructura química para producto M5 (d.2) Estructura química para producto M3G (e) Espectro de masa para muropéptido F (e.1) Estructura para producto M5 (e.2) Estructura química para producto M4-alanina-DAP. KRS, lisina-arginina-serina; Da, Dalton; DAP, ácido diaminopimélico

DISCUSSION **5**

5. Discusión

5.1. Antecedentes genómicos y proteómicos presuntivos para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*

La información disponible para genes codificantes PA3047 y PA14_24690 (cepas PAO1 y UCBPP-PA14), permite identificar la correspondencia entre las funciones moleculares asignadas a ambos genes, la vinculación en procesos biosintéticos y de proteólisis de peptidoglicano, y la similitud de sus respectivos entornos. Por su parte, antecedentes proteómicos teóricos para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* en cepas PAO1 y UCBPP-PA14, demuestran un consenso absoluto en cuanto a la naturaleza, estructura y probable funcionalidad de estas proteínas. La proteína DacB de *Pseudomonas aeruginosa*, corresponde a una D,D-peptidasa integrante de la familia D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa 3 (S13), incluida en el *cluster* de grupos ortólogos COG2027 [D-alanina-D-alanina carboxipeptidasa (*Penicillin-Binding Protein 4*)], con una secuencia principal SxxK (STMK) que incluye al residuo catalítico S72 (serina catalítica en posición 72), además de las triadas SxN (SNN) y KTG, características de *Penicillin-Binding Proteins* y que en conjunto favorecen procesos de acilación-deacilación, permitiendo posicionar a DacB dentro de la categoría de LMM-PBPs clase C subclase C1. Gracias a la resolución cristalográfica de la estructura molecular para tres LMM-PBPs clase C tipo 4 subclase C1, D,D-Peptidasa de *Actinomadura* sp. (cepa R39), PBP4a de *Bacillus subtilis* (cepa 168) y PBP4 de *Escherichia coli* (cepa K-12), ha sido posible establecer similitudes estructurales y funcionales con esta categoría, clase y tipo funcional de proteínas, demostrando una gran similitud en su plegamiento, con un dominio transpeptidasa asociado a otros dos dominios, adoptando un modelo de organización tipo muñeca rusa (*matrioska*) [el tercer dominio insertado en el segundo, mientras éste se presenta contenido en el primero (dominio I, PB)]. LMM-PBPs clase C tipo 4 subclase C1, poseen de mediana a alta actividad de *binding* frente a antibióticos β -lactámicos, con altas tasas de acilación y muy bajas tasas de deacilación, características que las convierten en candidatas adecuadas para estudios de co-cristalización con antibióticos β -lactámicos u otros ligandos, encontrándose además, pobremente asociadas a membrana interna, generalmente a través de interacciones electrostáticas, careciendo de residuos transmembrana, anclajes anfipáticos o lipídicos que favorezcan una unión definitiva. Esto último, además de la definición de una actividad de tipo D,D-endopeptidasa, constituyen argumentos que permiten prever un rol como hidrolasas de peptidoglicano, proponiendo a este grupo de proteínas como miembros del *pool* de autolisinas en pared celular. Se sugiere que las proteínas de esta clase y tipo funcional (subclase), podrían encontrarse insertas en el peptidoglicano o expuestas hacia la cara externa de este polímero donde ejercerían su actividad, pudiendo estar involucradas, indirectamente, en procesos de morfogénesis celular, separación de células hijas y formación de biopelículas (Sauvage *et al.*, 2008; Van Heijenoort, 2011). El carácter presuntivo de lo anteriormente descrito nos ha planteado el desafío de investigar, para definir la estructura, localización y, principalmente, funcionalidad de LMM-PBP4 en el metabolismo de la pared celular para el modelo bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2. Predicción de estructura secundaria para LMM-PBP4. Homología de secuencia con proteínas ortólogas

Estudios de alineamiento entre secuencias aminoacídicas para LMM-PBP4 de PAO1 y LMM-PBP4 de *E. coli* (ortólogo funcional), permitieron reconocer la naturaleza multimodular de esta PBP (PBP4 de PAO1), identificando (por convención con los residuos definidos para los dominios I, II y III en el modelo LMM-PBP4 de *E. coli*) los residuos aminoacídicos que establecen los límites para los tres dominios establecidos. La predicción realizada para definir la estructura secundaria de LMM-PBP4 (PAO1), logró destacar un inserto de 213 aminoácidos; entre las secuencias conservadas 1 (STMK) y 2 (SNN), y flanqueada por dos hélices α (α_2 - α_3); que forma los dominios II y III. Se demuestra, para el dominio I y la secuencia conservada STMK, que la serina activa en posición 72 se encuentra ubicada al inicio de una hélice α_2 , el motivo SNN se posiciona en un *loop* entre hélices α_3 y α_4 , mientras que la secuencia KTG forma parte de un ordenamiento en lámina β (β_2). El dominio II presenta una arquitectura conformada por una combinación de hélices α y láminas β , en donde destaca la presencia de un *loop* de longitud considerable. El dominio III demuestra, como en otros casos, un ordenamiento en láminas β conectadas por cortos *loops* (del mismo modo que la organización de dominios y motivos conservados en PBP4a para el modelo *Bacillus subtilis*). Las propiedades para el conjunto de residuos aminoacídicos en el extremo carboxilo terminal de LMM-PBP4 en PAO1 y su disposición estructural secundaria, permiten deducir una interacción electrostática y por polaridad, con la cara externa de la membrana interna, determinada por la presencia de al menos 4 residuos cargados positivamente, además de una importante presencia de residuos apolares (hidrofóbicos) en esta zona (11 residuos para una secuencia de 20 aminoácidos terminales en ordenamiento hélice α), lo que supone una débil relación con la membrana, pero superior a la descrita para el extremo C-terminal en PBP4 de *E. coli* (Harris *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2008), donde la interacción por carga de solo 5 residuos aminoacídicos básicos (carga positiva), la presencia de una cantidad menor de aminoácidos hidrofóbicos (9/20 aminoácidos) y la existencia de 3 residuos hidrofílicos finales no cargados (tripleto QNN), condiciona esta diferencia. Finalmente, la mayor identidad entre las secuencias de LMM-PBP4 (PAO1) y proteínas PBP4a de *Bacillus subtilis* 168 y D,D-peptidasa de *Actinomadura* sp. R39, particularmente entre los motivos conservados que definen y organizan el bolsillo catalítico de la proteína, modifica la concepción general y el planteamiento establecido sobre las relaciones de identidad “estructural” entre proteínas ortólogas para los modelos *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, y se constituye en antecedente fundamental para distinguir a PBP4a de *Bacillus subtilis* como prototipo estructural, en tratamientos de simulación bioinformática por homología, para LMM-PBP4 de PAO1.

5.3. Diseños recombinantes, afinidad antibiótica y actividad β -lactamasa específica para LMM-PBP4

Los productos recombinantes recuperados desde ensayos de purificación, correspondientes a las formas no procesada y procesada de LMM-PBP4, para clones con *tags* de histidina en extremos amino terminal y amino-carboxilo terminal, permiten especular sobre la dificultad que genera la presencia de la secuencia His-tag unida al extremo amino en la maduración de la proteína, retardando este proceso. La forma madura de la proteína, obtenida a

partir del diseño para LMM-PBP4 (PAO1) con péptido señal y secuencia His-tag en extremo carboxilo terminal, corresponde a la proteína de fusión de mayor estabilidad y confiabilidad experimental para la totalidad de los ensayos realizados durante esta investigación, lo que implica una alta proximidad con la organización fisiológicamente activa de esta proteína. Un ensayo diseñado para evaluar la relación entre el *binding* de determinados antibióticos β -lactámicos (ampicilina, piperacilina, aztreonam, imipenem, cefoxitina y cefotetan) por PBPs, y la potencia inductora para β -lactamasa cromosomal AmpC, concluyó que la principal diferencia entre buenos inductores, tales como imipenem, cefoxitina y cefotetan, y pobres inductores, como ampicilina, piperacilina y aztreonam, fue la mayor afinidad de los primeros (buenos sustratos para LMM-PBP4 y potentes inductores de β -lactamasa AmpC) por PBP1a, PBP4 y PBP7 (en cepas inducidas de *E. coli* transformadas con un plásmido que transporta genes *ampR* y *ampC*, derivados de *Enterobacter cloacae*), sugiriéndose que el *binding* por PBP4 podría iniciar la inducción de β -lactamasa cromosomal AmpC (Sanders *et al.*, 1997), situación confirmada por Moyá *et al.*, 2009. En nuestra investigación, la alta afinidad demostrada entre antibióticos β -lactámicos cefoxitina e imipenem y LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1 (proteína purificada y proteína de membrana) fortalece la correspondencia existente entre la actividad de *binding* para esta proteína, su inactivación enzimática y la resistencia antibiótica de alto nivel demostrada (hiperproducción constitutiva de β -lactamasa cromosomal AmpC).

Se ha sugerido un ancestro común de tipo β -lactamasa clase A para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* O1 y su homólogo funcional en el modelo *Escherichia coli* (LMM-PBP4 clase C tipo 4), sin embargo, la presencia de los dominios II y III para la proteína en PAO1, ha determinado que su secuencia aminoacídica presente mayor similitud con secuencias definidas para β -lactamasas clase C (Kishida *et al.*, 2006; Ghosh *et al.*, 2008). A pesar del probable vínculo evolutivo entre LMM-PBP4 (PAO1) y los tipos enzimáticos mencionados, los ensayos tendientes a evaluar la posible actividad β -lactamasa para LMM-PBP4 en PAO1, demuestran que la forma nativa de esta proteína no desarrolla esta funcionalidad.

