



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

“Estudio de la metalo-beta-lactamasa anclada a membrana NDM-1 y análisis de su evolución clínica”

Presentada por Guillermo Bahr

Rosario, Argentina

2018

“Estudio de la metalo-beta-lactamasa anclada a membrana NDM-1 y análisis de su evolución clínica”

Guillermo Bahr

Licenciado en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET) y en la Cátedra de Biofísica, Departamento de Química Biológica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1º de abril de 2013 y el 28 de febrero de 2018, bajo la dirección del Dr. Alejandro J. Vila

Índice

Abreviaturas	1
Capítulo 1. Introducción General	2
1.1 Resistencia a antibióticos	2
1.2 Resistencia a carbapenemes y carbapenemasas.....	4
1.3 Metallo-beta-lactamasas.....	6
1.4 Subclases y principales familias de MBLs	8
1.5 NDM-1.....	9
1.6 Lipoproteínas bacterianas	12
1.7 β -lactamasas lipidadas.....	15
Objetivos.....	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos	17
Capítulo 2. Materiales y métodos	18
2.1 Cepas bacterianas y reactivos químicos.....	18
2.2 Medios de cultivo	18
2.3 Vector pMBLe	18
2.4 Construcción de MBL mutantes	20
2.5 Técnicas de Biología Molecular de ADN.....	22
2.5.1 Purificación de ADN plasmídico	22
2.5.2 Electroforesis en gel de agarosa	22
2.5.3 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	22
2.5.4 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	23
2.5.5 Reacciones de ligación.....	23
2.5.6 Mutagénesis sitio-dirigida.....	23
2.5.7 Overlap Extension PCR	24
2.5.8 Transformación de <i>E. coli</i> mediante competencia inducida por CaCl ₂	25
2.6 Electroforesis de proteínas, preparación de fracciones celulares y Western Blot.....	26
2.6.1 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	26
2.6.2 Fraccionamiento celular y análisis de la localización de NDM-1	26
2.6.3 Western Blot.....	29

2.7	Efecto de la limitación de Zn(II) sobre niveles de proteína MBL y β -actividad lactamasa	30
2.8	Expresión de NDM-1 soluble recombinante.....	31
2.9	Proteólisis limitada de NDM-1 recombinante en sus formas holo y apo	32
2.10	Determinación de Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs).....	32
2.11	Detección de MBLs en células mediante microscopía de inmunofluorescencia	33
2.12	Experimentos de competencia.....	33
2.13	Determinación de afinidad por Zn(II) en esferoplastos.....	34
2.14	Análisis de la localización de NDM-1 en OMVs.....	34
2.15	Análisis de transferencia de resistencia a β -lactámicos mediante OMVs	35
2.16	Efecto de calprotectina en la actividad lactamasa de OMVs	35
2.17	Purificación y análisis de ADN a partir de OMVs.....	35
2.18	Búsqueda bioinformática de MBLs que contienen lipobox.....	36
Capítulo 3. Efecto de la disponibilidad de Zn(II) sobre la funcionalidad <i>in-vivo</i> de Metallo-Beta-Lactamasas. Influencia de la localización celular de NDM-1.....		37
3.1	Introducción	37
3.1.1	Regulación de la homeostasis de Zn(II) en Gram-negativos.....	37
3.1.2	Biosíntesis y adquisición de Zn(II) por MBLs. Efecto de Zn(II) en la resistencia a antibióticos.....	39
3.1.3	Inmunidad nutricional	41
3.2	Resultados.....	43
3.2.1	Efecto de la disponibilidad de Zn(II) sobre resistencia y niveles de proteína MBL	43
3.2.2	Construcción y caracterización de MBLs mutantes con localización celular modificada.....	49
3.2.3	Efecto del anclaje a membrana sobre capacidad de MBLs de otorgar resistencia.....	55
3.2.4	Modificación del test MHT para mejorar la detección de NDM-1	60
3.3	Discusión	64
Capítulo 4. Análisis de los alelos clínicos de NDM.....		67
4.1	Introducción	67
4.1.1	Alelos naturales de NDM	67
4.2	Resultados.....	71
4.2.1	Niveles de expresión y capacidad de conferir resistencia de los alelos.....	71
4.2.2	Efecto de limitación de Zn(II) sobre capacidad de conferir resistencia....	73
4.2.3	Estabilidad bajo limitación de Zn(II)	76

4.2.4	Evaluación in vivo de afinidad por Zn(II)	78
4.2.5	Competencia entre alelos de NDM en condiciones de limitación de Zn(II)	79
4.2.6	Comparación de los alelos de NDM con SPM-1	82
4.3	Discusión	83
Capítulo 5. Análisis de NDM-1 en Vesículas de Membrana Externa		86
5.1	Introducción	86
5.1.1	Vesículas de membrana externa	86
5.1.2	Biogénesis de OMVs y características de OMVs como vía de secreción ..	86
5.1.3	Roles biológicos de OMVs	89
5.1.4	OMVs y resistencia a antibióticos	91
5.2	Resultados.....	92
5.2.1	Purificación y caracterización de OMVs de <i>E. coli</i>	92
5.2.2	Efecto de la localización celular de MBLs sobre secreción a OMVs.....	94
5.2.3	Efecto de disponibilidad de Zn(II) sobre actividad β -lactamasa de OMVs.....	96
5.2.4	Transferencia de resistencia mediada por OMVs	96
5.2.5	Análisis de NDM-1 en OMVs de aislamientos clínicos.....	98
5.2.6	Búsqueda bioinformática de posibles MBLs lipidadas	100
5.3	Discusión	105
Conclusiones.....		108
Resumen.....		110
Referencias bibliográficas		113

Abreviaturas

BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolfosfato
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CP	Calprotectina
DO	Densidad Óptica
DPA	Ácido dipicolínico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il]etanosulfónico
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
MBL	Metalo- β -lactamasa
NBT	Nitroazul de tetrazolio
OMV	Vesícula de Membrana Externa
PBPs	Proteínas de unión a penicilina
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
SBL	Serín- β -lactamasa

Capítulo 1. Introducción General

1.1 Resistencia a antibióticos

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y su posterior introducción para el tratamiento clínico de infecciones en 1943 significaron el inicio de una verdadera revolución en el campo de la medicina^{1,2}. Durante los años siguientes, y hasta la década del '70, se descubrieron numerosas clases nuevas de estas drogas, en lo que se dio a llamar la Edad de Oro de los Antibióticos^{3,4}. Sumado a esto, se desarrolló una gran variedad de derivados semisintéticos de las drogas naturales, generando un amplio arsenal de compuestos quimioterapéuticos a disposición de los sistemas de salud. Los antibióticos no sólo permitieron combatir infecciones que resultaban previamente intratables, sino que posibilitaron además realizar intervenciones quirúrgicas de gran magnitud, tales como trasplantes de órganos o reemplazo de articulaciones, a las que el riesgo de infección habría tornado impracticables. A raíz de esto, los antibióticos constituyen en muchos aspectos la piedra angular de la medicina moderna⁵.

Desafortunadamente, la propia acción de estas drogas en la eliminación de los microorganismos patógenos convierte a su uso en una potente fuerza de selección para el surgimiento de bacterias resistentes. Es así como la introducción de cada nueva clase de antibióticos tuvo aparejada la identificación de organismos capaces de tolerarlos^{4,6} (Figura 1). La velocidad del surgimiento de resistencia en ámbitos clínicos para muchos de estos compuestos se encuentra probablemente asociada al hecho de que los determinantes de resistencia son ancestrales, habiendo evolucionado por la competencia de sus portadores con organismos ambientales productores de antibióticos naturales o teniendo su origen en los propios productores de antibióticos^{1,7}. A la selección de organismos intrínsecamente resistentes a antibióticos, con determinantes de resistencia codificados generalmente en su cromosoma, se adicionó la aparición de nuevas cepas con resistencia adquirida mediante transferencia génica horizontal. Elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones y transposones, sumado a fenómenos como la conjugación y transformación natural, permitieron que los mecanismos que contrarrestan la acción de los antibióticos se diseminaran velozmente entre organismos que resultaban previamente susceptibles a los mismos⁶. La capacidad de recombinación de ciertos elementos genéticos móviles llevó además a la creciente prevalencia en los últimos años de bacterias multirresistentes, en las que se

suelen recopilar numerosos mecanismos de resistencia introducidos como *cassettes* dentro de integrones.

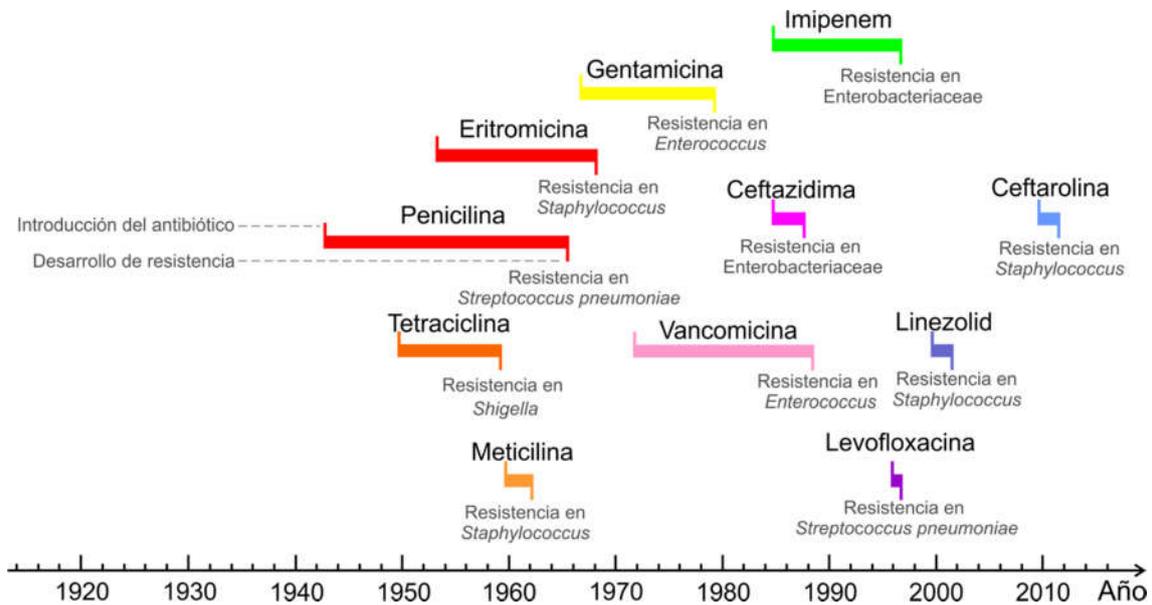


Figura 1. Línea de tiempo marcando la introducción de algunos de los antibióticos principales, y la detección clínica de bacterias destacadas resistentes a los mismos. Adaptado de Hede, K., Nature, 2014⁸

La selección de bacterias resistentes a antibióticos está acelerada por el uso inapropiado y/o excesivo de antibióticos, iniciando el tratamiento sin contar con un antibiograma o una identificación tentativa del organismo responsable de una infección, o prescribiéndolos para infecciones virales². También contribuye al sobreuso de antibióticos la venta no regulada de estas drogas en muchos países. Existe una probada correlación entre el número de dosis de antibióticos consumidas en una región y la frecuencia de bacterias resistentes⁹⁻¹¹. Por último, el uso de antibióticos en la ganadería como promotores del crecimiento y profilácticos para mantener la salud de los animales también genera condiciones que favorecen a la resistencia antimicrobiana, habiéndose demostrado la capacidad de organismos resistentes de movilizarse desde el ámbito rural a los consumidores de estos productos¹².

La carrera armamentista con los organismos resistentes tiene como complicación el hecho que la tasa de descubrimiento de nuevos antibióticos disminuyó abruptamente en las últimas décadas del siglo XX y el comienzo del siglo XXI. Si bien en los años posteriores se continuaron desarrollando drogas obtenidas por modificación de los esqueletos químicos conocidos, desde la introducción de las quinolonas a fines de la década de 1968 no se ha aprobado ninguna clase estructural novedosa de antibióticos con actividad contra Gram-negativos⁴. Entre la multiplicidad de causas se destacan la gran variedad de antibióticos disponibles y los menores incentivos económicos existentes para la industria farmacéutica para desarrollar nuevos quimioterapéuticos,

de uso por un período de tiempo y número de pacientes limitados, respecto a la búsqueda de fármacos para enfermedades crónicas o de uso extendido en el tiempo^{4,13}. De esta manera, los numerosos años y cientos de millones de dólares necesarios para introducir un nuevo medicamento en la clínica fueron invertidos como prioridad en el diseño de otros tipos de compuestos. Adicionalmente existen dificultades para el hallazgo de compuestos líderes en la búsqueda de nuevos antibióticos. Por ejemplo, en el 2007 la compañía GSK reportó un screening de 500.000 compuestos sintéticos buscando actividad contra *Escherichia coli*, sin haberse identificado ningún “hit” productivo¹⁴.

A pesar de los redoblados esfuerzos para el desarrollo de nuevos antibióticos y el creciente reconocimiento de la problemática en la comunidad internacional, la rápida diseminación de organismos multirresistentes y la notable velocidad con la que han surgido formas de resistencia frente a drogas recientemente introducidas han llevado a la predicción de que el mundo se encamina hacia una “era post-antibiótica”⁵. En este escenario, una elevada prevalencia de organismos pan-resistentes tornaría fútil el arsenal de antibióticos disponibles y llevaría a la humanidad nuevamente a una época de infecciones intratables. Más allá de la validez de las predicciones catastróficas, resulta claro que el problema de la resistencia a antibióticos no será resuelto meramente por la introducción de nuevas drogas, sino que requerirá del compromiso internacional para regular estrictamente el uso de las mismas, así como la eliminación de su uso en la cría de animales y la implementación de metodologías de rápida detección para reducir el potencial de dispersión de los organismos resistentes.

1.2 Resistencia a carbapenemes y carbapenemasas

Los carbapenemes son potentes antibióticos β -lactámicos de amplio espectro de acción, reservados como droga de último recurso en el tratamiento de muchas infecciones bacterianas¹⁵. La creciente prevalencia de β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs) en las décadas de 1980 y 1990, capaces de inactivar β -lactámicos como penicilinas y cefalosporinas, así como mecanismos de resistencia a otras clases de antibióticos ha llevado a un progresivo aumento de la utilización de los carbapenemes en la clínica¹⁶. Los carbapenemes son por lo tanto compuestos vitales para el tratamiento de infecciones severas e intrahospitalarias¹⁷. Desafortunadamente, esto ha estado acompañado de una creciente prevalencia en la última década de organismos resistentes a carbapenemes, para los cuales las opciones de tratamiento son frecuentemente muy limitadas.

La familia de las enterobacterias, que contiene a géneros como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia* y *Enterobacter*, es la fuente más común de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad¹⁷. Los organismos de este grupo pueden diseminarse fácilmente mediante el contacto entre personas así como a través de alimentos y superficies contaminadas, y son capaces de incorporar fácilmente nuevos mecanismos de resistencia mediante transferencia génica horizontal¹⁷. Precisamente la combinación con otros mecanismos de resistencia ha generado cepas multirresistentes que resultan muy difíciles o imposibles de combatir con los antibióticos disponibles en la actualidad. Es por ello que la diseminación de Enterobacterias Resistentes a Carbapenemes (CRE), que comenzó a adquirir magnitud a comienzo de la década del 2000¹⁸, resulta especialmente preocupante y llevó a que el CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE UU) las catalogue en el año 2013 como una amenaza crítica para los sistemas de salud¹⁹. Las infecciones por CRE tienen generalmente origen intrahospitalario, y están asociadas a una elevada tasa de mortalidad.

Si bien fenómenos tales como la delección de porinas o expresión de sistemas de eflujo contribuyen a la resistencia a carbapenemes, el mecanismo más importante es la expresión de carbapenemasas^{16,20}. Las carbapenemasas son β -lactamasas capaces de degradar e inactivar carbapenemes, y están presentes dentro de las clases A, B y D de β -lactamasas de la clasificación basada en secuencia propuesta por Ambler^{21,22}. Por su parte, las enzimas pertenecientes a la clase C hidrolizan carbapenemes muy pobremente, y sólo se encuentran implicadas en la resistencia a estas drogas cuando están sobreexpresadas en organismos que cuentan con delecciones o mutaciones en porinas que reducen la permeabilidad del antibiótico^{16,21}.

Las carbapenemasas pertenecientes a las clases A y D, que junto a las enzimas de clase C se conocen como serín- β -lactamasas (SBLs), tienen un mecanismo catalítico dependiente de la formación de un aducto covalente con el sustrato por ataque nucleofílico de un residuo de serina sobre el anillo β -lactámico²³. Estas tres clases de enzimas evolucionaron a partir de los dominios transpeptidasa de las PBPs que son blanco de los antibióticos β -lactámicos, logrando la capacidad de hidrolizar el aducto covalente con el antibiótico que de otra manera inactivaría irreversiblemente a la proteína. A pesar de la baja identidad de secuencia entre las distintas clases de SBLs, todas ellas poseen una estructura similar con un plegamiento $\alpha\beta$ conservado.

La clase A contiene diversas familias de carbapenemasas tales como GES, SME y SFC, pero su aparición en aislados clínicos es poco frecuente, con la notable excepción de KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase)¹⁶. Las enzimas pertenecientes a la

familia de KPC son las carbapenemasas más frecuentes a nivel mundial en Enterobacterias, con incidencia especialmente alta en EE. UU, Brasil, países mediterráneos y China²⁰. Se encuentran portadas tanto por Enterobacterias como por *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter baumannii*, y los genes codificantes para las mismas están frecuentemente asociados a transposones y ubicados en plásmidos con numerosos genes de resistencia a otros antibióticos. Poseen un amplio espectro de sustrato, siendo capaces de hidrolizar eficientemente antibióticos β -lactámicos de las 4 clases principales (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactamas), y no son inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam ni tazobactam²⁴. Sólo el avibactam, un inhibidor de β -lactamasas no β -lactámico recientemente introducido, es capaz de inhibir a las enzimas KPC y restaurar la actividad de estos antibióticos²⁴.

La clase D de β -lactamasas, definidas tradicionalmente por su carácter de oxacilinasas sin actividad frente a cefalosporinas de espectro extendido²¹, contiene múltiples enzimas capaces de hidrolizar carbapenemes, tales como OXA-23, OXA-40 y OXA-58¹⁶. Las carbapenemasas más diseminadas de esta clase son sin embargo las enzimas pertenecientes al grupo de OXA-48, codificada en plásmidos e identificada en aislamientos de Enterobacterias de Medio Oriente, norte de África, Europa y EE.UU²⁴. Si bien estas enzimas poseen una tasa de hidrólisis de carbapenemes relativamente baja, por lo que altos niveles de resistencia requieren de sobreexpresión de la enzima o combinación con otros mecanismos de resistencia¹⁶, sólo resultan inhibibles por avibactam²⁰.

1.3 Metallo-beta-lactamasas

Las β -lactamasas de clase B, o metallo- β -lactamasas (MBLs), son un grupo de carbapenemasas con orígenes evolutivos y mecanismo catalítico distintos a los de las serín- β -lactamasas. Tal como su nombre lo indica son metaloenzimas, que dependen de la presencia de Zn(II) en su sitio activo para llevar a cabo la hidrólisis del sustrato β -lactámico²⁵. Estos iones metálicos son responsables de la mayoría de las interacciones que orientan el sustrato así como de la generación del oxhidrilo que actúa como nucleófilo para atacar el anillo β -lactámico, sin formación de un intermediario covalente²⁶. Los iones Zn(II) estabilizan además la carga negativa generada sobre el nitrógeno luego de la apertura del anillo beta lactámico, hasta que se completa la reacción mediante la protonación de este grupo²⁷. Las diferencias mecánicas determinan que las MBLs no sean susceptibles a los inhibidores activos frente a las

SBLs, y hasta el momento no se dispone de inhibidores de uso clínico para estas enzimas²⁸.

Todas las MBLs son capaces de degradar carbapenemes, y la mayoría puede hidrolizar adicionalmente penicilinas y cefalosporinas, así como inhibidores de SBLs como ácido clavulánico y tazobactam²⁸. Aunque que los monobactamas no son sustrato de estas enzimas, las MBLs suelen encontrarse asociadas a SBLs en aislamientos clínicos, impidiendo el uso de estos antibióticos para combatir a los organismos que las producen. Algunos reportes recientes sugieren además que algunas MBLs tienen la capacidad de degradar lentamente al avibactam, a pesar de la ausencia de un anillo β -lactámico en este inhibidor^{29,30}.

Desde el punto de vista estructural, las MBLs poseen un plegamiento conservado tipo $\alpha\beta\alpha$ (Figura 2), con el sitio activo ubicado en un surco ancho y poco profundo entre las dos mitades $\alpha\beta$ de la proteína²⁵. Allí un conjunto de ligandos metálicos unen 1 o 2 iones Zn(II) necesarios para el funcionamiento de estas enzimas. Residuos ubicados en bucles que rodean el sitio activo contribuyen a la unión del sustrato y podrían estar implicados en la estabilización de los intermediarios de reacción²⁶.

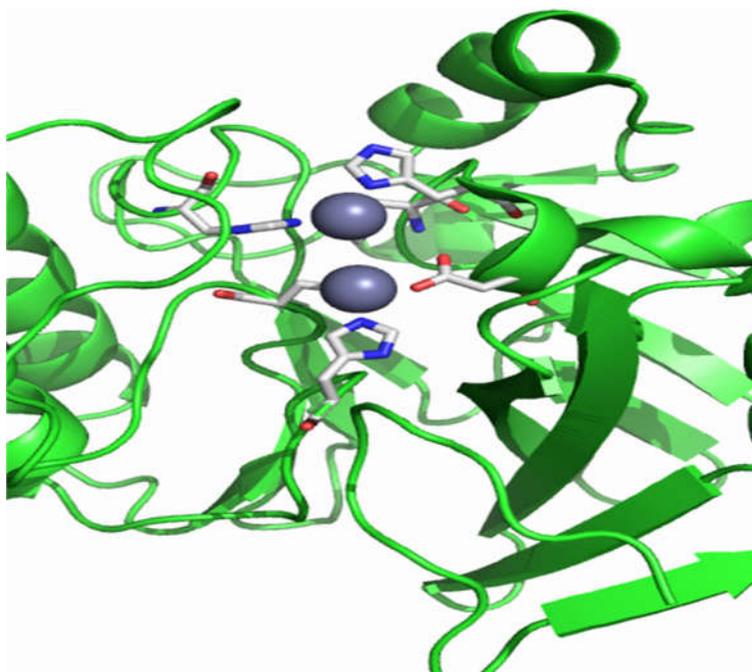


Figura 2. Estructura de la MBL NDM-1 (PDB: 4EY2) mostrando el plegamiento típico $\alpha\beta\alpha$ de estas enzimas. Los iones Zn(II) del sitio activo se muestran como esferas grises, y los residuos que participan en la coordinación de los mismos como “sticks” en blanco.

Las MBLs comparten su plegamiento con los demás miembros de la Superfamilia de las metalo- β -lactamasas³¹, un conjunto de proteínas de origen temprano en la evolución de la vida que se encuentran presentes tanto en Bacterias como en Arqueas y

Eucariotas. Estas proteínas comparten un motivo característico de unión a metal de secuencia H-X-H-X-D-H. Las proteínas de la superfamilia cumplen funciones muy diversas, siendo muchas de ellas hidrolasas dependientes de metal, aunque también incluyen oxidorreductasas, enzimas de reparación de ADN y metabolismo de ARN, y proteínas que participan en transformación natural captando ADN exógeno. Algunas de las proteínas de la superfamilia unen Zn(II), mientras que otras poseen centros de hierro, y ciertos miembros de este grupo contienen dominios adicionales además del que adquiere el plegamiento característico.

La presencia de Zn(II) en el sitio activo de las MBLs es esencial tanto para la unión de sustrato como para la catálisis³². El espacio periplasmático, donde las MBLs llevan a cabo su función en organismos Gram-negativos, carece de mecanismos capaces de mantener la homeostasis de Zn(II)³³, por lo que el Zn(II) disponible para estas enzimas se encuentra directamente ligado a los niveles extracelulares del ion. En este sentido, distintos estudios publicados han demostrado la influencia de la disponibilidad de metal en el medio de crecimiento sobre la capacidad de las MBLs de captar Zn(II) y conferir resistencia^{34,35}. Esto adquiere importancia durante un proceso infeccioso, dado que el sistema inmune de vertebrados utiliza la llamada Respuesta de Inmunidad Nutricional para reducir los niveles de Zn(II) y otros iones metálicos en los sitios de infección³³, con el objetivo de dificultar el crecimiento del patógeno. La respuesta de inmunidad nutricional podría además condicionar la capacidad de las MBLs de conferir resistencia.

1.4 Subclases y principales familias de MBLs

Las MBLs se dividen en 3 subclases de acuerdo a su secuencia y perfil de sustrato. Las MBLs tienen un bajo grado de homología en general, y distintas familias de enzimas dentro de una subclase suelen tener identidad de secuencia en el orden del 25%³⁶. Las enzimas de subclase B1 y B2 forman un grupo evolutivo separado de las de subclase B3, con quienes poseen porcentajes de identidad de secuencia de alrededor del 12 a 15%³⁶. Existen indicios de que la actividad lactamasa en estos dos grupos de MBLs surgió de forma independiente durante la evolución, en lugar de derivar de un ancestro común con esta capacidad hidrolítica^{37,38}.

Las enzimas de subclase B1 poseen un amplio espectro de sustrato, siendo capaces de degradar carbapenemes, penicilinas y cefalosporinas. Estas MBLs requieren la unión de dos equivalentes de Zn(II) en su sitio activo para ser funcionales, e incluyen a casi la totalidad de las MBLs de relevancia clínica²⁸. Este grupo contiene a la primer

MBL descrita, BcII de *Bacillus cereus*, identificada en el año 1966 como una β -lactamasa capaz de ser inactivada por quelantes metálicos³⁹. Se encuentran además en la subclase B1 las enzimas de codificación cromosómica CcrA/CfiA de *Bacteroides fragilis*, BlaB de *Elizabethkingia meningoséptica*, y Bla2 de *Bacillus anthracis*, así como numerosas β -lactamasas codificadas en plásmidos. Estas últimas son las de mayor relevancia clínica y potencial de diseminación, y se destacan entre ellas las familias de IMP, VIM y NDM, y la enzima SPM-1.

Por su parte, las MBLs B2 son carbapenemasas exclusivas, sin capacidad de hidrólisis significativa de penicilinas y cefalosporinas. El espectro de sustrato restringido de estas enzimas se debería al menos en parte a un sitio activo más estrecho, por la presencia de una α -hélice extendida que se ubica sobre una de sus paredes⁴⁰. La actividad de las enzimas B2 sólo requiere la incorporación de Zn(II) a uno de los sitios de unión presentes en el sitio activo, mientras que el segundo sitio de coordinación une metal con baja afinidad debido a la mutación de uno de los residuos ligandos, teniendo la unión de Zn(II) en esta posición un efecto inhibitorio sobre la enzima. Existe un número reducido de enzimas pertenecientes esta subclase, todas ellas cromosómicas: SfhI de *Serratia fonticola*, ImiS de *Aeromonas veronii*, y las variantes de CphA encontradas en *Aeromonas* spp.

Las β -lactamasas de la subclase B3 comparten con las B1 su amplio espectro de sustrato y el requerimiento de unión de dos Zn(II), aunque los residuos responsables de la coordinación se ven modificados en uno de los sitios de unión. Con excepción de la enzima AIM de *P. aeruginosa*⁴¹, de codificación plasmídica, las proteínas de esta subclase se encuentran codificadas en el cromosoma, e incluyen a las familias FEZ de *Legionella gormanii*, BJP de *Bradirrhizobium japonicum*, GOB de *Elizabethkingia meningoséptica* y CAU de *Caulobacter crescentus*. Si bien la mayoría de las MBLs B3 carecen de importancia clínica, la enzima L1 de *Stenotrophomonas maltophilia* es responsable, junto a una SBL llamada L2 producida en tándem, la resistencia a β -lactámicos de este importante patógeno en pacientes con fibrosis quística.

1.5 NDM-1

NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase) fue identificada por primera vez en el año 2008 en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* obtenidos de un paciente sueco que había estado hospitalizado en la India⁴². Estudios retrospectivos revelaron la presencia de la MBL ya en aislados clínicos de Enterobacterias obtenidos en la región en los años 2006 y 2007⁴³, indicando que había estado distribuyéndose sin haber sido detectada durante un período de tiempo considerable. En escasos años esta enzima de la subclase

B1 ha experimentado una diseminación muy acelerada a nivel mundial, habiendo sido encontrada en todos los continentes. Como es común entre las MBLs, NDM-1 posee baja homología con otras enzimas de su clase y presenta la mayor similitud respecto a VIM-2, con un 32% de identidad de secuencia⁴².

Las infecciones con organismos portadores de NDM-1 son frecuentes en países asiáticos y especialmente en el Subcontinente Indio, es decir la región que comprende India, Pakistán, Bangladesh, Sri Lanka, Bután y Nepal. Allí, la enzima ha adquirido preocupantes características de endemidad, siendo detectada no sólo en contextos hospitalarios sino también en muestras de aguas ambientales en los alrededores de Nueva Delhi⁴⁴. Aislados de *K. pneumoniae* productora de NDM-1 fueron encontrados en la flora intestinal de personas que habían retornado de viajes al subcontinente indio y se sometieron a estudios por malestar gastrointestinal⁴⁵, demostrando el potencial de esta carbapenemasa de diseminarse a partir de colonización intestinal luego de contacto con comida o agua contaminada. La enzima también fue identificada en plantas de tratamiento de aguas y efluentes de hospitales en China^{46,47} y agua de río en Vietnam⁴⁸, indicando una dispersión ambiental sin precedentes de este mecanismo de resistencia.

En el resto del mundo, NDM-1 está especialmente diseminada en los Balcanes, Medio Oriente y norte de África, que constituyen reservorios secundarios para los organismos productores de esta enzima^{17,49}. El Reino Unido, de vínculos históricos con el subcontinente indio, fue uno de los primeros países europeos donde se detectó la enzima, y muchos de los aislados provenían de pacientes que habían realizado viajes a India o Pakistán⁵⁰. Además, se han casos esporádicos de infecciones con productores de NDM en países tales como España, Francia, Italia, Grecia, Turquía, EE UU, Canadá, Colombia, Sudáfrica, Corea del Sur, Japón y Australia⁴⁹. En Argentina, la primera detección fue en un aislado de la enterobacteria *Providencia rettgeri* en el año 2013.

La mayoría de los productores de NDM en aislamientos clínicos son Enterobacterias, seguido en frecuencia por *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, y de forma más esporádica una gran variedad de otros organismos^{49,50}. Entre las Enterobacterias, *K. pneumoniae* y *E. coli* son las especies más frecuentemente observadas que expresan esta enzima. No se han descrito factores de virulencia específicos asociados a los plásmidos que contienen *bla*_{NDM-1}, por lo que las bacterias portadoras de NDM-1 no parecen ser más virulentas que otros aislados similares⁴⁹.

El gen *bla*_{NDM-1} ha sido encontrado principalmente en diversos plásmidos conjugativos pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad. La diseminación

mundial de NDM-1 no está asociada a ningún clon, plásmido o estructura genética en particular⁵¹. El entorno inmediato del gen suele incluir en su extremo 5' la secuencia de inserción IS*Ab*125, ya sea completa o trunca, y el gen de resistencia a bleomicina *ble*_{MBL} en el 3'. Estudios en *A. baumannii* productores de NDM-1 ubicaron al gen entre dos elementos IS*Ab*125 completos, formando el transposón compuesto Tn125⁴⁹. La presencia de estos elementos en forma incompleta en Enterobacterias sugiere la posibilidad de que NDM-1 haya sido portada por *Acinetobacter* antes de ser transferida a las Enterobacterias donde fue identificada.

Al igual que ocurre con otras MBLs de relevancia clínica, los plásmidos que contienen *bla*_{NDM-1} suelen portar además genes de SBLs así como de resistencia para otras clases de antibióticos, como aminoglicósidos, fluoroquinolonas, macrólidos, rifampicina y cloranfenicol⁴⁹. Frecuentemente, las opciones de tratamiento para estos organismos multirresistentes productores de NDM-1 están limitadas a fosfomicina, tigeciclina y colistina, teniendo este último graves efectos secundarios por su nefrotoxicidad. El uso de colistina como droga de último recurso para combatir organismos productores de NDM-1 podría encontrar complicaciones en el futuro ante la diseminación de MCR-1, enzima que otorga resistencia a esta polimixina y para la cual ya se ha observado producción en conjunto con NDM-1⁵².