5.4. Actividades enzimáticas de LMM-PBP4

Un primer acercamiento al reconocimiento de la funcionalidad de LMM-PBP4 (PAO1), realizado a través de ensayos de digestión sobre tripéptido sintético N α ,N ϵ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (AcLAA), demostró la capacidad de las proteínas recombinantes purificadas de cortar la unión D-alanina-D-alanina en este sustrato, favoreciendo el proceso natural de transpeptidación. La generación de una forma soluble para LMM-PBP4 (libre de His-tag) ensayada sobre muropéptidos naturales M5 (monómero disacárido pentapéptido) y D45 (dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido) purificados, confirmó la capacidad de esta enzima de desarrollar una actividad D,D-carboxipeptidasa, removiendo una D-alanina terminal desde la cadena peptídica para el sustrato M5, generando una disminución en la cantidad relativa de este monómero y un incremento del producto M4 (monómero disacárido tetrapéptido). La actividad enzimática de LMM-PBP4 sobre dímero disacárido D45, demostró una competencia de tipo D,D-endopeptidasa, siendo capaz de hidrolizar el enlace peptídico que mantiene la configuración dimérica de este sustrato, generando los productos monoméricos esperados M5 y M4, respectivamente. La cantidad de monómero disacárido tetrapéptido (M4) fue

levemente superior a la cantidad recuperada de monómero disacárido pentapéptido (M5), situación que pone de manifiesto una actividad D,D-carboxipeptidasa secundaria a partir del producto M5 generado, funcionalidad que también es identificada desde el sustrato D45, por la producción de dímero disacárido tetrapéptido-tetrapéptido (D44). Un tercer análisis, destinado a evaluar la actividad D,D-peptidasa de LMM-PBP4 (PAO1) sobre peptidoglicano macromolecular, se realizó en un sistema biológico [mutante *E. coli* DV900 (Δ ponB, *dacA*, *dacB*, *pbp4B*, *dacC*, *dacD*, *pbpG*, *ampH*, *ampC*)] carente de toda actividad D,D-carboxipeptidasa y D,D-endopeptidasa y modificado mediante un proceso de lisogenización, características que lo convierten en un hospedador adecuado para la expresión de cada una de las proteínas recombinantes generadas. Variaciones en la relación molar de muropéptidos, permitieron identificar una disminución significativa de los sustratos M5 y D45 en cada transformante sometido a inducción, frente a la ausencia de cambios en el perfil de muropéptidos para el material no inducido. A partir del sustrato D45, el incremento en los productos monoméricos M5 y, particularmente M4 (efecto determinado por la disposición del producto M5 como sustrato alternativo para una actividad secundaria D,D-carboxipeptidasa), definen una funcionalidad de tipo D,D-endopeptidasa, mientras que la presencia de los productos D44 (el desarrollo de una nueva actividad D,D-endopeptidasa sobre sustrato dimérico D44, recientemente generado, amplifica la cantidad final de producto monomérico M4) y M4, confirman una actividad de tipo D,D-carboxipeptidasa frente a sustratos D45 y M5. Para una mayor comprensión de la bifuncionalidad D,D-carboxipeptidasa/D,D-endopeptidasa descrita para LMM-PBP4 (PAO1), la actividad enzimática sobre derivados anhidros M5N (sustrato monomérico pentapeptídico anhidro) y D45N (dímero disacárido tetrapéptido-pentapéptido anhidro), demostró un comportamiento similar al de sustratos muropéptidos sin residuos terminales de cadena aunque con un perfil minoritario de productos, que no impidió el reconocimiento de una actividad D,D-carboxipeptidasa sobre sustrato M5N, por presencia de producto M4N, además de funcionalidades de tipo D,D-endopeptidasa/D,D-carboxipeptidasa sobre sustrato dimérico D45N, por recuperación de muropéptidos M4, M5, M4N y M5N.

5.5. Análisis cinético de actividades D,D-peptidasa identificadas en LMM-PBP4

Para establecer una conclusión definitiva respecto del comportamiento individual de cada actividad enzimática identificada, y lograr precisar la funcionalidad predominante, se efectuó un análisis cinético de la actividad D,D-carboxipeptidasa y D,D-endopeptidasa para LMM-PBP4 (PAO1) sobre muropéptidos purificados M5 y D45. Esta etapa de la investigación permitió conocer valores de V_{max} y K_m , obtenidos a partir de las representaciones para el modelo de regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten, parámetros que posteriormente fueron utilizados para el cálculo de la constante catalítica k_{cat} (número de cambio de la enzima o moles de sustrato transformado por mol de enzima en unidad de tiempo), demostrando una bifuncionalidad D,D-endopeptidasa/D,D-carboxipeptidasa para esta proteína, y confirmando una actividad cinética de tipo D,D-endopeptidasa como la función predominante para LMM-PBP4 en el modelo *Pseudomonas aeruginosa* O1 (valores de k_{cat} , 15-17 veces más altos para la actividad sobre sustrato D45, respecto de la actividad demostrada sobre sustrato natural M5).

5.6. Localización subcelular de LMM-PBP4

La determinación de la ubicación subcelular de esta proteína, a partir de una metodología de fraccionamiento de compartimentos celulares basada en la generación de esferoplastos (Thein *et al.*, 2010), demuestra que la conformación madura (procesada) para la proteína recombinante de LMM-PBP4 (PAO1) con *tags* de histidina en extremo carboxilo terminal expresada en cepa transformante *E. coli* BL21(DE3), se encuentra ubicada en fracción de membrana y espacio periplásmico, situación que corrobora la débil interacción entre esta enzima y la cara externa de la membrana interna en el modelo bacteriano *E. coli*. La unión del extremo C-terminal de LMM-PBP4 (PAO1) a una secuencia His-tag en un vector de expresión compatible con *Pseudomonas aeruginosa* permitió nivelar las condiciones experimentales, confirmando una localización subcelular asociada a membrana y liberada al espacio periplásmico en este modelo bacteriano, antecedente nuevo y favorable al argumento que la propone como potencial hidrolasa-autolisina de peptidoglicano, desarrollando actividades de tipo D,D-endopeptidasa/D,D-carboxipeptidasa en procesos asociados a maduración y recambio (reciclaje) de este polímero.

5.7. Inmunolocalización de LMM-PBP4 en el modelo *Pseudomonas aeruginosa*

Estudios previos de localización para HMM-PBPs asociadas a división celular en modelos bacilares *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, han sido realizados mediante ensayos de inmunofluorescencia y protocolos de fusión a proteína fluorescente verde (GFP), sin embargo, existe información bastante limitada sobre el patrón posicional para LMM-PBPs clase C (proteínas particularmente importantes durante las etapas de separación celular, maduración y reciclaje de peptidoglicano). Un primer estudio sistemático, orientado a precisar la localización de proteínas involucradas en la síntesis de pared celular para el modelo bacteriano *Bacillus subtilis*, y que incorporó un total de 11 proteínas implicadas en su crecimiento vegetativo, pertenecientes a las diferentes clases de PBPs (HMM-PBPs clase A y B, LMM-PBPs clase C) (Scheffers *et al.*, 2004), permitió valorar nuestros resultados de inmunolocalización, a partir de la comparación con los patrones de fluorescencia identificados para LMM-PBP4a (PBP clase C con actividad D,D-carboxipeptidasa y alta homología estructural con LMM-PBP4 de PAO1). Nuestros experimentos de inmunolocalización para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*, ejecutados mediante protocolos de fijación, permeabilización, inmunomarcaje y tratamiento antibiótico, utilizando un anticuerpo policlonal específico anti-PBP4, un anticuerpo comercial anti-histidina, cepas *wild-type* UCBPP-PA14 y mutante en proteína DacB (PA14::*dacB*), además de un constructo recombinante para LMM-PBP4 en vector compatible con *Pseudomonas aeruginosa* transformado en cepa mutante PA14::*dacB*, confirman la ausencia de esta proteína en el sitio de división celular y descartan la conexión de LMM-PBP4 (PAO1) con proteínas septales (FtsZ) y del divisoma bacteriano. El reconocimiento previo de una funcionalidad D,D-carboxipeptidasa para LMM-PBP4 y la distribución de focos de fluorescencia alrededor de la célula con tendencia a una ubicación periférica (lateral), constituye un modelo posicional para esta proteína muy poco reconocido dentro la categoría de LMM-PBPs e indicativo de una modalidad de crecimiento celular regulado por la arquitectura del peptidoglicano, donde la inserción de nuevas unidades

pentapeptídicas sucedería en zonas de alta porosidad para la porción cilíndrica de la célula bacteriana (arquitectura permisiva) (Potluri *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2013). La demostración de un patrón posicional alternante entre los *spots* fluorescentes para LMM-PBP4 en cada pared lateral, genera un efecto helicoidal en la célula similar al patrón de localización observado para proteínas del citoesqueleto (MreB y Mbl) en los sistemas bacterianos *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, situación asociada a un modo disperso de crecimiento longitudinal, donde cortos filamentos de MreB dirigen la incorporación de peptidoglicano naciente a través del complejo biosintético de elongación (Cava *et al.*, 2013). En función de lo observado en las imágenes recuperadas, respecto de la presentación y disposición de la señal fluorescente para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*, de lo descrito para proteínas relacionadas y de los antecedentes teóricos que sustentan la existencia de dos complejos multienzimáticos vinculados a la síntesis de pared celular septal y lateral, es posible sugerir, un rol participativo y de cooperatividad de esta LMM-PBP con otras proteínas durante el crecimiento bacteriano longitudinal (elongación celular).

5.8. Modelo estructural para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*

El análisis de la estructura tridimensional de LMM-PBP4 (PAO1), obtenida a través de un proceso de modelado por homología, utilizando como referencia la secuencia y estructura cristalográfica de LMM-PBP4a de *Bacillus subtilis* (cepa 168), permitió la distinción de los tres dominios (módulos) que la definen como LMM-PBP clase C subclase C1. Como en el caso de sus homólogos estructurales PBP4a de *Bacillus subtilis*, D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39 y su homólogo funcional PBP4 de *Escherichia coli*, la unidad monomérica de LMM-PBP4 en *Pseudomonas aeruginosa* O1 presenta un inserto que define los dominios II y III, contenidos en el dominio I, exhibiendo, cada uno de ellos, una orientación muy similar a la descrita para sus proteínas homólogas, con ordenamientos en láminas β que se disponen en ángulo recto (aproximado) con respecto a las del siguiente dominio (Sauvage *et al.*, 2005; Kishida *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2007). El dominio II de LMM-PBP4 (residuos 91-180 y 258-303) contiene 5 láminas β y 2 hélices α , con un ordenamiento paralelo entre β_2 , β_3 , β_4 y β_5 , y una lámina β_1 antiparalela. La lámina β_2 es seguida por hélice α_1 , mientras que β_3 es continuada por hélice α_2 , por lo tanto, la organización tridimensional del subdominio formado por β_2 - α_1 - β_3 - α_2 - β_4 , se corresponde con un plegamiento tipo Rossmann. Como en PBP4a de *B. subtilis* y D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39, un extenso *loop* se entiende desde los residuos R149-V185 (longitud superior a la informada preliminarmente, desde el análisis de estructura secundaria), sobre el dominio de unión a penicilina (PB), con aminoácidos formando parte integral de un bolsillo específico en el sitio activo de la proteína. En la cara posterior del dominio II, opuesta a la superficie de contacto con el dominio PB, tres residuos de lisina y cuatro de arginina exponen un área cargada positivamente, determinando un mecanismo de unión a membrana interna alternativo a las interacciones electrostáticas y por polaridad, definidas para el extremo carboxilo terminal en esta proteína. La definición de una superficie similar ha sido descrita para el dominio II de PBP4a en *B. subtilis* y D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39 (Sauvage *et al.*, 2005; Sauvage *et al.*, 2007), sin embargo, la presencia de residuos de esta naturaleza no ha sido reconocida para LMM-PBP4 en el sistema bacteriano *Escherichia coli*. El dominio III (residuos 181-257), integrado por una unidad de 5 láminas β orientadas de modo antiparalelo, en donde la organización β_1 , β_2 ,

$\beta 3$ se presenta separada de $\beta 4$, $\beta 5$ por un *loop* de longitud considerable (19 residuos) y un breve ordenamiento en hélice α , condiciona una arquitectura de menor rigidez y con diferencias destacables, respecto de la descripción realizada para la organización del dominio III en D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39, concluyéndose además, que el *loop* conector entre láminas $\beta 3$ - $\beta 4$ forma parte integral de la superficie de entrada al sitio activo. El sitio activo de LMM-PBP4 de PAO1, localizado en el dominio I, se encuentra constituido por un segmento inicial de hélice $\alpha 2$ (S72-K75), que integra la secuencia STMK [que incluye la serina catalítica en posición 72 (*S72)], la cadena lateral de una lámina $\beta 2$ (V424-L429) que contiene el motivo conservado KTG, y un pequeño *loop* que conecta hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ (Y314-N317), y que incorpora una tercera secuencia conservada SNN. La disposición tridimensional de cada residuo atómico constituyente del sitio activo para la proteína modelada y la determinación de sus distancias de interacción, confirman valores que se encuentran en el rango de tolerancia definido para residuos conservados. Un aspecto particularmente interesante, tiene relación con la determinación de la distancia de ataque entre la serina catalítica S72 y el átomo de carbono de un grupo carbonilo en el enlace peptídico entre residuos D-alanina-D-alanina, con un valor de 2.53 Å, una longitud levemente inferior a la medida de 3.2 Å descrita entre un grupo amina en un residuo D-alanina y el átomo de oxígeno de la serina activa (S52) para PBP4a en *Bacillus subtilis* (Sauvage *et al.*, 2007). Se comprueba, además, la interacción entre los grupos NH de los aminoácidos treonina en posición 428 y serina catalítica en posición 72, un enlace determinante de la cavidad oxianión en el sitio activo, con una distancia estimada de 4.21 Å. La reactividad entre los residuos mencionados, podría desempeñar una funcionalidad estabilizante en intermediarios tetraédricos aniónicos, propiedad sugerida para residuos equivalentes S49-T413 en D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39 (Nemmara *et al.*, 2013). Los modelos tridimensionales para sustrato mimético AMV-L-Ala-FGA-L-Lys-D-Ala-D-Ala y antibióticos cefoxitina e imipenem, empleados en la simulación de la interacción enzima-sustrato, advierten de la orientación de la serina catalítica (S72) en el sitio activo y su trayectoria hacia el átomo de carbono (grupo carbonilo) en el enlace peptídico para residuos terminales D-alanina-D-alanina, y de la hidrólisis del enlace amida en el anillo β -lactámico para sustratos antibióticos y la generación de un compuesto acil-enzima estable. Los residuos involucrados en los mecanismos de acilación y deacilación por PBPs no están claramente identificados, sin embargo, para el primer proceso, una lisina en posición 75 (K75) probablemente corresponda al aminoácido estructural prioritario. La equivalencia posicional demostrada entre residuos del sitio activo de LMM-PBP4 (PAO1) y aminoácidos constituyentes de un subsitio en el bolsillo catalítico para PBP4 de *E. coli* y otras LMM-PBPs clase C (PBP4a de *Bacillus subtilis* y D,D-Peptidasa de *Actinomadura* R39), involucrados en la especificidad por el sustrato, a través del reconocimiento y acomodación del grupo terminal $\text{NH}_3^+\text{-CH-COO}^-$ para el aminoácido *meso*A₂pm en la cadena peptídica, establece una probable característica deferencial entre proteínas monofuncionales y bifuncionales (con actividades D,D-carboxipeptidasa/D,D-endopeptidasa) (Clarke *et al.*, 2009). Lo anteriormente expuesto, en reciprocidad con las dimensiones estimadas de amplitud y profundidad para la cavidad del sitio activo de LMM-PBP4 (PAO1), que favorecen el acceso a sustratos de mayor tamaño y longitud, representa información constitutiva que sustenta el desarrollo de una funcionalidad D,D-endopeptidasa por esta proteína. Finalmente, conviene destacar que para el modelo estructural de PBP4a en *B. subtilis*, una treonina en posición 394 (T394) constituye un residuo

aminoacídico con capacidad para establecer un puente de hidrógeno con T412 (motivo conservado KTG), contribuyendo a la red de enlaces que fortalece el sitio activo, y que ha sido reconocido en una posición equivalente en otros representantes de la categoría LMM-PBPs clase C subclase C1, mientras que en PBP5, PBP6 y PBP6b de *E. coli* (proteínas con funcionalidad D,D-carboxipeptidasa exclusiva), un residuo de arginina ocupa esta posición, impidiendo estéricamente el posicionamiento de un sustrato mayor al grupo metilo de la última D-alanina en la cadena peptídica (la presencia de un residuo pequeño como la treonina, deja un espacio libre que permitiría acomodar la cadena peptídica de una segunda hebra de peptidoglicano). En el modelo ejecutado para LMM-PBP4 de PAO1, un aminoácido treonina (T386) en posición coincidente con la ubicación de T394 para *Bacillus subtilis*, podría representar una tercera explicación estructural para el desarrollo de una actividad D,D-endopeptidasa en esta proteína.

5.9. Papel modulador de LMM-PBP4 en la integridad molecular de la pared celular para el modelo *Pseudomonas aeruginosa*

El clonaje del gen codificante para LMM-PBP4 de PAO1 (*dacB*) en vectores de expresión compatibles con *Pseudomonas aeruginosa*, permitió el abordaje experimental para investigar el rol modulador de esta PBP en la integridad molecular de la pared celular, mediante el análisis de la estructura del peptidoglicano para estirpes *wild-type* y mutantes en proteínas del mecanismo regulatorio de inducción de AmpC (DacB, AmpE y AmpDh2), en condiciones naturales, de complementación-sobreexpresión e inactivación antibiótica de LMM-PBP4. La ausencia de funcionalidades D,D-endopeptidasa y D,D-carboxipeptidasa en el mutante DacB, compensadas por las actividades enzimáticas de LMM-PBP5/6 y LMM-PBP7, explica las ligeras diferencias demostradas en la composición de su peptidoglicano frente a la organización estructural de este polímero para la cepa de referencia (*wild-type*) (a pesar de estar en situación de sobreexpresión de AmpC). La estructura del peptidoglicano para los mutantes en proteínas AmpE y AmpDh2 no presenta cambios significativos respecto de la cepa control, esta falta de modificaciones significativas en la mureína de mutantes para las proteínas AmpE (transductor de membrana interna propuesto como modulador de la actividad de AmpD e imprescindible para la inducción de AmpC) y AmpDh2 (amidasa de membrana externa con una importancia relativamente menor en la expresión de *ampC*, en relación a sus homólogos AmpD-AmpDh3), da cuenta de la imposibilidad de establecer alguna relación entre estas proteínas y efectores estructurales implicados en el mecanismo de inducción de β -lactamasa AmpC. El peptidoglicano de cepas *wild-type* y mutantes en las proteínas indicadas (DacB, AmpE y AmpDh2), conteniendo el constructo recombinante para LMM-PBP4 y en situación de inducción de *dacB*, muestra un descenso en la cantidad de constituyentes diméricos y triméricos, lo que conduce a un aumento proporcional en la cantidad de monómeros y a una disminución importante en los niveles de entrecruzamiento, destacando además, un descenso en la cantidad de formas anhidras y una reducción menor en los niveles de pentapéptido (M5), cambios que resultan coherentes con el desarrollo de una actividad principal de tipo D,D-endopeptidasa y una actividad secundaria de tipo D,D-carboxipeptidasa, producto de la complementación y sobreexpresión de LMM-PBP4 en los sistemas bacterianos mencionados. La consecuencia del eficiente bloqueo que el β -lactámico cefoxitina ejerce en todas las LMM-PBPs, interrumpiendo funcionalidades D,D-carboxipeptidasa y