Esta enzima cuenta con una localización celular única que la diferencia de las demás MBLs. Mientras que éstas son enzimas periplasmáticas solubles, NDM-1 se encuentra anclada a la membrana externa en bacterias Gram Negativas⁵³. Esto se debe a la presencia de una señal de lipidación denominada *lipobox* en el péptido líder de la proteína, que determina su modificación postraducciona por la adición de grupos lipídicos a un residuo de cisteína dentro de esta secuencia señal. Más allá del reporte inicial de esta localización, todas las demás caracterizaciones de la enzima han utilizado variantes solubles, con distintas deleciones en el extremo N-terminal, por lo que no se habían explorado los posibles efectos del anclaje a membrana sobre la funcionalidad de la proteína como determinante de resistencia.

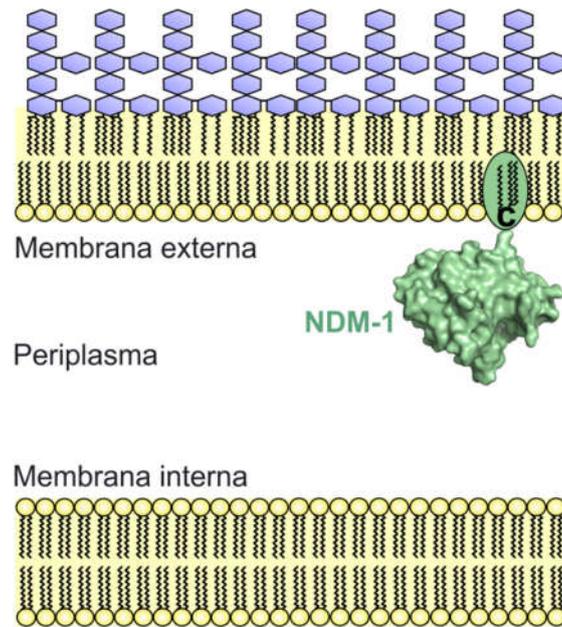


Figura 3. Esquema de la localización celular de NDM-1, anclada mediante su grupo lipídico a la cara periplasmática de la membrana externa.

Hasta el momento se han detectado 19 alelos clínicos de NDM, la mayoría de los cuales difieren de NDM-1 en 1 a 3 mutaciones puntuales. Todas estas variantes comparten la señal de lipidación encontrada en NDM-1, por lo que también se encontrarían ancladas a membrana.

1.6 Lipoproteínas bacterianas

La modificación postraduccional que determina el anclaje a membrana de NDM-1 se encuentra mediada por un sistema de lipidación de proteínas altamente conservado, tanto en Gram-negativos como Gram-positivos⁵⁴. Los péptidos líder N-terminales de las lipoproteínas tienen las características típicas de las proteínas secretadas, pero poseen hacia su extremo final una señal de lipidación denominada *lipobox*, con una secuencia consenso [LVI]-[ASTVI]-[GAS]-C⁵⁵.

La biosíntesis de lipoproteínas tiene lugar en la cara periplasmática de la membrana interna luego del transporte de la proteína desde el citoplasma, generalmente a través del sistema Sec, y está mediado por la terna de proteínas Lgt, LspA y Lnt⁵⁶ (Figura 4). La primera de ellas transfiere un grupo diacilglicerol al sulfhidrilo de la cadena lateral de la Cys conservada del lipobox, quedando unido por un enlace tioéter. A continuación la peptidasa señal de lipoproteínas LspA remueve el péptido líder de la prolipoproteína, quedando como residuo N-terminal la Cys del lipobox. Por último Lnt transfiere un grupo acilo al amino libre de dicho residuo, formando la lipoproteína

madura. La fuente de los grupos lipídicos transferidos por Lgt y Lnt son los fosfolípidos de la membrana interna⁵⁷.

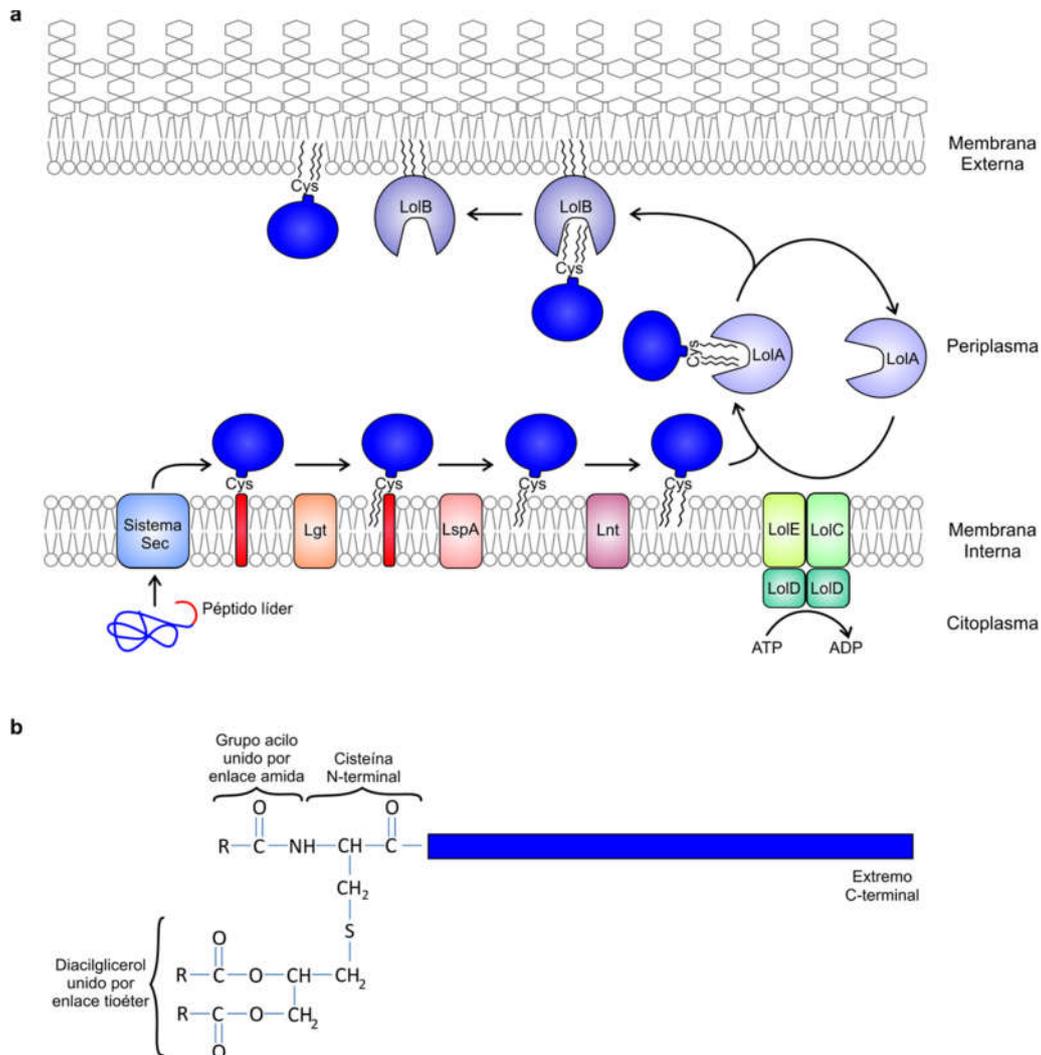


Figura 4. a) Esquema del proceso de biosíntesis de lipoproteínas en bacterias Gram-negativas. **b)** Estructura de los grupos lipídicos unidos a la cisteína N-terminal de una lipoproteína madura.

En organismos Gram-negativos la mayoría de las lipoproteínas son luego translocadas a la membrana externa mediante el sistema Lol⁵⁴. Las proteínas LolCDE forman un sistema tipo ATP binding cassette ubicado en la membrana interna que extrae a la lipoproteína de la membrana y se la transfiere a la chaperona periplasmática soluble LolA. La misma posee una estructura del tipo barril β incompleto, dejando una cavidad donde se introducen los grupos lipídicos de la proteína carga. LolA entrega a la proteína transportada a LolB, que es en sí misma una lipoproteína de membrana externa y con estructura similar a LolA, que la deposita finalmente en la cara periplasmática de la membrana externa. Algunas lipoproteínas de Gram-negativos son retenidas en la membrana interna, lo que depende al menos en parte de la presencia de residuos de Asp en las dos posiciones inmediatamente posteriores a la Cys del lipobox,

y que permiten evadir al sistema Lol⁵⁸. En los organismos Gram-positivos, que carecen de membrana externa y del sistema Lol, las lipoproteínas son retenidas en la membrana citoplasmática. Los organismos Gram-positivos de bajo contenido G+C carecen de Lnt, y darían origen a lipoproteínas diaciladas en lugar de las formas triaciladas observadas en Gram-positivos de alto G+C y Gram-negativos. Sin embargo la detección de lipoproteínas triaciladas en algunos de estos organismos sugiere la existencia de una vía alternativa a Lnt para la adición del lípido al grupo amino libre de la cisteína lipitada⁵⁶.

La vía de lipidación de proteínas es esencial en organismos Gram-negativos, y la delección de los genes involucrados en la misma resulta generalmente letal⁵⁶. Por otro lado, muchos Gram-positivos pueden tolerar mutaciones en estos genes, originando sólo defectos en el crecimiento, aunque en muchas de estas bacterias las lipoproteínas resultan necesarias para la virulencia^{56,57}. Si bien existen en Eucariotas diversos tipos de lipidación tales como S-palmitoilación, S-isoprenilación o N-miristoilación, las maquinarias que realizan estos procesos de modificación postraduccional no tienen homología con las proteínas bacterianas^{56,57}.

Se estima que entre un 1 y 3%, y hasta 5% en algunos casos, de los marcos abiertos de lectura en genomas bacterianos codifican para lipoproteínas⁵⁵, que llevan a cabo diversas funciones, muchas de ellas aún no identificadas. La lipoproteína más abundante en *E. coli*, y la primera en ser descubierta, es la lipoproteína de Braun o Lpp. Ésta contribuye a mantener la integridad de la membrana externa, al estar anclada a ella por su extremo N-terminal mientras que su extremo C-terminal está unido covalentemente al péptidoglicano. Otra lipoproteína denominada Pal cumple funciones estructurales similares, pero su unión con el péptidoglicano es no covalente, y mediante su interacción con las proteínas del sistema Tol enlaza membrana interna, pared celular y membrana externa⁵⁹. Adicionalmente un conjunto de lipoproteínas son claves en el sistema Bam de inserción de proteínas barril β^{60} , tales como porinas, en la membrana externa, así como la proteína lipitada LptE⁶¹ es crucial para el tránsito de las unidades de lipopolisacárido desde la membrana interna a la externa. Otras lipoproteínas participan en procesos de señalización, tales como NlpE y RcsF, que actúan en el sentido de contacto con superficies y de estrés de la envoltura celular⁶², o en procesos de patogénesis tales como adhesión a células o inicio de procesos inflamatorios, siendo además las lipoproteínas potentes inductores del sistema inmune. Se sabe que la pérdida de Lgt lleva a una reducción en la virulencia de organismos tales como *Mycobacterium tuberculosis* o *Listeria monocytogenes*⁵⁷. Las lipoproteínas tienen una importancia adicional en Gram-positivos, donde muchos de los componentes de unión

a sustrato de los sistemas ABC que son proteínas periplasmáticas solubles en Gram-negativos se encuentran ancladas a la membrana celular para evitar que se pierdan al medio externo⁶³.

Dada su alta conservación tanto en Gram-positivos como Gram-negativos y ausencia de sistemas similares eucariotas, el proceso de lipidación bacteriano resulta un blanco atractivo aún no explotado con fines terapéuticos⁶⁴. La globomicina⁶⁵, un lipopéptido cíclico que actúa como inhibidor de LspA, produce la acumulación letal de Lpp no procesada en la membrana interna de *E. coli*. Este compuesto y un antibiótico funcionalmente similar llamado myxovirescin producido por *Mixococcus xanthus* han sido identificados como compuestos prometedores para el desarrollo de nuevas clases de antibióticos⁶⁴. También se han reportado recientemente inhibidores del sistema Lol que interfieren con la translocación de las lipoproteínas a la membrana externa⁶⁶. La actual crisis de resistencia a antibióticos podría desembocar por lo tanto en el desarrollo de drogas clínicas que ataquen esta importante vía del metabolismo bacteriano.

1.7 β -lactamasas lipidadas

Si bien la enorme mayoría de las β -lactamasas caracterizadas son enzimas solubles, se han identificado instancias en las que estas enzimas se encuentran unidas a membranas mediante un ancla lipídica.

Muchas de las β -lactamasas que experimentan lipidación son SBLs pertenecientes a organismos Gram-positivos, habiendo sido reportadas por primera vez en *Bacillus cereus* hace más de 50 años⁶⁷. Mientras que en Gram-negativos la membrana externa constituye una barrera que mantiene a las β -lactamasas solubles periplasmáticas asociadas a la célula, las enzimas secretadas por Gram-positivos pueden difundir y liberarse al medio extracelular. Desde este punto de vista, la localización de SBLs con anclaje lipídico en la membrana citoplasmática de estos organismos podría constituir una ventaja evolutiva al mantener toda la actividad de hidrólisis de antibióticos ligada a la célula productora.

Las SBLs lipidadas en Gram-positivos son enzimas de clase A. Entre ellas se encuentran BLIII (también conocida como BlaZ) de *Bacillus cereus*⁶⁸, PC1/BlaZ de *Staphylococcus aureus*⁶⁹ y PenP de *Bacillus licheniformis*⁷⁰. Pueden detectarse además para estas enzimas numerosos homólogos que contienen un lipobox en organismos relacionados en las bases de datos de secuencias biológicas. A pesar de los beneficios planteados para la lipidación, sólo el 50% de BLIII y PenP se encuentran unidas a membrana^{68,70}, con un porcentaje variable para PC1 de acuerdo a la cepa de *S. aureus*⁷¹.

Las formas secretadas de estas enzimas (“exoenzimas”) se generarían por proteólisis de la especie anclada, dando lugar a formas solubles de menor peso molecular que las correspondientes lipoproteínas.

En el caso de Gram-negativos, las β -lactamasas lipidadas son menos frecuentes. La primera detectada con estas características y una de las mejor caracterizadas es la enzima de clase A BRO-1 de *Moraxella catarrhalis*, un patógeno oportunista del sistema respiratorio⁷². A pesar de tener un lipobox canónico, se reportó que sólo el 10% de la enzima se encuentra anclada a membrana en su hospedador nativo, y un 45% cuando es producida de forma recombinante en *E. coli*⁷³. Además de la MBL NDM-1, recientemente se reportó una SBL de clase A lipitada en *Burkholderia pseudomallei* llamada PenA⁷⁴. Estas dos enzimas se encuentran completamente en sus formas unida a membrana.

Objetivos

Objetivo General

El objetivo del presente trabajo de tesis es estudiar la influencia del anclaje a membrana de la metalo-beta-lactamasa NDM-1 sobre su función como determinante de resistencia, de manera de analizar la contribución de esta localización celular única al éxito y diseminación de la enzima. Además, se buscará caracterizar el proceso evolutivo de esta lactamasa en ambientes clínicos a través del estudio de sus alelos naturales.

Objetivos Específicos

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos.

- 1) Caracterizar la capacidad de NDM-1 y otras MBLs de otorgar resistencia bajo condiciones de baja disponibilidad de Zn(II), que emulen las presentes en sitios de infección.
- 2) Determinar el efecto del anclaje a membrana de NDM-1 sobre su capacidad de otorgar resistencia, mediante comparación con mutantes solubles de la enzima.
- 3) Analizar la influencia del anclaje a membrana en la secreción de NDM-1 en vesículas de membrana externa.
- 4) Comparar la capacidad de los alelos clínicos de NDM de otorgar resistencia en condiciones que simulen las presentes durante una infección.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Cepas bacterianas y reactivos químicos

Se utilizó *Escherichia coli* DH5 α para la construcción del plásmido pMBLe, para la expresión de proteínas a partir de este vector y para los estudios microbiológicos y bioquímicos. Se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 para la expresión con el vector pMBLe-*bla*_{NDM-1} en estudios de fraccionamiento celular. Se utilizaron como fuentes de los genes *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2} y *bla*_{NDM-1} las cepas *P. aeruginosa* 48-1997A⁷⁵, *Acinetobacter junii* M7978⁷⁶, *P. aeruginosa* COL-1⁷⁷ y el plásmido pET26-*bla*_{NDM-1} (generosamente provisto por el Dr. James Spencer, Universidad de Bristol, Reino Unido), respectivamente. Los aislados clínicos productores de NDM-1 empleados en los estudios con OMVs (*Providencia rettgeri* 15758, *Serratia marcescens* 17468 and *Enterobacter cloacae* 17464) fueron generosamente proporcionados por la Dra. Alejandra Corso (ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina).

De no aclararse lo contrario, las cepas se crecieron a 37°C en caldo de lisogenia (LB), suplementado con 20 μ g/mL de gentamicina cuando fue necesario para mantener la selección del plásmido pMBLe.

2.2 Medios de cultivo

- Caldo de lisogenia (medio líquido LB): triptona 1% P/V, extracto de levadura 0,5% P/V, NaCl 1% P/V (Difco)
- Medio sólido LB Agar: triptona 1% P/V, extracto de levadura 0,5% P/V, NaCl 1% P/V, Agar-agar 1.5% (Difco)
- Medio líquido SOC: peptona de carne 2%, extracto de levadura 0,5%, KCl 2,5mM, NaCl 10mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM y glucosa 20mM.

2.3 Vector pMBLe

Se construyó el plásmido pMBLe para permitir la expresión de distintos genes *bla* en cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*, manteniendo el péptido líder nativo de cada enzima. Para generar este vector, se amplificó la región del plásmido pTGR11⁷⁸ que contiene los genes *lacI*^Q, el promotor *P*_{tac} y los terminadores de transcripción, usando los cebadores SacIFw y NcoIRv, y se la subclonó en los sitios *SacI* y *NcoI* del vector pBBR1-MCS5⁷⁹, con origen de replicación de amplio espectro y marcador de resistencia

a gentamicina. Las secuencias de los cebadores utilizados para esta construcción y para el clonado de genes en el vector pMBLe se muestran en la Tabla 1.

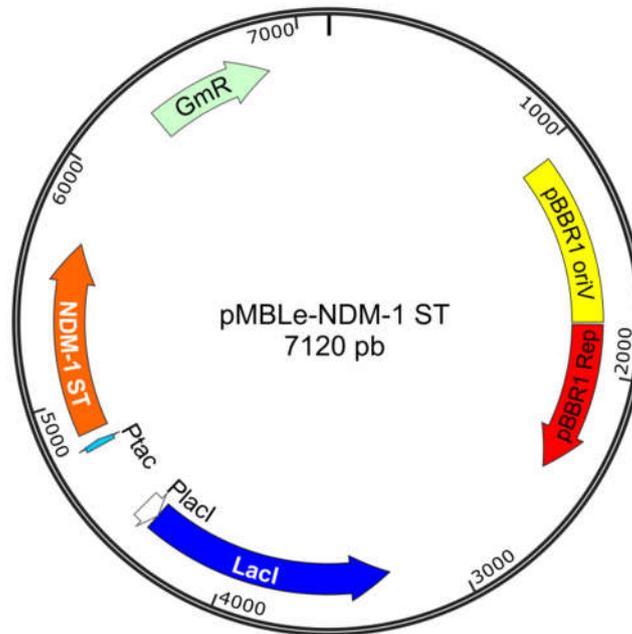


Figura 5. Mapa del vector pMBLe-NDM-1 ST, que contiene clonada la MBL NDM-1 con una secuencia StrepTag-II fusionada a su extremo C-terminal. Se muestran además el promotor tac (Ptac), la secuencia codificante para el marcador de resistencia a gentamicina (GmR), el ori y la proteína de replicación del vector de amplio espectro pBBR1 del cual deriva el plásmido (pBBR1 oriV y pBBR1 Rep, respectivamente), y el promotor y la secuencia codificante del represor LacI (PlacI y LacI, respectivamente). El mapa fue generado utilizando el software SnapGene Viewer.

Los genes *bla* completos, incluyendo sus péptidos señal nativos, fueron amplificados con o sin la adición en su extremo C-terminal de la secuencia StrepTag-II. Todas las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo usando la ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen) con el siguiente programa de ciclos térmicos: 3 min a 95°C, 30 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 55°C y 1 min a 68°C, y finalmente 10 min a 68°C. Se utilizaron para este procedimiento los cebadores IMP1NdeIFw, IMP1EcoRIRv y IMP1StEcoRIRv para *bla*_{IMP-1}; NDM1NdeIFw, NDM1HindIIIRv y NDM1StHindIIIRv para *bla*_{NDM-1}; VIM2NdeIFw, VIM2HindIIIRv y VIM2StHindIIIRv para *bla*_{VIM-2}; SPM1NdeIFw, SPM1HindIIIRv y SPM1StHindIIIRv para *bla*_{SPM-1}. Los genes *bla* amplificados fueron subclonados en los sitios *NdeI* y *HindIII* (*EcoRI* en el caso de *bla*_{IMP-1}) del vector pMBLe.

Los plásmidos obtenidos por este procedimiento se usaron para transformar *E. coli* DH5α mediante transformación química con CaCl₂, o *P. aeruginosa* PAO1 siguiendo un procedimiento de electroporación previamente descrito⁸⁰. Estas y las demás construcciones de ADN realizadas en este trabajo se verificaron mediante el

servicio de secuenciación de ADN provisto por la Universidad de Maine, EE UU. Para verificar las construcciones realizadas en el vector pMBLe se utilizaron los oligos pMBLe Fw y pMBLe Rv

Cebador	Secuencia (5' → 3')
pMBLe Fw	GCTGTTGACAATTAATCATCGGCTC
pMBLe Rv	CACTACCATCGGCGCTACG
SacIFw	GTCTAGTGAGCTCCTCTCTCAAGGGCATCG
NcoIRv	GGAATTAAGGTACCATGGTTAATTAATATATACTAG
IMP1NdeIFw	GACATCATATGAGCAAGTTATCTGTATTC
IMP1EcoRIRv	GACGTGAATTCTTAGTTGCTTGGTTTTGATGG
IMP1StEcoRIRv	GACGTGAATTCCTACTTTTCGAATTGTGGGTGAGACCAGTT GCTTGGTTTTGATGGTTTTTAC
NDM1NdeIFw	TATACATATGGAATTGCCAATATTATGCACC
NDM1HindIIIRv	GACGTAAGCTTCTAGCGCAGCTTGTCGGC
NDM1StHindIIIRv	GACGTAAGCTTCTACTTTTCGAATTGTGGGTGAGACCAGCGCAGCTTGTCGGC
VIM2NdeIFw	GACATCATATGTTCAAACTTTTGAGTAAGTTATTGGTC
VIM2HindIIIRv	GACGTAAGCTTCTACTCAACGACTGAGCGATTTGTG
VIM2StHindIIIRv	GACGTAAGCTTCTACTTTTCGAATTGTGGGTGAGACCACTCAACGACTGAGCG ATTTGTG
SPM1NdeIFw	GTACGTCATATGAATTCACCTAAATCGAGAGC
SPM1HindIIIRv	GTACGTAAGCTTCTACAGTCTCATTTCCGCAAC
SPM1StHindIIIRv	GTACGTAAGCTTCTACTTTTCGAATTGTGGGTGAGACCACAGTCTCATTTCCGCC AAC

Tabla 1. Cebadores utilizados para construcción del vector pMBLe y clonado de genes en el mismo.

2.4 Construcción de MBL mutantes

El gen codificante para el mutante NDM-1 C26A fue generado a partir del vector pMBLe-blaNDM-1 mediante un procedimiento de mutagénesis sitio-dirigida por amplificación del vector, usando los cebadores NDM-1-C26AFw y NDM-1-C26ARv.

Los genes *bla* codificantes para las variantes V-NDM (en el que los primeros 47 aminoácidos de NDM-1 fueron reemplazados por los primeros 42 residuos de VIM-2) y N-VIM (proteína VIM-2 en la cual los primeros 42 residuos fueron reemplazados por los primeros 47 residuos de NDM-1) se construyeron por Overlap Extension PCR usando los cebadores parcialmente complementarios VIM2-B, NDM1-C, NDM1-D y VIM2-E (Tabla 2), junto con los cebadores externos VIM2NdeIFw, NDM1NdeIFw, VIM2StHindIIIRv and NDM1StHindIIIRv. Estos genes amplificados por PCR se clonaron el vector pMBLe tal como se describió previamente.

Los genes *bla* para los alelos de NDM-1 fueron generados a partir de pMBLe-*bla*_{NDM-1}, mediante el procedimiento de mutagénesis sitio dirigida por amplificación del vector. Los oligos utilizados se detallan en la Tabla 2.

Cebador	Secuencia (5' → 3')
NDM-1-C26AFw	CATTGATGCTGAGCGGGGCGATGCCCCGGTGAAATC
NDM-1-C26ARv	GATTTACCCGGGCATCGCCCCGCTCAGCATCAATG
VIM2-B	ATTCGGTGCGAGCTGGCGGAAAACCAGATCCCCGACCGGAATTCGC
NDM1-C	GATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCG
NDM1-D	ACCATCGGCAATCTGGTAAAGCCGGACCTCGCCAAACCGTTGGTCGCC
VIM2-E	GAGGTCCGGCTTTACCAGATTGCCG
P28AFw	GAGCGGGTGCATGGCCGGTGAAATCC
P28ARv	GGATTTACCCGGCCATGCACCCGCTCAGCATC
R32S/G36DFw	CCGGTGAAATCAGCCCGACGATTGACCAGCAAATGG
R32S/G36DRv	TCCATTTGCTGGTCAATCGTCGGGCTGATTTACCCGG
G69S/A74TFw	CGACATGCCGAGTTTCGGGGCAGTCACTTCCAACGGTTTG
G69S/A74TRv	CCGTTGGAAGTGACTGCCCCGAAACTCGGCATGTCGAG
V88LFw	TGGCGGCCGCTGCTGTTGGTCGATAC
V88LRv	GTATCGACCAACAGCACGCGGCCGCCATCCCTG
D95NFw	ATACCGCCTGGACCAATGACCAGAC
D95NRv	GTCTGGTCATTGGTCCAGGCGGTATC
D130GFw	AGATGGGCGGTATGGGCGCGCTGCATG
D130GRv	ATGCAGCGCGCCCATACCGCCCATCTTG
D130NFw	CAAGATGGGCGGTATGAACGCGCTGCATG
D130NRv	CATGCAGCGGTTCCATACCGCCCATCTTG
E152KFw	ACCAGCTTGCCCCGAAAAGGGGATGGTTG
E152KRv	CAACCATCCCCTTTTTCGGGGCAAGC
M154LFw	AGAGGGGCTGGTTGCGGCGCAACAC
M154LRv	CGCCGCAACCAGCCCCTCTTGC
M154VFw	AGAGGGGGTGGTTGCGGCGCAACAC
M154VRv	CGCCGCAACCACCCCCTCTTGC
G200RFw	ACCGTTGGGATCGACCGCACCGACATCGC
G200RRv	GCGATGTCGGTGCGGTCGATCCCAACGGTG
G222DFw	CTCGGCAATCTCGATGATGCCGACACTGAG
G222DRv	AGTGTCGGCATCATCGAGATTGCCGAGCG
A233VFw	CACTACGCCCGTCAGTGCGCGCGTTTG
A233VRv	CAAACGCGCGCACTGACGCGGCGTAG
R264HFw	CACTCATACGGCCACATGGCCGACAAGC
R264HRv	GCTTGTGCGCCATGTGGGCCGTATGAGTG

Tabla 2. Cebadores usados en la construcción de mutantes de MBLs.

2.5 Técnicas de Biología Molecular de ADN

2.5.1 Purificación de ADN plasmídico

Las purificaciones de ADN plasmídico se realizaron empleando el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se partió de cultivos de 10 mL de las cepas conteniendo el plásmido de interés, creciéndolos durante 16 hs en presencia del antibiótico de selección.

Se controló la pureza e integridad de las preparaciones de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa. Las concentraciones de ADN se determinaron espectrofotométricamente, utilizando la relación de que 1 unidad de absorbancia a 260 nm con un paso óptico de 1 cm equivale a 50 µg/mL de ADN doble hebra.

2.5.2 Electroforesis en gel de agarosa

Las corridas electroforéticas en geles de agarosa se llevaron a cabo utilizando sistemas de tipo submarino. Los geles utilizados contenían entre 1 y 2% P/V de agarosa, de acuerdo al tamaño de las moléculas de ADN a resolver, y se prepararon en solución reguladora TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8). Para la detección del ADN doble hebra se incorporó a los geles el colorante SYBR® Green (Invitrogen), adicionándolo antes de la gelificación del mismo a la concentración especificada por el fabricante. Para la visualización de las bandas de ADN se utilizó un transiluminador de luz azul Safe Imager (Invitrogen).

Antes de su siembra los geles, las muestras se mezclaron con 10% V/V de una solución conteniendo azul de bromofenol 0,25% P/V; xilenocianol 0,25% P/V y glicerol 30% V/V en agua destilada estéril. Se realizaron las electroforesis en solución reguladora TAE como solución de corrida, utilizando un voltaje constante de 80V.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron ADN del fago λ digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* (Invitrogen) y 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

2.5.3 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Los cortes de ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega).

En los casos en que se realizaron digestiones con dos enzimas, se empleó cuando fue posible un medio de reacción en el que ambas fuesen activas, para realizar un corte

simultáneo. De lo contrario, se procedió al corte secuencial, purificando a partir de un gel de agarosa el producto del corte con la primera enzima antes de digerirlo con la segunda endonucleasa.

2.5.4 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

2.5.5 Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se llevaron a cabo con la enzima T4 ADN ligasa (Promega), de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Estas reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ L, y se utilizó una concentración molar del fragmento 3 veces mayor a la del vector, con el objetivo de minimizar la religación del mismo. Se realizaron controles de religación del vector, sin adición del inserto. Las reacciones se llevaron a cabo generalmente a 4°C durante 16 h, y en todos los casos se realizaron ligaciones direccionales.

2.5.6 Mutagénesis sitio-dirigida

2.5.6.1 Mutagénesis por amplificación del vector

Para generar las mutaciones sitio-específicas deseadas se utilizó la técnica denominada Mutagénesis por amplificación del vector⁸¹. Este procedimiento requiere la utilización de plásmidos purificados a partir de cepas que contengan el sistema Dam de metilación (tales como *E. coli* DH5 α y muchas otras cepas de laboratorio de esta bacteria), y se basa en la utilización de un par de oligos totalmente complementarios entre sí, que contienen en su secuencia la mutación deseada. Los oligos hibridan en posiciones equivalentes en hebras opuestas del molde, y son extendidos mediante una reacción de PCR con una polimerasa altamente procesiva, por ejemplo Pfx Platinum (Invitrogen). La polimerasa continúa sintetizando hasta copiar completamente el plásmido circular utilizado como molde, sin desplazar a los oligos mutagénicos. Las hebras de ADN no metiladas producto de esta reacción pueden hibridarse para dar lugar a un plásmido mellado. Luego de la amplificación, el ADN parental metilado y las moléculas híbridas hemimetiladas son degradadas mediante el uso de la enzima de restricción DpnI. De esta manera se enriquece la solución en el producto de la reacción que consiste en el plásmido mutagenizado no metilado, en estado mellado, y se eliminan las secuencias molde que carecen de la mutación. Los productos de esta digestión se transforman luego en células de *E. coli*, donde los plásmidos mellados se religan y se replican.

2.5.6.2 Reacción de amplificación y digestión con DpnI

Las amplificaciones se llevaron a cabo en 50 μ L de medio de reacción conteniendo 100 ng de ADN molde, 10 μ M de cada oligonucleótido mutagénico, 2,5U de ADN polimerasa Pfx platinum (Invitrogen), 0,3 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 mM de $MgSO_4$ y 1X de la solución de reacción provista en el kit de Pfx platinum. Para todos los casos se realizaron controles negativos sin el agregado de ADN molde. Se utilizó un termociclador (MJ MiniTM Personal Thermal Cycle, Biorad) con un programa que consistía en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C, seguida de 18 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 95°C, 30 segundos de hibridación a 55°C y una extensión durante 1 minuto por kb del molde a 68°C y por último una extensión final a 68°C durante 10 minutos.

Para la digestión con *DpnI*, se adicionó 1U de esta enzima (Invitrogen) directamente a la mezcla de reacción luego de la amplificación, y se incubó durante una hora a 37°C.

2.5.6.3 Recuperación de los plásmidos mutantes

Se transformaron células de *E. coli* DH5 α con la mezcla de reacción tratada con *DpnI*, utilizando el método de transformación química con $CaCl_2$. Se realizaron preparaciones de ADN plasmídico de colonias de transformantes seleccionadas al azar y se determinó la secuencia de los plásmidos aislados para comprobar si la mutagénesis había resultado exitosa.