D,D-endopeptidasa, genera una composición muy similar para el peptidoglicano de cepas *wild-type* y mutantes, en el que destaca un marcado incremento en la cantidad relativa de monómero disacárido pentapéptido que estimula la formación de dímeros y trímeros con enlaces 4-3 (al no verse afectados los niveles de DAP-DAP), generando una reducción en monómeros y el fortalecimiento del porcentaje de entrecruzamiento. Frente a la inducción de *dacB* y el tratamiento antibiótico con cefoxitina, el alza en el nivel de monómeros y un descenso en el entrecruzamiento, claramente definido por la expresión de una actividad D,D-endopeptidasa predominante, confirman un proceso de reversión en el valor de M5 (a niveles basales *wild-type*) que no resulta del todo eficiente, ya que LMM-PBP4 es mejor D,D-endopeptidasa que D,D-carboxipeptidasa. Los cambios que produce el tratamiento con imipenem en el peptidoglicano de cepas *wild-type* y mutantes en proteínas DacB, AmpE y AmpDh2, son evidentemente menores a los ejecutados por cefoxitina, destacando un leve aumento en formas anhidras, además de un incremento en el nivel de monómero disacárido pentapéptido (aunque en magnitudes menores a las recuperadas luego del tratamiento con cefoxitina). La expresión de LMM-PBP4 asociada al tratamiento con imipenem, permite el reconocimiento de una reversión menor para la cantidad de M5 en estas cepas, hecho que confirma, nuevamente, el desarrollo de una funcionalidad D,D-endopeptidasa por sobre la actividad D,D-carboxipeptidasa, para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*. Modelos actuales consideran que los efectos específicos sobre la pared celular producidos por concentraciones subinhibitorias de ciertos β -lactámicos, tales como cefoxitina e imipenem, determinan la acumulación citoplasmática de residuos 1,6-anhidroMurNAc, muropéptidos que reemplazarían al represor UDP-MurNAc-pentapéptido desde el regulador AmpR, determinando la activación del gen *ampC* (Johnson *et al.*, 2013). Estudios preliminares han demostrado una correlación entre la potencia de inducción de AmpC por β -lactámicos y la afinidad de estos antibióticos por ciertas LMM-PBPs, una situación recientemente reconocida en el modelo *Pseudomonas aeruginosa*, a través del hallazgo de la inactivación de *dacB* como principal mecanismo de sobreexpresión de β -lactamasa AmpC (Moyá *et al.*, 2009). Una investigación paralela desarrollada por nuestro grupo de investigación, basada en el análisis de todas las combinaciones posibles para mutantes en LMM-PBPs de *Pseudomonas aeruginosa*, en condiciones basales y de tratamiento con cefoxitina, logró precisar i) que la mutación en *dacB* condiciona un nivel de expresión importante para *ampC* sin modificar considerablemente el nivel de M5, ii) que la mutación en *dacC* (gen codificante para LMM-PBP5/6) aumenta significativamente el nivel de monómero disacárido pentapéptido, demostrando un menor nivel de expresión para *ampC* (aunque equivalente en condiciones de tratamiento con cefoxitina), y iii) que la doble mutación *dacB-dacC* condiciona un efecto sinérgico en la expresión de *ampC* (expresión de alto nivel) asociado a un incremento considerable en la cantidad relativa de M5, lo que supone la implicancia de este muropéptido en el mecanismo molecular que conecta la sobreexpresión de AmpC y la mutación en el gen *dacB* (inactivación de LMM-PBP4 por antibiótico β -lactámico) (Ropy *et al.*, 2014; AAC04236-14), antecedentes que se corresponden con la interpretación que actualmente Fisher & Mobashery, 2014 realizan sobre la identidad estructural del muropéptido efector para la inducción de esta β -lactamasa, postulando al producto 1,6-anhidroMurNAc-pentapéptido, como el co-inductor que desreprime *ampC*, sin embargo, nuestro análisis no demuestra cambios en la composición de mureina relativos a un incremento en la cantidad de M5, que permita

proponer un sistema de activación de *ampC* a través de un efector de naturaleza pentapeptídica. El conocimiento actual confirma que *ampR* induce la expresión de *ampC* mediante la unión a uno de los miembros de la familia 1,6-anhidroMurNAc-péptidos, que especies tripeptídicas o pentapeptídicas podrían actuar a este nivel en el modelo *Citrobacter freundii* (Balcewich *et al.*, 2010), que la inactivación de PBP4 conduce a la sobreexpresión de β -lactamasas y a un incremento en los niveles de pentapéptido en *Aeromonas hydrophila* (Tayler *et al.*, 2010) y que el análisis cromatográfico de la pared celular en función del perfil de muropéptidos eluidos, no constituye un procedimiento aplicable en estudios con la finalidad de definir la configuración estructural precisa del efector intracelular que activa la expresión de *ampC*. Esta última circunstancia valida la necesidad de desarrollar una estrategia experimental basada en el reconocimiento de residuos conservados de peptidoglicano de tipo N-acetilglucosamina (GlcNAc) o N-acetilmurámico (MurNAc), a través de un procedimiento de afinidad en soporte sólido utilizando lectinas o anticuerpos anti-PG (fracción sacárida), que permita la captura de anhidro-muropéptidos citoplasmáticos de interés (independientemente de la longitud de su cadena peptídica) para su posterior separación, cuantificación e identificación.

5.10. Análisis proteómico de muropéptidos no reconocidos en cepa de referencia UCBPP-PA14

Del total de muropéptidos recuperado por HPLC para la cepa *wild-type* UCBPP-PA14 y estirpes mutantes PA14::*dacB*, PA14::*ampE*, PA14::*ampDh2* (transformadas con clones recombinantes pHERD-PBP4/pSEVA-PBP4 e investigadas en condiciones naturales y de complementación-sobreexpresión e inactivación antibiótica de LMM-PBP4), un grupo minoritario de productos monoméricos no lograron ser identificados mediante el análisis comparativo frente a tiempos de elución para muropéptidos conocidos, sin embargo, mediante espectrometría de masa (MALDI-TOF) fue posible su reconocimiento, destacando la presencia de i) un monómero disacárido tripéptido con un segmento KRS carboxilo terminal (M3-KRS), secuencia que determina la asociación de este muropéptido con una proteína homóloga a Opr1 de PAO1, lipoproteína no descrita para la cepa de referencia UCBPP-PA14, y ii) del monómero M4-D-Ala-DAP, producto que advertiría la actividad de un ortólogo funcional para MpaA (*Murein peptide amidase A*, proteína citoplasmática asociada al recambio de mureina, capaz de hidrolizar el enlace γ -D-Glu-mesoA₂pm de un sustrato tripéptido exclusivo, reconocida en *Escherichia coli* pero no en *Pseudomonas aeruginosa*) con competencia sobre sustrato tetrapeptídico. La demostración de estos muropéptidos contribuye al avance en el conocimiento sobre la composición estructural del peptidoglicano para la estirpe *wild-type* UCBPP-PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*, cepa procedente de un aislamiento clínico primario que no ha sido sometida a manipulación excesiva en el laboratorio (en contraste a PAO1) y que corresponde al modelo de investigación en virulencia-patogenicidad para la especie.

CONCLUSIONES

6

6. Conclusiones

Del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral es posible extraer las siguientes conclusiones:

1. A pesar del vínculo evolutivo entre LMM-PBP4 y β -lactamasas clase A, y de la homología de secuencia con β -lactamasas clase C, se comprueba la ausencia de actividad β -lactamasa para la forma nativa de esta proteína
2. La capacidad de hidrólisis de LMM-PBP4 frente a sustrato sintético y muropéptidos naturales, identifica actividades de tipo D,D-carboxipeptidasa y D,D-endopeptidasa
3. El peptidoglicano de cepa *wild-type* y mutante DacB, en condiciones de complementación, sobreexpresión e inactivación antibiótica de LMM-PBP4, confirma *in vivo* la bifuncionalidad D,D-endopeptidasa y D,D-carboxipeptidasa de esta proteína
4. Parámetros cinéticos definen como predominante una funcionalidad de tipo D,D-endopeptidasa para LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*
5. La alta afinidad demostrada entre antibióticos β -lactámicos cefoxitina e imipenem y LMM-PBP4 se correlaciona con su actividad de *binding*, su inactivación enzimática e hiperproducción constitutiva de β -lactamasa AmpC
6. Se reconoce la ausencia de LMM-PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa* en el sitio de división celular, descartando su asociación con proteínas septales y del divisoma bacteriano
7. La localización de LMM-PBP4 en fracción de membrana y compartimento periplásmico, y su ausencia en fracción citoplasmática, sostiene la propuesta de esta proteína como potencial hidrolasa-autolisina asociada a procesos de maduración-reciclaje de peptidoglicano
8. El modelo estructural para la unidad monomérica de LMM-PBP4, determina la presencia de un inserto de 213 aminoácidos que constituye los dominios II y III, y que la define como LMM-PBP clase C subclase C1
9. Dimensiones estimadas para la cavidad del sitio activo de LMM-PBP4 que favorecen el acceso a sustratos de mayor tamaño, y un aminoácido treonina en posición 386 (T386) que permitiría acomodar la cadena peptídica de una segunda hebra de peptidoglicano, sustentan una funcionalidad de tipo D,D-endopeptidasa

Conclusiones

10. La mureina de cepa *wild-type* y mutantes en proteínas reguladoras de la producción de AmpC, en condiciones naturales y de complementación, sobreexpresión e inactivación antibiótica de LMM-PBP4, no exhibe cambios que permitan proponer un sistema de activación de *ampC* a través de un efector de naturaleza pentapeptídica
11. La identificación de un monómero disacárido tripéptido con un segmento C-terminal KRS (M3-KRS), indica la asociación de este muropéptido con una proteína homóloga a Oprl de PAO1, lipoproteína no descrita para la cepa de referencia UCBPP-PA14
12. La presencia del producto monomérico M4-D-Ala-DAP, advierte de la actividad de un ortólogo funcional para MpaA (*Murein peptide amidase A*), una proteína citoplasmática asociada al recambio de mureina, reconocida en *Escherichia coli* pero no en *Pseudomonas aeruginosa*

CONCLUSIONES ADICIONALES

1. La disposición de la señal fluorescente para LMM-PBP4 de PAO1 en pared celular lateral, constituye una propuesta posicional poco reconocida dentro de la categoría de LMM-PBPs y probablemente indicativa de un modo disperso de crecimiento longitudinal
2. El reconocimiento de una superficie cargada positivamente en el dominio II de LMM-PBP4 (PAO1) podría corresponder a un modo de unión a membrana alternativo a las interacciones electrostáticas y por polaridad definidas para el extremo carboxilo terminal en esta proteína
3. El diseño recombinante para LMM-PBP4 (PAO1) y secuencia His-tag en extremo C-terminal, corresponde a la proteína de fusión de mayor estabilidad y confiabilidad experimental en la totalidad de ensayos realizados, evidencia de una alta proximidad con la organización constitutiva para una proteína fisiológicamente activa