2.5.7 Overlap Extension PCR

Las reacciones de mutagénesis sitio-dirigida por Overlap Extension PCR⁸¹ se llevaron a cabo en 50 μ L de medio de reacción conteniendo 150 ng de ADN molde, 0,3 μ M de cada oligonucleótido, 1 U de ADN polimerasa Pfx Platinum (Invitrogen), 0,3 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1mM de $MgSO_4$ y 1X de la solución de reacción provista en el kit de Pfx platinum. Para todos los casos se realizaron controles negativos sin el agregado de ADN molde.

Estas reacciones se llevaron a cabo utilizando dos etapas de amplificación. En el primer paso, se realizaron dos reacciones de PCR en paralelo, utilizando en una de ellas cebador directo que hibrida en la región previa (en dirección 5') al comienzo del gen y otro reverso en la zona de la mutación, y en la otra reacción un cebador directo que hibrida en la zona de la mutación a introducir y otro reverso luego del final del gen. Se empleó para esta amplificación el siguiente programa: 1 minuto a 95°C, (15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 68°C) por 30 ciclos, 7 minutos a 68°C y 5

minutos a 25°C. Mediante estas dos amplificaciones se obtuvieron por separado dos poblaciones de productos solapados en la región de la mutación a introducir. Se verificaron los productos por electroforesis en gel de agarosa y se purificaron a partir del mismo. En la segunda etapa, estos productos purificados se combinaron y amplificaron con los cebadores externos directo y reverso (pMBLe Fw y pMBLe Rv) que hibridan por fuera de los sitios de restricción externos *NdeI* y *HindIII* respectivamente, utilizando el siguiente programa de PCR: 1 minuto a 95°C, (15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 68°C) por 30 ciclos, 7 minutos a 68°C y 5 minutos a 25°C. Este fragmento luego se clonó dentro del vector pMBLe a través de los sitios *NdeI* y *HindIII* y las mezclas de ligación se introdujeron en células de *E. coli* DH5α utilizando competencia inducida por CaCl₂. Se realizó además un control de religación del plásmido pMBLe.

2.5.8 Transformación de *E. coli* mediante competencia inducida por CaCl₂

Para la transformación de células de *E. coli* DH5α, se inoculó una colonia en medio líquido LB y se creció a 37°C durante 16hs con agitación. Se realizó una dilución 1:100 del cultivo saturado en medio LB, y se lo dejó crecer a 37°C durante 2 horas, hasta alcanzar una DO_{600nm} de aproximadamente 0,4. A continuación, se fraccionó el cultivo en alícuotas de 1mL por cada transformación a realizar. Cada tubo se centrifugó durante 3 minutos a 5000 rpm y 4°C en centrífuga refrigerada, se descartaron los sobrenadantes, y las células se resuspendieron en 500 µL de CaCl₂ 0,1 M frío. Se centrifugaron nuevamente las células bajo las mismas condiciones, y se resuspendieron en 90 µL de CaCl₂ 0,1 M frío. Luego, se adicionó a las células 2 µL de plásmido purificado o 10 µL de mezcla de ligación, y se las incubó en hielo durante 1 hora. Después se les aplicó un choque térmico de 1 minuto a 42°C, y se las incubó durante 1 hora a 37°C en medio SOC con agitación para permitir su recuperación. Finalmente, las células se sembraron en placas conteniendo LB-agar suplementado gentamicina 20 µg/mL o el antibiótico de selección correspondiente y se crecieron durante 16hs a 37°C. Se realizaron además controles negativos, siguiendo los mismos pasos sin agregado de ADN plasmídico.

2.6 Electroforesis de proteínas, preparación de fracciones celulares y Western Blot

2.6.1 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Se prepararon geles para SDS-PAGE con concentraciones del 14% para el gel de separación (14 % P/V de Acrilamida-Bisacrilamida 30:0,8 en Tris:HCl 0,126 M pH 8,8; SDS 0,26 % P/V) y 4,5 % P/V para el gel de concentración (4,5 % P/V de Acrilamida-Bisacrilamida 30:0,8 % P/V en Tris:HCl 0,126 M pH 6,8, SDS 0,26 % P/V). Las muestras de proteínas fueron incubadas en solución de siembra (glicerol 5% V/V, SDS 2% P/V, β -mercaptoetanol 0,1 % V/V, azul de bromofenol 0,1 mg/ml) durante 10 min a 100°C para su desnaturalización previo a ser sembradas en los geles.

Para la corrida electroforética se utilizó el sistema MiniProtean III (BioRad), empleando un voltaje constante de 150V. Luego de la separación electroforética, los geles fueron fijados durante 5 minutos en una solución de etanol: ácido acético: agua (25:10:75), y luego teñidos durante 10 minutos con una solución de Azul Brillante de Coomassie R-250 al 1% (P/V) en etanol:ácido acético: agua (50:10:40). Los geles se decoloraron mediante incubaciones sucesivas con etanol: ácido acético: agua (25:10:75).

2.6.2 Fraccionamiento celular y análisis de la localización de NDM-1

2.6.2.1 Preparación de periplasma y esferoplastos

Se realizó la extracción de proteínas periplasmáticas siguiendo un protocolo previamente descrito⁸². Se tomaron 2 o 3 mL de cultivos de *E. coli* o *P. aeruginosa* pMBLe-*bla*, se colectaron las células por centrifugación y se las lavó con Tris 20 mM pH 8, NaCl 150 mM. Las células se resuspendieron luego en Tris 20 mM pH 8, EDTA 0,1 mM, sacarosa 20% P/V, lisozima 1 mg/mL, PMSF 0,5 mM. Para normalizar la densidad de células en las preparaciones, el volumen de resuspensión fue ajustado de acuerdo a la fórmula $V = 100 \mu\text{L} \times \text{DO}_{600\text{nm}} \times V_c$, donde V_c es el volumen de cultivo inicial (en mL). Las células se incubaron a 4°C con agitación suave durante 30 min, y luego se colectaron por centrifugación. Se tomó del sobrenadante la fracción del extracto periplasmático. El pellet conteniendo los esferoplastos fue lavado con Tris 20 mM pH 8, 0,1 mM EDTA, sacarosa 20% P/V, y luego resuspendido en el mismo volumen de esta solución.

2.6.2.2 Preparación de membranas totales

Se tomaron 20 mL de cultivo de *E. coli* o *P. aeruginosa* pMBLe-*bla* de $DO_{600nm} = 1$, inducido durante 2h con 50 μ M IPTG a 37°C, y se colectaron las células por centrifugación. Las mismas se resuspendieron en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, PMSF 1 mM, y se rompieron mediante sonicación. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14 000 g y 4°C durante 20 min, luego de lo que las membranas se separaron por ultracentrifugación a 150 000 g y 4°C durante 1 h. Las preparaciones de membranas se lavaron con HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, se colectaron nuevamente por ultracentrifugación y fueron resuspendidas en el mismo buffer. Se cuantificaron las proteínas totales en las fracciones de membrana mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) usando el BCA Protein Assay Kit (Pierce)

2.6.2.3 Solubilización de proteínas de membrana

Se utilizó un protocolo de extracción secuencial de proteínas de membrana previamente descrito^{83,84}, para analizar el tipo de interacciones que mantenían a las proteínas asociadas a membrana. De forma resumida, se colectaron membranas totales por ultracentrifugación a 150 000 g y 4°C durante 1h, y se resuspendieron en KCl 1M. Luego de incubar durante 30 min en hielo y ultracentrifugar en las mismas condiciones que antes, se obtuvieron en el sobrenadante proteínas periféricas asociadas por interacciones electrostáticas débiles. Las membranas remanentes se trataron luego con 0.1 M Na_2CO_3 durante 30 min en hielo, y ultracentrifugadas para obtener en el sobrenadante proteínas periféricas asociadas por interacciones electrostáticas fuertes. A continuación las membranas fueron sometidas a tratamientos equivalentes, resuspendiéndolas secuencialmente en Tritón X-100 0,0016 % P/V y 0,23 % P/V, para extraer en los sobrenadantes luego de ultracentrifugar proteínas integrales o periféricas asociadas por interacciones hidrofóbicas.

2.6.2.4 Separación de membranas internas y externas

Se tomaron esferoplastos preparados a partir de 250 mL de cultivos de $DO_{600nm} = 1$ de *E. coli* o *P. aeruginosa*, conteniendo pMBLe-*bla*_{NDM-1} o pMBLe-*bla*_{N-VIM}, y se los resuspendió en Tris 20 mM pH 8, 1 mM PMSF. Los esferoplastos se rompieron mediante sonicación y se removieron los restos celulares por centrifugación a 14 000 g y 4°C durante 20 min. Las membranas totales se colectaron luego por ultracentrifugación a 150 000 g y 4°C durante 1 h, y se las resuspendió en Tris 20 mM pH 8, sacarosa 20% P/V. Las membranas se depositaron sobre un gradiente continuo de sacarosa (entre el 30 y 55 % P/V) en Tris 20 mM pH 8, y se ultracentrifugaron a 160 000 g y 4°C durante 16 h en un rotor tipo “swinging bucket” Beckman SW 40 Ti.

Las fracciones dispuestas a lo largo del gradiente fueron luego analizadas mediante SDS-PAGE, western blot y medidas de actividad β -lactamasa para determinar la localización de las enzimas NDM-1 o N-VIM. Las fracciones correspondientes a membrana interna y membrana externa se identificaron mediante ensayos de actividad NADH oxidasa, utilizando un protocolo previamente descrito⁸³, y mediante caracterización por espectrometría de masa de bandas de SDS-PAGE. Las mismas fueron sometidas a digestión triptica seguida de análisis MS/MS, realizado en el servicio de espectrometría de masa del Mass Spectrometry Laboratory for Protein Sequencing, The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, EE UU.

2.6.2.5 Análisis de la orientación de NDM-1 en la membrana externa

Se incubaron esferoplastos y células totales de *E. coli* pMBLe-*bla*_{NDM-1} con proteinasa K, siguiendo un protocolo previamente descrito⁸⁵. Las muestras obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE y western blot.

2.6.2.6 Inhibición del procesamiento de lipoproteínas mediante globomicina

Se crecieron cultivos líquidos de *E. coli* pMBLe-*bla*_{NDM-1} o pMBLe-*bla*_{NDM-1 C26A} a 37°C hasta alcanzar $DO_{600nm} = 0,8$. Se adicionó globomicina (Sigma) a una concentración final de 0, 25 o 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se continuó el crecimiento durante 10 min a 28°C. Luego, se indujo la expresión de las β -lactamasas mediante agregado 100 μM IPTG, y se continuó el crecimiento a 28°C durante 1h. Finalmente se tomaron alícuotas de células totales para analizar mediante western blot.

2.6.2.7 Purificación de vesículas de membrana externa (OMVs)

Para la purificación de OMVs, se inocularon 250 mL de LB fresco con 3 mL de cultivo saturado de *E. coli* pMBLe-*bla*. Se creció a 37°C hasta alcanzar $DO_{600nm} = 0,4$, se indujo la expresión de β -lactamasas mediante agregado de 20 μM IPTG, y se continuó el crecimiento durante toda la noche a 37°C. En el caso de las cepas clínicas, se inocularon 250 mL de LB con 3 mL del cultivo saturado, y se creció durante 5 h a 37°C. Se separaron las células mediante centrifugación y los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa con poros de 0.45 μm (Millipore). Se precipitaron las OMVs mediante adición de 55 % P/V de sulfato de amonio a la suspensión filtrada, seguido de agitación a 4°C durante 3 h (*E. coli* DH5 α) o durante toda la noche (cepas clínicas). Se separó el material precipitado mediante centrifugación a 12 800 g durante 10 min, se lo resuspendió en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM y se lo dializó durante toda la noche contra >100 volúmenes del mismo

buffer. Luego las muestras fueron filtradas a través un filtro para jeringas Minisart de 0,45 μm (Sartorius), se depositaron sobre igual volumen de sacarosa 50% P/V en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, y se ultracentrifugaron a 150 000 g y 4°C durante 1h. Los pellets conteniendo las OMVs se lavaron con HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, se resuspendieron en el mismo buffer y se sometieron a centrifugación en gradiente de sacarosa. Las fracciones conteniendo las OMVs (juzgado de acuerdo a su patrón de proteínas que se correspondía con la membrana externa) se juntaron, lavaron con HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM y se almacenaron a -80°C. Las OMVs se cuantificaron de acuerdo a su contenido de proteína total, utilizando el BCA Protein Assay Kit (Pierce).

Para determinar la esterilidad de las preparaciones, se plaquearon 10 μL de una suspensión OMVs de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína en LB agar, sin observarse crecimiento bacteriano. Los rendimientos de OMVs fueron de alrededor de 200 $\mu\text{g}/250\text{mL}$ de cultivo inicial.

La calidad de las preparaciones de OMVs fue comprobada mediante microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa, siguiendo un protocolo previamente publicado⁸⁶. De forma resumida, las vesículas se fijaron con glutaraldehído 4% en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM durante 30 min a temperatura ambiente, y luego se tiñeron con acetato de uranilo 2%. Las muestras teñidas se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109T. La ausencia de contaminantes celulares correspondientes a lisis celular durante la preparación de las OMVs se verificó mediante western blots con detección de la proteína citoplasmática GroEL en las preparaciones de OMVs. Además, las OMVs y muestras de distintas fracciones de *E. coli* pMBLe-blaNDM-1 (citoplasma, periplasma, membrana interna y membrana externa^{85,87}) fueron analizadas mediante SDS-PAGE, comparando sus patrones de proteína.

2.6.3 Western Blot

Luego de separar las proteínas mediante geles de SDS-PAGE de 14%, se realizó la transferencia de las mismas a membranas de PVDF (Hybond P, GE Healthcare), mediante dispositivo de electrotransferencia húmeda. Se utilizó para esto una solución de Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, realizándose la transferencia durante 16 h a un voltaje constante de 30V. Se bloqueó la membrana con solución de bloqueo (PBS 1X pH 7.4, 5% leche descremada, 0.1 Tween 20), realizando 4 cambios de la solución separados por 10 minutos de incubación. Se adicionó luego una solución de anticuerpos primarios en solución de bloqueo, incubándose durante 1h. Luego de remover el exceso

de anticuerpo con lavados con solución de bloqueo, se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a fosfatasa alcalina, en solución de bloqueo. Se incubó nuevamente durante 1h y se realizaron lavados para remover el anticuerpo no unido. Finalmente se procedió a lavar la membrana 3 veces con solución de reacción de fosfatasa alcalina (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), y se realizó el revelado agregando solución de reacción de fosfatasa alcalina suplementada con 0.3 mg/mL NBT y 0.1 mg/mL BCIP. Se cuantificaron las intensidades de las bandas luego del revelado utilizando el software ImageJ⁸⁸, las cuales se convirtieron en cantidades relativas de proteína mediante curvas de calibración construidas bajo las mismas condiciones experimentales. Se utilizaron como controles de carga western blots realizados con detección de la proteína de unión a maltosa (MBP) periplasmática, y subunidad β prima de la RNA polimerasa y chaperona GroEL citoplasmáticas, para muestras de periplasma y citoplasma o células totales, respectivamente.

Los anticuerpos y concentraciones utilizadas fueron:

- Anticuerpo monoclonal de ratón Anti-StrepTag-II (Novagen): dilución 1/1000
- Anticuerpo policlonal de conejo Anti-StrepTag-II (cedido por el Dr. Robert Bonomo – Case Western Reserve University, Cleveland, EE UU): dilución 1/1000
- Anticuerpo policlonal de conejo Anti-GroEL (cedido por Dr. Alejandro Viale – IBR): dilución 1/60000
- Anticuerpo policlonal de ratón Anti-*E. coli* RNA Polimerasa β Prima (BioLegend): dilución 1/1000
- Anticuerpo policlonal de conejo Anti-MBP (Rockland): dilución 1/1000
- Anticuerpo secundario de cabra Anti-IgG ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Bio-Rad): dilución 1/2500
- Anticuerpo secundario de cabra Anti-IgG conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Bio-Rad): dilución 1/3000

2.7 Efecto de la limitación de Zn(II) sobre niveles de proteína MBL y β-actividad lactamasa

Se crecieron a 37°C cultivos de *E. coli* pMBLe-*bla* hasta alcanzar una DO_{600nm} = 0.4. Se indujo la expresión de las MBLs por adición de 50 μM IPTG, continuando el crecimiento a 37°C durante 1 h y luego a 20°C durante 2 h (para desacelerar el metabolismo celular). A continuación, los cultivos se dividieron en dos partes iguales. A una mitad se le agregó 1000 μM DPA, mientras que la otra se mantuvo como un control no tratado, y ambas partes se continuaron creciendo a 20°C. Se tomaron alícuotas de

los cultivos tratados con DPA y no tratados a distintos tiempos luego del agregado de DPA: 0, 10 (sólo en el caso del cultivo tratado con DPA), 90 y 960 minutos. Se realizaron extracciones de periplasma de las alícuotas como se describió anteriormente, obteniendo las fracciones de periplasma y esferoplastos, que fueron analizadas mediante western blot.

Se midieron las velocidades de hidrólisis de imipenem en células totales de alícuotas tomadas a los 90 y 960 min de los cultivos tratados con DPA y controles no tratados. Se colectaron las células de 1 mL de cultivo, que fueron lavadas y luego resuspendidas en un volumen 300 μ L x DO_{600nm} de Tris 20 mM pH 8 tratado con Chelex-100. Se midió la actividad β -lactamasa de 5 μ L de esta suspensión de células en 300 μ L de medio de reacción, usando un espectrofotómetro Jasco V-670 y cubetas de paso óptico 0,1 cm. Se corrigieron las medidas restando la tasa basal de hidrólisis observada para la cepa no productora de lactamasas. Los niveles de proteína y actividad en muestras tratadas con DPA se informaron como relativos a los valores correspondientes a las muestras no tratadas.

Se procedió de forma similar para determinar el efecto de la adición de DPA sobre los niveles de proteína de los alelos de NDM, pero en ese caso se utilizó 100 μ M de IPTG para inducir la expresión de los mismos, continuando el crecimiento a 37°C durante 2h. Luego se dividieron los cultivos en 2 partes iguales, y se adicionó a una mitad 500 μ M DPA, manteniendo la otra como un control no tratado. Se tomaron alícuotas de los cultivos a los 0, 10, 30 y 60 min luego de la adición de DPA, y se analizaron las muestras de células totales mediante western blot.

2.8 Expresión de NDM-1 soluble recombinante

La variante soluble de NDM-1 utilizada en los ensayos (NDM-1 Δ 38) fue purificada en el laboratorio y provista generosamente por la Lic. Antonela Palacios (IBR-CONICET). Esta variante se expresó a partir del vector pET 28, que contenía clonados los residuos 39 a 270 de NDM-1, y había sido modificado para reemplazar el sitio de corte por trombina por un sitio de procesamiento para la proteasa TEV. La proteína se sobreexpresó en *E. coli* BL21 (DE3). Se creció el cultivo a 37°C en medio mínimo M9 hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,6$. Luego se indujo la expresión de proteína mediante el agregado de 0.5 mM IPTG y 0.5 mM $ZnSO_4$ al medio de cultivo. Se continuó el crecimiento durante 16 h a 18°C, y se colectaron las células mediante centrifugación. Luego de resuspenderlas en Tris 50 mM pH 8, NaCl 200 mM, las células se rompieron mediante sonicación, y se eliminó el material insoluble por

centrifugación. Se purificó la proteína utilizando cromatografía de afinidad con una columna de Ni-Sepharose, y se eliminó el tag polihistidina de NDM-1 por corte con proteasa TEV fusionada a una cola de 6 histidinas. Se eliminó el tag cortado y la proteasa por un segundo paso cromatográfico con la resina Ni-Sepharose. La proteína se concentró un concentrador centrífugo Amicon de corte 10 kDa (Millipore). Se determinaron las concentraciones de proteína mediante medidas de absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de absorción molar ($\epsilon_{280\text{nm}}$) de 28 000 M⁻¹ cm⁻¹ (calculado a partir de la secuencia de la proteína utilizando la herramienta ExPASy ProtParam, disponible en web.expasy.org/protparam/). La proteína NDM-1 $\Delta 38$ en su forma de apoenzima (libre de metal) se obtuvo por dos pasos de diálisis de la holoproteína (unida a Zn(II)) purificada contra 100 volúmenes de HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 20 mM durante 12 h con agitación. Se removió el EDTA de la preparación de apoenzima mediante 3 pasos de diálisis contra 100 volúmenes de HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 1M, Chelex 100, seguidos de 3 pasos de diálisis contra 100 volúmenes de HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, Chelex 100. Todos los buffers usados para preparar las apoenzimas se incubaron con agitación en presencia de Chelex 100 (Bio-Rad).

2.9 Proteólisis limitada de NDM-1 recombinante en sus formas holo y apo

Se trataron alícuotas de 200 μg de NDM-1 soluble recombinante purificada en su forma unida a metal (holoenzima) o libre de metal (apoenzima) con 2,5 μg de proteinasa K en Tris 10 mM pH 8, 5 mM CaCl₂ a 16°C. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, y se detuvo la reacción de proteólisis por agregado de 5 mM PMSF. Se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie.

2.10 Determinación de Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs)

La determinación de CIMs para antibióticos β -lactámicos se llevó a cabo con un protocolo basado en el recomendado por el CLSI⁸⁹. Se realizaron diluciones 1/100 en LB fresco de cultivos saturados de las cepas de *E. coli* pMBLe-*bla*, y se los creció a 37°C hasta $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,1$. Se prepararon en LB fresco diluciones de $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.01$ a partir de estos cultivos, las cuales fueron utilizadas para sembrar las placas para determinación de CIM, y se las mantuvo en hielo hasta el momento de ser utilizadas. Se inocularon 2-3 μL de estas diluciones en placas conteniendo el antibiótico deseado, 20 μM IPTG y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, utilizando un dispositivo multi-inoculador. Para

determinar el efecto de la disponibilidad de Zn(II) sobre la resistencia a antibiótico, se adicionaron además al medio de crecimiento distintas concentraciones del quelante de cationes divalentes ácido dipicolínico (DPA). Se utilizó el mismo protocolo en el caso de la determinación de CIM para alelos de NDM, con la excepción de que se adicionó 100 μM IPTG a las placas de CIM.

Las CIM relativas en presencia de DPA fueron calculadas de acuerdo a la fórmula $(\text{CIM}_{\text{MBL}} - \text{CIM}_{\text{control}}) / (\text{CIM}_{\text{MBL} + 0\mu\text{M DPA}} - \text{CIM}_{\text{control} + 0\mu\text{M DPA}})$, donde CIM_{MBL} y $\text{CIM}_{\text{control}}$ son los valores medidos para *E. coli* DH5 α pMBLe-*bla* o pMBLe (vector vacío), respectivamente, bajo cada condición, y $\text{CIM}_{\text{MBL} + 0\mu\text{M DPA}}$ o $\text{CIM}_{\text{control} + 0\mu\text{M DPA}}$ son los valores correspondientes a medio de crecimiento sin agregado de DPA.

Las determinaciones de CIM de imipenem en presencia de calprotectina recombinante fueron realizadas en medio líquido LB suplementando con 0, 100 o 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP, usando el método de microdilución en medio líquido⁸⁹. La calprotectina usada en estos estudios fue purificada por el grupo de Elizabeth Nolan (MIT, Massachusetts, EE UU) usando un método previamente descrito⁹⁰.

2.11 Detección de MBLs en células mediante microscopía de inmunofluorescencia

Las células de *E. coli* se lavaron dos veces con PBS, se las fijó con 0.5 mL de paraformaldehído 3% en PBS durante 10 min, y se las permeabilizó con Tritón X-100 0,1% en PBS durante 5 min. Luego, las células fueron incubadas con anticuerpos monoclonales de ratón anti StrepTag-II (dilución 1:100), los cuales fueron detectados por incubación con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados al fluoróforo Cy-3 (dilución 1:1000, Invitrogen). Las células se montaron con el reactivo SlowFadeAntifade (Molecular Probes), y fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800 (Nikon, Japón)

2.12 Experimentos de competencia

Se transformaron cepas isogénicas de *E. coli* W3110⁹¹ y *E. coli* W3110 ΔlacZ ⁹² con los plásmidos pMBLe-*bla*_{NDM-1}, pMBLe-*bla*_{NDM-4}, pMBLe-*bla*_{NDM-6} y pMBLe-*bla*_{NDM-15}. Se crecieron a 37°C durante 16 h pares de cepas expresando distintos alelos de NDM bajo el contexto de fenotipos Lac opuestos (por ejemplo *E. coli* W3110 pMBLe-*bla*_{NDM-1} y *E. coli* W3110 ΔlacZ pMBLe-*bla*_{NDM-4}). A continuación se realizaron diluciones 1/100 de estos cultivos en medio LB fresco, y se los creció a 37°C hasta alcanzar $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$. Se mezclaron cantidades iguales (de acuerdo a la $\text{DO}_{600\text{nm}}$) de células Lac⁻ expresando uno de los alelos y células Lac⁺ expresando el otro alelo y se las diluyó

1/500 en medio LB fresco, suplementado con 20 µg/mL gentamicina, 100 µM IPTG, distintas concentraciones de cefotaxima, y con o sin adición de 250 µM DPA o 250 µg/mL de CP. La mayor concentración de cefotaxima utilizada fue la máxima que permitió crecimiento bacteriano visible bajo cada condición. Se llevó a cabo la competencia entre las cepas así preparadas creciéndolas durante 16 h a 37°C. Luego se tomaron unas 100 a 300 células del cultivo final y se plaquearon en LB-agar suplementado con 60 µg/mL X-Gal y 100 µM IPTG, creciéndolas 16 h a 37°C. Se realizó un recuento de colonias blancas y azules para determinar la proporción de células Lac⁺ y Lac⁻, y por tanto de cada variante de la enzima, en la población luego de la competencia. Para evitar que potenciales efectos en la aptitud de las cepas debido al contexto Lac⁺/⁻ influenciara los resultados, los experimentos fueron repetidos invirtiendo las cepas que producían cada alelo.

2.13 Determinación de afinidad por Zn(II) en esferoplastos

Se centrifugaron esferoplastos de células de *E. coli* expresando distintas variantes de NDM y se los resuspendió en HEPES 10 mM pH 7.5, NaCl 200 mM tratado previamente con Chelex-100 para eliminar trazas de iones metálicos. A continuación los esferoplastos se diluyeron 1/50 en HEPES 10 mM pH 7.5, NaCl 200 mM tratado con Chelex-100 y suplementado con distintas cantidades de DPA (0-50 µM). Luego de una incubación a 30°C durante 10 min, se adicionó 550 µM imipenem y se determinó la actividad β-lactamasa a 30°C utilizando un espectrofotómetro JASCO V-670. Se monitoreó la hidrólisis de imipenem a 300nm utilizando el cambio en el coeficiente de absortividad molar correspondiente a $\Delta\epsilon_{300nm} = -9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.14 Análisis de la localización de NDM-1 en OMVs

Se incubó una muestra de 16 µg de proteína total de OMVs, intactas o previamente lisadas con detergente, con 100 µg de proteinasa K en Tris 10 mM pH 8, 5 mM CaCl₂ a 25°C, y se tomaron muestras a los 10 y 60 minutos. Se inactivó la proteasa en estas muestras por agregado de PMSF 5 mM, y se las analizó mediante SDS-PAGE y western blot. La lisis de OMVs fue llevada a cabo por incubación con Tritón X-100 0.125 % v/v durante 30 min a 37°C, siguiendo un protocolo previamente descripto⁸⁶.

2.15 Análisis de transferencia de resistencia a β -lactámicos mediante OMVs

Se crecieron células de *E. coli* que contenían el plásmido pMBLe vacío y eran sensibles a β -lactámicos a 37°C en 8 mL de medio líquido LB hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,5$. Se las centrifugó a 6000 g durante 10 min y se las resuspendió en 240 μ L de HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM. Se mezcló 1 μ L de esta suspensión con 8 μ g de OMVs purificadas de cepas de *E. coli* productoras de NDM-1, NDM-1 C26A, o que no producían MBLs, y se las incubó sin agitación durante 1h a 37°C. La mezcla se diluyó 1/10 en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, y se sembraron gotas de 3 μ L de la dilución en placas de LB-agar para determinar CIM frente a antibióticos β -lactámicos.

2.16 Efecto de calprotectina en la actividad lactamasa de OMVs

Se incubaron muestras de 0,8 μ g de proteína total de OMVs purificadas de cultivos de *E. coli* productores de NDM-1 o NDM-1 C26A durante 2 min a 30°C en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM suplementado con distintas concentraciones de calprotectina (0-300 μ g/mL). Luego de la incubación, se agregó imipenem 500 μ M, y se determinó la actividad β -lactamasa remanente mediante medidas espectrofotométricas. Adicionalmente, se llevó a cabo este experimento utilizando NDM-1 soluble recombinante, ajustando la concentración de proteína para igualar la actividad en ausencia de calprotectina de las OMVs que contenían NDM-1.

2.17 Purificación y análisis de ADN a partir de OMVs

Se trataron muestras de OMVs conteniendo 10 μ g de proteína total con DNasa I 50 μ g/mL (Sigma) durante 1 h a 37°C para hidrolizar el ADN asociado a la superficie de las vesículas y el ADN en suspensión. Se detuvieron las reacciones mediante incubación a 80°C durante 10 min. Luego se lisaron las vesículas por agregado de Tritón X-100 0,125% e incubación a 37°C durante 30 min. A continuación se purificó el ADN presente en las muestras mediante el uso del kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Se cuantificó el ADN utilizando un equipo Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Los rendimientos promedio de ADN obtenidos de las distintas cepas fueron: *E. coli* pMBLe-blaNDM-1 13 ± 4 ng/ μ g OMV, *P. rettgeri* 59 ± 30 ng/ μ g OMV, *S. marcescens* 28 ± 9 ng/ μ g OMV, *E. cloacae* 51 ± 14 ng/ μ g OMV.

Para analizar la presencia del gen *bla*_{NDM-1} en OMVs, se utilizó amplificación por PCR del mismo usando como molde 50 ng de ADN purificado a partir de las vesículas, con los cebadores NDM1NdeIFw y NDM1HindIIIRv y usando el protocolo previamente

descripto. Se realizaron amplificaciones a partir de dos preparaciones independientes de ADN de vesículas. Los controles negativos marcaron la ausencia de contaminación con ADN exógeno durante este análisis.

2.18 Búsqueda bioinformática de MBLs que contienen lipobox

Se buscaron homólogos a enzimas de las subclases B1, B2 y B3 mediante la herramienta BLAST usando la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI, los cuales fueron depurados para su posterior análisis. En el caso de las enzimas homólogas a B1 y B2, las secuencias que no contenían los motivos típicos HXHXD y GGC para MBLs B1, y NXHXD y GNC para MBLs B2, fueron descartadas. De manera similar, los homólogos a B3 que no poseían el motivo HXHXDH y una identidad de secuencia >25% a GOB-1 fueron excluidos.

A continuación las proteínas se filtraron las proteínas que contenían una secuencia lipobox posible en sus extremos N-terminales, mediante las herramientas de predicción DOLOP (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/>) y LipoP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>). Las secuencias determinadas como positivas por alguna de estas dos herramientas fueron alineadas junto a MBLs canónicas B1+B2 o B3, según el caso, mediante el software Expreso (<http://www.tcoffee.org/>) de alineamiento de secuencias múltiples asistido por información estructural. Se construyeron árboles filogenéticos a partir de estos alineamientos usando el algoritmo de máxima verosimilitud PhyML (<http://www.phylogeny.fr>), usando el modelo LG de sustitución y 100 bootstraps. Se dibujaron árboles evolutivos sin raíz usando DrawTree, contenido en el paquete Phylip (<http://www.evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).

Capítulo 3. Efecto de la disponibilidad de Zn(II) sobre la funcionalidad *in-vivo* de Metallo-Beta-Lactamasas. Influencia de la localización celular de NDM-1.

Los resultados presentados en este capítulo fueron obtenidos en colaboración con el Dr. Lisandro J. González.

3.1 Introducción

3.1.1 Regulación de la homeostasis de Zn(II) en Gram-negativos

El zinc es un metal esencial para todos los seres vivos, dado su rol de cofactor necesario para una amplia variedad de proteínas. Se estima que un 10% de las proteínas humanas y un 5% de las bacterianas tienen capacidad de unir Zn(II)⁹³. A diferencia de otros metales de transición como el cobre o el hierro, que pueden alternar entre dos estados de oxidación *in vivo*, el zinc se encuentra exclusivamente en su estado Zn(II) y no participa de reacciones redox en los organismos vivos. A pesar de ello cumple un papel destacado en muchas enzimas actuando como un ácido de Lewis, atrayendo o estabilizando cargas negativas de las especies involucradas en la reacción, además de tener un rol estructural en muchas proteínas³³. Más allá de su importancia, un exceso de Zn(II) libre puede tener efectos tóxicos por unión inespecífica, desplazando a otros iones metálicos de sus sitios de coordinación nativos. Debido a esto, los organismos poseen sistemas de homeostasis para el Zn(II) y otros cationes metálicos, de manera de asegurarse un suministro adecuado para las funciones biológicas que los requieren y manteniendo concentraciones intracelulares que eviten efectos no deseados^{94,95}.

Los mecanismos de homeostasis de zinc y otros cationes metálicos en Gram-negativos están bien caracterizados^{93,94}. Los niveles de Zn(II) en citoplasma se encuentran fuertemente regulados, mantenidos dentro de un rango acotado de concentraciones. Bajo condiciones de abundancia del metal en el medio extracelular, el ingreso del mismo a través de la membrana interna tiene lugar mediante la permeasa de expresión constitutiva ZupT, impulsado por la fuerza protón motriz. Ante escasez de Zn(II) se activa la expresión del importador de alta afinidad ZnuABC, del tipo ATP binding cassette. ZnuA es una proteína periplasmática que capta Zn(II) para

entregárselo al canal transmembrana ZnuB, estando el ingreso del metal impulsado por hidrólisis de ATP por parte de ZnuC. La expresión de este sistema está regulada por el represor Zur, que impide la expresión del operón *znuABC* en su forma activa unida a Zn(II), pero pierde su capacidad de unirse al ADN al bajar los niveles citoplasmáticos del metal y generarse la forma no metalada de la proteína. La expresión de este importador de Zn(II) de alta afinidad es crítica para la capacidad de numerosos patógenos de infectar a su hospedador, entre ellos *Acinetobacter baumannii*, *Brucella abortus*, cepas patogénicas de *E. coli* y *Salmonella enterica*³³. La respuesta transcripciones disparada al desactivarse Zur también incluye la expresión de homólogos que no requieren metal de las proteínas ribosomales dependientes de Zn(II). Esto reduce las necesidades de Zn(II) de la bacteria, dado que la mayor parte del mismo en citoplasma está unido a ribosomas, y además libera este metal de ribosomas ya formados para su uso en otras vías críticas⁹³.

En situaciones de exceso de Zn(II) en el citoplasma se activa el sistema de eflujo de la ATPasa tipo P ZntA. En *E. coli*, la expresión de la misma está regulada por el activador ZntR, el cual es activo en su forma unida a metal, formada al elevarse los niveles de Zn(II) citoplasmático por encima de un umbral. Las afinidades de Zur y ZntR por Zn(II) definen una ventana de concentraciones de Zn(II) libre en la cual se mantiene la homeostasis citoplasmática de este metal mediante sus correspondientes regulones⁹³.

Al contrario de lo que ocurre en el citoplasma, para la mayoría de los organismos Gram-negativos no se conocen mecanismos de transporte activo capaces de acumular Zn(II) en el espacio periplasmático³³. De tal manera, el ion ingresaría simplemente por difusión a través de las porinas ubicadas en la membrana externa, cuyos poros permiten el pasaje de sustancias de hasta unos 600 Da⁹⁶, por lo que su concentración en el periplasma estaría directamente ligada a los niveles extracelulares. La excepción está en algunos organismos que poseen proteínas en su membrana externa capaces de captar Zn(II) de forma activa. Por ejemplo *Neisseria gonorrhoeae* cuenta con el importador de membrana externa ZnuD que utiliza para tal fin energía provista por el sistema TonB^{93,97}. También en este patógeno la porina de membrana externa CbpA parece tener la capacidad de captar calprotectina unida a Zn(II) y tomar su ion metálico⁹⁷, contrarrestando una importante pieza de la respuesta de inmunidad nutricional del hospedador (Sección 3.1.3). Este proceso se ha denominado “piratería de zinc” por similitud a mecanismos de nombre análogo caracterizados para adquisición hierro por parte de bacterias patógenas.

También se ha encontrado que algunas bacterias liberan pequeñas moléculas quelantes capaces de unir Zn(II) en el medio extracelular, y que luego son captadas por receptores específicos en la superficie celular, contribuyendo a la adquisición de Zn(II) en ambientes con disponibilidad limitada de este metal. Estos compuestos de bajo peso molecular, llamados “zincóforos”⁹³, funcionarían de forma análoga a la captación de hierro mediante sideróforos descrita para un gran número de especies bacterianas. Se ha demostrado en *S. aureus* la producción de un zincóforo denominado staphylopine, el cual tiene rol clave en la adquisición de Zn(II) durante una infección⁹⁸. Además, *Yersinia pestis* secreta un quelante metálico denominado yersiniabactin, de acción dual como sideróforo y zincóforo, y cuya producción resulta importante para la virulencia de este patógeno en modelos de infección⁹⁹.

3.1.2 Biosíntesis y adquisición de Zn(II) por MBLs. Efecto de Zn(II) en la resistencia a antibióticos

El Zn(II) es esencial para la función de las MBLs, siendo necesaria su presencia en el sitio activo tanto para la unión de sustrato como la catálisis³². Es por ello que la capacidad de estas enzimas de adquirir y retener los iones metálicos condiciona su potencial como determinante de resistencia.

Luego de ser sintetizadas las MBLs son exportadas a través de la membrana interna mediante el sistema Sec⁸². Por lo tanto, las enzimas abandonan el citoplasma en forma desplegada, y su plegamiento final y adquisición de Zn(II) tienen lugar en el espacio periplasmático. Dado que el periplasma carece de mecanismos activos capaces de mantener la homeostasis de Zn(II), las concentraciones disponibles para las MBLs estarían ligadas a los niveles extracelulares del mismo. Para metales como el cobre, se han identificado metalochaperonas que captan los iones metálicos y los entregan de forma específica a sus proteínas diana, pero hasta el momento no han sido descritas metalochaperonas de Zn(II).

La influencia de la composición del medio extracelular sobre la capacidad de MBLs periplasmáticas de captar iones metálicos fue demostrada en estudios con la enzima L1 de subclase B³⁵. La expresión de L1 en periplasma utilizando medio rico LB o medio mínimo con Zn(II) agregado dio lugar a proteína unida a Zn(II), y con un contenido metálico cercano al máximo esperado de 2 equivalentes de este ion por molécula de proteína. Sin embargo, cuando se utilizó medio mínimo suplementado con otros metales como Fe(II) o Mn(II) la enzima obtenida incorporó metal de forma

heterogénea, y parte de los sitios metálicos en la población unieron estos iones mientras que una proporción incorporó Zn(II). Mientras tanto, la proteína producida en medio mínimo sin metales agregados incorporó tanto Zn(II) como Fe(II) pero con un pobre contenido metálico total, inferior a 1 equivalente por molécula de proteína.

Las MBLs se encuentran optimizadas para captar Zn(II) en el espacio periplasmático, mediante adaptaciones para incrementar su afinidad por este ion, como demuestran una serie de trabajos realizados en el laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo de tesis. Las enzimas de subclase B1 poseen una cisteína como ligando de uno de los Zn(II) del sitio activo, mientras que las enzimas de la superfamilia de las MBL poseen típicamente un residuo de ácido aspártico en esa posición³¹. La presencia de cisteína como ligando metálico resultaba llamativa en proteínas periplasmáticas, dada las características oxidantes de este compartimiento celular, y que la oxidación de este residuo impide la unión de Zn(II). Además, la caracterización *in vitro* del mutante BcII C221D, en el que se reemplazó esta posición por el residuo conservado en la superfamilia, demostró que la enzima purificada podía hidrolizar antibióticos con eficiencia comparable a la variante silvestre¹⁰⁰, de forma similar a lo observado previamente para el mutante C221D de IMP-1. A pesar de ello, el mutante C221D otorgaba niveles de resistencia mucho menores a *E. coli* frente β -lactámicos, aunque se restauraba su función con la adición de exceso de Zn(II) al medio de crecimiento. La determinación de las afinidades de unión a metal de la proteína salvaje y el mutante demostraron que la sustitución C221D reduce apreciablemente la capacidad de la enzima de captar Zn(II)¹⁰⁰. Los altos niveles de Zn(II) presentes en los ensayos *in vitro* permiten a BcII C221D funcionar correctamente, mientras que esta no puede adquirir el metal necesario bajo la menor disponibilidad del mismo en el periplasma. Por ello, se concluyó que la selección natural favoreció la presencia de una cisteína en esa posición, asegurando la formación de una especie bimetálica y la supervivencia de la bacteria productora.

Un fenómeno similar fue observado para SPM-1 mediante el análisis de mutantes resultantes de aleatorización de posiciones próximas al sitio activo de la enzima¹⁰¹. El mutante G121A de SPM-1 demostró una capacidad equivalente a la enzima salvaje de hidrolizar sustratos en condiciones de elevada disponibilidad de Zn(II), pero su capacidad de otorgar resistencia se vio notablemente disminuida en presencia de compuestos quelantes de metal en el medio extracelular. Posiblemente la presión de selección actuante sobre la enzima determinó la fijación de un residuo de glicina en esta posición para permitir el funcionamiento de la enzima en condiciones de pobre disponibilidad del metal.

Estudios de evolución dirigida también pusieron en relevancia la importancia de la unión a Zn(II) para las MBLs. La selección de variantes de BcII con resistencia aumentada frente al sustrato pobremente hidrolizado cefalexina dio lugar a un mutante denominado M5¹⁰², con una mejora de 32 veces en la CIM (concentración inhibitoria mínima). De las cuatro mutaciones presentes en M5, la sustitución G262S era responsable de la mayor parte del incremento en la tasa de hidrólisis del sustrato para la enzima pura. Sin embargo, la resistencia conferida a *E. coli* no se condecía con la caracterización in vitro, y eran necesarias las demás mutaciones para llegar a la máxima CIM, conferida por M5³⁴. Se encontró que la mutación G262S reducía la afinidad por Zn(II) de la enzima, y que otra sustitución, N70S, compensaba su efecto en M5. En concordancia con ello, la adición de un exceso de Zn(II) al medio de crecimiento incrementaba marcadamente la resistencia otorgada por el mutante G262S pero no en M5, demostrando que las dificultades en la adquisición de metal *in vivo* condicionaban el funcionamiento de este primer mutante.

3.1.3 Inmunidad nutricional

El sistema inmune de vertebrados utiliza diversas estrategias para evitar la infección por patógenos, ya sea montando un ataque directo sobre éstos o generando condiciones adversas para su desarrollo. Una de las respuestas establecidas por el sistema de inmunidad innata ante una infección es la denominada Inmunidad Nutricional, por la que se restringe la disponibilidad de distintos iones metálicos necesarios para el crecimiento del patógeno invasor¹⁰³.

Este fenómeno fue identificado en primer lugar para el hierro, produciéndose luego de una infección una fuerte reducción en los niveles circulantes en sangre de este metal¹⁰⁴. Incluso en ausencia de patógenos la concentración libre del mismo es muy reducida, y una proporción mayoritaria del hierro en el cuerpo se encuentra formando parte de la hemoglobina y mioglobina. El Fe(III) es insoluble a pH fisiológico y es transportado en la sangre por la transferrina, que une el metal con una afinidad extremadamente alta, de manera que los niveles de este ion libre en la sangre son del orden de 10^{-24} M. Mientras tanto, el exceso de hierro intracelular está unido a la proteína de almacenamiento ferritina. Ante la presencia de patógenos tiene lugar la “respuesta hipoferrémica”, en la que disminuyen los niveles de hierro en sangre así como su absorción en el intestino. Adicionalmente, los neutrófilos pueden liberar proteínas quelantes de Fe como lactoferrina, que también se secreta de forma constitutiva en la superficies de las mucosas.

Sin embargo la inmunidad nutricional no se limita al Fe(III), y en las últimas décadas se ha descripto la importancia de la restricción de Zn(II) y Mn(II) en este proceso^{33,103,105}. Durante una infección se desarrolla una respuesta de “hipozincemia”, inducida por LPS y mediada por la citoquina pro-inflamatoria IL-6, que lleva a la captación del Zn(II) circulante mediante transportadores como Zip-14¹⁰⁶. Además de esta respuesta sistémica, los neutrófilos liberan en los sitios de infección grandes cantidades de calprotectina, una proteína quelante de alta afinidad de Zn(II) y Mn(II) con amplia actividad antimicrobiana⁹⁰. La calprotectina representa más del 40% de la proteína citoplasmática total de los neutrófilos¹⁰³, y se ha reportado en concentraciones de hasta 1 mg/mL en sitios de infección. Esta proteína es un componente importante de las NETs (neutrophil extracellular traps), complejas redes de ADN, proteínas nucleares y moléculas antimicrobianas que inmovilizan a los patógenos. La calprotectina puede también contribuir a respuestas inflamatorias, mediante interacción con los Toll-like receptor 4 (TLR-4) y receptores RAGE, y actuar en la quimiotaxis atrayendo neutrófilos al sitio de infección¹⁰⁷. Además de ser producida por neutrófilos, la expresión de calprotectina también puede ser inducida en células epiteliales en la superficie de las mucosas durante la respuesta inflamatoria. Estudios con ratones deficientes en calprotectina demostraron la importancia de esta proteína para la protección contra patógenos tales como *A. baumannii*, *H. pylori*, *S. aureus* y *Candida albicans*¹⁰⁷.

La calprotectina es un heterodímero de las proteínas S100A8 y S100A9 (también llamadas calgranulina A y B, respectivamente), con pesos moleculares de 10,8 y 13,2 kDa respectivamente. El heterodímero es capaz de dimerizar para formar un tetrámero en presencia de Ca(II) (Figura 6), el cual posee una afinidad incrementada por Zn(II)⁹⁰. Las constantes de disociación para Zn(II) medidas para calprotectina en su forma unida a Ca(II) son $K_{d1} \leq 10$ pM y $K_{d2} \leq 240$ pM, mientras que en la forma libre de calcio los valores son $K_{d1} = 133 \pm 58$ pM y $K_{d2} = 185 \pm 219$ nM⁹⁰. Los sitios de unión a metal están ubicados en la interface de los dos monómeros y mientras que uno de ellos puede unir tanto Zn(II) como Mn(II), el otro incorpora exclusivamente este primer ion. Se ha propuesto que los gradientes de Ca(II) regulan *in vivo* la afinidad de calprotectina. De esta manera la proteína se encontraría en su forma dimérica en el interior de los neutrófilos donde los niveles de Ca(II) libre son bajos, y al ser liberada al medio extracelular con concentraciones de Ca(II) en el orden de 1 mM pasaría a su forma tetramérica de mayor afinidad para exponer a los patógenos a la máxima capacidad quelante⁹⁰.

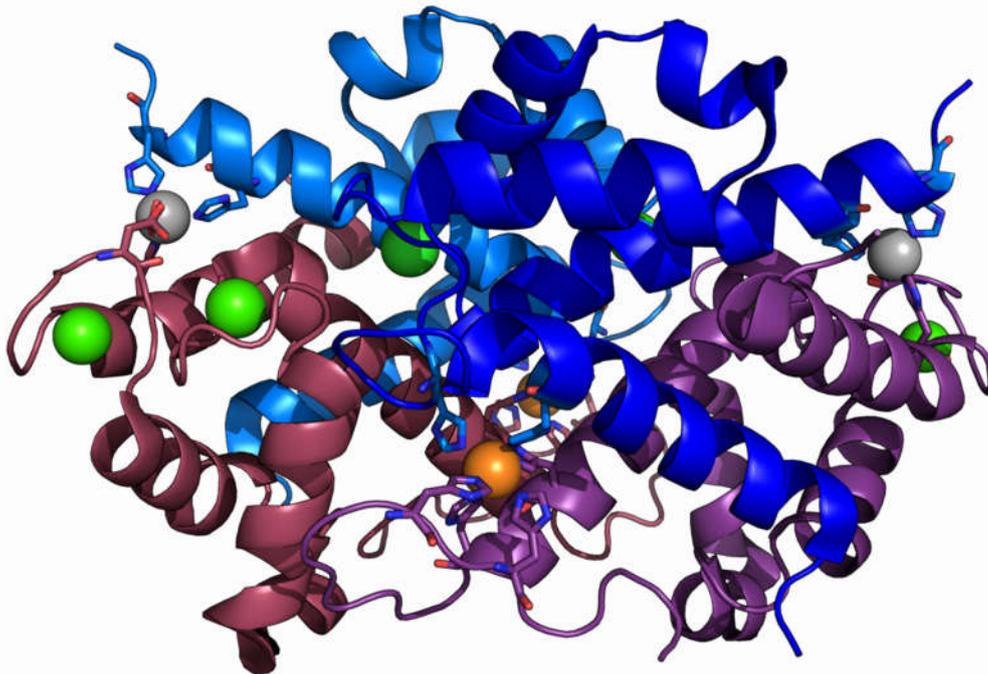


Figura 6. Estructura del tetrámero de calprotectina (PDB: 4GGF). Las dos cadenas de S100A8 se muestran en tonos de azul, y las de S100A9 en tonos de violeta. Los iones metálicos en el sitio de unión de Zn(II) se muestran como esferas grises, los del sitio de unión de Mn(II)/Zn(II) como esferas naranjas, los iones Ca(II) como esferas verdes, y los residuos ligandos de Zn(II) y Mn(II) como “sticks”.

Otras proteínas de la familia S100 también actúan en la inmunidad nutricional, pero a diferencia de calprotectina funcionan como homodímeros. La calgranulina C (S100A12) es producida por neutrófilos, tiene capacidad de unir Zn(II) y Cu(II), y se ha demostrado su actividad antimicrobiana¹⁰⁸. Sin embargo, el rol de esta proteína en la inmunidad nutricional no está claro. La psoriasina (S100A7) es secretada por los queratinocitos de la piel, y secuestra Zn(II) para restringir su disponibilidad a bacterias¹⁰⁹. También puede desencadenar respuestas pro-inflamatorias, las cuales contribuyen a la enfermedad autoinmune psoriasis.

3.2 Resultados

3.2.1 Efecto de la disponibilidad de Zn(II) sobre resistencia y niveles de proteína MBL

Durante una infección, los niveles de Zn(II) y otros cationes metálicos disponibles para el patógeno invasor se ven reducidos drásticamente por la respuesta de Inmunidad Nutricional llevada a cabo por el sistema inmune de vertebrados. Trabajos realizados previamente por el grupo demostraron que una restricción en los

niveles de Zn(II) extracelular afecta a la capacidad de las MBLs de otorgar resistencia^{34,100,101}. Por lo tanto, las condiciones de baja disponibilidad de este ion prevalentes en sitios de infección podrían constituir un factor que condiciona la resistencia conferida por MBLs, y que no está representado en las determinaciones rutinarias de CIM, en las que se usan medios de crecimiento ricos con abundante Zn(II) (por ejemplo, el medio LB tiene un contenido de Zn(II) total de alrededor de 15 μM ³⁴).

Se decidió evaluar si diferentes MBLs muestran una susceptibilidad diferencial a los niveles extracelulares de este catión esencial para su actividad. Para ello se clonaron por separado distintas MBLs de relevancia clínica (NDM-1, VIM-2, IMP-1 y SPM-1) en el vector pMBLe. Las enzimas fueron clonadas bajo un promotor inducible por IPTG, cada una de ellas con su péptido líder nativo para dirigir las al espacio periplasmático. Para facilitar la detección y cuantificación de estas enzimas, se fusionó al extremo C-terminal de las mismas el péptido StrepTag II (ST)¹¹⁰, permitiendo su inmunodetección mediante anticuerpos monoclonales comerciales anti-ST. Esto permitió detectar de forma unificada todas las MBLs utilizadas con anticuerpos altamente específicos, dirigidos contra una misma secuencia en todas estas proteínas.

Luego de clonar las construcciones en *E. coli* DH5 α , se comprobó que la adición de esta secuencia de 8 residuos no altera la capacidad de las enzimas de otorgar resistencia frente a antibióticos β -lactámicos (Tabla 3).

	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	Imipenem		Ceftazidima	
	-ST	+ST	-ST	+ST
pMBLe (control)	0.25		0.06	
NDM-1	2	2	8	8
VIM-2	2	2	4	4-8
IMP-1	1	1	2-4	2-4
SPM-1	2	2	128	128

Tabla 3. CIM de imipenem y ceftazidima para cepas *E. coli* DH5 α productoras de las enzimas NDM-1, VIM-2, IMP-1 o SPM-1, con (+ST) o sin (-ST) la adición al extremo C-terminal de las mismas de la secuencia StrepTag-II.

Se procedió a continuación a analizar la influencia de los niveles externos de Zn(II) sobre la capacidad de las MBLs de otorgar resistencia. Para ello se realizaron determinaciones de CIM de cefotaxima para *E. coli* DH5 α expresando NDM-1, VIM-2, IMP-1 o SPM-1 en medio LB agar suplementado con distintas cantidades del quelante de cationes divalentes ácido dipicolínico (DPA) para reducir la disponibilidad de zinc. Se decidió utilizar cefotaxima para estas determinaciones debido a que las MBLs

utilizadas otorgan niveles relativamente altos de resistencia frente a este antibiótico, lo que brinda un amplio rango para evaluar el efecto de la limitación de metal sobre estas enzimas.

Se comprobó que la adición de cantidades crecientes de DPA causa una reducción progresiva en la resistencia otorgada por estas lactamasas, hasta alcanzar los niveles correspondientes a la cepa control (Figura 7-a, Tabla 4). Entre las MBLs analizadas, SPM-1 es la que presenta mayor tolerancia a la depleción de Zn(II) seguida por IMP-1, mientras que NDM-1 y VIM-2 resultan más sensibles y poseen un perfil similar.

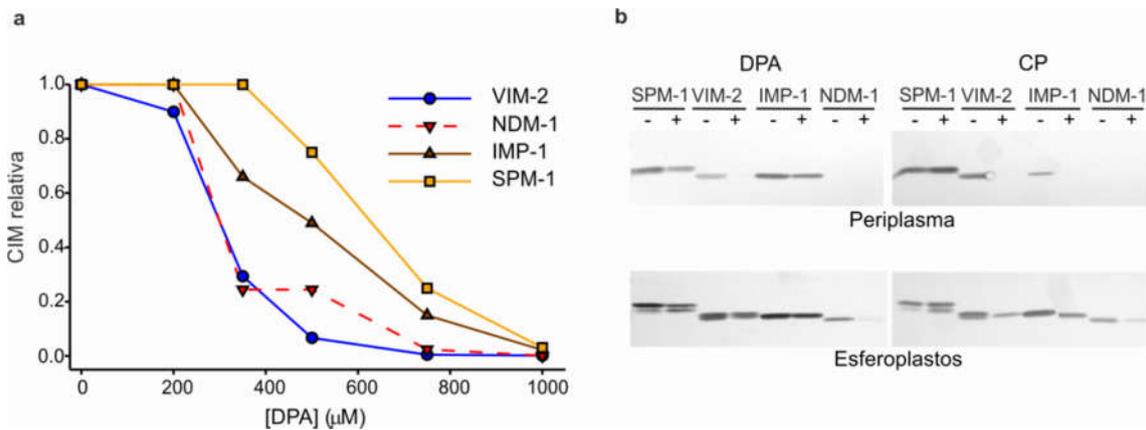


Figura 7. a) CIM relativas de cefotaxima para células de *E. coli* expresando VIM-2, NDM-1, IMP-1 o SPM-1 en medio de cultivo LB agar suplementado con las concentraciones indicadas del quelante DPA. Las CIM relativas en presencia de DPA fueron calculadas de acuerdo a la fórmula $(CIM_{MBL} - CIM_{control}) / (CIM_{MBL} + 0\mu M DPA - CIM_{control} + 0\mu M DPA)$, donde CIM_{MBL} y $CIM_{control}$ son los valores medidos para *E. coli* DH5α pMBLe-*bla* o pMBLe (vector vacío), respectivamente, bajo cada condición, y $CIM_{MBL} + 0\mu M DPA$ o $CIM_{control} + 0\mu M DPA$ son los valores correspondientes a medio de crecimiento sin agregado de DPA. **b)** Análisis mediante western blot de niveles de MBL en células crecidas bajo condiciones equivalentes a las utilizadas en los ensayos de CIM, con (+) o sin (-) agregado de 350 µM DPA o 250 µg/mL CP al medio de cultivo.

	CIM Cefotaxima (µg/mL)					
	0 µM DPA	200 µM DPA	350 µM DPA	500 µM DPA	750 µM DPA	1000 µM DPA
pMBLe (control)	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
NDM-1	8	8	2	2	0.25	0.06
VIM-2	4-8	4-8	2	0.5	0.06-0.125	0.06
IMP-1	2-4	2-4	2	1-2	0.5	0.125
SPM-1	128	128	128	64-128	32	4

Tabla 4. CIMs de cefotaxima para células de *E. coli* expresando VIM-2, NDM-1, IMP-1 o SPM-1 en medio de cultivo LB agar suplementado con las concentraciones indicadas del quelante DPA. Los datos corresponden a tres experimentos independientes.

Para entender mejor las causas de la reducción de resistencia resultante de la restricción en el contenido de Zn(II) del medio de crecimiento, se estudió el impacto del agregado de quelante en los niveles de MBL presentes en la célula. Se crecieron células

de *E. coli* produciendo estas MBLs en medio LB conteniendo DPA 350 μ M, y se compararon los niveles de proteína β -lactamasa alcanzados en cultivos control a los que no se les adicionó quelante. Se utilizó esta concentración de DPA dado que es aquella en la que se comienzan a evidenciar efectos por la adición del quelante sobre la resistencia conferida por las MBLs ensayadas. Se observó que la reducción de CIM en condiciones de baja disponibilidad de Zn(II) está acompañada por una menor cantidad de proteína MBL presente en periplasma (Figura 7-b). Se observó un efecto similar en células crecidas en presencia de calprotectina (CP), la proteína quelante de Zn(II) liberada por células del sistema inmune en los sitios de infección, purificada en forma recombinante y provista por colaboradores en el grupo de Elizabeth Nolan (MIT, Cambridge, EEUU). Esto que indica que los resultados obtenidos se deben a la reducción en los niveles de Zn(II) disponible, independientemente del agente quelante utilizado. Además, cabe destacar que el pequeño tamaño del DPA (PM = 167 Da) permitiría su acceso desde el medio extracelular al espacio periplasmático mediante las porinas de la membrana externa, mientras que esto no ocurriría en el caso de calprotectina (PM = 24 kDa para el heterodímero), por lo que se concluyó que el fenómeno no requiere de la interacción directa del quelante con la MBL.

Los niveles de las diferentes MBLs se vieron afectados en distinto grado por estas condiciones. VIM-2 se encontraba debajo del límite de detección en extractos periplasmáticos de las células tratadas con DPA, mientras que los niveles de IMP-1 y SPM-1 se vieron afectados en menor medida. Esto se correlaciona cualitativamente con el efecto del agregado de DPA sobre la resistencia conferida por estas MBLs. NDM-1 no fue detectada en extractos periplasmáticos ya que es una proteína anclada a la membrana externa de *E. coli*. La adición de DPA llevó a una reducción en los niveles de NDM-1 en esferoplastos, pero en menor grado que la observada para VIM-2 en periplasma, si bien en ambos casos la resistencia conferida por ambas proteínas se vio afectada de forma similar por el agregado de quelante.

La reducción observada en los niveles de proteína MBL podría deberse a menores niveles de expresión, o a una menor acumulación en periplasma bajo condiciones donde no se puede formar la especie unida a metal. Para diferenciar entre estas posibilidades, se buscó determinar el efecto de una reducción repentina en la disponibilidad de Zn(II) sobre MBLs que se habían expresado y acumulado en periplasma en medio LB, con elevada disponibilidad de este ion. Cultivos expresando MBLs fueron divididos en dos, y a una mitad se le adicionó 1000 μ M DPA mientras que la otra mitad fue mantenida como control sin tratamiento. Ambas partes de cada cultivo fueron luego crecidas a 20°C, y se tomaron alícuotas a distintos intervalos de

tiempo (0', 10', 90', 960') tras la adición del quelante. Para cada muestra se realizó una extracción periplasmática, y se cuantificaron por Western Blot los niveles de proteína presentes en periplasma y en esferoplastos (Figura 8, Figura 9-a), realizándose la cuantificación en membranas totales y esferoplastos en el caso de NDM-1.

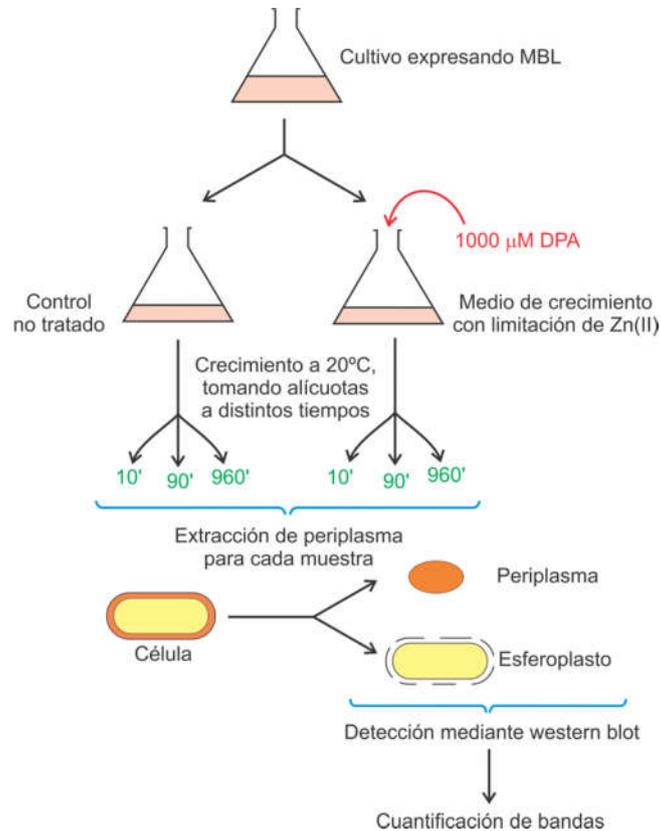


Figura 8. Esquema del experimento para evaluar el efecto de la limitación de Zn(II) por agregado de DPA sobre los niveles de proteína MBL.

La depleción de Zn(II) lleva a una rápida reducción en los niveles de VIM-2 en periplasma, mientras que las cantidades de SPM-1 permanecen inalteradas (Figura 9-b). Para IMP-1 y NDM-1 también se ven reducciones en los niveles de proteína aunque más moderadas. Esta caída en los niveles de proteína podría deberse a que las MBL desprovistas de metal (apo-enzimas) generadas ante la súbita limitación en la disponibilidad de Zn(II) sean más sensibles a la degradación que las formas unidas a metal.

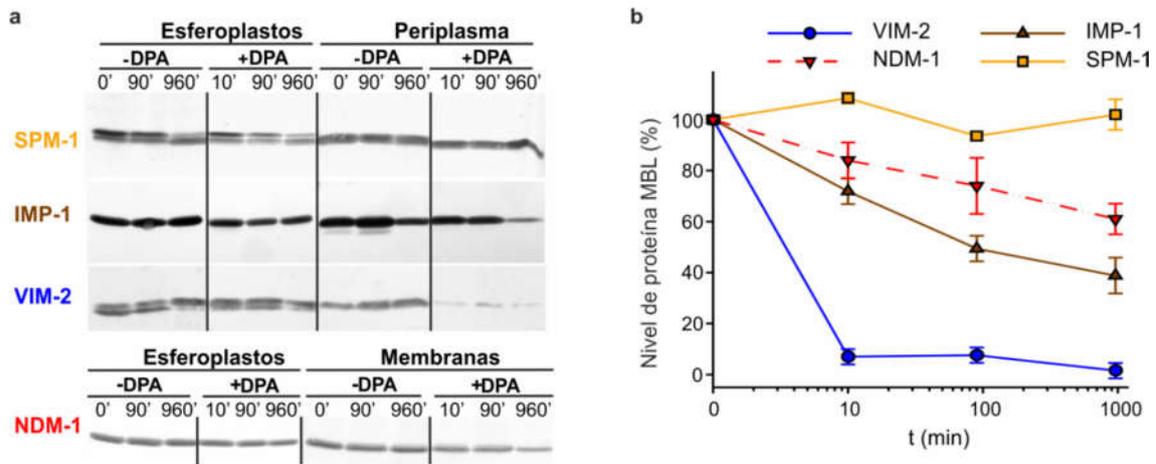


Figura 9. a) Análisis mediante western blot de los niveles de proteína MBL en distintas fracciones celulares como función del tiempo luego del agregado de 1000 μ M DPA. **b)** Niveles de proteína MBL en periplasma (membranas para el caso de NDM-1) cuantificados a partir de western blots en a), como función del tiempo luego de la adición de 1000 μ M DPA, normalizados respecto a muestras control no tratadas con DPA. Los niveles de proteína se presentan como porcentaje del contenido de proteína inicial remanente luego del tratamiento con DPA. Los datos corresponden a tres experimentos independientes y se presentan como media \pm error estándar

Esta hipótesis se encuentra apoyada por análisis de proteólisis limitada realizados *in vitro* con una forma truncada de NDM-1 producida en forma recombinante, en los cuales se observó que la apo-enzima era degradada con mayor facilidad por proteinasa K que la forma unida a zinc (Figura 10-c). Por lo tanto, la disminución en los niveles de las MBLs luego de la adición de DPA estarían causados por la mayor sensibilidad de las formas desprovistas de metal de estas enzimas al procesamiento por parte de proteasas del espacio periplasmático. Es importante destacar que la degradación observada *in vivo* es específica para las MBLs, dado que los niveles de otras proteínas presentes en los extractos periplasmáticos no se vieron afectados (Figura 10-a y b).