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

7

7. Referencias bibliográficas

Alvarez-Ortega, C.; Wiegand, I.; Olivares, J.; Hancock, R.; Martínez, J. (2010). Genetic Determinants Involved in the Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to β -Lactam Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10): 4159-4167

Asgarali, A.; Stubbs, K.; Oliver, A.; Vocadlo, D.; Mark, B. (2009). Inactivation of the Glycoside Hidrolase NagZ Attenuates Antipseudomonal β -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemoteraphy*, 53(6): 2274-2282

Avison, M.; Horton, R.; Walsh, T.; Bennett, P. (2001). *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(29): 26955-26961

Avison, M.; Niumsup P.; Nurmahomed, K.; Walsh, T.; Bennett, P. (2004). Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* β -lactamase regulator, BlrA. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2): 197-202

Ayala, J.; Cava, F.; de Pedro, M. (2012). Stress Response in Microbiology. Chapter 1. Cell Wall Stress-sensing Regulatory Systems in Gram-negative Bacteria. Requena, J. (Editor). Caister Academic Press, Norfolk, UK. First Edition, pp. 1-18

Balasubramanian, D.; Schneper, L.; Merighi, M.; Smith, R.; Narasimhan, G.; Lory, S.; Mathee, K. (2012). The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS ONE*, 7(3): 1-21

Balcewich, M.; Reeve, T.; Orlikow, E.; Donald, L.; Vocadlo, D.; Mark, B. (2010). Crystal structure of the AmpR effector binding domain provides insight into the molecular regulation of inducible AmpC β -lactamase. *Journal of Molecular Biology*, 400(5): 998-1010

Barreteau, H.; Kovac, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S.; Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2): 168-207

Benkert, P.; Biasini, M.; Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3): 343-350

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2005). Volume 2. The *Proteobacteria*, Part B: The *Gammaproteobacteria*. Brenner, D.; Krieg, N.; Staley, J. (Editors). Garrity, G. (Editor in chief). Springer Science+Business Media, Inc. Second Edition, pp. 323-355

- Birdsell, D.; Cota-Robles, E. (1967). Production and Ultrastructure of Lysozyme and Ethylenediamine tetraacetate-Lysozyme Spheroplasts of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 93(1): 427-437
- Bleves, S.; Viarre, V.; Salacha, R.; Michel, G.; Filloux, A.; Voulhoux R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*, 300 (8): 534-543
- Bouhss, A.; Trunkfield, A.; Bugg, T.; Mengin-Lecreux, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2): 208-233
- Cabeen, M.; Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8): 601-610
- Carrasco, C.; Rojas, A.; Zhang, W.; Heseck, D.; Lee, M.; Barbe, S.; André, I.; Ferrer, P.; Silva, N.; Castro, G.; Martínez, M.; Mobashery, S.; Hermoso, J. (2011). Crystal structures of bacterial peptidoglycan amidase AmpD and an unprecedented activation mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(36): 31714-31722
- Cava, F.; Kuru, E.; Brun, Y.; de Pedro, M. (2013). Modes of cell wall growth differentiation in rod-shaped bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 16(6): 1-7
- Cavallari, J.; Lamers, R.; Scheurwater, E.; Matos, A.; Burrows, L. (2013). Changes to Its Peptidoglycan-Remodeling Enzyme Repertoire Modulate β -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7): 3078-3084
- Chen, Y.; Zhang, W.; Shi, Q.; Heseck, D.; Lee, M.; Mobashery, M.; Shoichet, B. (2009). Crystal Structures of Penicillin-Binding Protein 6 from *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*, 131(40): 14345-14354
- Choi, K.; Kumar, A.; Schweizer, H. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 64(3): 391-397
- Chowdhury, Ch; Nayak, T.; Young, K.; Ghosh, A. (2010). A weak DD-carboxypeptidase activity explains the inability of PBP6 to substitute for PBP5 in maintaining normal cell shape in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 303(1): 76-83
- Clarke, T.; Kawai, F.; Park, S.; Tame, J.; Dowson, C.; Roper, D. (2009). Mutational Analysis of the Substrate Specificity of *Escherichia coli* Penicillin Binding Protein 4. *Biochemistry*, 48(12): 2675-2683
- de León, S.; Daniels, K.; Clarke, A. (2010). Production and purification of the penicillin-binding protein 3 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expression and Purification*, 73(2): 177-183

- de Pedro, M. (2009). Encyclopedia of Microbiology. Volume I. Peptidoglycan (Murein). Schaechter, M. (Editor in chief). Academic Press, Inc. Third Edition, pp. 827-843
- Den Blaauwen, T.; Aarsman, M.; Vischer, N.; Nanninga, N. (2003). Penicillin-binding protein PBP2 of *Escherichia coli* localizes preferentially in the lateral wall and at mid-cell in comparison with the old cell pole. *Molecular Microbiology*, 47(2): 539-547
- Denome, S.; Elf, P.; Henderson, T.; Nelson, D.; Young, K. (2009). *Escherichia coli* Mutants Lacking All Possible Combinations of Eight Penicillin Binding Proteins: Viability, Characteristics, and Implications for Peptidoglycan Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 181(13): 3981-3993
- Desmarais, S.; de Pedro, M.; Cava, F.; Huang, K. (2013). Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Molecular Microbiology*, 89(1): 1-13
- Egan, A.; Vollmer, W. (2013). The physiology of bacterial cell division. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1): 8-28
- EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing (2010). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 1.1., pp. 1-18
- Farra, A.; Islam, S.; Strålfors, A.; Sörberg, M.; Wretling, B. (2008). Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(5): 427-433
- Fisher, J.; Mobashery, S. (2014). The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the Gram-negative Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic Chemistry*, 56(1): 41-48
- Frère, J.; Leyh-Bouille, M.; Ghuysen, J.; Nieto, M.; Perkins, H. (1976). Exocellular DD-Carboxypeptidases-Transpeptidases from *Streptomyces*. *Methods in Enzymology*, 45: 610-636
- Gan, L.; Chen, S.; Jensen, G. (2008). Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 105(48):18953-18957
- Genilloud, O.; Garrido, M.; Moreno, F. (1984). The transposon Tn5 carries a bleomycin-resistance determinant. *Gene*, 32(1-2): 225-233
- Ghosh, A.; Chowdhury, Ch.; Nelson, D. (2008). Physiological functions of D-alanine carboxypeptidases in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 16(7): 309-317
- Glauner, B. (1988). Separation and quantification of muropeptides with high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 172(2): 451-464

- Glauner, B.; Holtje, J.; Schwarz, U. (1988). The Composition of the Murein of *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, 263(21): 10088-10095
- Goffin, G.; Ghuysen, J. (1998). Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(4): 1079-1093
- González-Leiza, S.; de Pedro, M.; Ayala, J. (2011) AmpH, a bifunctional DD-endopeptidase and DD-carboxypeptidase of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 193: 6887-6894
- Goodell, W.; Schwarz, U. (1983). Cleavage and resynthesis of peptide crossbridges in *Escherichia coli* murein. Journal of Bacteriology, 156(1): 136-140
- Guex, N.; Diemand, A.; Peitsch, M. (1999). Protein modelling for all. Trends in Biochemical Sciences, 24(9): 364-367
- Guex, N.; Peitsch, M. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis, 18(15): 2714-2723
- Guzman, L.; Belin, D.; Carson, M.; Beckwith, J. (1995). Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P_{BAD} Promoter. Journal of Bacteriology, 177(14): 4121-4130
- Handfield, J.; Gagnon, L.; Dargis, M.; Huletsky, A. (1997). Sequence of the *ponA* gene and characterization of the penicillin-binding protein 1A of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Gene, 199(1-2): 49-56
- Harris, F.; Brandenburg, K.; Seydel, U.; Phoenix, D. (2002). Investigations into mechanisms used by the C-terminal anchors of *Escherichia coli* penicillin-binding proteins 4, 5, 6 and 6b for membrane interaction. European Journal of Biochemistry, 269(23): 5821-5829
- Harry, E.; Pogliano, K.; Losick, R. (1995). Use of Immunofluorescence To Visualize Cell-Specific Gene Expression during Sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 177(12): 3386-3393
- Hauser, A.; Ozer, E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* (Poster). Nature Reviews Microbiology, 9(3): 1
- Honoré, N.; Nicolas, M.; Cole, S. (1989). Regulation of enterobacterial cephalosporinase production: the role of a membrane-bound sensory transducer. Molecular Microbiology, 3(8): 1121-1130
- Jacoby, G. (2009). AmpC β -Lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 22(1): 161-182
- Johnson, J.; Fisher, J.; Mobashery, S. (2013). Bacterial cell-wall recycling. Annals of the New York Academy of Sciences, 1277(1): 54-75