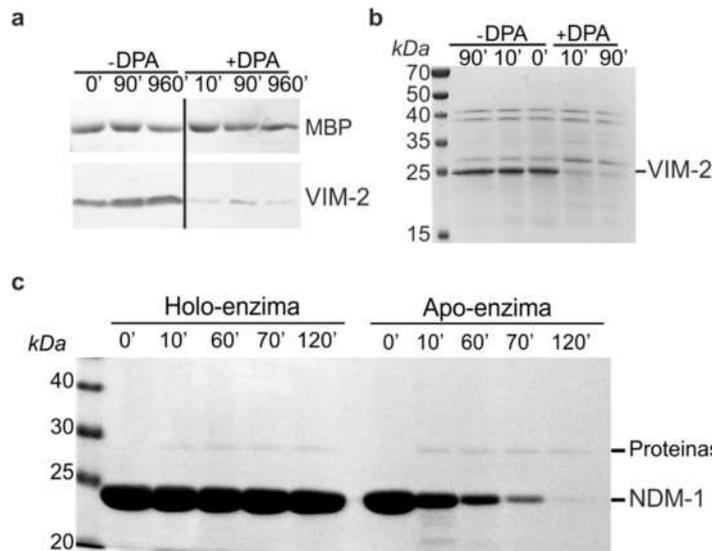


Figura 10. a) Análisis mediante western blot de muestras de periplasma de *E. coli* DH5 α expresando VIM-2, tomadas a distintos tiempos luego de la adición de 1000 μ M DPA. Se realizó inmunodetección mediante anticuerpos anti-ST (VIM-2) y anti-MBP. **b)** SDS-PAGE de muestras de periplasma de *E. coli* DH5 α expresando VIM-2, tomadas a distintos tiempos luego de la adición de 1000 μ M DPA. **c)** SDS-PAGE de muestras de proteólisis limitada de NDM-1 recombinante soluble, en su forma unida a Zn(II) (holo-enzima) o libre de metal (apo-enzima), luego de distintos tiempos de tratamiento con proteinasa K.

3.2.2 Construcción y caracterización de MBLs mutantes con localización celular modificada

A diferencia de las demás MBLs de relevancia clínica, las cuales son enzimas periplasmáticas solubles, NDM-1 se encuentra anclada a la membrana externa por la presencia de un grupo lipídico unido a su extremo N-terminal⁵³. Esta modificación postraduccional está determinada por la presencia de una señal de lipidación denominada lipobox, de secuencia LSGC, ubicada dentro del péptido líder de la enzima. Dicha secuencia es reconocida por un sistema de lipidación altamente conservado en bacterias Gram-negativas. Luego del exporte desde el citoplasma, la terna de proteínas de membrana interna Lgt, LspA, Lnt remueve el péptido líder, quedando como residuo N-terminal al residuo de C ubicada dentro del lipobox, a la cual se asocian los lípidos responsables del anclaje. Luego el sistema LolABCDE trasloca a la proteína desde la membrana interna hacia la cara interna de la membrana externa.

Si bien la localización de NDM-1 en membranas había sido previamente demostrada para la enzima en células de *E. coli*⁵³, NDM-1 también había sido descrita en múltiples organismos no fermentativos tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, en los cuales se desconocía si se mantenía esta característica. Se evaluó por lo tanto la distribución celular de NDM-1 en comparación con la MBL

soluble VIM-2 en *E. coli* DH5 α y en *P. aeruginosa* PAO1, ésta última utilizada como modelo de bacilos no fermentativos. Para la expresión en ambos organismos se utilizó el vector pMBLe, cuyo origen de replicación de amplio rango de hospedador y promotor P_{tac} son activos en *P. aeruginosa*. Células de ambos organismos expresando cada una de estas enzimas se rompieron mediante sonicación, y el homogenado obtenido fue centrifugado durante 10 min a 12800 g para remover los restos celulares. El sobrenadante resultante fue ultracentrifugado a 150000 g por 1h para separar los componentes solubles de los fragmentos de membrana, y las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante western blot y medidas de actividad β -lactamasa. Se observó que tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa* NDM-1 se localizaba en las fracciones de membrana, indicando que el anclaje a membrana se mantiene en *Pseudomonas* (Figura 11-a). De acuerdo a lo esperado, VIM-2 se encontró presente como una proteína soluble en los dos casos. Para ambas enzimas, la localización de la actividad β -lactamasa se correspondió con lo observado mediante western blot.

Se analizó además el mecanismo de unión de NDM-1 a la membrana en estos en *E. coli* y *P. aeruginosa* mediante tratamiento secuencial de preparaciones de membranas totales de estos organismos con distintos compuestos: KCl 1M, Na₂CO₃ 0.1 M pH 11, Tritón X-100 0.0016 %P/V y finalmente Tritón X-100 0.23 %P/V⁸⁴. Luego de incubar a las membranas durante 30 min en hielo con cada reactivo, se las ultracentrifugó para separar el sobrenadante conteniendo las proteínas extraídas de las membranas remanentes localizadas en el pellet, las cuales se resuspendieron en la siguiente solución de la serie. Cada fracción de proteínas solubilizadas fue analizada mediante western blot y por medidas espectrofotométricas de actividad β -lactamasa frente a imipenem (Figura 11-b). NDM-1 no fue extraída por la solución de KCl ni la de Na₂CO₃, indicando que la unión de la proteína a la bicapa no se produce por interacciones electrostáticas. En cambio, el tratamiento con el detergente no iónico Tritón X-100 sí fue capaz de liberar a la enzima de las membranas, tanto en concentraciones por debajo como por encima de la CMC (Concentración Micelar Crítica) de este compuesto (0.023 %P/V), lo que indica que la asociación de NDM-1 a la superficie de la membrana depende de interacciones hidrofóbicas. Las micelas de detergente obtenidas que contenían NDM-1 presentaban actividad lactamasa, indicando que la proteína puede ser extraída de la membrana sin afectar su plegamiento.

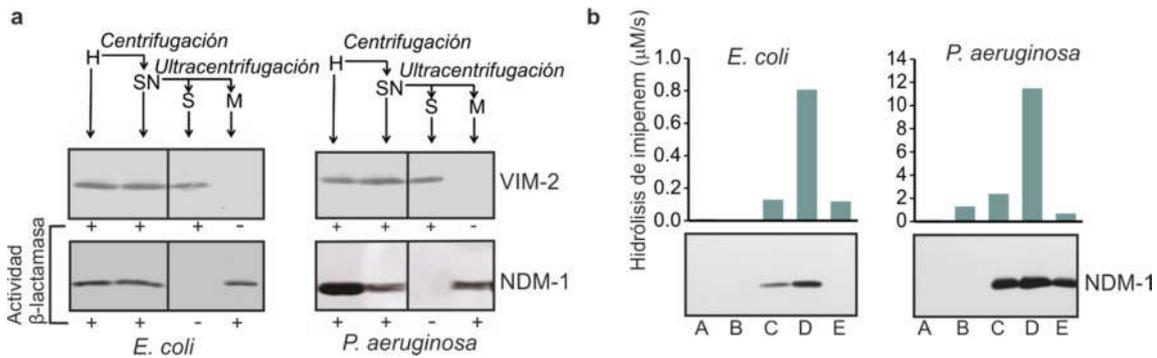


Figura 11. a) Análisis mediante western blot de la localización de NDM-1 y VIM-2 en distintas fracciones celulares obtenidas a partir de *E. coli* DH5α o *P. aeruginosa* PAO1 expresando estas enzimas. H: homogenado total obtenido por sonicación, SN: sobrenadante obtenido luego de centrifugar H a 12800 g por 10 min, S y M: fracciones de componentes celulares solubles (S) o fragmentos de membrana (M) separados por ultracentrifugación de SN por 1 h a 150000 g. **b)** Análisis mediante western blot y determinación espectrofotométrica de actividad β-lactamasa contra imipenem de fracciones de proteínas extraídas luego de la incubación secuencial con distintos reactivos de membranas de *E. coli* DH5α o *P. aeruginosa* PAO1 que expresaban NDM-1. A: KCl 1M, B: Na₂CO₃ 0.1 M, C: Tritón X-100 0.0016 %P/V, D: Tritón X-100 0.23 %P/V, E: membranas finales remanentes luego del último tratamiento.

Se desconocía si la localización celular única de NDM-1 impactaba sobre la funcionalidad *in vivo* de la proteína, o se trataba meramente de un remanente de su historia evolutiva. Para evaluar el impacto del anclaje a membrana, se generaron en el vector pMBLe variantes con localización celular modificada de NDM-1 y de la MBL periplasmática soluble VIM-2. Se construyó la enzima quimérica V-NDM intercambiando el péptido líder de NDM-1 por el de VIM-2, y la variante N-VIM mediante el procedimiento recíproco, fusionando el péptido líder de NDM-1 a la enzima VIM-2, incluyendo la señal de lipidación (Figura 12-a). Se construyó además el mutante NDM-1 C26A en el residuo de cisteína presente en el lipobox, al cual se asocian los grupos lipídicos responsables del anclaje, fue reemplazado con alanina. Todas estas variantes fueron construidas con el péptido ST fusionado a su C-terminal.

Las enzimas fueron expresadas en *E. coli* y se evaluó su localización celular mediante experimentos de extracción periplasmática, obteniéndose las fracciones de esferoplastos y periplasma, las cuales fueron analizadas mediante western blot con anticuerpos anti-ST. La ausencia de una señal de lipidación funcional en NDM-1 C26A y V-NDM determina que las mismas sean proteínas periplasmáticas solubles, mientras que N-VIM se encuentra anclada a membrana y está ausente en los extractos periplasmáticos (Figura 12-b y c).

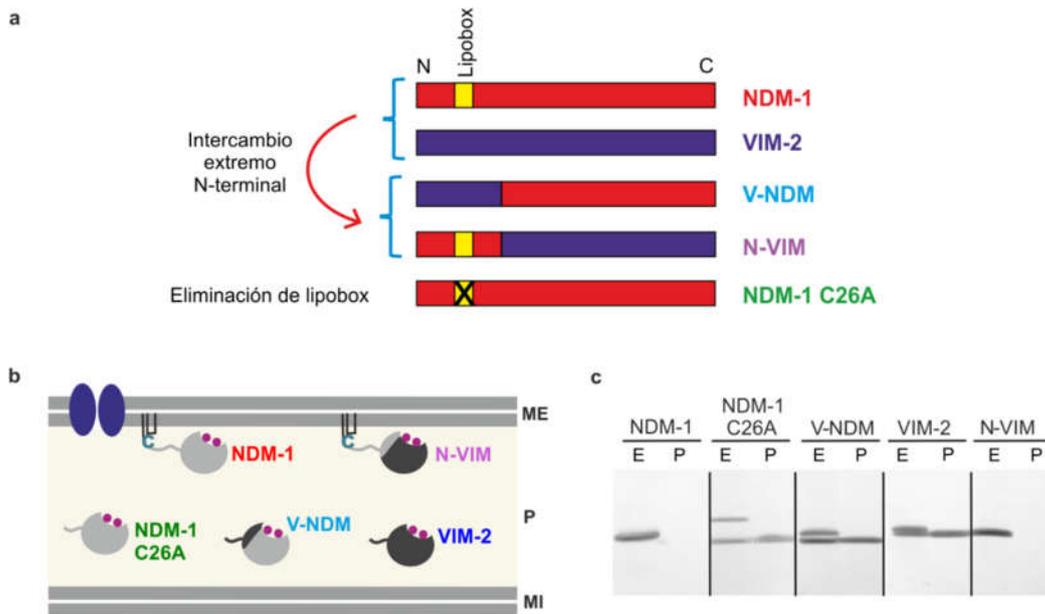


Figura 12. a) Esquema de la construcción de los mutantes con localización celular alterada a partir de las MBLs salvajes NDM-1 y VIM-2. Se indican con N y C los extremos N- y C-terminales de la proteína, respectivamente, y con un recuadro amarillo la secuencia lipobox. **b)** Esquema de la localización celular de NDM-1, NDM-1 C26A, V-NDM, VIM-2 y N-VIM. ME: Membrana externa, P: periplasma, MI: membrana interna. **c)** Análisis mediante western blot de NDM-1, NDM-1 C26A, V-NDM, VIM-2 y N-VIM en fracciones de esferoplastos (E) y periplasma (P) obtenidas de células de *E. coli*.

Para explorar en mayor profundidad la localización celular de N-VIM y NDM-1, se realizaron preparaciones de membrana de células de *E. coli* que expresaban estas lactamasas y se separaron los fragmentos de membrana interna de la externa por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante western blot y medidas de actividad β -lactamasa para determinar la localización de estas proteínas, indicando que ambas se hallaban presentes en las fracciones de membrana externa, ubicadas en la zona de mayor concentración de sacarosa del gradiente (Figura 13-a). La localización de las mismas en la membrana externa fue confirmada por determinaciones de actividad NADH oxidasa e identificación de proteínas representativas mediante espectrometría de masa (Figura 13-a). La localización celular de NDM-1 también fue evaluada por esta metodología en células de *P. aeruginosa* PAO1 que expresaban la enzima, comprobándose que también se encuentra ubicada en la membrana externa en este organismo (Figura 13-b).

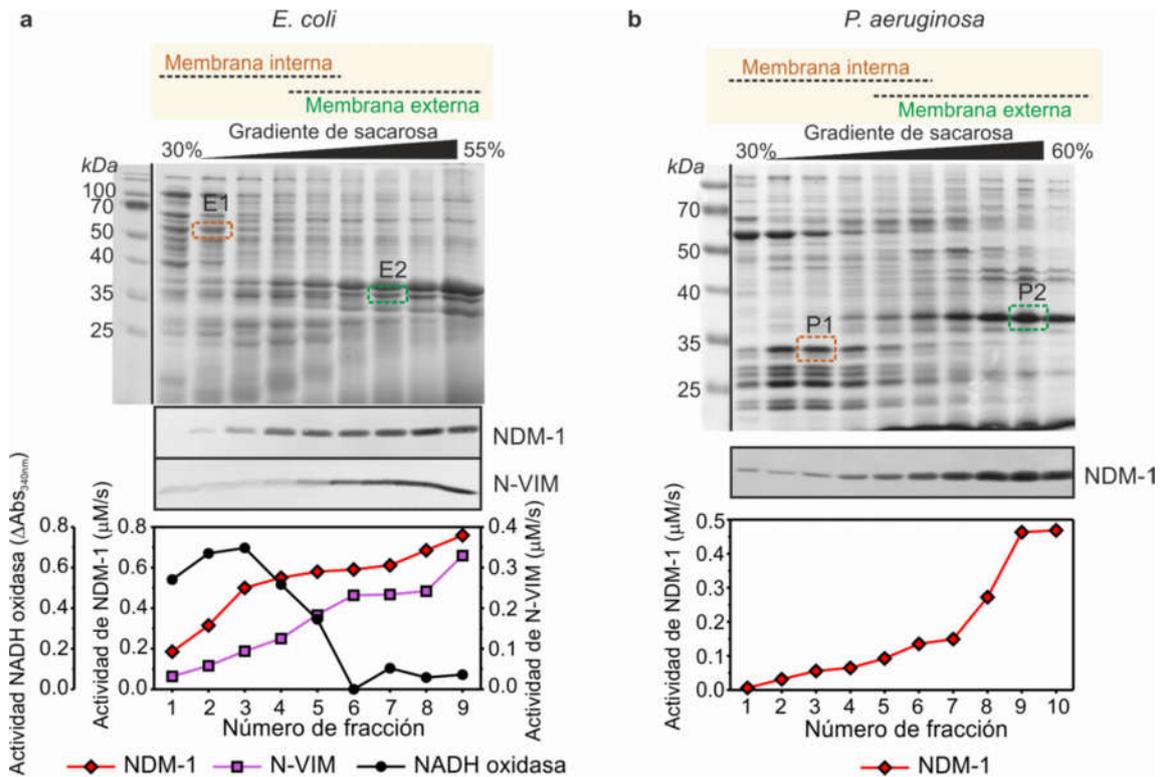


Figura 13. Análisis mediante SDS-PAGE y western blot de fracciones obtenidas por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa de 30 a 55% de membranas de *E. coli* DH5 α expresando NDM-1 o N-VIM (a) o células de *P. aeruginosa* PAO1 expresando NDM-1 (b). En el panel inferior se muestran las determinaciones de actividad NADH oxidasa y actividad β -lactamasa contra imipenem de las fracciones. Las bandas de SDS-PAGE marcadas con recuadros en la figura fueron analizadas mediante espectrometría de masas para confirmar el carácter de membrana interna o externa de las fracciones (E1: SecD, subunidad del sistema Sec de translocación de proteínas, E2: OmpA, P1: Subunidad b de ATP sintasa, P2: OprF)

Las distintas vías de procesamiento utilizadas por NDM-1 y el mutante soluble NDM-1 C26A fueron demostradas por experimentos de expresión en presencia de globomicina, un antibiótico que bloquea el procesamiento y la maduración de las lipoproteínas mediante inhibición de la peptidasa señal de lipoproteínas LspA^{65,111}. Mientras que el agregado de globomicina lleva a la acumulación del precursor no procesado de NDM-1, esto no ocurre para NDM-1 C26A (Figura 14). De esta manera la eliminación de la señal de lipidación en NDM-1 C26A probablemente lleva a que sea procesada por la peptidasa señal I (LepB) como la mayoría de las proteínas periplasmáticas exportadas por el sistema Sec¹¹².

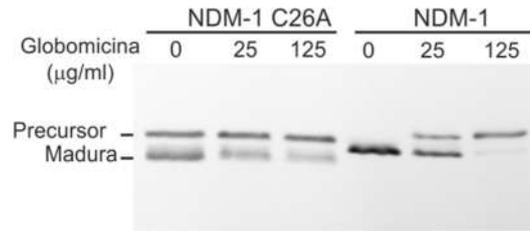


Figura 14. Análisis mediante western blot de muestras de células totales de *E. coli* DH5 α expresando NDM-1 o NDM-1 C26A, luego de tratamiento con distintas concentraciones de globomicina.

El sitio de procesamiento de NDM-1 C26A fue identificado mediante espectrometría de masa de la proteína madura, purificada a partir de extractos periplasmáticos de *E. coli* mediante uso de una resina de afinidad para StrepTag-II denominada StrepTactin Agarosa (GE Healthcare). Una banda de SDS-PAGE correspondiente a la proteína purificada fue digerida con tripsina y analizada por MS/MS en el servicio de espectrometría de masas del CEQUIBIEM (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UBA). Se obtuvo una cobertura del 51% de la proteína madura, identificándose un péptido semi-tríptico que comienza con el residuo de G29, correspondiente al extremo N-terminal de la misma. De esta manera se confirmó que el procesamiento del precursor de NDM-1 C26A se produce entre los residuos Pro28 y Gly29, en concordancia con la predicción por la herramienta bioinformática SignalP¹¹³ para corte mediado por la peptidasa señal I.

Capítulo 3. Efecto de la disponibilidad de Zn(II) sobre la funcionalidad in-vivo de Metallo-Beta-Lactamasas. Influencia de la localización celular de NDM-1.

a

↓

```

1   MELPNIMHPV AKLSTALAAA LMLSGAMPGE IRPTIGQQME TGDQRFGLDV
51  FRQLAPNVWQ HTSYLDMPGF GAVASNGLIV RDGGRVLLVD TAWTDDQTAQ
101 ILNWIQQEIN LPVALAVVTH AHQDKMGGMD ALHAAGIATY ANALSNQLAP
151 QEGMVAAQHS LTFAANGWVE PATAPNFGPL KVFYPPGPGHT SDNITVIGIDG
201 TDIAFGGCLI KDSKAKSLGN LGDADTEHYA ASARAFGAAF PKASMIVMSH
251 SAPDSRAAIT HTARMADKLR WSHPQFEK

```

b

Secuencia del péptido	Modificaciones	Nº PSMs	MH+ teórica [Da]	XCorr Sequest HT	Confianza
QEINLPVALAVVTHAHQDK		7	2083,12946	5,47	Alta
QEINLPVALAVVTHAH		1	1711,94898	4,32	Alta
SLGNLGDADTEHYAASAR		5	1847,85184	3,88	Alta
MGGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQEGMVA	3xOxidación [M1; M4; M29]	1	3121,43873	3,57	Alta
QEINLPVALAVVTH		1	1503,85295	2,95	Alta
FAANGWVEPATAPNFGPLK		1	1987,00722	2,76	Alta
GWVEPATAPNFGPLK		2	1583,82165	2,66	Alta
VEPATAPNFGPLK		1	1340,72088	2,48	Alta
QEINLPVALAVVT		1	1366,79404	2,48	Alta
GEIRPTIGQQMETGDQR	1xOxidación [M11]	1	1931,92396	2,44	Alta
QEINLPVAL		1	996,57242	2,4	Alta
MGGMDALHAAGIATYAN	2xOxidación [M1; M4]	1	1695,74652	2,39	Alta
TAPNFGPLK		3	944,51999	2,33	Alta
FGDLVFR		2	853,45666	2,28	Alta
QEINLPVALA		1	1067,60954	2,19	Alta
VASNGLIVR		1	928,55744	2,07	Alta
AFGAAPFK		2	808,4352	1,99	Alta
APNFGPLK		1	843,47231	1,91	Alta

Figura 15. a) Secuencia de aminoácidos de NDM-1 C26A, indicando en verde la cobertura de péptidos obtenida por análisis de MS/MS de la proteína purificada digerida con tripsina. Se marca con una flecha roja la posición del corte por la peptidasa señal I predicho por la herramienta SignalP, y con subrayado en azul la secuencia StrepTag en el extremo C-terminal. **b)** Péptidos identificados mediante MS/MS de NDM-1 C26A purificada luego de digestión de la banda de gel con tripsina. Nº PSMs: (Peptide Spectrum Matches) número de veces que se detectó el péptido y su patrón de fragmentación en la muestra, XCorr Sequest HT: puntuación de correlación entre el espectro de fragmentación observado para el péptido y su secuencia, Confianza: confianza en la identificación correcta del péptido.

3.2.3 Efecto del anclaje a membrana sobre capacidad de MBLs de otorgar resistencia

La determinación de CIMs de células que expresaban las variantes NDM-1 C26A, V-NDM y N-VIM demostró que eran capaces de otorgar resistencia frente a diversos antibióticos beta-lactámicos (Tabla 5). Sorprendentemente, ambos mutantes solubles de NDM-1 dieron lugar a valores más elevados de CIM que la enzima salvaje. A pesar de que el anclaje a membrana no mejora la resistencia conferida por NDM-1, existe la posibilidad de que esta modificación constituya una ventaja en algún otro

aspecto del funcionamiento *in vivo* de la lactamasa. La variante anclada a membrana N-VIM también otorgó menores niveles de resistencia que la enzima VIM-2 soluble.

	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
	Imipenem	Cefotaxima	Piperacilina	Cefepime	Ceftazidima
pMBLe (control)	0.25	0.06	1	0.03	0.125-0.25
VIM-2	2	4-8	32-64	0.25-0.5	8
N-VIM	0.5	0.5	8	0.03-0.06	0.5
NDM-1	2	8	32-64	4-8	256
V-NDM	4-8	64	256	16-32	1024-2048
NDM-1 C26A	2	16	64	8-16	512

Tabla 5. CIMs de antibióticos β -lactámicos para células de *E. coli* DH5 α que expresan VIM-2, NDM-1, N-VIM, NDM-1 C26A, V-NDM o que contienen el plásmido pMBLe vacío. Los datos corresponden a tres experimentos independientes.

Dada la distinta susceptibilidad a una reducción en los niveles de Zn(II) mostrada por las MBLs de relevancia clínica previamente analizadas, se buscó evaluar si la localización celular podía alterar la respuesta de estas enzimas a condiciones de limitación de zinc. Para ello se analizó el efecto del anclaje a membrana sobre la capacidad de otorgar resistencia en condiciones de baja disponibilidad de Zn(II) de los mutantes NDM-1 C26A, V-NDM y N-VIM. Se realizaron determinaciones de CIM de cefotaxima para células de *E. coli* que expresaban estas variantes y las enzimas salvajes en medio LB agar suplementado con distintas cantidades de DPA. Si bien los mutantes solubles de NDM-1 (NDM-1 C26A y V-NDM) otorgan mayor resistencia que NDM-1 en condiciones de alta disponibilidad de zinc, se observó que mismos poseen mayor sensibilidad que la enzima salvaje a la limitación de metal, siendo la diferencia particularmente marcada para V-NDM (Figura 16-a, Tabla 6-a). Se obtuvieron resultados similares cuando se repitieron estas determinaciones utilizando como antibiótico imipenem (Figura 16-b, Tabla 6-b) De esta manera, el anclaje de NDM-1 a membrana parece mejorar la tolerancia de esta enzima a condiciones de baja abundancia de Zn(II), como las que se pueden presentar durante la patogénesis.

Se ensayó además el efecto del agregado de distintas cantidades de calprotectina (CP) sobre la resistencia conferida por estas enzimas (Figura 16-c). Estas determinaciones de CIM fueron realizadas por el método de micro-dilución en medio LB en placas de 96 pocillos, dada la gran cantidad de CP que sería necesaria para realizar los experimentos por el método de macro-dilución en agar. En este caso, si bien en el rango de concentraciones de CP ensayadas la diferenciación entre NDM-1 salvaje y los mutantes NDM-1 C26A y V-NDM no fue tan marcada, se produjo una reducción en la resistencia otorgada por estas últimas en 100 $\mu\text{g/mL}$ CP mientras que en el caso

de NDM-1 se mantuvo constante respecto de 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CP. Se observó además que esta proteína tiene la capacidad de anular la resistencia conferida por MBLs a concentraciones que aún permiten el crecimiento bacteriano, reduciendo las CIM a valores de la cepa control que contiene el plásmido vacío (pMBLe).

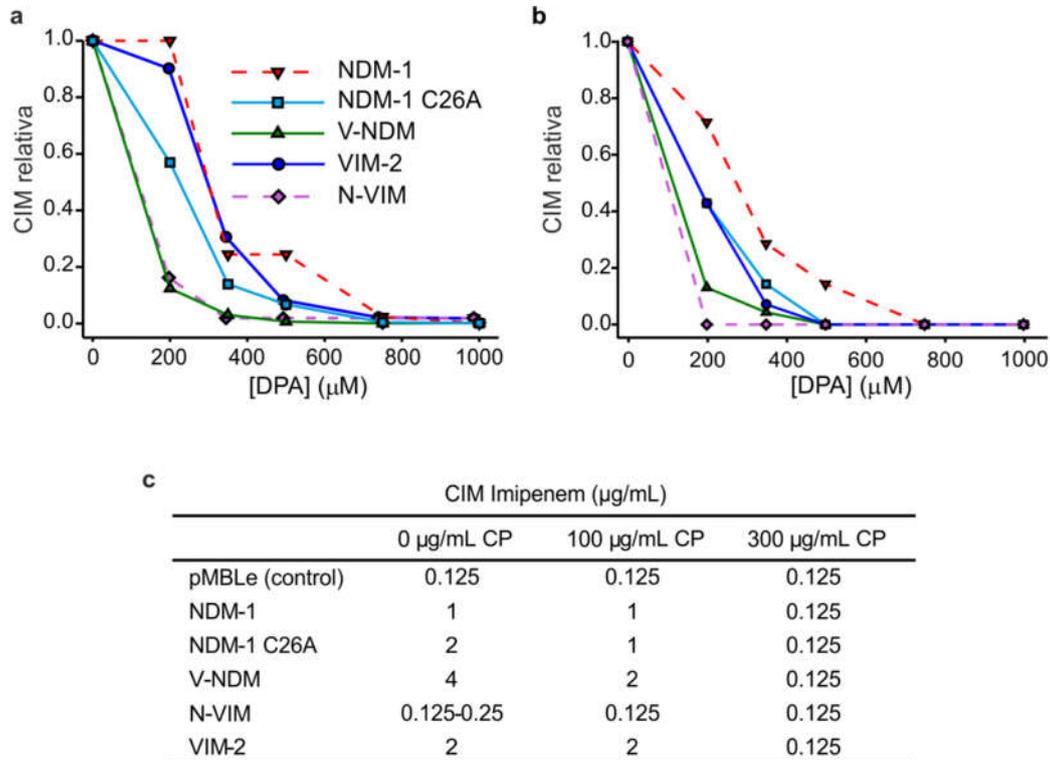


Figura 16. a y b) CIM relativa de cefotaxima (**a**) o imipenem (**b**) para células de *E. coli* DH5 α expresando VIM-2, NDM-1, NDM-1 C26A, V-NDM o N-VIM en medio de cultivo suplementado con las concentraciones indicadas de DPA. **c)** CIMs de imipenem para células de *E. coli* expresando VIM-2, NDM-1, NDM-1 C26A, V-NDM o N-VIM, o que contienen el vector pMBLe vacío, en presencia de distintas concentraciones de calprotectina.

Capítulo 3. Efecto de la disponibilidad de Zn(II) sobre la funcionalidad in-vivo de Metallo-Beta-Lactamasas. Influencia de la localización celular de NDM-1.

a

	CIM Cefotaxima ($\mu\text{g/mL}$)					
	0 μM DPA	200 μM DPA	350 μM DPA	500 μM DPA	750 μM DPA	1000 μM DPA
pMBLe (control)	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
NDM-1	8	8	2	2	0.25	0.06
NDM-1 C26A	8-16	8	2	1	0.125	0.06
V-NDM	64	8	2	0.5	0.06-0.125	0.06
VIM-2	4-8	4-8	2	0.5	0.06-0.125	0.06
N-VIM	0.5	0.125	0.06	0.06	0.06	0.06

b

	CIM Imipenem ($\mu\text{g/mL}$)					
	0 μM DPA	200 μM DPA	350 μM DPA	500 μM DPA	750 μM DPA	1000 μM DPA
pMBLe (control)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.125
NDM-1	2	1-2	0.5-1	0.5	0.25	0.125
NDM-1 C26A	2	1	0.5	0.25	0.25	0.125
V-NDM	4-8	1	0.5	0.25	0.25	0.125
VIM-2	2	1	0.25-0.5	0.25	0.25	0.125
N-VIM	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.125

Tabla 6. CIMs de cefotaxima (**a**) o imipenem (**b**) para células de *E. coli* DH5 α expresando VIM-2, NDM-1, NDM-1 C26A, V-NDM o N-VIM en medio de cultivo suplementado con las concentraciones indicadas de DPA. Los datos corresponden a tres experimentos independientes.

A continuación se procedió a analizar cómo responden los niveles de proteína de estas variantes a una depleción de Zn(II) en el medio de cultivo por agregado de 1000 μM DPA. Al igual que lo observado previamente para las MBLs salvajes, la reducción en la disponibilidad de Zn(II) conduce a una reducción en los niveles de estas enzimas. Sin embargo, las variantes unidas a membrana NDM-1 y N-VIM fueron más estables ante la degradación luego de agregado de DPA que las correspondientes proteínas solubles V-NDM y NDM-1 C26A, y VIM-2, respectivamente (Figura 17-a). La mayor estabilidad de las variantes unidas a membrana es particularmente apreciable en el caso de N-VIM: mientras que la enzima VIM-2 salvaje sufrió una degradación casi total en 10 min luego del agregado de DPA, los niveles de N-VIM se ubicaron alrededor del 50% de la proteína inicial a los 90 min de adición del quelante.