- Juan, C.; Moyá, B.; Pérez, J.; Oliver, A. (2006). Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level β -lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5): 1780-1788
- Kelley, L.; Sternberg, M. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, 4(3): 363-371
- Kershaw, N.; Caines, M.; Sleeman, M.; Schofield, C. (2005). The enzymology of clavam and carbapenem biosynthesis. *Chemical Communications*, 14(34): 4251-4263
- Kishida, H.; Unzai, S.; Roper, D.; Lloyd, A.; Park, S.; Tame, J. (2006). Crystal structure of penicillin binding protein 4 (*dacB*) from *Escherichia coli*, both in the native form and covalently linked to various antibiotics. *Biochemistry*, 45(3): 783-792
- Kong, K.; Aguila, A.; Schneper, L.; Mathee, K. (2010a). *Pseudomonas aeruginosa* β -lactamase induction requires two permeases, AmpG and AmpP. *BMC Microbiology*, 10(328): 1-15
- Kong, K.; Schneper, L.; Mathee, K. (2010b). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 118(1): 1-36
- Korat, B.; Motti, H.; Keck, W. (1991). Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli*: molecular cloning of the *dacB* gene, controlled overexpression, and alterations in murein composition. *Molecular Microbiology*, 5(3): 675-6848217
- Korsak, D.; Markiewicz, Z.; Gutkind, G.; Ayala, J. (2010). Identification of the full set of *Listeria monocytogenes* penicillin-binding proteins and characterization of PBPD2 (Lmo2812). *BioMed Central Microbiology*, 10(239): 1-13
- Langee, T.; Dargis, M.; Huletsky, A. (1998). An *ampD* Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Negative Regulator of AmpC β -Lactamase Expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12): 3296-3300
- Lee, D.; Urbach, J.; Wu, G.; Liberati, N.; Feinbaum, R.; Miyata, S.; Diggins, L.; He, J.; Saucier, M.; Déziel, E.; Friedman, L.; Li, L.; Grills, G.; Montgomery, K.; Kucherlapati, R.; Rahme, L.; Ausubel, F. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology*, 7(10): R90.1-R90.14
- Lee, M.; Artola, C.; Carrasco, C.; Martínez, S.; Heseck, D.; Spink, E.; Lastochkin, E.; Zhang, W.; Hellman, L.; Boggess, B.; Hermoso, J.; Mobashery, S. (2013). Cell-wall remodeling by the zinc-protease AmpDh3 from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of the American Chemical Society*, 135(34): 12604-12607

- Legaree, B.; Daniels, K.; Weadge, J.; Cockburn, D.; Clarke, A. (2007). Function of penicillin-binding protein 2 in viability and morphology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(3): 411-424
- Liao, X.; Hancock, R. (1997). Identification of a penicillin-binding protein 3 homolog, PBP3x, in *Pseudomonas aeruginosa*: gene cloning and growth phase-dependent expression. *Journal of Bacteriology*, 179(5): 1490-1496
- Liberati, N.; Urbach, J.; Miyata, S.; Lee, D.; Drenkard, E.; Wu, G.; Villanueva, J.; Wei, T.; Ausubel, F. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 103(8): 2833-2838
- Lister, P.; Wolter, D.; Hanson, N. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4): 582-610
- Lyczak, J.; Cannon, C; Pier, G. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 2(9): 1051-1060
- Maddock, J.; Shapiro, L. (1993). Polar Location of the Chemoreceptor Complex in the *Escherichia coli* cell. *Science*, 259(5102): 1717-1723
- Maddocks, S.; Oyston, P. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 154(12): 3609-3623
- Madigan, Michael T.; Martinko, John M.; Dunlap, Paul V.; Clark, David P. (2009). Brock. *Biología de los microorganismos*. Capítulo 15. Dominio *Bacteria*: las proteobacterias. Addison Wesley. Decimosegunda edición, pág. 456-459
- Maqbool, A.; Hervé, M.; Mengin-Lecreulx, D.; Wilkinson, A.; Thomas, G. (2012). MpaA is a murein-tripeptide-specific zinc carboxypeptidase that functions as part of a catabolic pathway for peptidoglycan-derived peptides in γ -proteobacteria. *The Biochemical Journal*, 448(3): 329-341
- Mark, B.; Vocado, D.; Oliver, A. (2011). Providing β -lactams a helping hand: targeting the AmpC β -lactamase induction pathway. *Future Microbiology*, 6(12): 1415-1427
- Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications* (2009). Chapter 2. Bacterial cell envelope peptidoglycan. Vollmer, W.; Born, P.; Holst, O.; Brennan, P.; von Itzstein, M. (Editors). Moran, A. (Editor in chief). Academic Press, Inc. First Edition, pp. 15-28

- Moyá, B.; Beceiro, A.; Cabot, G.; Juan, C.; Zamorano, L.; Alberti, S.; Oliver, A. (2012). Pan- β -Lactam Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains: Molecular Mechanisms, Penicillin-Binding Protein Profiles, and Binding Affinities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9): 4771-4778
- Moyá, B.; Dötsch, A.; Juan, C.; Blázquez, J.; Zamorano, L.; Haussler, S.; Oliver, A. (2009). β -lactam Resistance Response Triggered by Inactivation of a Nonessential Penicillin-Binding Protein. *PLoS Pathogens*. 2009, 5(3): 1-10
- Moyá, B.; Juan, C.; Albertí, S.; Pérez, J.; Oliver, A. (2008). Benefit of Having Multiple *ampD* Genes for Acquiring β -Lactam Resistance without Losing Fitness and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10): 3694-3700
- Moyá, B.; Zamorano, L.; Juan, C.; Ge, Y.; Oliver, A. (2010). Affinity of the New Cephalosporin CXA-101 to Penicillin-Binding Proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9): 3033-3937
- Nakagawa, J.; Tamaki, S.; Tomioka, S.; Matsushashi, M. (1984). Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. Penicillin-binding protein 1Bs of *Escherichia coli* with activities of transglycosylase and transpeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(22): 13937-13946
- Nemmara, V.; Adediran, S.; Dave, K.; Duez, C.; Pratt, R. (2013). Dual Substrate Specificity of *Bacillus subtilis* PBP4a. *Biochemistry*, 52(15): 2627-2637
- Nicola, G.; Peddi, S.; Stefanova, M.; Nicholas, R.; Gutheil, W.; Davies, C. (2005). Crystal Structure of *Escherichia coli* Penicillin-Binding Protein 5 Bound to a Tripeptide Boronic acid Inhibitor: A Role for S-110 in Deacylation. *Biochemistry*, 44(23): 8207-8217
- Noguchi, H.; Matsushashi, M.; Mitsushashi, S. (1979). Comparative studies of penicillin-binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 100(1): 41-49
- Nordahl, T.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10): 785-786
- Núñez de Castro, I. (2001). *Enzimología*. Capítulo 4. Cinética enzimática. Ediciones Pirámide. Primera Edición, pág. 101-123
- O'Callaghan, C.; Morris, A.; Kirby, S.; Shingler, H. (1972). Novel Method for Detection of β -Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1(4): 283-288

- O'Daniel, P.; Zajicek, J.; Zhang, W.; Shi, Q.; Fisher, J.; Mobashery, S. (2010). Elucidation of the Structure of the Membrane Anchor of Penicillin-Binding Protein 5 of *Escherichia coli*. *Journal of The American Chemical Society*, 132(12): 4110-4118
- Peters, P.; Migocki, M.; Thoni, C.; Harry, E. (2007). A new assembly pathway for the cytokinetic Z ring from a dynamic helical structure in vegetatively growing cells of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 64(2): 487-499
- Plá, J.; Rojo, F.; de Pedro, M.; Ayala, J. (1990). Cloning and expression of the *ponB* gene, encoding penicillin-binding protein 1B of *Escherichia coli*, in heterologous systems. *Journal of Bacteriology*, 172(8): 4448-4455
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2(65): 1-13
- Potluri, L.; Karczmarek, A.; Verheul, J.; Piette, A.; Wilkin, J.; Werth, N.; Banzhaf, M.; Vollmer, W.; Young, K.; Nguyen-Distèche, M.; den Blaauwen, T. (2010). Septal and lateral wall localization of PBP5, the major D,D-carboxypeptidase of *Escherichia coli*, requires substrate recognition and membrane attachment. *Molecular Microbiology*, 77(2): 300-323
- Pratt, R. (2008). Substrate specificity of bacterial DD-peptidases (penicillin-binding proteins). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(14): 2138-2155
- Prior, J.; Lynch, M.; Gill, R. (2010). Broad-Host-Range Vectors for Protein Expression Across Gram Negative Hosts. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(2): 326-332
- Qiu, D.; Damron, H.; Mima, T.; Schweizer, H.; Yu, H. (2008). P_{BAD}-Based Shuttle Vectors for Functional Analysis of Toxic and Highly Regulated Genes in *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. and Other Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23): 7422-7426
- Quénéée, L.; Lamotte, D. Polack, B. (2005). Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques*, 38(1): 63-67
- Quintela, J.; Caparrós, M.; de Pedro, M. (1995). Variability of peptidoglycan structural parameters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 125(1): 95-10048
- Rahme, L.; Stevens, E.; Wolfort, S.; Shao, J.; Tompkins, R.; Ausubelt, F. (1995). Common Virulence Factors for Bacterial Pathogenicity in Plants and Animals. *Science*, 268(5219): 1899-1902
- Reith, J.; Mayer, C. (2011). Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1): 1-11

- Remans, K.; Vercammen, K.; Bodilis, J.; Cornelis, P. (2010). Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 156(9): 2597-260748
- Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5): 658-684
- Ropy, A.; Cabot, G.; Sanchez-Diener, I.; Aguilera, C.; Moyá, B.; Ayala, J.; Oliver, A. (2014). Role of *Pseudomonas aeruginosa* Low Molecular-Mass Penicillin-Binding Proteins in AmpC Expression, β -Lactam Resistance and Peptidoglycan Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (control number AAC05150-14R1)
- Sainsbury, S.; Bird, L.; Rao, V.; Shepherd, S.; Stuart, D.; Hunter, W.; Owens, R.; Ren, J. (2011). Crystal structures of penicillin-binding protein 3 from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of native and antibiotic-bound forms. *Journal of Molecular Biology*, 405(1): 173-184
- Saleh, M.; Bartual, S.; Abdullah, M.; Jensch, I.; Asmat, T.; Petruschka, L.; Pribyl, T.; Gellert, M.; Lillig, C.; Antelmann, H.; Hermoso, J.; Hammerschmidt, S. (2013). Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* surface thioredoxin-fold lipoproteins crucial for extracellular oxidative stress resistance and maintenance of virulence. *EMBO Molecular Medicine*, 5(12): 1852-1870
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. (1998). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition, pp: 1659. ISBN 0-87969-309-6
- Sanders, C.; Bradford, P.; Ehrhardt, A.; Bush, K.; Young, K.; Henderson, T.; Sanders, E. (1997). Penicillin-Binding Proteins and Induction of AmpC β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(9): 2013-2015
- Sauvage, E.; Duez, C.; Herman, R.; Kerff, F.; Petrella, S.; Anderson, J.; Adediran, S.; Pratt, F.; Frère, J.; Charlier, P. (2007). Crystal Structure of the *Bacillus subtilis* Penicillin-binding Protein 4a, and its Complex with a Peptidoglycan Mimetic Peptide. *Journal of Molecular Biology*, 371(2): 528-539
- Sauvage, E.; Herman, R.; Petrella, S.; Duez, C.; Bouillenne, F.; Frère, J.; Charlier, P. (2005). Crystal Structure of the *Actinomadura* R39 DD-peptidase Reveals New Domains in Penicillin-binding Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35): 31249-31256
- Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J.; Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2): 234-258
- Scheffers, D.; Jones, L.; Errington, J. (2004). Several distinct localization patterns for penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 51(3): 749-764