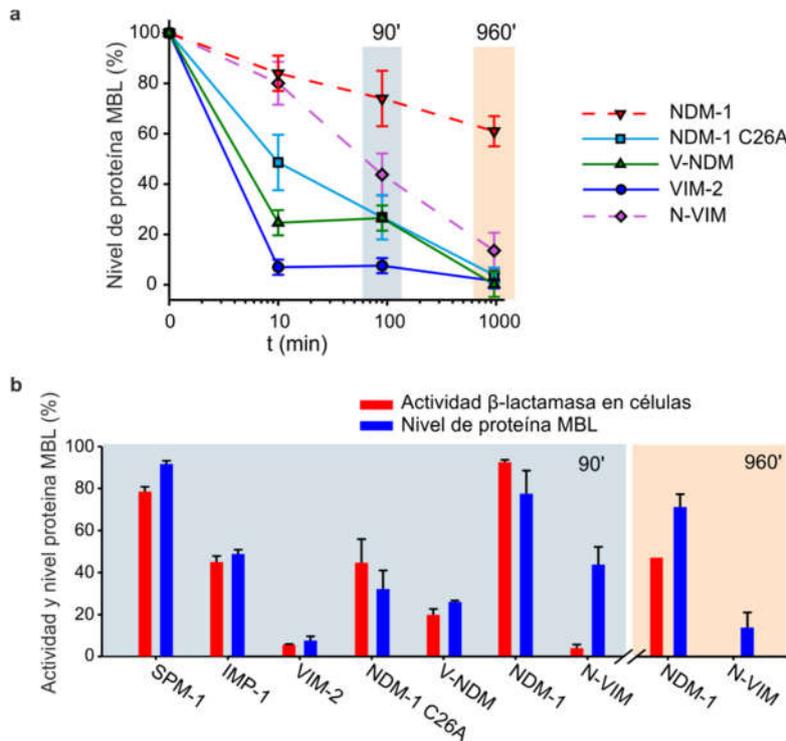


Figura 17. a) Niveles de proteína MBL en periplasma (líneas sólidas) o membranas (líneas punteadas) cuantificados a partir de western blots como función del tiempo luego de la adición de 1000 μ M DPA, normalizados respecto a muestras control no tratadas con DPA. Los datos corresponden a tres experimentos independientes y se presentan como media \pm error estándar **b)** Actividad lactamasa vs imipenem en células totales y niveles periplasmáticos de proteína MBL luego de una incubación de 90 min con 1000 μ M DPA. Los mismos datos se determinaron para las variantes ancladas a membrana de luego de 960 min de incubación. Los datos corresponden a tres experimentos independientes y se presentan como media \pm error estándar

Bajo la suposición de que el anclaje a membrana no modifica la afinidad por Zn(II), esto indicaría que las metalo-beta-lactamasas ancladas a membrana se encuentran más protegidas frente a la proteólisis que las variantes solubles. Es posible que el anclaje a membrana restrinja el acceso de proteasas, y constituya una ventaja evolutiva que incremente la estabilidad cinética de NDM-1 bajo condiciones limitantes de Zn(II).

Los niveles de proteína MBL detectados en el experimento anterior mediante western blot no brindan información sobre el contenido de zinc de las enzimas, dado que tanto las apo-enzimas como las holo-enzimas son detectadas. Dado que las MBL sólo son activas en su forma unida a metal, la actividad β -lactamasa de las mismas puede brindar información sobre su contenido metálico. Se procedió a analizar el impacto de la depleción de Zn(II) en la actividad de las variantes periplasmáticas solubles y ancladas a membrana de las MBLs, midiendo la actividad carbapenemasa de células totales de *E. coli* tratadas con DPA por 90 min o 16 h. Se comparó la actividad carbapenemasa de estos cultivos tratados con DPA con controles no tratados. A los 90

min, la actividad carbapenemasa se redujo en paralelo con los niveles de proteína MBL en la mayoría de los casos (Figura 17-b). Esto sugiere que la proteína MBL detectada en las muestras tratadas con DPA corresponde mayormente a la forma activa, unida a Zn(II). Por lo tanto, las MBL desprovistas de Zn(II) (apo-enzimas) no se acumulan frente a una depleción de metal. En contraste, N-VIM presentó una baja actividad específica, que sugiere acumulación de la forma inactiva libre de metal. Esto puede apreciarse más claramente a las 16h, cuando las variantes unidas a membrana (NDM-1 y N-VIM) mostraron acumulación de las formas apo. Los resultados indican que el anclaje a membrana estabiliza a las MBLs, permitiendo la acumulación de estas proteínas como apoenzimas en el espacio periplasmático protegiéndolas de la degradación.

3.2.4 Modificación del test MHT para mejorar la detección de NDM-1

Existen numerosos ensayos clínicos para detectar la presencia de organismos productores de β -lactamasas o carbapenemasas²⁰. Algunos de ellos se basan en la detección rápida y altamente sensible de los genes responsables de la producción de estas enzimas, utilizando reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos para las clases de mayor prevalencia clínica. En años recientes también se ha avanzado en el desarrollo de métodos para identificar a productores de β -lactamasas a partir de análisis por espectrometría de masa.

Además de estos ensayos que detectan de forma directa la presencia del gen o la proteína responsables de la resistencia, existen tests fenotípicos basados en la detección de la actividad β -lactamasa. Entre ellos se encuentra el método Carba-NP, en el cual una muestra del aislamiento a ensayar se suspende en un medio que contiene un carbapenem y un indicador de pH. La hidrólisis del antibiótico libera H^+ que a su vez producen el viraje del indicador, por lo que la presencia de una carbapenemasa se evidencia como un cambio de color del medio de ensayo.

El test de Hodge modificado (MHT) es un test fenotípico para identificar productores de carbapenemasas, recomendado por el CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio de EE UU) para aislamientos clínicos de Enterobacterias con CIMs elevadas contra estos antibióticos. Para llevar a cabo este ensayo, se esparce en la superficie de una placa una cepa indicadora, sensible a carbapenemes, de modo que generaría un pasto bacteriano en ausencia del antibiótico. En el centro de la placa se ubica un disco de papel conteniendo un carbapenem, y se realizan estrías desde el

borde de la placa hacia el centro con los aislamientos que se desea analizar. Luego de incubar para permitir el crecimiento bacteriano, las estrías correspondientes a las cepas resistentes a carbapenemes habrán crecido hasta proximidades del disco central que contiene el antibiótico, mientras que la cepa indicadora presentará una amplia zona de inhibición alrededor del mismo (Figura 19-a). Las cepas productoras de carbapenemasas liberarán parte de las enzimas al medio circundante produciendo la degradación del antibiótico, lo que permite que el crecimiento de la cepa sensible se aproxime más al disco central a lo largo de las estrías correspondientes a dichos aislamientos que en las zonas alejadas de las mismas. El crecimiento de la cepa indicadora permitido por la protección conferida por la carbapenemasa permite diferenciar a los productores de estas enzimas de aislamientos cuya resistencia se debe a otros mecanismos, como delección de porinas o sistemas de eflujo.

El MHT tiene una alta sensibilidad para la detección de las carbapenemasas de clase A y D, pero presentaba una sensibilidad reducida para la detección de NDM-1, inferior al 50%¹¹⁴. Existía la posibilidad de que la localización en membrana de esta enzima impidiera su liberación desde las células y por lo tanto fuera el origen de la alta tasa de falsos negativos en el test. En colaboración con investigadores del Instituto Malbrán (Buenos Aires, Argentina) se buscó determinar el efecto del anclaje a membrana sobre la detección de MBLs mediante el MHT¹¹⁴.

Se evaluó en primer lugar la localización subcelular de NDM-1 en un conjunto de aislamientos clínicos productores de la enzima: *Providencia rettgeri* 15758, *Serratia marcescens* 17468 y *Enterobacter cloacae* 17464. Se sonicaron células de estos organismos obteniendo un homogenado (H) que luego fue ultracentrifugado para separar proteínas solubles (S) de aquellas de membrana (M). Al analizar estas muestras mediante western blot con anticuerpos Anti-NDM se comprobó que, al igual que en las cepas de laboratorio previamente caracterizadas, la enzima se halla completamente anclada a membrana en estos aislamientos clínicos (Figura 18). *P. rettgeri* presentó menores niveles de expresión totales por lo que para evaluar la localización fue necesario aumentar el tiempo de revelado para tener mayor sensibilidad en la detección.

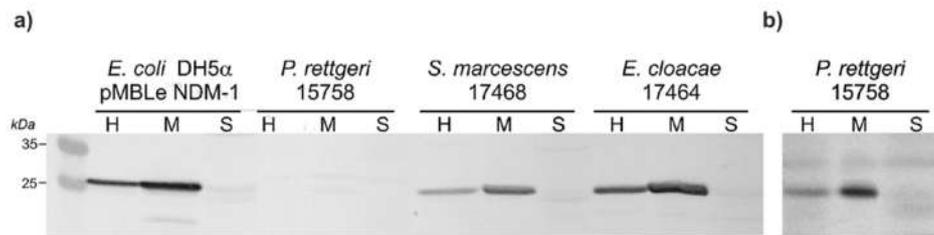


Figura 18. a) Análisis mediante western blot de fracciones de homogenado total (H), membranas (M) y proteínas solubles (S) obtenidas de *E. coli* DH5 α pMBLe-*bla*_{NDM-1} y aislamientos clínicos productores de NDM-1. **b)** Detección extendida mediante western blot de las muestras provenientes de *P. rettgeri* para incrementar la sensibilidad. Adaptado de Pasterán et al., *J Clin Microbiol*, 2016¹¹⁴.

Se analizó la respuesta de *E. coli* DH5 α productoras de NDM-1, NDM-1 C26A, V-NDM, VIM-2 o N-VIM en el test MHT, observándose claramente que las bacterias que expresaban MBLs ancladas a membrana (NDM-1 y N-VIM) daban lugar a falsos negativos en el test, mientras que aquellas que producían las correspondientes variantes solubles (NDM-1 C26A, V-NDM y VIM-2) sí permitían el crecimiento de la cepa indicadora de acuerdo a lo esperado para un productor de carbapenemasas (Figura 19-a). En base a esto, y a las observaciones de que el detergente no-iónico Tritón X-100 es capaz de solubilizar a NDM-1 a partir de las membranas bacterianas manteniendo su actividad lactamasa, los investigadores del Instituto Malbrán desarrollaron una modificación del MHT, en el cual se adiciona al medio de crecimiento este detergente para ayudar a la liberación de las MBLs ancladas a membrana. Esta variación del test se denominó Tritón Hodge Test (THT), y al ser aplicado a las cepas *E. coli* DH5 α productoras del conjunto de MBLs antes mencionado demostró su capacidad de revertir los falsos negativos previamente observados para aquellas que producían enzimas ancladas a membrana (Figura 19-b).

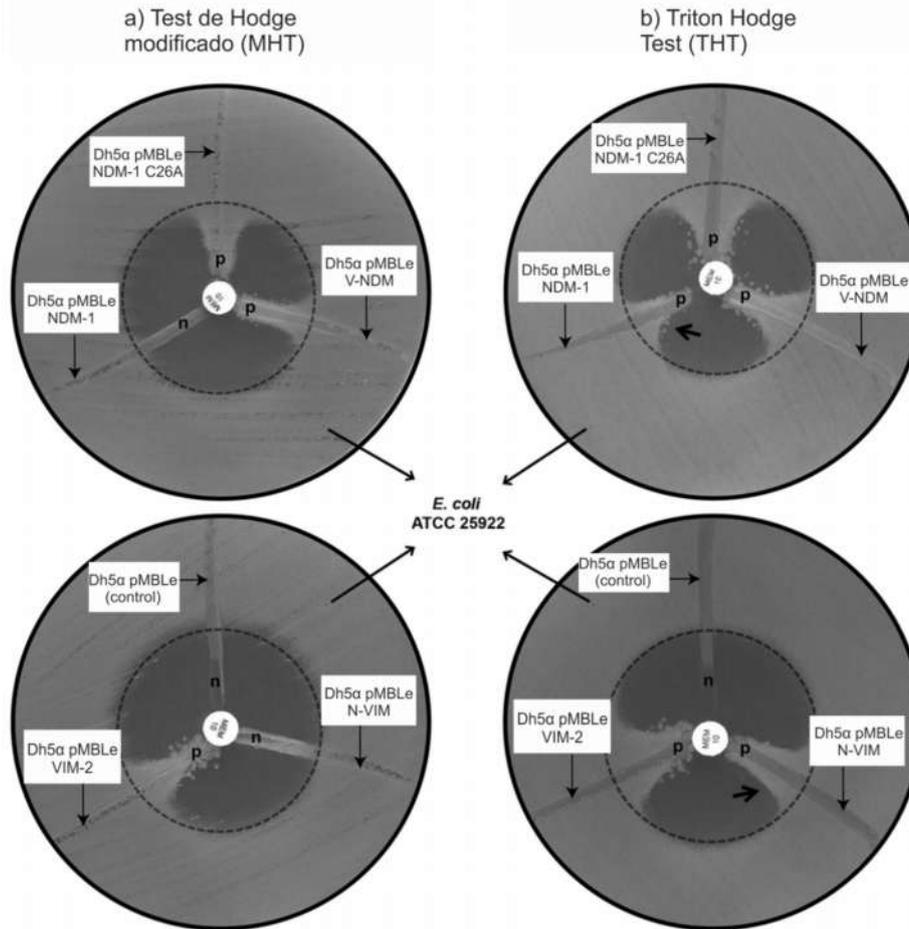


Figura 19. Resultados del test de Hodge Modificado (MHT) (a) y del Tritón Hodge Test (THT) (b) para cepas de *E. coli* DH5 α productoras de NDM-1, NDM-1 C26A, V-NDM, VIM-2 y N-VIM. Se utilizó como cepa control no productora de carbapenemasas *E. coli* DH5 α portando el plásmido pMBLe vacío. Como antibiótico se empleó un disco con 10 μ g de meropenem. Los resultados del test para cada cepa se indican a lo largo de la estría correspondiente a cada una como positivo (p) o negativo (n) de acuerdo a la capacidad de la misma de permitir el crecimiento de la cepa indicadora sensible a carbapenemes (*E. coli* ATCC 25922) sembrada en toda la placa. Adaptado de Pasterán et al., J Clin Microbiol, 2016¹¹⁴.

La evaluación del funcionamiento del THT versus el MHT con un panel de aislamientos clínicos productores de NDM-1 y otras carbapenemasas demostró una amplia mejora en las tasas de detección de NDM-1 (92,5-100% dependiendo del carbapenem utilizado para el test) en el test THT respecto a los pobres resultados observados para MHT (20-32,5%)¹¹⁴. Estas mejoras se obtuvieron además sin afectar la detección de otras MBLs o carbapenemasas del tipo SBL, y sin incrementar la tasa de falsos positivos en organismos resistentes a carbapenemes sin producción de carbapenemasas. Se propuso por lo tanto al THT como una alternativa superadora a la utilización del MHT para detección de carbapenemasas¹¹⁴.

3.3 Discusión

La capacidad de las MBLs de adquirir Zn(II) en el espacio periplasmático resulta esencial para su función como determinantes de resistencia. La carencia de mecanismos de homeostasis en el periplasma determina que la disponibilidad de iones Zn(II) en este compartimiento está directamente ligada a la concentración de metal libre extracelular. Los resultados expuestos en el presente capítulo ilustran cómo la capacidad de las MBLs de proteger frente a antibióticos β -lactámicos se ve condicionada bajo una limitación en la disponibilidad de Zn(II) en el medio de crecimiento.

La resistencia conferida por todas las MBLs analizadas se vio reducida por adición del quelante DPA al medio de cultivo, pero distintas enzimas mostraron diferentes grados de susceptibilidad a esta limitación de metal. Entre las MBLs salvajes estudiadas, VIM-2 y NDM-1 mostraron la más rápida caída en presencia de DPA, mientras que IMP-1 se vio afectada en menor grado, y SPM-1 mostró la mayor tolerancia al quelante. Dado que la adición de calprotectina produjo resultados similares, existe la posibilidad de que las MBLs presenten distinta susceptibilidad a los efectos de la inmunidad nutricional durante una infección. No está claro aún qué influencia tiene este factor sobre el éxito de estas enzimas como determinantes de resistencia.

Se halló además que la caída en la resistencia ante limitación de metal no sólo se debe a la generación de apo-enzimas inactivas, sino al hecho de que éstas son degradadas en el espacio periplasmático. Ensayos de proteólisis limitada realizados con NDM-1 recombinante soluble en sus formas de holo y apo-enzima demostraron la mayor accesibilidad de estas últimas a las proteasas. Estos fueron resultados inesperados, dado que las apo-MBLs purificadas son enzimas estables, y de las cuales se cuenta con diversas estructuras cristalográficas¹¹⁵⁻¹¹⁷. Por otro lado, existe información termodinámica que señala que las formas libres de metal de las MBLs son menos estables que las correspondientes holoenzimas, si bien las temperaturas de fusión de ambas formas suelen ubicarse por encima del rango fisiológicamente relevante^{101,118-120}. Los resultados obtenidos indican que el Zn(II) no sólo cumple un rol catalítico sino que además es requerido para la estabilidad *in vivo* de estas proteínas.

Se generaron mutantes de NDM-1 y VIM-2 de localización celular modificada: las quimeras N-VIM y V-NDM, y el mutante puntual NDM-1 C26A. La ubicación en membrana de la primera, y periplasmática como proteínas solubles de las otras dos demuestra el rol del lipobox en el anclaje a membrana de NDM-1. La localización en

membrana de NDM-1 le permite tolerar mejor la limitación de metal que sus variantes solubles, que son rápidamente degradadas luego del agregado de DPA. La lipidación de NDM-1 puede constituir una estrategia de estabilización de un polipéptido más inestable que otras MBLs como SPM-1. Si bien los mecanismos responsables de esta ganancia en estabilidad *in vivo* no están definidos, la proximidad de la enzima a la superficie de la membrana podría ocultar o dificultar el acceso a sitios susceptibles a proteólisis. Alternativamente, puede que la localización en membrana externa y no el contacto con la bicapa proteja a NDM-1 de las proteasas debido al efecto de la barrera del péptidoglicano. Se ha reportado que los poros presentes en la mureína permiten el pasaje de proteínas de hasta unos 100 kDa¹²¹, mientras que la proteasa principal periplasmática DegP sólo es activa en forma de oligómeros de muy elevado peso molecular, con 12 o 24 protómeros¹²² y con masas totales de 564 y 1128 kDa respectivamente. Se ha identificado a la optimización de la afinidad por Zn(II) como una característica importante durante la evolución de las MBLs^{34,100}. El anclaje a membrana constituye una vía alternativa para aumentar la estabilidad de estas enzimas en condiciones de limitación de Zn(II).

La protección a la degradación para MBLs lipidadas también se observó para N-VIM, que mostró una tasa de proteólisis mucho menor que la observada para la forma soluble de la proteína bajo estas condiciones. Sin embargo, el funcionamiento de esta enzima parece estar afectado por el entorno de membrana, con una reducción de entre 2 y 4 diluciones de sus CIM respecto a VIM-2 soluble. Además a pesar de que el anclaje retrasa su degradación, la enzima pierde fácilmente su actividad y capacidad de conferir resistencia ante agregado de DPA, lo que sugiere que las MBLs requieren adaptaciones para una funcionalidad óptima en contacto con la membrana. Si bien las cepas que producen NDM-1 también presentan menores CIM que aquellas que expresan las formas solubles NDM-1 C26A y V-NDM, las diferencias son menores que en el caso de N-VIM.

Los quelantes metálicos también han sido propuestos como alternativas para contrarrestar la resistencia mediada por MBLs en patógenos clínicos. Se ha demostrado la capacidad del complejo Ca(II)-EDTA como inhibidor de MBLs en un modelo de ratones con neumonía causada por *P. aeruginosa* productora de IMP-1, sin efectos de toxicidad aparente a pesar de su capacidad de captar diversos iones metálicos¹²³. Recientemente un compuesto natural denominado Aspergillomarasmine A (AMA), estructuralmente similar al EDTA, ha demostrado efectividad para restaurar la eficacia del tratamiento con carbapenemes frente a patógenos productores MBLs, tanto en estudios con los microorganismos aislados como en modelos animales de infección¹²⁴.

Notablemente, este compuesto fue efectivo para inactivar VIM-2 y NDM-1 pero mostró menor capacidad de inhibición frente a IMP-1, y menor eficiencia aún contra SPM-1. Esto se correlaciona perfectamente con los datos de CIM en presencia de DPA obtenidos para estas enzimas. La capacidad de SPM-1 de tolerar la acción de AMA plantea la posibilidad de que las demás MBLs puedan evolucionar para optimizar su capacidad de unión a Zn(II) de manera de restaurar la resistencia, lo que significa un importante desafío a la viabilidad del uso de quelantes como estrategia clínica. Si bien estas potenciales MBLs con afinidad mejorada podrían ser contrarrestadas por compuestos con mayor afinidad por metal, la susceptibilidad de metaloproteínas críticas del hospedador a la acción de estos compuestos probablemente presente una cota máxima para la capacidad quelante de los mismos.

Si bien no se han informado hasta el momento estudios detallados para identificar el origen del fenómeno, existen algunos reportes que muestran que la capacidad de otorgar resistencia *in vivo* de las MBLs no se correlaciona completamente con los datos medidos *in vitro* de susceptibilidad a β -lactámicos. En particular, el tratamiento con los carbapenemes ertapenem y doripenem de ratones infectados con *Klebsiella pneumoniae* o *E. coli* productoras de NDM-1 mostró cierta efectividad para reducir la carga bacteriana en el organismo a pesar de la resistencia observada en placas, en contraste de lo observado para infección con una cepa isogénica de *K. pneumoniae* productora de KPC-2¹²⁵. Posteriormente, en un estudio ampliado se volvió a observar este fenómeno para aislados de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* productores de NDM-1 frente a tratamiento con estos carbapenemes en modelos animales, y no para tratamiento con el monobactam aztreonam (no degradado por MBLs) o la fluoroquinolona levofloxacin¹²⁶. Adicionalmente, existen algunos reportes clínicos de tratamiento exitoso de pacientes infectados con productores de NDM-1 utilizando carbapenemes como meropenem o ertapenem¹²⁶. Estas discrepancias entre lo observado *in vivo* y las caracterizaciones de resistencia utilizadas para evaluar las opciones potenciales de tratamiento podrían deberse a que las condiciones de estas últimas no reflejan adecuadamente el ambiente en los sitios de infección. Posiblemente, las condiciones de ensayos de CIM que suelen utilizar medios ricos con niveles de Zn(II) disponible relativamente altos no reproducen las condiciones impuestas por la inmunidad nutricional *in vivo* y el desafío que éstas generan para el funcionamiento de las MBLs.

Capítulo 4. Análisis de los alelos clínicos de NDM

Parte de los resultados presentados en este capítulo fueron obtenidos por la Lic. Luisina Vitor Horen en el desarrollo de su trabajo de Tesina de Licenciatura en Biotecnología, en la que participé como Director Asistente.

4.1 Introducción

4.1.1 Alelos naturales de NDM

Desde la primera identificación de NDM-1 en el año 2009, se han descrito 19 variantes naturales de la enzima¹²⁷. Todos los alelos conservan la señal de lipidación presente en NDM-1 (Figura 20), y la mayoría de los mismos son mutantes simples o dobles respecto a NDM-1, siendo el más divergente el mutante quintuple NDM-10. Adicionalmente, para muchos de los dobles mutantes existen alelos naturales para los dos mutantes simples correspondientes, por ejemplo NDM-15 (M154L A233V) junto con NDM-4 (M154L) y NDM-6 (A233V). Todos los alelos contienen sustituciones respecto a NDM-1 con la excepción de NDM-18 en el cual hay una duplicación de 5 residuos en el extremo N-terminal de la proteína.

```

NDM-1      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-2      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MAGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-3      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-4      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-5      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-6      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-7      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-8      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-9      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-10     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEISPTIDQQMETGDQRFGLV 50
NDM-11     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-12     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-13     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-14     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-15     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-16     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-17     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-18     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
NDM-19     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALM LSGC MPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLV 50
*****

```

Figura 20. Alineamiento de los primeros 50 residuos de las variantes naturales de NDM. Se indica en rojo la secuencia lipobox, y las posiciones conservadas se encuentran marcadas con asteriscos.

Las mutaciones se encuentran distribuidas por toda la estructura de la proteína, la mayoría de ellas en posiciones cercanas a la superficie y alejadas del sitio activo (Figura 21). El residuo más frecuentemente mutado es M154, estando la mutación M154L presente en 9 alelos (el mutante simple NDM-4, los mutantes dobles NDM-5, NDM-7, NDM-8, NDM-12, NDM-13, NDM-15, y los mutantes triples NDM-17 y NDM-19) y M154V en el mutante simple NDM-11. Otras posiciones frecuentemente mutadas son D130 con las sustituciones D130G y D130N presentes en dos alelos cada una (NDM-8 y NDM-14, y NDM-7 y NDM-19, respectivamente), y A233 mediante la

mutación A233V en tres alelos (NDM-6, NDM-15 y NDM-19). Las mutaciones V88L y D95N se encuentran presentes en dos de las variantes de la enzima cada una (NDM-5 y NDM-17, y NDM-3 y NDM-13, respectivamente).

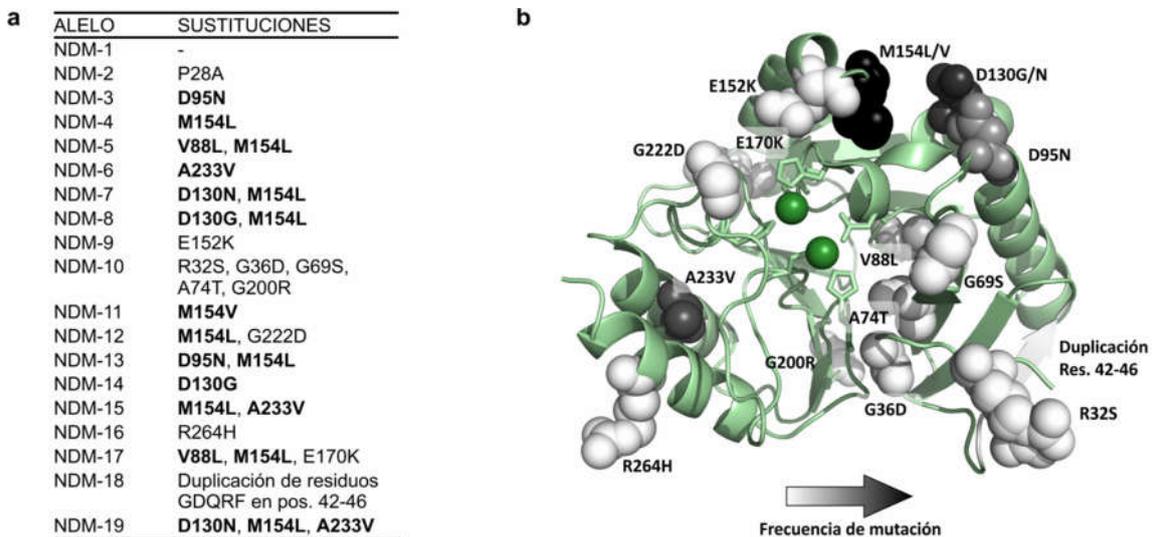


Figura 21. a) Variantes de NDM y sus mutaciones correspondientes respecto a NDM-1. Las sustituciones presentes en dos o más alelos están marcadas en negrita. **b)** Estructura cristalina de NDM-1 (PDB: 4EY2) mostrando como esferas las posiciones de las mutaciones presentes en los alelos de NDM. Las esferas están coloreadas con tonos de blanco al negro de acuerdo a la frecuencia de mutación en esa posición. Los iones Zn(II) del sitio activo se muestran como esferas verdes, y los ligandos metálicos como “sticks”.

Con un grado de identidad de secuencia de entre 98.1 y 99.6%, la familia de enzimas NDM presenta una menor divergencia que las de otras MBLs de alta relevancia clínica como IMP y VIM, indicando posiblemente un origen más reciente de los alelos identificados. El grupo de enzimas VIM presenta una identidad de secuencia de entre 87.7 y 99.6% excluyendo a la variante más divergente VIM-7, y de 72.9-99.6 % si se incluye a la misma¹²⁸. La familia contiene dos ramas principales correspondientes a VIM-1 y VIM-2, con 17 sustituciones de diferencia entre ambas enzimas, y otra en la que se ubica VIM-7. Numerosos alelos de VIM derivan a su vez de los núcleos de VIM-1 o VIM-2 mediante unas pocas mutaciones puntuales. En el caso de IMP, los miembros de la familia presentan entre un 80 y 99.6% de identidad de secuencia, pero su árbol evolutivo es más difuso que el de la familia VIM, con menor agrupación de las proteínas en núcleos de alta similitud¹²⁸. Estas características filogenéticas han llevado a plantear un posible origen polifilético de la familia IMP¹²⁹.

En un estudio recientemente publicado se analizó la prevalencia mundial de distintas MBLs en Enterobacterias y *Pseudomonas*, utilizando detección por PCR y secuenciación de ADN para resolver los alelos de las distintas familias de MBLs¹³⁰. Esta caracterización arrojó que NDM-1 es por amplia diferencia la variante más común a nivel mundial, al estar presente en 60 (83.33%) de los 72 aislamientos analizados

portadores de enzimas NDM. También se caracterizaron 2 aislamientos (2.78%) productores de NDM-16, 6 aislamientos (8.33%) que portaban NDM-7 y 4 (5.56%) a NDM-5. La mayor prevalencia de NDM-1 y la baja divergencia dentro de la familia sugieren que esta variante no fue sólo la primera en ser detectada cronológicamente sino la que dio origen a los demás alelos luego de empezar a diseminarse en ámbitos clínicos.

Muchos de los alelos de NDM han sido detectados en países del Subcontinente Indio y Medio Oriente (Tabla 7), en concordancia con la elevada prevalencia ya descrita para NDM-1 en estas regiones. Adicionalmente, muchos de los alelos detectados en otros países como Alemania y EE UU fueron identificados en muestras de pacientes con vínculos epidemiológicos a dichas zonas geográficas.

Los estudios de caracterización inicial de algunas de estas variantes arrojan incrementos en la capacidad de hidrolizar distintos antibióticos β -lactámicos y de conferir resistencia a los mismos, especialmente a carbapenemes. Sin embargo, las condiciones de los ensayos varían considerablemente entre los distintos trabajos, y existen pocos estudios en los que se analicen múltiples alelos en simultáneo, lo que dificulta comprobar si las mutaciones dan lugar a diferencias marcadas entre las propiedades las variantes.

Un estudio comparativo realizado con los alelos 1 a 8 de NDM no encontró diferencias significativas en la capacidad de los mismos de otorgar resistencia frente a diversos antibióticos β -lactámicos ni en las características cinéticas de las enzimas purificadas¹³¹. Sólo se observaron algunas variaciones en los perfiles de estabilidad térmica determinados por dicroísmo circular de las variantes purificadas, mostrando algunos alelos un incremento en estabilidad respecto a NDM-1. Los extremos de estabilidad térmica correspondieron a NDM-8 ($T_m = 72.1$ °C) y NDM-6 ($T_m = 55.1$ °C), mientras que NDM-1 mostró una $T_m = 59.5$ °C. Cabe destacar que tanto las determinaciones cinéticas como de estabilidad fueron llevadas a cabo con variantes truncadas de los alelos en las que se eliminó el sitio de lipidación, por lo que los resultados no reflejan la posible influencia del entorno nativo de membrana sobre las propiedades de la enzima.

Lactamasa	Mutaciones	Bacteria	País de origen	Código de acceso (GenBank ID)
NDM-1	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i>	India ⁴²	KJ018857
NDM-2	P28A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Egipto ¹³²	JF703135
NDM-3	D95N	<i>Escherichia coli</i>	Australia ¹³³	JQ734687
NDM-4	M154L	<i>Escherichia coli</i>	India ¹³⁴	JQ348841
NDM-5	V88L, M154L	<i>Escherichia coli</i>	Reino Unido ¹³⁵	KX062216
NDM-6	A233V	<i>Escherichia coli</i>	EE UU ¹³⁶	JN967644
NDM-7	D130N, M154L	<i>Escherichia coli</i>	Alemania ¹³⁷	KP826705
NDM-8	D130G, M154L	<i>Escherichia coli</i>	Nepal ¹³⁸	KP265938
NDM-9	E152K	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China ¹³⁹	KC999080
NDM-10	R32S, G36D, G69S, A74T, G200R	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	India ¹⁴⁰	KF361506
NDM-11	M154V	<i>Escherichia coli</i>	India	KP265939
NDM-12	M154L, G222D	<i>Escherichia coli</i>	Nepal ¹⁴¹	AB926431
NDM-13	D95N, M154L	<i>Escherichia coli</i>	Nepal ¹⁴²	LC012596
NDM-14	D130G	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	China ¹⁴³	KM210086
NDM-15	M154L, A233V	<i>Escherichia coli</i>	India	KP735848
NDM-16	R264H	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rusia ¹³⁰	KP862821
NDM-17	V88L, M154L, E170K	<i>Escherichia coli</i>	China ¹⁴⁴	KX812714
NDM-18	Duplicación de residuos GDQRF en posiciones 42-46	<i>Escherichia coli</i>	Alemania	KY503030
NDM-19	D130N, M154L, A233V	<i>Escherichia coli</i>	Canadá	MF370080

Tabla 7. Especies bacterianas y países de origen de los aislamientos en los que se identificaron por primera vez las distintas variantes de NDM. La lista actualizada de variantes fue tomada de BLBD¹⁴⁵ (Beta-Lactamase Data Base, <http://www.bldb.eu/>). Se detallan también los números de acceso para cada variante en la base de datos de secuencias biológicas GenBank del NCBI, y referencian las publicaciones correspondientes a la identificación de las mismas junto a los países de origen. En caso de no existir publicaciones, se obtuvo la información de los países y aislamientos de identificación de cada variante a partir de las entradas en las bases de datos de secuencia.