Scheffers, D.; Pinho, M. (2005). Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4): 585-607

Schmidtke, A.; Hanson, N. (2008). Role of *ampD* Homologs in Overproduction of AmpC in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11): 3922-3927

Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3381-3385

Silby, M.; Winstanley, C.; Godfrey, S.; Levy, S.; Jackson, R. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4): 652-680

Silva-Rocha, R.; Martínez-García, E.; Calles, B.; Chavarría, M.; Arce-Rodríguez, A.; de las Heras, A.; Páez-Espino, A.; Durante-Rodríguez, G.; Kim, J.; Nikel, P.; Platero, R.; de Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 41(D1): D666-D675

Sivaneson, M.; Mikkelsen, H.; Ventre, I.; Bordi, C.; Filloux, A. (2011). Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Molecular Microbiology*, 79(5): 1353-1366

Smith, J.; Kumarasiri, M.; Zhang, W.; Heseck, D.; Lee, M.; Toth, M.; Vakulenko, S.; Fisher, J.; Mobashery, S.; Chen, Y. (2013). Structural analysis of the role of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 5 in β -lactam resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7): 3137-3146

Song, J.; Xie, G.; Elf, P.; Young, K.; Jensen, R. (1998). Comparative analysis of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 7 in the context of its membership in the family of low-molecular-mass PBPs. *Microbiology*, 144(4): 975-983

Spratt, B.; Pardee, A. (1975). Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature*, 254(5500): 516-517

Stover, C.; Pham, X.; Erwin, A.; Mizoguchi, S.; Warrener, P.; Hickey, M.; Brinkman, F.; Hufnagle, W.; Kowalik, D.; Lagrou, M.; Garber, R.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, LL.; Coulter, S.; Folger, K.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G.; Wu, Z.; Paulsen, I.; Reizer, J.; Saier, M.; Hancock, R.; Lory, S.; Olson, N. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799): 959-964

Strateva, T.; Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9): 1133-1148

- Tarry, M.; Arends, S.; Roversi, P.; Piette, E.; Sargent, F.; Berks, B.; Weiss, D.; Lea, S. (2009). The *Escherichia coli* Cell Division Protein and Model Tat Substrate SufI (FtsP) Localizes to the Septal Ring and Has a Multicopper Oxidase-Like Structure. *Journal of Molecular Biology*, 386(2): 504-519
- Taylor, A.; Ayala, J.; Niumsup, P.; Westphal, K.; Baker, J.; Zhang, L.; Walsh, T.; Wiedemann, B.; Bennett, P.; Avison, M. (2010). Induction of β -lactamase production in *Aeromonas hydrophila* is responsive to β -lactam-mediated changes in peptidoglycan composition. *Microbiology*, 156(8): 2327-2335
- The Bacteria A Treatise on Structure and Function (1986). Volume X. The Biology of *Pseudomonas*. Gunsalus, I. (Consulting Editor). Sokatch, J.; Nicholas O. (Editors in Chief). Sokatch, J. (Volume Editor). Academic Press, Inc., pp. 3-20
- The Prokariotes A handbook on the Biology of Bacteria Proteobacteria: Gamma Subclass (2006). Volume 6. Chapter 3.3.21 Nonmedical: *Pseudomonas*. Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. (Editors). Dworking, M. (Editor in chief). Springer Science+Business Media, Inc. Third Edition, pp. 646-703
- Thein, M.; Sauer, G.; Paramasivam, N.; Grin, I.; Linke, D. (2010). Efficient Subfractionation of Gram-Negative Bacteria for Proteomics Studies. *Journal of Proteome Research*, 9(12): 6135-6147
- Tsutsumi, Y.; Tomita, H.; Tanimoto, K. (2013). Identification of Novel Genes Responsible for Overexpression of *ampC* in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12): 5987-5993
- Turner, R.; Hurd, A.; Cadby, A.; Hobbs, J.; Foster, S. (2013). Cell wall elongation mode in Gram-negative bacteria is determined by peptidoglycan architecture. *Nature Communications*, 4(1496): 1-8
- Typas, A.; Banzhaf, M.; Gross, C.; Vollmer, W. (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2): 123-136
- Uehara, T.; Park, J. (2003). Identification of MpaA, an Amidase in *Escherichia coli* That Hydrolyzes the γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelate Bond in Murein Peptides. *Journal of Bacteriology*, 185(2): 679-68248
- van Dam, V.; Orlachs, N.; Breukink, E. (2009). Specific labeling of peptidoglycan precursors as a tool for bacterial cell wall studies. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 10(4): 617-624
- Van Heijenoort, J. (2011). Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(4): 636-663
- Vega, D.; Ayala, J. (2006). The DD-carboxypeptidase activity encoded by *pbp4B* is not essential for the cell growth of *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 185(1): 23-27

- Villaverde, A. (2012). Bacterial inclusion bodies: an emerging platform for drug delivery and cell therapy. *Nanomedicine*, 7(9): 1277-1279
- Vollmer, W. (2012). Bacterial growth does require peptidoglycan hydrolases. *Molecular Microbiology*, 86(5): 1031-1035
- Vollmer, W.; Blanot, D.; de Pedro M. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2):149-167
- Vollmer, W.; Seligman, S. (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in Microbiology*, 18(2): 59-66
- Wilson, R.; Dowling, R. (1998). Lung infections. 3. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax*, 53(3):213-219
- Wolter, D.; Lister, P. (2013). Mechanisms of β -lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Pharmaceutical Design*, 19(2): 209-222
- Work, E. (1957). Reaction of Ninhydrin in Acid Solution with Straight-Chain Amino Acids Containing Two Amino Groups and its Application to the Estimation of $\alpha\epsilon$ -Diaminopimelic Acid. *Biochemical Journal*, 67(3): 416-423
- Young, K. (2011). *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. Peptidoglycan. John Wiley & Sons, Ltd., pp. 1-11
- Zamorano, L.; Reeve, T.; Deng, L.; Juan, C.; Moyá, B.; Cabot, G.; Vocadlo, D.; Mark, B.; Oliver, A. (2010). NagZ Inactivation Prevents and Reverts β -Lactam Resistance, Driven by AmpD and PBP4 Mutations, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9): 3557-3563
- Zhao, G.; Meier, T.; Kahl, S.; Gee, K.; Blaszcak, L. (1999). BOCILLIN FL, a Sensitive and Commercially Available Reagent for Detection of Penicillin-Binding Proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5): 1124-1128

ANEXOS

8

8. Anexos

8.1. Medios de cultivo

8.1.1. Medio Luria-Bertani

Componentes	Concentración final
Triptona (Pronadisa)	1%
Extracto de levadura (Pronadisa)	0.5%
Cloruro sódico (Merck)	0.5%

* Agar Luria-Bertani: incorporar agar bacteriológico europeo 1.5% (Pronadisa)

8.1.2. Medio Mueller Hinton (Difco™, Becton Dickinson)

Componentes	Cantidad
Hidrolizado ácido de caseína	17.5 g
Extracto de carne bovina	2 g
Almidón soluble	1.5 g
Volumen final (Agua destilada)	1000 ml

* Agar Mueller Hinton: incorporar 15 g de agar bacteriológico europeo

8.1.3. Medio SOC

Componentes	Concentración final
Triptona	2%
Extracto de levadura	0.5%
Cloruro sódico	0.05%
Sulfato de magnesio (Merck)	0.48%
Cloruro potásico (Merck)	0.0186%
D(+)-glucosa monohidratada (Merck)	0.36%

8.1.4. Medio M63 5X

Componentes	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Probus)	10 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	68 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Merck)	2.5 mg
Volumen final (Agua destilada)	1000 ml

* Ajustar pH a 7.0 con KOH 5M y diluir 1X en agua Milli-Q estéril. Suplementar con MgSO₄ 1mM y succinato 20 mM

8.2. Reacciones de amplificación para gen *dacB*

8.2.1. Master mix Touchdown PCR - Colony PCR

Componentes	Volumen	Concentración final
Buffer 10X con MgSO ₄	2.5 µl	1X
Mix dNTPs 10 mM	0.5 µl	0.2 mM
Primer Fw 10 µM	0.56 µl	0.225 µM
Primer Rv 10 µM	0.56 µl	0.225 µM
ADN (diluciones)	1 µl	1 µl
<i>Pfu</i> polimerasa 2.5 U/µl	0.25 µl	0.625 U
DMSO	2.5 µl	10%
Agua libre de nucleasas	17.13 µl	-
Volumen final	25 µl	-

8.2.2. Programa de amplificación para gen *dacB* y clonaje en vectores pET-28b(+), pTP1 y pBTBxh-2

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95°C	2 min	1
Denaturación	95°C	45 s	5
<i>Annealing</i>	68°C	1 min	
Extensión	72°C	3 min	
Denaturación	95°C	45 s	5
<i>Annealing</i>	64°C	1 min	
Extensión	72°C	3 min	
Denaturación	95°C	45 s	5
<i>Annealing</i>	60°C	1 min	
Extensión	72°C	3 min	
Denaturación	95°C	45 s	20
<i>Annealing</i>	55°C	30 s	
Extensión	72°C	3 min	
Extensión final	72°C	5 min	1
	4°C	∞	

8.2.3. Programas de amplificación para gen *dacB* y clonaje en vectores pHERD26T, pSEVA234

Para la amplificación del gen *dacB* y su posterior clonaje en el vector pHERD26T, se utilizó el programa de amplificación descrito en 8.2.2., con modificaciones en las temperaturas de *annealing* (64°C-60°C-55°C-50°C).

Para la amplificación del gen *dacB* y su posterior clonaje en el vector pSEVA234, se utilizó el protocolo de amplificación detallado en 8.2.2. Sólo se modificó la selección de las temperaturas de *annealing* en este ensayo (62°C-58°C-54°C-50°C)

8.3. Reacciones de amplificación para mutantes de inserción por transposición (PA14NR)

8.3.1. Master mix PCR

Componentes	Volumen	Concentración final
Buffer 10X con MgSO ₄	5 µl	1X
Mix dNTPs 10 mM	1 µl	0.2 mM
Primer Fw 10 µM	1.125 µl	0.225 µM
Primer Rv 10 µM	1.125 µl	0.225 µM
ADN	1 µl	1 µl
Pfu polimerasa 2.5 U/µl	0.5 µl	1.25 U
DMSO	5 µl	10%
Agua libre de nucleasas	35.25 µl	-
Volumen final	50 µl	-

8.3.2. Programa de amplificación

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95°C	2 min	1
Denaturación	95°C	2 min	
Annealing	65°C	1 min	30
Extensión	72°C	3 min	
Extensión final	72°C	5 min	1
	4°C	∞	

* Amplicones fueron separados por electroforesis (80-100V, 150 mA) en gel de agarosa (0.8-1.0%) y buffer TAE1X

8.4. Antibióticos

Antibiótico (Proveedor)	Laboratorio - Proveedor	Solvente	Solución stock
Ampicilina (Gobemicina)	Normon	Agua Milli-Q estéril	200 mg/ml
Aztreonam	Bristol-Myers Squibb	Agua Milli-Q estéril	2.5 mg/ml
Cefoxitina	Normon	Agua Milli-Q estéril	5 mg/ml
Ceftazidima	GlaxoSmithKline	Agua Milli-Q estéril	5 mg/ml
Gentamicina (Genta-Gobens)	Normon	Agua Milli-Q estéril	40 mg/ml
Imipenem	Sigma-Aldrich	Buffer fosfato 10 mM pH 7.2	2.5 µg/ml
Kanamicina	Sigma-Aldrich	Agua Milli-Q estéril	150 mg/ml
Tetraciclina	Sigma-Aldrich	Etanol 70%	50 mg/ml

* Soluciones filtradas en unidades Acrodisc® Syringe Filter 0.2 µm (Pall) y almacenadas a -20°C

8.5. Marcadores de tamaño y masa molecular

Marcador	Proveedor	Rango	Uso
ADN fago Lambda (λ) digerido con <i>Hind</i> III	CBMSO	0.6-23.1 Kb	ADN
ADN fago Phi (Φ) 29 digerido con <i>Hind</i> III	CBMSO	273-4370 pb	ADN
DNA Molecular Weight Marker XIV	Roche	100-2642 pb	ADN
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Life Technologies	14-191 kDa	Proteína
ProSieve™ Color Protein Marker	Lonza Rockland	10-190 kDa	Proteína
Unstained SDS-PAGE Protein Standards, Broad Range	Bio-Rad	6.5-200 kDa	Proteína
Precision Plus Protein™ All Blue Standards	Bio-Rad	10-250 kDa	Proteína

8.6. Incorporación de dATP en fragmentos de PCR amplificados

Componentes	Volumen	Concentración final
Producto de PCR purificado (polimerasa <i>Pfu</i>)	5 μ l	-
5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer (Promega)	2 μ l	1X (1.5mM MgCl ₂)
dATP 2 mM	1 μ l	0.2 mM
GoTaq® DNA polymerase 5 U/ μ l (Promega)	1 μ l	5 U
Agua estéril libre de nucleasas	1 μ l	-
Volumen final	10 μ l	

* La reacción se incubó a 70°C por 30 min. Se emplearon 2 μ l en ensayos de ligación

8.7. Desfosforilación de extremos 5' en vectores de expresión

Componentes	Volumen	Concentración final
Vector digerido	40 μ l	-
Alkaline Phosphatase 10X Reaction Buffer (Promega)	5 μ l	1X
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal 1 U/ μ l (Promega)	2.5 μ l	5 U
Agua estéril libre de nucleasas	2.5 μ l	-
Volumen final	50 μ l	

* La reacción se incubó a 37°C por 60 min. La inactivación enzimática se realizó por incubación a 80°C por 10 min

8.8. Preparación gel de poliacrilamida (gel concentrador)

Componentes gel <i>stacking</i> 5%	Volumen
Agua Milli-Q estéril	1.4 ml
Solución de Acrilamida/Bisacrilamida 30% (29:1) (Bio-Rad)	0.33 ml
Tris 1.5 M pH 6.8	0.25 ml
SDS 10%	0.02 ml
Persulfato de amonio 10% (Merck)	0.02 ml
TEMED (Merck)	0.002 ml
Volumen Final	2 ml

8.9. Preparación gel de poliacrilamida (gel separador)

Componentes gel <i>separating</i> 10%	Volumen
Agua Milli-Q estéril	1.9 ml
Solución de Acrilamida/Bisacrilamida 30% (29:1) (Bio-Rad)	1.7 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	1.3 ml
SDS 10%	0.05 ml
Persulfato de amonio 10% (Merck)	0.05 ml
TEMED (Merck)	0.002 ml
Volumen Final	5 ml

* El gel fue confeccionado, cargado y sometido a electroforesis en un sistema Mini-PROTEAN® (Bio-Rad)

8.10. Buffer y soluciones**8.10.1. Buffer PBS 10X**

Componentes	Cantidad
Cloruro sódico (Merck)	80 g
Cloruro potásico (Merck)	2 g
Fosfato disódico dodecahidratado (Merck)	28.96 g
Fosfato potásico	2 g
Volumen Final (Agua Milli-Q)	1000 ml

8.10.2. Buffer TAE 50X

Componentes	Cantidad - Volumen
Trizma® base (Sigma-Aldrich)	242 g
Acido acético glacial (Merck)	57.1 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 ml
Volumen Final (Agua Milli-Q)	1000 ml

8.10.3. Buffer Tris Glicina 10X / SDS

Componentes	Cantidad
Trizma® base	30.2 g
Glicina (Sigma-Aldrich)	188 g
SDS (Merck)	10 g
Volumen Final (Agua Milli-Q)	1000 ml

8.10.4. Solución de persulfato de amonio 10%

1 g de persulfato de amonio (Merck) fue disuelto en 8 ml de agua Milli-Q, el volumen se ajustó finalmente a 10 ml y se fraccionó en alícuotas de 500 µl almacenadas a -20°C

8.10.5. Solución de bromuro de etidio

Se utilizó una solución *stock* de BrEt 5 mg/ml. Se incorporó un volumen suficiente para una concentración final en gel de 0.3 µg/ml

8.10.6. Buffer de carga ADN 10X

Componentes	Cantidad - Volumen	Concentración final
Glicerol 85% (Sigma-Aldrich)	4.6 ml	39%
SDS 10%	0.5 ml	0.5%
EDTA 0.5 M pH 8.0	0.2 ml	0.01 M
Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)	25 mg	0.25%
Volumen Final (Agua Milli-Q)	10 ml	

* La solución fue alícuotada y almacenada a -20°C

8.10.7. Laemmli Buffer Sample 4X

Componentes	Cantidad - Volumen	Concentración final
Tris-HCl 1M pH 6.8	6.25 ml	0.25 M
SDS	2 g	8%
Glicerol 85%	8.82 ml	30%
2-mercaptoetanol (Merck)	2.5 ml	10%
Azul de bromofenol	5 mg	0.02%
Agua Milli-Q	7.43 ml	-
Volumen Final	25 ml	

8.10.8. Buffer de transferencia

Componentes	Cantidad - Volumen
Trizma® base	5.81 g
Glicina	2.93 g
SDS (Merck)	0.375 g
Metanol (Sigma-Aldrich)	200 ml
Agua Milli-Q	800 ml
Volumen Final	1000 ml

8.10.9. Solución stock de IPTG

Para una solución *stock* 1 M, 2.38 g de IPTG (Calbiochem®) fueron pesados y disueltos en un volumen final de 10 ml de agua Milli-Q estéril. La preparación fue filtrada, alicuotada y almacenada a -20°C

8.10.10. Solución stock de X-Gal

100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido fueron disueltos en un volumen de 2 ml de DMF (N,N-dimetilformamida). La solución fue alicuotada, filtrada y almacenada protegida de la luz a -20°C

8.10.11. Solución stock de L(+)-arabinosa

Una solución *stock* de L(+)-arabinosa 40% fue preparada en un volumen final de 10 ml de agua Milli-Q estéril. La mezcla fue filtrada en unidades Millex®-GS Filter 0.22 μm (Millipore) y almacenada a 4°C

8.10.12. Solución stock de Luciferina M: 280.3 g/mol

Para una solución *stock* 17 mM, 10 mg de D(-)-Luciferin (Roche) fueron pesados y disueltos en 2.1 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8.0. Fracciones de 20 μl almacenadas a -20°C

8.10.13. Solución stock de Luminol 0.5 M M: 177.16 g/mol

88.6 mg de Luminol (Sigma-Aldrich) fueron pesados y disueltos en 1 ml de DMSO. Alícuotas de 20 μl fueron almacenadas a -20°C

8.10.14. Solución de tinción con azul de Coomassie

Componentes	Volumen
Metanol	450 ml
Acido Acético Glacial (Panreac)	100 ml
Coomassie Blue G-250 (LKB Bromma)	2.5 g
Agua destilada	450 ml
Volumen Final	1000 ml

* La solución fue filtrada (papel filtro) y almacenada a temperatura ambiente protegida de la luz

8.10.15. Solución de desteñido y fijación

Componentes	Volumen
Metanol	100 ml
Aido Acético Glacial	70 ml
Agua destilada	830 ml
Volumen Final	1000 ml