4.2 Resultados

Desde la primera identificación de NDM-1 en el año 2008 se han aislado al menos 19 alelos de la enzima en ambientes clínicos. El conjunto de variantes clínicas de NDM posee una divergencia de secuencia mucho menor que la observada para otras MBLs, ya que los alelos difieren en una o dos sustituciones de aminoácidos respecto a NDM-1, con excepción del quintuple mutante NDM-10. Esto brinda una oportunidad de analizar la contribución de estas mutaciones a la adaptación de la enzima a patógenos clínicos.

Con el objetivo de evaluar el efecto de estas mutaciones sobre la capacidad de esta β -lactamasa de otorgar resistencia, se construyeron las primeras 16 variantes clínicas de NDM en el vector pMBLe, clonadas con su péptido líder nativo bajo un promotor inducible por IPTG. Al igual que para las caracterizaciones de MBLs descritas anteriormente, todos los alelos fueron clonados con la secuencia StrepTag-II en su extremo C-terminal para facilitar su detección. Los variantes de NDM fueron introducidas en células de *E. coli* DH5 α , permitiendo evaluar el impacto de las sustituciones sobre un contexto isogénico.

4.2.1 Niveles de expresión y capacidad de conferir resistencia de los alelos

La expresión de los distintos alelos clínicos de NDM en células de *E. coli* dio lugar a niveles de proteína lactamasa similares a NDM-1 para la mayoría de los alelos (Figura 22-a). En ningún caso se observó un incremento significativo en los niveles de expresión por sobre de los de esta enzima. Por otro lado, para algunos alelos se observó una reducción en la acumulación de proteína, siendo el caso más marcado para el quintuple mutante NDM-10, con un nivel de expresión de alrededor del 20% del correspondiente a NDM-1. Los alelos NDM-6 (A233V) y NDM-15 (M154L A233V) por su parte, presentaron niveles de proteína de alrededor del 50% de los observados para NDM-1.

A continuación se evaluó la localización celular de las variantes de NDM, realizando un protocolo de extracción de periplasma a partir de células de *E. coli* expresando los distintos alelos. Este fraccionamiento demostró que los alelos se encuentran ausentes de extractos periplasmáticos (Figura 22-b), lo que indica que los mismos poseen la localización de membrana externa esperada por la presencia de la señal de lipidación dentro de su péptido líder. La única excepción fue el alelo NDM-2 (P28A), en el cual una proporción de alrededor del 20% de la proteína lactamasa se hallaba presente en la fracción periplasmática. Esto muestra que mutaciones cercanas a

la cisteína del lipobox que sufre la lipidación (C26) pueden afectar el procesamiento de la enzima.

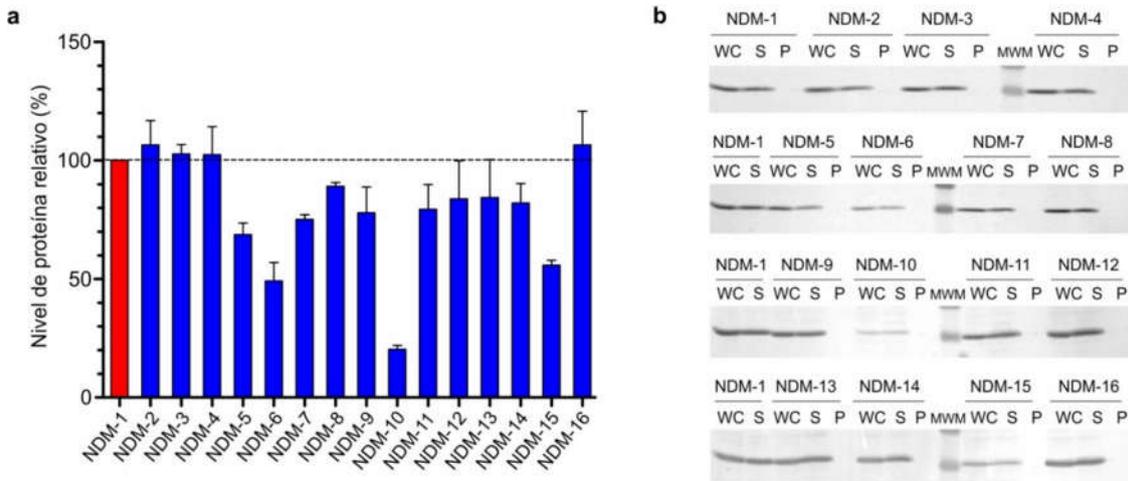


Figura 22. a) Niveles de proteína MBL para células de *E. coli* DH5 β expresando distintos alelos de NDM, cuantificados mediante Western Blot a partir de células totales. Los datos corresponden a tres experimentos independientes y se presentan como media \pm error estándar **b)** Western Blot de fracciones de células de *E. coli* DH5 α expresando distintos alelos de NDM. WC: células totales, S: esferoplastos, P: periplasma, MWM: marcador de peso molecular.

Luego, se procedió a comparar la capacidad de los distintos alelos clínicos de otorgar resistencia. Se realizaron determinaciones de CIM en LB agar para 4 antibióticos β -lactámicos (imipenem, cefepime, piperacilina, y cefotaxima) para células de *E. coli* DH5 α expresando cada variante de NDM. Los niveles de resistencia observados para la mayoría de los alelos se encuentran dentro de una dilución respecto a la cepa expresando NDM-1 (Tabla 8). La excepción fue nuevamente el alelo NDM-10, para el cual se observó una marcada reducción en la capacidad de otorgar resistencia, en concordancia con la reducción en los niveles de expresión de esta variante.

Alelo	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	IMI	CFP	PIP	CTX
NDM-1	8	16	128	64-128
NDM-2	8	16	128	128
NDM-3	8	16	128	128
NDM-4	8	16	128	128
NDM-5	8	16	128	64-128
NDM-6	8	8	64-128	64
NDM-7	8	16	128	128
NDM-8	8	16	128	128
NDM-9	8	16	128	64-128
NDM-10	1	1-2	8	32
NDM-11	8	8	128	128
NDM-12	8	16	64-128	64-128
NDM-13	8	16	128	128
NDM-14	8	16	128	128
NDM-15	8	8	64	64
NDM-16	8	16	128	128
pMBLe	0,25	<0.007	2	0,03

Tabla 8- Valores de CIM de antibióticos β -lactámicos para células de *E. coli* DH5 α productoras de distintos alelos de NDM. Células de *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido vacío (pMBLe) fueron usadas como cepa control no productora de lactamasas. IMI: imipenem, CFP: cefepime, PIP: piperacilina, CTX: cefotaxima.

4.2.2 Efecto de limitación de Zn(II) sobre capacidad de conferir resistencia

Si bien no se observaron diferencias marcadas en la capacidad de otorgar resistencia para la mayoría de los alelos de NDM, cabe destacar que las condiciones estándar utilizadas para la determinación de CIM involucran el uso de medios de cultivo con alto contenido de Zn(II). Se ha reportado que el medio LB posee un contenido de Zn(II) en el orden de 5 a 15 μM ^{34,146}. En cambio, la disponibilidad de Zn(II) se ve fuertemente restringida en los sitios de infección, donde el sistema inmune del hospedador libera grandes cantidades de proteínas quelantes de Zn(II) de alta afinidad tales como la calprotectina. Por lo tanto se decidió evaluar cómo afecta la disponibilidad de Zn(II) a la resistencia conferida por los alelos de NDM mediante la determinación de CIM para cefotaxima en presencia de distintas cantidades de DPA (Figura 23).

Si bien la resistencia conferida por los alelos de NDM se vio gradualmente reducida por el agregado de cantidades crecientes de DPA al medio de cultivo, la respuesta mostró una fuerte variación entre los distintos alelos (Figura 23, Tabla 9). En general, la resistencia conferida por las variantes de NDM se vio menos afectada por la

adición de DPA que la otorgada por NDM-1, con el impacto de la limitación de Zn(II) siendo sólo observable a concentraciones de DPA mayores a 350 μM . Por el contrario, la resistencia otorgada por el quintuple mutante NDM-10 se redujo drásticamente a bajas concentraciones del quelante. Estos resultados demuestran que las mutaciones presentes en los alelos de NDM alteran marcadamente la respuesta de la enzima a condiciones de baja disponibilidad de Zn(II).

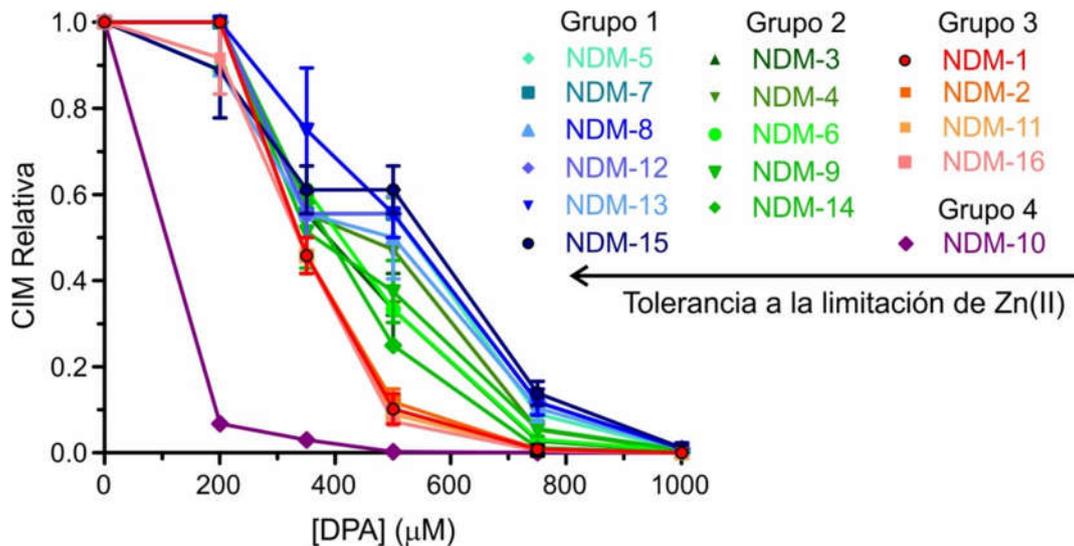


Figura 23. CIMs relativas de cefotaxima para células de *E. coli* DH5 α expresando distintos alelos de NDM, obtenidas en medio LB agar suplementado con las concentraciones indicadas de DPA. Los valores de CIM se presentan como relativos a la CIM en presencia de 0 μM DPA. Los datos corresponden a tres experimentos independientes y se presentan como media \pm error estándar.

Alelo	CIM Cefotaxima (µg/mL)					
	0 µM DPA	200 µM DPA	350 µM DPA	500 µM DPA	750 µM DPA	1000 µM DPA
NDM-1	128	128	32-64	8	1	0.125
NDM-2	128	128	32-64	16	1	0.125
NDM-3	128	128	64	32	4	0.5
NDM-4	128	128	64	64	8	0.5
NDM-5	128	128	64	64	8	0.5-1
NDM-6	64-128	64	64	32	2-4	0.5
NDM-7	128	128	64	64	16	1
NDM-8	128	128	64	64	16	1
NDM-9	128	128	64	32	8	0.5-1
NDM-10	32	2	0.5-1	0.125	0.06	0.06
NDM-11	128	128	32-64	8	0.5-1	0.125
NDM-12	128	128	64	64	16	1
NDM-13	128	128	64-128	64	16	1
NDM-14	128	128	64	32	1-2	0.25
NDM-15	64-128	64	64	64	16	1
NDM-16	128	128	64	8	0.5-1	0.125
pMBLe	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06

Tabla 9. CIMs de cefotaxima para células de *E. coli* DH5α expresando distintos alelos de NDM o conteniendo el vector pMBLe vacío, obtenidas en medio LB agar suplementado con las concentraciones indicadas de DPA. Los datos corresponden a tres experimentos independientes.

Las variantes de NDM pueden clasificarse en cuatro niveles de acuerdo a la dependencia de su capacidad conferir resistencia con la concentración de DPA. Los alelos del Nivel 1 poseen la mayor tolerancia a la limitación de Zn(II): NDM-15 (M154L A233V), NDM-13 (D95N M154L), NDM-12 (M154L G222D), NDM-8 (D130G M154L), NDM-7 (D130N M154L) y NDM-5 (V88L M154L). Los alelos del Nivel 2 por su parte poseen una tolerancia incrementada a la escasez de Zn(II), pero con CIM al menos una dilución menor a las correspondientes a los alelos del Nivel 1. Este conjunto incluye a NDM-14 (D130G), NDM-9 (E152K), NDM-6 (A233V), NDM-4 (M154L) y NDM-3 (D95N). El Nivel 3 incluye a MBLs con un comportamiento similar a NDM-1, y engloba a NDM-16 (R264H), NDM-11 (M154V), NDM-2 (P28A) y NDM-1. Por último el Nivel 4 contiene sólo a NDM-10, siendo el único alelo cuyo rendimiento en presencia de DPA es peor que el de NDM-1.

Los alelos del Nivel 1, con mayor tolerancia a la limitación de Zn(II), son todos dobles mutantes, mientras que los alelos del Nivel 2 son mutantes simples. Esto sugiere que los mutantes dobles se encuentran mejor adaptados para conferir resistencia bajo condiciones similares a las presentes en sitios de infección, y que la acumulación de mutaciones durante la evolución clínica de NDM tiende a optimizar esta característica. La mutación M154L en particular parece ser clave en este aspecto, dado que está presente en todas las variantes del Nivel 1. El efecto beneficioso de la sustitución

dependería de la presencia de Leu en esta posición, ya que NDM-11 (M154V) tiene características similares a NDM-1.

4.2.3 Estabilidad bajo limitación de Zn(II)

A continuación se procedió a analizar qué características de los alelos de NDM son responsables de los distintos fenotipos de resistencia en presencia de agentes quelantes. Dada la distinta tendencia observada anteriormente para diversas MBLs a la degradación inducida por depleción de Zn(II) en el medio de cultivo, se evaluó el efecto de las mutaciones presentes en variantes sobre la estabilidad *in vivo* de la enzima en estas condiciones. Para ello se procedió de forma similar a ya realizado con las MBLs salvajes y las variantes de NDM-1 y VIM-2 con localización celular modificada. Cultivos de *E. coli* expresando cada uno de los alelos de NDM fueron divididos en dos y a una de las partes se le adicionó 500 μ M DPA, mientras que la otra mitad se mantuvo como un control no tratado, y se continuó el crecimiento a 37°C, tomando alícuotas a los 0, 10, 30 y 60 minutos luego del agregado de quelante. La concentración de DPA y la temperatura de incubación posterior fueron modificadas respecto a los experimentos antes realizados dado que la tasa de degradación de NDM-1 era muy baja en las condiciones anteriormente usadas (1000 μ M DPA y 20°C). La mayor velocidad de degradación de NDM-1 esperada a temperaturas más altas posibilitaría identificar más fácilmente a alelos con estabilidad mejorada.

Bajo las condiciones utilizadas, se observó una rápida degradación de NDM-1, con una vida media ($t_{1/2}$) de alrededor de 9 minutos (Figura 24). Este experimento revela que: (1) los distintos alelos presentan una gran variabilidad de tasas de degradación, con $t_{1/2}$ entre 2 y 75 min, y (2) la mayoría de los alelos posee una mayor estabilidad que NDM-1. Las variantes de NDM-1 pueden dividirse en cuatro grupos de acuerdo a sus perfiles de estabilidad. El Grupo 1 consiste en proteínas con una estabilidad marcadamente incrementada, con $t_{1/2}$ de entre 75 y 53 min, e incluye a NDM-15 (M154L A233V), NDM-6 (A233V) y NDM-9 (E152K). Las variantes del Grupo 2 también son más estables a la degradación que NDM-1, pero con incrementos de vida media menos pronunciados. El Grupo 2 consiste de NDM-5 (V88L), NDM-7 (D130N M154L), NDM-12 (M154L G222D) y NDM-13 (D95N M154L), con $t_{1/2}$ entre 20 y 17 min. Los alelos del Grupo 3 son aquellos que presentan una velocidad de degradación similar a NDM-1, con una vida media de entre 13 y 8 min, e incluyen a NDM-2 (P28A), NDM-3 (D130G), NDM-4 (M154L), NDM-11 (M154V) y NDM-16 (R264H). Por último, el Grupo 4 incluye al quintuple mutante NDM-10, con un $t_{1/2}$ menor a 2 min, que es el único alelo que presenta menor estabilidad que NDM-1.

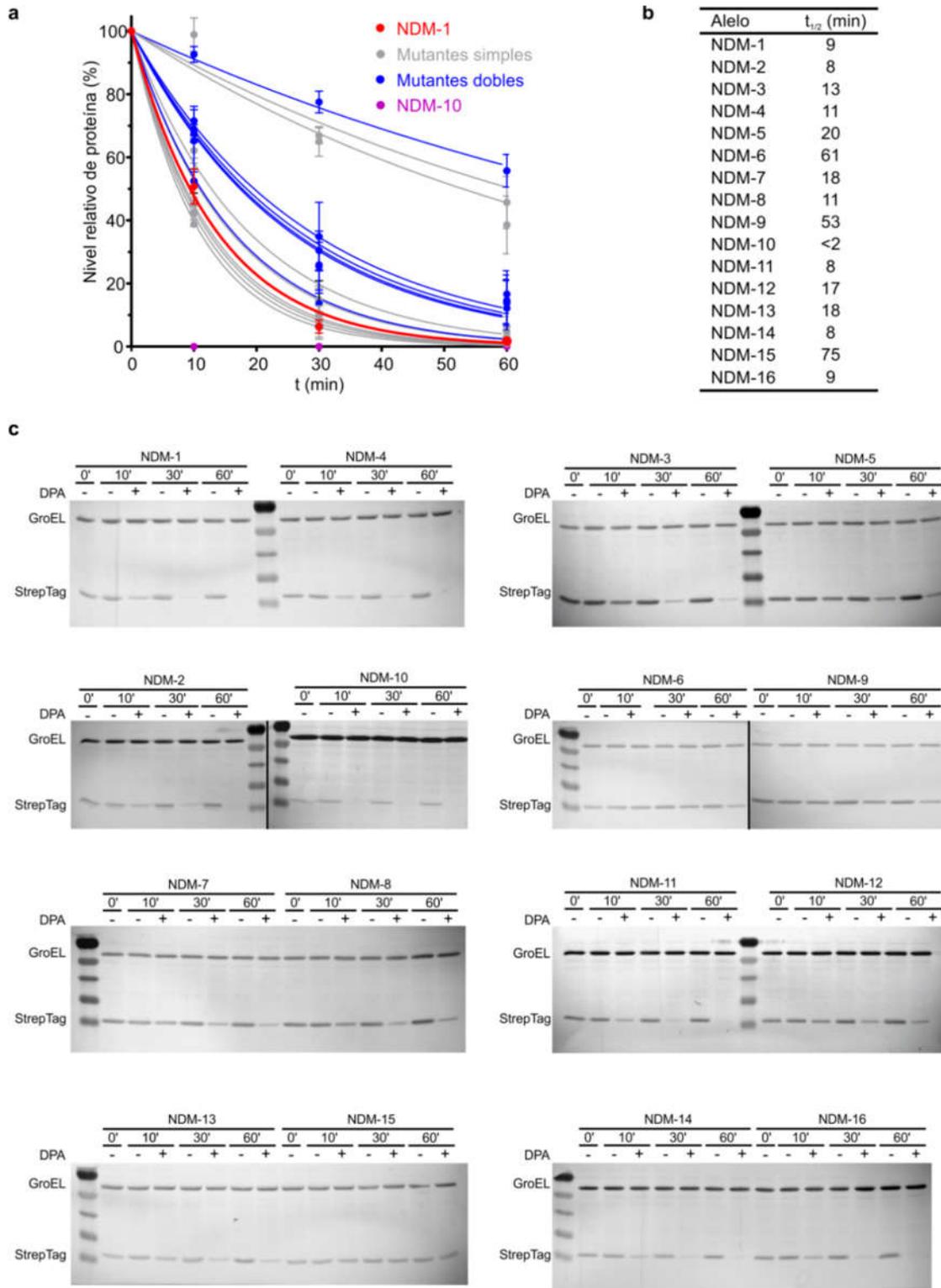


Figura 24. a) Niveles de proteína MBL para alelos de NDM en células de *E. coli* DH5 α , cuantificados mediante western blot (mostrados en **c**) en función del tiempo luego del agregado de 500 μ M DPA. Los niveles se presentan como relativos a los de controles no tratados con DPA, y corresponden a la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron ajustados a un decaimiento exponencial (líneas continuas). **b)** Vidas medias ($t_{1/2}$) para alelos de NDM, obtenidas del ajuste a decaimiento exponencial en **a**). **c)** Western blot representativos, mostrando niveles de proteína MBL para alelos de NDM en células de *E. coli* en función del tiempo luego del agregado de 500 μ M DPA. Se realizó adicionalmente inmunodetección de GroEL como control de carga.

La mayoría de los dobles mutantes mostró una mayor estabilidad que NDM-1, con la excepción de NDM-8 (D130G M154L). Dos mutaciones en particular, A233V y E152K, parecen ser responsables del gran incremento en estabilidad observado para los alelos del Grupo 1.

Si bien se observó una correlación entre los valores de CIM en presencia de DPA y la estabilidad las variantes luego de agregado del quelante, esta característica no explica todos los fenotipos de resistencia observados. Por ejemplo, NDM-15 (M154L A233V) y NDM-6 (A233V) poseen estabilidades similares, pero el primer alelo tiene mayor capacidad de otorgar resistencia bajo limitación de Zn(II). Adicionalmente, NDM-4 (M154L) y NDM-11 (M154V) poseen estabilidades similares a NDM-1, pero la resistencia conferida por NDM-4 es menos susceptible a la reducción en la disponibilidad de Zn(II), mientras que NDM-11 tiene características similares a NDM-1 en este aspecto. Por lo tanto, la mutación M154L parece mejorar la resistencia bajo estas condiciones sin incrementar la estabilidad *in vivo* de la proteína, mientras que la sustitución M154V no parece tener un efecto apreciable.

4.2.4 Evaluación *in vivo* de afinidad por Zn(II)

Existen dos mecanismos distintos que podrían permitir a los alelos de NDM mejorar su capacidad de otorgar resistencia bajo condiciones de limitación de Zn(II). Por un lado, el aumento de la estabilidad de las formas apo de las MBLs permitiría reducir la pérdida de proteína. Por otro lado, una optimización en la afinidad por Zn(II) reduciría la acumulación de apo proteínas de las variantes de NDM. Dado que la mutación M154L no parece alterar la estabilidad de las proteínas, se buscó evaluar el impacto de sustituciones en esta posición en la afinidad por metal de la enzima, comparándola con la mutación A233V. Se analizó NDM-1 junto a los alelos NDM-4, NDM-6, NDM-11 y NDM-15, que contienen sustituciones en dichas posiciones. Para comparar la afinidad por Zn(II) de las enzimas manteniéndolas dentro de su entorno nativo de membrana, se incubaron esferoplastos conteniendo a estos alelos con distintas concentraciones de DPA y se midió la actividad lactamasa contra imipenem remanente luego de la incubación.

En todos los casos, la actividad lactamasa se redujo gradualmente ante incubación con concentraciones crecientes de DPA (Figura 25-a). Dado que los esferoplastos no poseen las proteasas periplasmáticas responsables de la degradación de las MBLs, este experimento elimina la degradación que tiene lugar en el periplasma bajo estas condiciones (Figura 25-b). Por lo tanto, se espera que la pérdida de actividad lactamasa refleje exclusivamente la acumulación de apoenzimas frente al agregado de

distintas cantidades de DPA, permitiendo comparar la afinidad por Zn(II) de los distintos alelos.

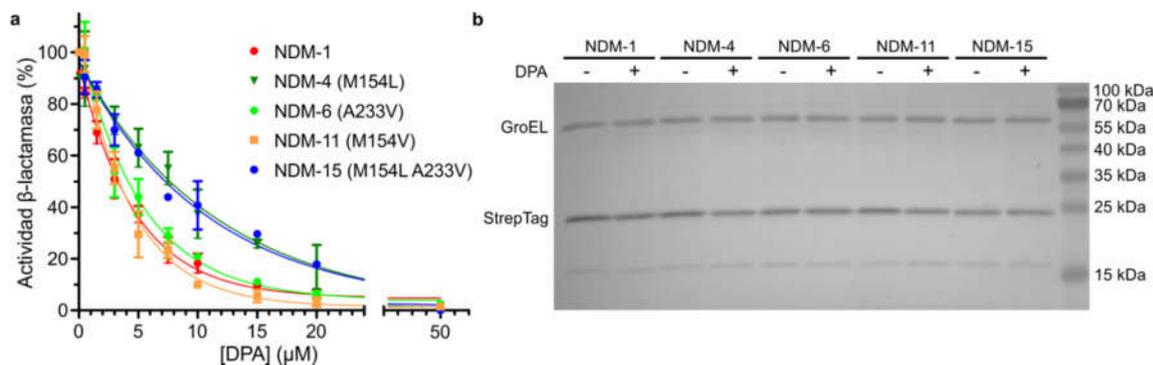


Figura 25. a) Actividad β -lactamasa (relativa a actividad en 0 μ M DPA) de esferoplastos de *E. coli* expresando alelos de NDM, luego de incubación por 10 minutos a 30°C con distintas concentraciones de DPA. Los datos corresponden a tres experimentos independientes y se presentan como media \pm error estándar. **b)** Western blot mostrando niveles de proteína MBL en células de *E. coli* expresando alelos de NDM, luego de incubación por 15 minutos a 30°C con (+) o sin (-) agregado de 5 mM DPA. Se realizó adicionalmente inmunodetección de GroEL como control de carga.

Las variantes NDM-4 (M154L) y NDM-15 (M154L A233V) fueron las que mostraron la menor susceptibilidad a inactivación por DPA, mientras que NDM-6 (A233V) y NDM-11 (M154V) tuvieron un comportamiento muy similar a NDM-1. Esto sugiere que la mutación M154L incrementa la afinidad de unión a Zn(II) de estas enzimas, mientras que la mutación estabilizante A233V no parece alterar esta propiedad.

4.2.5 Competencia entre alelos de NDM en condiciones de limitación de Zn(II)

Dada la distinta tolerancia observada para los alelos de NDM frente a una reducción en la disponibilidad de Zn(II), se decidió comparar de forma directa la aptitud de los mismos para otorgar resistencia bajo estas condiciones. De esta forma se puede evaluar la capacidad de los alelos de competir con otros bajo la presión de selección impuesta por un entorno que simula el de un sitio de infección. Se llevaron a cabo experimentos de competencia entre células de *E. coli* expresando NDM-1, NDM-4, NDM-6 o NDM-15 en presencia de distintas concentraciones de cefotaxima, con o sin adición de quelantes de metal al medio de cultivo. Para poder evaluar las proporciones de cada alelo del par bajo competencia en la población final, los mismos fueron clonados en células de *E. coli* W3110 (fenotipo Lac⁺) y W3110 Δ lac (fenotipo Lac⁻). Los experimentos de competencia fueron realizados mezclando cantidades iguales de células Lac⁺ portando uno de los alelos y células Lac⁻ expresando el otro alelo, en medio de cultivo líquido LB suplementado con distintas cantidades de cefotaxima y quelantes.

Luego de crecimiento durante 16 h, las proporciones finales de cada alelo en la población fueron determinadas a través del fenotipo Lac⁺/Lac⁻ asociado a los mismos mediante recuento de colonias blancas y azules en placas conteniendo X-Gal. Para compensar posibles efectos del fenotipo Lac⁺/Lac⁻ sobre los resultados de la competencia, los experimentos fueron luego repetidos invirtiendo las cepas que portaban cada alelo.

NDM-1 y los mutantes simples NDM-4 y NDM-6 no mostraron diferencias marcadas de aptitud bajo condiciones de elevada disponibilidad de Zn(II), dado que ninguno de estos alelos pareció estar favorecido por sobre los otros en medio de cultivo sin agregado de DPA en el rango de concentraciones de cefotaxima ensayadas (Figura 26-a,b). Por otro lado, tanto NDM-1 como NDM-4 fueron seleccionadas por sobre NDM-15, en concordancia con sus CIM ligeramente más altas para cefotaxima (128 µg/mL vs 64-128 µg/mL) (Figura 26-c,d). Por otro lado, los experimentos de competencia realizados en presencia de 250 µM DPA mostraron resultados radicalmente diferentes. En ellos, los mutantes simples NDM-4 y NDM-6 fueron seleccionados frente a NDM-1, mientras que NDM-4 fue superada por NDM-15. Además, este mutante doble pudo competir con NDM-1 de forma más efectiva que los dos mutantes simples, lo que demuestra que la acumulación de mutaciones en los alelos de NDM lleva a una mejora progresiva en su aptitud.

También se llevaron a cabo experimentos de competencia entre NDM-1 y NDM-15 en presencia de calprotectina. Los resultados obtenidos (Figura 26-d) fueron similares a los observados en los experimentos con DPA, demostrando que se obtiene una diferencia de aptitud similar cuando se simula la limitación de metal realizada por el sistema inmune del hospedador frente a una infección. La concentración de calprotectina usada (250 µg/mL) se encuentra dentro del rango de relevancia fisiológica, con valores reportados de hasta 1000 µg/mL en sitios de infección¹⁴⁷. Los resultados demuestran que alelos de NDM con capacidad de unión a Zn(II) mejorada son capaces de superar a NDM-1 bajo estas condiciones, incluso a concentraciones de antibiótico muy por debajo de la CIM.

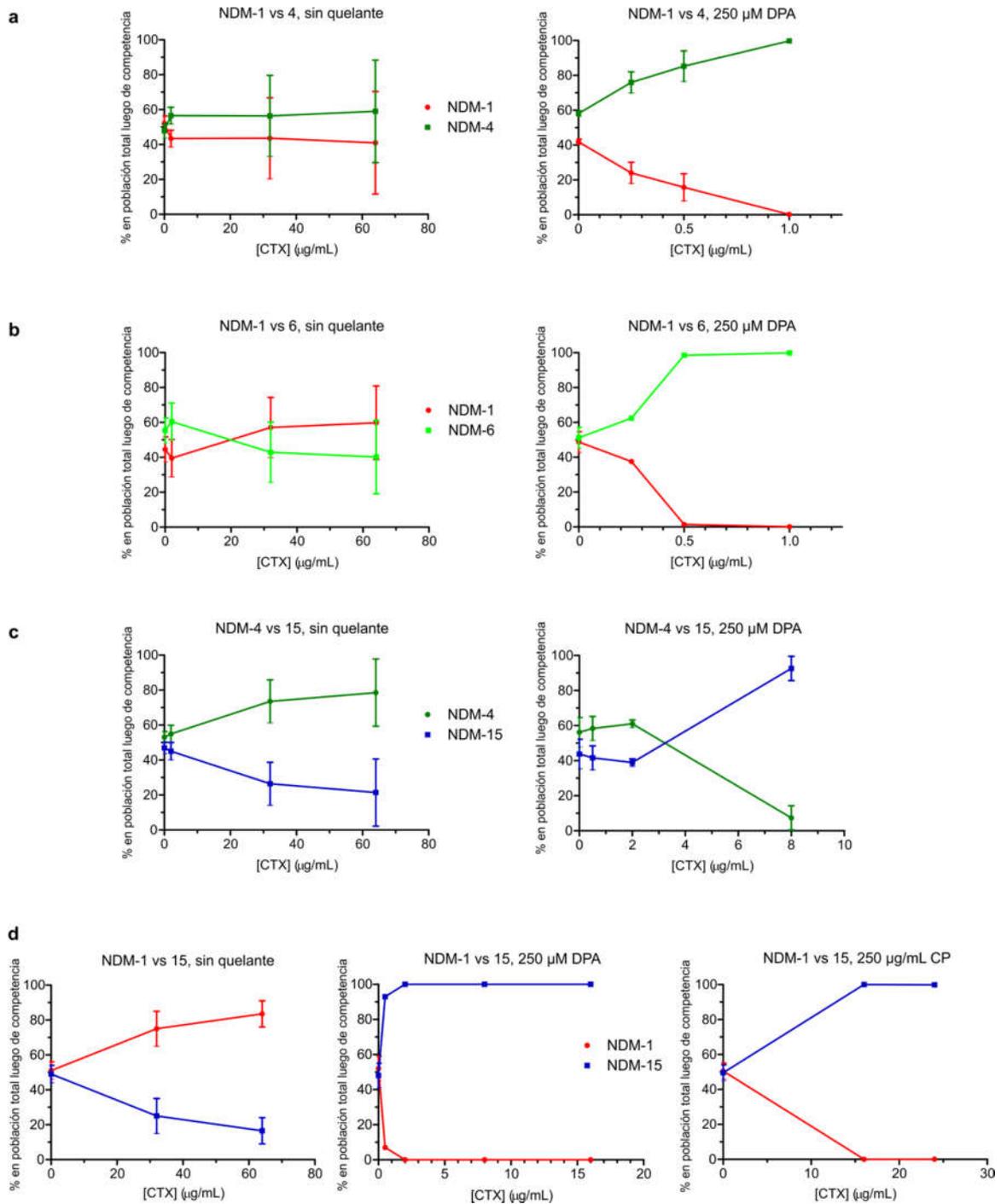


Figura 26- Experimentos de competencia entre células de *E. coli* W3110 expresando distintos alelos de NDM, en presencia de distintas cantidades de cefotaxima en el medio de cultivo, y con o sin la adición de quelantes metálicos. Los datos se presentan como media \pm error estándar de dos determinaciones independientes invirtiendo el fenotipo Lac⁺/Lac⁻ de la cepa portando cada alelo.

4.2.6 Comparación de los alelos de NDM con SPM-1

En la caracterización reportada en el Capítulo 1, SPM-1 demostró ser la MBL con mayor tolerancia a la limitación de Zn(II), tanto en cuanto a su capacidad de conferir resistencia como a su estabilidad proteica bajo estas condiciones. Dada la adaptación observada para muchos alelos de NDM a baja disponibilidad de Zn(II), superando a NDM-1, se buscó evaluar el comportamiento de éstos en comparación con el de SPM-1.

La comparación de las CIM relativas de cefotaxima en presencia de distintos agregados de DPA obtenidas previamente para SPM-1 contra las correspondientes a los alelos de NDM indican que las variantes más tolerantes a la limitación de Zn(II) tienen una capacidad de otorgar resistencia en presencia de este quelante similar a la observada para SPM-1 (Figura 27).

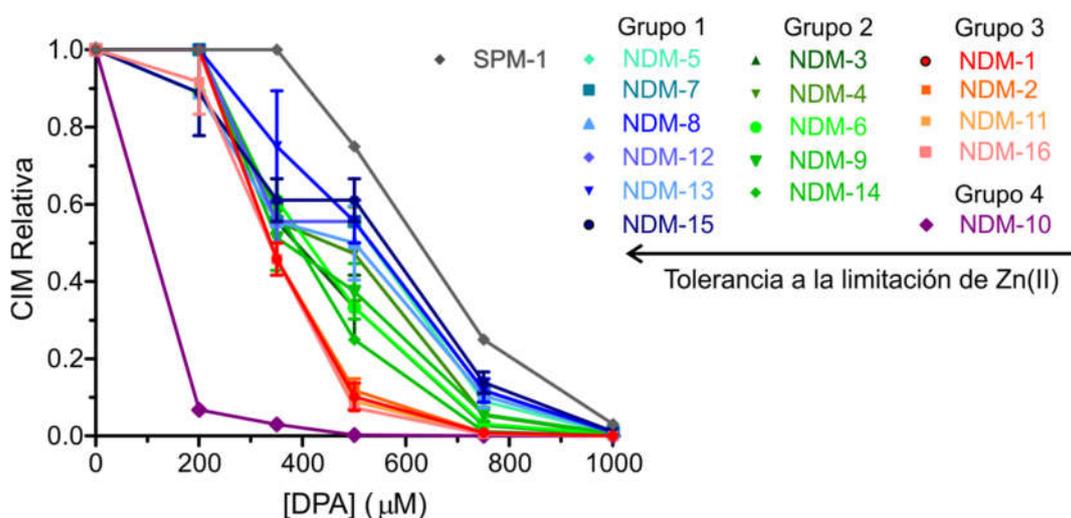


Figura 27. CIMs de cefotaxima para células de *E. coli* DH5α expresando SPM-1 o los distintos alelos de NDM en medio LB agar suplementado con las concentraciones indicadas de DPA.

Se buscó comparar además la tasa de degradación luego de la adición de DPA de SPM-1 con la de los alelos de NDM. Dado que los experimentos realizados en el Capítulo 1 fueron hechos bajo otras condiciones (1000 μ M DPA e incubación a 20°C vs 500 μ M DPA e incubación a 37°C para los alelos de NDM), se realizaron nuevamente los experimentos para SPM-1, detectando mediante western blot los niveles de esta proteína en periplasma en función del tiempo luego de la adición de 500 μ M DPA. Bajo estas condiciones, la velocidad de degradación de SPM-1 continúa siendo más lenta que la observada para NDM-1 (Figura 28). Sin embargo, muchos de los dobles mutantes de NDM presentan estabilidades similares a esta enzima, y el mutante doble NDM-15 (M154L A233V) y los mutantes simples NDM-6 (A233V) y NDM-9 (E152K) son proteolizados a menor velocidad que SPM-1. Por lo tanto, las estabilidades frente a la limitación de Zn(II) de buena parte de los alelos de NDM supera a la de la MBL más

estable previamente observada en este trabajo, demostrando el potencial de adaptación de estas enzimas a través de un número limitado de mutaciones puntuales.

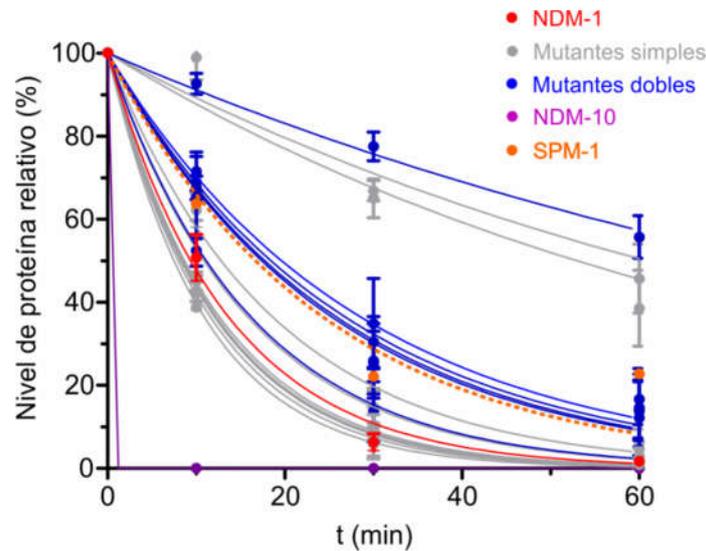


Figura 28. Niveles de proteína MBL para alelos de NDM en células de *E. coli* y SPM-1 en muestras de periplasma, cuantificados mediante western blot en función del tiempo luego del agregado de 500 μM DPA.

4.3 Discusión

Hasta la fecha se han identificado más de 3000 β -lactamasas (inventariadas por Iorga *et al.* en BLDB¹⁴⁵, <http://www.blbd.eu/>), incluyendo SBLs y MBLs, las cuales han sido caracterizados con distintos niveles de profundidad en cuanto a su capacidad de conferir resistencia frente a antibióticos β -lactámicos así como a las propiedades bioquímicas y biofísicas de las proteínas purificadas. Numerosos estudios utilizando variantes naturales o generadas en el laboratorio han buscado además analizar la evolución de estas enzimas y predecir potenciales caminos evolutivos futuros para las mismas. A pesar de ello, no están del todo claras las presiones de selección que determinaron el surgimiento de los alelos caracterizados para las principales familias de MBLs. Si bien los grupos de IMP y VIM presentan numerosas variantes clínicas, el grado de divergencia que existe dentro de estas familias dificulta reconstruir en detalle el proceso de adaptación a partir del inicio de su diseminación en patógenos. Es por ello que la familia de NDM, en la que la mayoría de los alelos difiere en un número muy limitado de sustituciones, brinda una oportunidad única para comprender la evolución de estas enzimas en contextos clínicos.

En concordancia con estudios previamente publicados¹³¹, los alelos de NDM dan lugar a niveles similares de resistencia en medios ricos en Zn(II). En contraste, el

comportamiento de estas variantes difiere marcadamente en condiciones de baja disponibilidad de Zn(II), habiéndose encontrado además que la mayor parte de los alelos de NDM supera la capacidad de NDM-1 de conferir resistencia. Por lo tanto los caminos evolutivos seguidos por estas variantes clínicas parecen mejorar la funcionalidad de la enzima bajo condiciones similares a las esperadas durante la respuesta de inmunidad nutricional, en lugar de incrementar la capacidad hidrolítica de la enzima y la resistencia ante una abundancia del metal.

Se hallaron dos mecanismos distintos que contribuyen a la adaptación de estas enzimas a la baja disponibilidad de Zn(II). Por un lado, la estabilización de las apo-enzimas inestables mantiene los niveles totales de proteína capaces de captar Zn(II), y por el otro la optimización de la afinidad por Zn(II) para mantener los niveles de enzima activa unida a metal. Las mutaciones A233V y E152K conllevan un notable incremento en la estabilidad *in vivo* de la enzima, mientras que la sustitución más frecuente entre los alelos de NDM (M154L) actúa aumentando la afinidad por Zn(II). Estos dos mecanismos pueden actuar de forma independiente, o combinarse sin efectos epistáticos aparentes.

Un grupo de los alelos estudiados, compuesto por NDM-2, NDM-11 y NDM-16, mostró un comportamiento muy similar a NDM-1, sin ventajas aparentes respecto a esta enzima. Puede que estas mutaciones sean neutras desde un punto de vista adaptativo, mero resultado de la deriva génica. Sin embargo, también es posible que reflejen adaptaciones específicas del hospedador y que no sean evidentes al expresar la proteína en *E. coli*. Por ejemplo, NDM-2 ha sido sólo reportada hasta el momento en *A. baumannii*, por lo que podrían existir ventajas asociadas a este alelo en dicho organismo, de forma similar a la adaptación descrita para SPM-1 a su hospedador *P. aeruginosa*¹⁰¹.

Los resultados expuestos en el presente capítulo se condicen con un reporte recientemente publicado en el que se analizan un conjunto de variantes naturales y mutantes recombinantes de NDM¹⁴⁸. Las caracterizaciones llevadas a cabo en dicho estudio indican que la mutación M154L en NDM-4 incrementa la afinidad por Zn(II) de la enzima, observándose un incremento adicional por la incorporación de la sustitución G222D en NDM-12 (M154L G222D). Se propuso en base al análisis de la estructura cristalográfica obtenida para NDM-4 en comparación con NDM-1 que la mutación M154L actúa mediante contacto directo de Leu154 con una de las histidinas ligando de Zn(II), ayudándola a mantener una conformación óptima para la unión de metal, sin observarse mayores alteraciones en la estructura general de la proteína o en las proximidades del sitio activo. Cabe destacar que también es posible que la mutación

M154L ejerza su efecto mediante modificación de propiedades dinámicas de la proteína, alterando las distintas conformaciones que ésta explora en solución, las cuales no se ven adecuadamente reflejadas en la imagen estática provista por las estructuras cristalográficas.

En la comparación de la respuesta a la depleción de Zn(II) de las MBLs de relevancia clínica expuesta en el Capítulo 1, SPM-1 reveló la menor susceptibilidad a la reducción de la disponibilidad de metal en el medio extracelular, así como una de las mayores estabilidades bajo estas condiciones. La comparación de la dependencia de las CIM con la concentración de DPA y de la tasa de degradación luego del agregado de este quelante entre los alelos de NDM y SPM-1 indica que algunas de estas variantes han evolucionado logrando igualar o superar el desempeño de SPM-1. Esto podría resultar relevante para el desarrollo de inhibidores clínicos de las MBLs, ya que mientras NDM-1 resultó sensible a la inactivación por el quelante AMA, SPM-1 no mostró inhibición frente a este compuesto¹²⁴. La adaptación de los alelos de NDM a condiciones de baja disponibilidad de Zn(II) hasta niveles similares a los de SPM-1 probablemente les permita sortear también la acción de AMA y otros compuestos con el mismo mecanismo de acción, lo que remarca la necesidad de desarrollar inhibidores de MBLs específicos que no dependan de la capacidad de quelar iones metálicos.

Los resultados expuestos en este capítulo sugieren diversas vías para continuar la caracterización de los efectos de la evolución en los alelos de NDM. Resultaría importante, para complementar y profundizar los estudios realizados con los alelos en células de *E. coli*, proceder al análisis de estas enzimas en forma purificada. De esta manera se podrían comprobar los efectos propuestos para las mutaciones como M154L y A233V sobre la afinidad y estabilidad frente a proteólisis de las variantes de NDM, así como determinar si las sustituciones presentes en los alelos afectan las propiedades cinéticas de estas enzimas. Además, se podrían generar combinaciones de las sustituciones observadas no presentes en los alelos, como por ejemplo M154L con la mutación estabilizante E152K, y comprobar si existe un efecto aditivo entre las mismas, o se producen interacciones epistáticas, así como explorar si mediante la generación de triples o cuádruples mutantes se pueden obtener variantes con tolerancia aún mayor a la limitación de Zn(II).

Capítulo 5. Análisis de NDM-1 en Vesículas de Membrana Externa

Los resultados presentados en este capítulo fueron obtenidos en colaboración con el Dr. Lisandro J. González.

5.1 Introducción

5.1.1 Vesículas de membrana externa

En 1965 se reportó la presencia de LPS soluble en forma de “lipoglicopéptidos extracelulares” en sobrenadantes de cultivos de mutantes de *E. coli* auxótrofos para lisina, crecidos bajo condiciones de limitación de este aminoácido¹⁴⁹. Más tarde se determinó mediante microscopía electrónica que el fenómeno se debía a la liberación de fragmentos de la membrana externa, que se encontraban formando pequeñas partículas esféricas o vesículas con un núcleo denso rodeado de una única membrana¹⁵⁰. Se comprobó posteriormente que estas partículas, inicialmente denominadas “blebs” y luego Vesículas de Membrana Externa u OMVs, son producidas por las células bajo condiciones normales de crecimiento, y que también son liberadas durante procesos infecciosos.

Las OMVs son vesículas con un diámetro que varía generalmente entre unos 20 y 250 nm, dependiendo de la especie bacteriana¹⁵¹. Se generan a partir de protrusiones de la membrana externa de Gram-negativos, que se escinden liberando de la célula una partícula esférica cerrada, rodeada de una membrana derivada de los constituyentes de la membrana externa y que contiene en su lumen componentes periplasmáticos. Las OMVs están formadas principalmente por lipopolisacárido, fosfolípidos, proteínas de membrana externa y proteínas periplasmáticas. Se ha reportado además en ocasiones la presencia de proteínas de membrana interna y citoplasmáticas, así como ADN o ARN, si bien se desconocen los procesos por los que estos componentes podrían llegar al lumen de las vesículas.

5.1.2 Biogénesis de OMVs y características de OMVs como vía de secreción

La liberación de OMVs constituye una vía secretoria con características y ventajas distintivas, al que algunos autores postulan como el “Sistema de Secreción Tipo o” (SSTo)¹⁵². Las OMVs permiten la secreción conjunta de proteínas solubles en su lumen y unidas a su superficie, junto con componentes insolubles como proteínas de membrana. Además, la membrana de las OMVs ofrece una barrera que impide el

acceso de proteasas extracelulares, comunes en la mayoría de los ambientes de crecimiento bacteriano, a la carga contenida en el lumen. Por último estas vesículas proveen un vehículo para la secreción conjunta de múltiples proteínas, entregándolas de forma concentrada y simultánea a sitios alejados de la célula productora¹⁵³. Esto puede ser resultar especialmente importante cuando se requiere la acción de múltiples factores para llevar a cabo una función, por ejemplo en la liberación un conjunto de adhesinas y factores de virulencia durante la patogénesis.

Adicionalmente, se ha caracterizado en múltiples organismos que la composición de las OMVs no se corresponde de forma directa con la de los compartimientos de periplasma y membrana externa de las que estas derivan¹⁵¹. Por el contrario, existen componentes proteicos o lipídicos que se encuentran presentes en proporciones mayores a las esperadas, o que se ven excluidos de las vesículas. Este proceso, denominado selección de carga, tiene mecanismos que aún no han sido caracterizados, pero su existencia indica que la producción de vesículas no se debe meramente a la liberación al azar de fragmentos de la membrana externa. Un ejemplo de marcada selección de carga es observado en *P. aeruginosa*, donde las OMVs están compuestas casi exclusivamente por LPS de tipo B, que constituye un componente minoritario de la membrana externa¹⁵⁴. *Porphyromonas gingivalis* produce también dos tipos de LPS, neutro y aniónico, y a este último se unen proteasas extracelulares denominadas gingipainas producidas por este organismo. En mutantes que no producen la forma aniónica de LPS, las gingipainas se encuentran ausentes de OMVs, pero simultáneamente se produce la inclusión en las mismas de las proteínas RagA y RagB que normalmente se encuentran excluidas de las vesículas¹⁵⁵.

Hasta el momento no se han caracterizado los mecanismos responsables de la biogénesis de OMVs, si bien se han propuesto diversas alternativas con distintos grados de evidencia empírica¹⁵¹. La producción de OMVs requiere la formación de una protuberancia en la membrana externa, lo que implicaría la existencia de una zona donde los contactos de esta bicapa con el peptidoglicano son más débiles para permitir su curvatura. En este sentido, se ha observado un fenotipo de hipervesiculación (producción incrementada de OMVs) en mutantes deficientes en proteínas que actúan como unión entre la pared celular y la membrana externa, tales como la porina OmpA, Lpp, y el sistema Tol/Pal^{156,157}. Además OmpA está presente en menores niveles en OMVs respecto a la membrana externa, y que Lpp está ausente en las vesículas¹⁵¹. Una contribución adicional a la formación de vesículas sería la existencia de zonas o microdominios en la membrana externa donde se agrupan moléculas capaces de inducir curvatura. Un trabajo reciente demostró la capacidad de enzimas que modifican

el LPS de contribuir a este proceso, analizando la hipervesiculación en cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) que expresan la deacilasa de lípido A PagL¹⁵⁸. La remoción de parte de las cadenas acilo del lípido A, un disacárido unido a ácidos grasos que ancla el LPS a la membrana externa, produce especies de lípido A con forma de cono invertido, que al ubicarse en la membrana externa podrían producir la curvatura adecuada. La expresión de PagL lleva a una producción de OMVs 4 veces mayor, estando el LPS parcialmente deacilado generado por la enzima casi totalmente localizado en las OMVs. Otra posibilidad, no excluyente con las anteriores, es que la acumulación en zonas del espacio periplasmático de proteínas mal plegadas, restos de degradación de péptidoglicano e intermediarios mal localizados del metabolismo del LPS origine una presión de turgencia capaz de curvar la membrana externa y de iniciar el proceso de formación de una vesícula.

Se desconocen también los mecanismos responsables de la fisión de la vesícula para su liberación una vez formada, un proceso que en principio requiere energía en un espacio periplasmático que carece de ATP o GTP. La formación de OMVs tiene en apariencia características comunes a la formación de virus rodeados de membrana como el de la influenza, donde las partículas formadas no tienen dimensiones fijas sino una distribución de tamaños¹⁵³. Por último cabe destacar que es posible que no haya un único mecanismo responsable de la biogénesis de OMVs, sino que la formación de las mismas tenga diferentes roles y maquinarias involucradas en distintos organismos y condiciones ambientales.

Independientemente de los detalles mecánicos de su formación, se acepta en general que la producción de OMVs es un proceso fisiológico que no involucra la lisis celular^{151,152}. Ocurre de forma ubicua, en tanto se cree que todas las especies bacterianas Gram-negativas producen OMVs, y este proceso tiene lugar tanto bajo crecimiento planctónico como cuando las células forman parte de biofilms. En años recientes se ha encontrado además evidencia de producción de vesículas de membrana en organismos Gram-positivos tales como *Staphylococcus aureus* o *Bacillus anthracis*¹⁵¹. La liberación de vesículas rodeadas de membrana también ha sido descrita en otros dominios de la vida además de bacterias. Se han observado la producción de vesículas de membrana en ciertas arqueas, y la producción de exosomas en eucariotas guarda similitudes con la generación de OMVs¹⁵⁹.

La generación de OMVs es un proceso regulado, evidenciado por la existencia de mutaciones que pueden incrementar hasta 100 veces la producción de vesículas sin generar inestabilidad en la membrana externa¹⁶⁰. Se ha demostrado que factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes y condiciones de estrés pueden

modificar la producción de OMVs. El estrés de envoltura celular produce la activación de la vía σ_E de respuesta a estrés, que conduce a un incremento en la producción de OMVs¹⁶¹. Se ha caracterizado que mutantes con actividades σ_E constitutivas aumentadas también tienen un fenotipo de hipervesiculación. Las OMVs parecen constituir una vía de eliminación de proteínas mal plegadas del espacio periplasmático, y la delección de la proteasa/chaperona periplasmática DegP conduce a un aumento en la producción de OMVs, las cuales están enriquecidas en proteínas mal plegadas¹⁶².

5.1.3 Roles biológicos de OMVs

La capacidad de las OMVs de portar conjuntos de proteínas con actividad biológica permite que las mismas se encuentren involucradas en una amplia variedad de procesos. Las OMVs pueden actuar en la adquisición de nutrientes, habiéndose observado empaquetamiento preferencial de proteasas y glicosilasas en las mismas, que podrían liberar nutrientes degradando moléculas a distancia del organismo productor¹⁵¹. Las OMVs de *Neisseria meningitidis* y *P. gingivalis* están enriquecidas en proteínas involucradas en la captación de hemo, y es posible que estén involucradas por lo tanto en la adquisición de hierro, aunque se desconoce cómo incorporaría luego la bacteria el metal^{163,164}. Recientemente se describió la producción de abundantes cantidades de OMVs por parte de *Prochlorococcus*, las cianobacterias más abundantes en el océano, que pueden ser utilizadas como fuente exclusiva de carbono por bacterias heterótrofas marinas¹⁶⁵. Por otro lado, se cree que *Myxococcus xanthus* utiliza OMVs en la depredación de otras bacterias, al haber enriquecimiento de enzimas hidrolíticas y antibióticos en las grandes cantidades de vesículas generadas por este organismo¹⁶⁶, que además son capaces de lisar a células de *E. coli* y *Pseudomonas*. Por último se ha mostrado que las OMVs portadoras de enzimas hidrolíticas pueden actuar como “bienes comunitarios”, generando nutrientes que benefician tanto al organismo productor como a otras especies bacterianas. Este es el caso para las OMVs producidas por miembros del género *Bacteroides*, miembros de la microflora intestinal humana, las cuales portan enzimas que degradan polisacáridos, siendo los productos generados consumidos también por otros organismos que no son capaces de tal hidrólisis¹⁶⁷.

Se ha descrito que las OMVs son un constituyente importante de la matriz extracelular que rodea a las bacterias que se encuentran formando biofilms^{168,169}. La señal de quórum sensing de *P. aeruginosa* denominada PQS es altamente hidrofóbica, y un 80% de la misma es secretada en OMVs¹⁷⁰. Por ello, la comunicación establecida por esta vía que estimula la producción de biofilms parece ocurrir principalmente a

través de OMVs. Las OMVs producidas por *Porphyromonas gingivalis* contienen adhesinas que ayudan al establecimiento de biofilms mixtos en la placa dental¹⁶⁹. De forma similar, la adición de OMVs purificadas a un cultivo de *Helicobacter pylori* promueve la formación de biofilms *in vitro*¹⁷¹, revelando un posible rol de las vesículas en el establecimiento de la matriz extracelular del biofilm y en el contacto entre células.

Las OMVs también pueden contribuir de forma directa a la supervivencia bacteriana bajo condiciones de estrés o exposición a antibióticos. La hipervesiculación en un mutante de *E. coli* incrementó su resistencia al fago T4, presuntamente debido a la presencia de grandes cantidades de “membranas señuelo” a través de las OMVs, las cuales contienen el receptor del virus pero no son capaces de dar lugar a un ciclo de infección¹⁷².

Las OMVs también cumplen un rol destacado durante la patogénesis. Se ha documentado ampliamente la producción de OMVs por parte de bacterias durante procesos de infección, y que las condiciones de estrés y otros factores presentes en el medio dentro del hospedador llevan en muchos casos a una mayor liberación de vesículas^{173,174}. En *S. Typhimurium* el sistema de señalización PhoP/PhoQ responde a las condiciones presentes durante el crecimiento intracelular del patógeno e incrementa la producción de OMVs mediante la expresión de la proteína PagL¹⁵⁸. Se ha demostrado la capacidad de las OMVs de ser internalizadas en células eucariotas por múltiples vías, lo que las convierte en una eficiente ruta de entrega de toxinas y otros factores de virulencia, tales como la toxina Shiga (STX) y citolisina A (ClyA) de *E. coli*¹⁷⁵. Además de ser secretada en forma libre, la toxina vacuolizante VacA es liberada por *H. pylori* en OMVs, las cuales son internalizadas por las células del epitelio gástrico, tanto en cultivo de células como *in vivo*¹⁷⁶. Asimismo, la toxina Cif producida por *P. aeruginosa* es liberada en OMVs, y produce la degradación del canal transmembrana de cloruro CFTR, reduciendo la secreción de cloruro por las células del hospedador y por tanto la eliminación del patógeno por mucosidad¹⁷⁷. Se han detectado OMVs en sangre y otros fluidos biológicos de pacientes o animales infectados con *Neisseria meningitidis* y *Borrelia burgdorferi*, demostrando la capacidad de las mismas de migrar grandes distancias desde el sitio de infección¹⁵².

También se ha descrito la presencia de ADN y ARN, junto con otros componentes citoplasmáticos, en OMVs¹⁷⁵. Si bien se desconocen los mecanismos que permitirían a estos componentes cruzar la membrana interna, se ha reportado que el ADN empaquetado en las vesículas tiene la capacidad de actuar en transferencia génica horizontal. Se ha reportado que las OMVs producidas por la cepa patogénica *E. coli* O157:H7 tienen la capacidad de transferir los genes codificantes para toxinas Shiga *stx1*

y *stx2* a la cepa de laboratorio *E. coli* JM109¹⁷⁸. En casos como *A. baylyi* la eficiencia de transformación de las células receptoras disminuye drásticamente si se eliminan componentes del sistema de transformación natural, lo que indicaría que la captación del ADN contenido en OMVs por parte de este organismo compartiría parte de su mecanismo con la adquisición de ADN libre ambiental¹⁷⁹. Estas OMVs de *A. baylyi* también fueron capaces de transferir ADN a células de *E. coli* DH5 α , evidenciando el potencial de las vesículas para transferencia génica entre especies¹⁷⁹. OMVs purificadas de *P. aeruginosa* PAO1 contenían ADN plasmídico, pero no fueron capaces de transferirlo a la propia cepa ni a *E. coli* DH5 α , lo que sugiere que no todas las OMVs tienen capacidad de transferir material genético¹⁸⁰. Por último, se ha demostrado también la presencia de ARN pequeños en OMVs de *P. aeruginosa*, los cuales pueden internalizarse a células del hospedador por fusión de la OMV con la membrana de estas, donde pueden silenciar genes y actuar como inmunomoduladores de la respuesta al patógeno¹⁸¹.

5.1.4 OMVs y resistencia a antibióticos

Dado el variado conjunto de roles propuestos o demostrados para las OMVs en distintos aspectos de la fisiología bacteriana, no resulta sorprendente que también se las encuentre asociadas a la resistencia a antibióticos. De forma similar a lo detallado anteriormente para virus líticos, las OMVs pueden otorgar protección pasiva frente a compuestos dañinos, absorbiéndolos y titulando la cantidad que llega a las células productoras. Por ejemplo, *Pseudomonas syringae* mostró mejor tolerancia ante el agregado de péptidos antimicrobianos como melitina, pero no frente a estreptomycin, cuando se adicionaron al medio OMVs purificadas producidas por esta bacteria¹⁸². Las OMVs también mostraron capacidad de protección frente a compuestos tales como la colistina o polimixina B en *E. coli*¹⁷². Posiblemente esto se deba a que las drogas hidrofóbicas y con actividad contra membranas como melitina y colistina se adsorban a la membrana de OMVs y se vean tituladas parcialmente en presencia de las mismas, pero los compuestos solubles como estreptomycin no presenten tal interacción.

Las vesículas también pueden portar enzimas que inactivan al antibiótico, ejemplificado en numerosas instancias de asociación de β -lactamasas a OMVs. Aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística secretan la β -lactamasa codificada en sus cromosomas dentro de OMVs¹⁸³. El patógeno *Stenotrophomonas maltophilia* produce OMVs que contienen la MBL L1 y la SBL L2, habiéndose hallado además que la exposición a carbapenemes estimula fuertemente la producción de estas

vesículas¹⁸⁴. La membrana que rodea a las vesículas puede proteger a las β -lactamasas contenidas en ellas de proteasas extracelulares e incluso de la inactivación por parte de anticuerpos contra la enzima producidos por el hospedador, como demostró para la β -lactamasa secretada en OMVs por *Moraxella catarrhalis*¹⁸⁵. Los beneficios otorgados por la actividad lactamasa en vesículas pueden beneficiar a otras bacterias además del productor de las mismas. Las OMVs generadas por *Bacteroides thetaiotaomicron* contienen la cefalosporinasa cromosómica de clase A BtCepA, y son capaces de proteger de cefalosporinas a células de *Salmonella Typhimurium* y *Bacteroides brevis* sensibles a las mismas por adición de las vesículas purificadas a cultivos¹⁸⁶. Este mismo mecanismo se propuso para la protección observada con sobrenadantes de cultivos de *E. coli* productora de lactamasas sobre *S. Typhimurium* sensible a β -lactámicos¹⁸⁷.

La potencialidad de las OMVs de actuar en procesos de transferencia génica horizontal también ha sido propuesta como una vía para la diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos. Se ha demostrado la presencia de la enzima OXA-24 y su gen codificante *bla*_{OXA-24} en OMVs purificadas de aislados de *A. baumannii* resistentes a carbapenemes. El ADN contenido en dichas vesículas mostró capacidad de transformar a células de otra cepa *A. baumannii*, adquiriendo éstas el gen de resistencia⁸⁶. Vesículas provenientes de *Neisseria gonorrhoeae* también demostraron capacidad de transferir plásmidos R conteniendo genes de resistencia a penicilinas hacia cepas de esta bacteria sensibles a antibióticos β -lactámicos¹⁸⁸.

5.2 Resultados

5.2.1 Purificación y caracterización de OMVs de *E. coli*

Las vesículas de membrana externa (OMVs) son producidas por todas las bacterias Gram negativas, tanto patógenas como no patógenas, y tanto bajo condiciones de crecimiento planctónico así como cuando se encuentran asociadas a superficies¹⁵³. Se han descrito múltiples instancias de asociación de OMVs a procesos de patogénesis y resistencia a antibióticos¹⁸². Entre ellas, se ha reportado que OMVs producidas por distintas especies portan β -lactamasas y son capaces de degradar antibióticos. A pesar de ello, no existía información respecto a si NDM-1 es liberada en vesículas o se encuentra excluida de las mismas. Además, dado que las OMVs se están delimitadas por una bicapa derivada de la membrana externa, resultaba interesante la posibilidad de que la asociación de NDM-1 la misma mediante su anclaje lipídico pudiera alterar la capacidad de la enzima de ser secretada en estas vesículas.

Para evaluar estas posibilidades, se realizaron purificaciones de OMVs a partir de cultivos de *E. coli* DH5 α pMBLe-*bla*_{NDM-1}. Se obtuvieron sobrenadantes libres de células mediante centrifugación de estos cultivos, que luego fueron filtrados a través de una membrana con poros de 0,45 μ m para eliminar las células remanentes. Las OMVs presentes en la suspensión filtrada fueron luego precipitadas con sulfato de amonio, y resuspendidas en un volumen menor. Luego de eliminar por diálisis el sulfato de amonio remanente, se depositó a la suspensión sobre igual volumen de sacarosa 30% y se la ultracentrifugó, colectando las OMVs del pellet formado. Las vesículas obtenidas se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de muestras con tinción negativa con acetato de uranilo, en el servicio de microscopía de LANAIS-MIE (Facultad de Medicina – UBA). Las OMVs obtenidas poseían la morfología y tamaño esperados (Figura 29-a), coincidentes con observaciones publicadas para vesículas purificadas a partir de *E. coli*¹⁸⁹, y carecían de potenciales contaminantes tales como fimbrias o flagelos. Adicionalmente, se observó que el patrón de proteínas en SDS-PAGE de estas muestras de OMVs era similar al de la membrana externa, y que las vesículas carecían de contaminación de componentes citoplasmáticos, evidenciada por la ausencia de GroEL (Figura 29-c). El análisis de las preparaciones de OMVs por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa arrojó que las muestras son homogéneas, sin evidenciarse separación de distintos componentes a lo largo del gradiente (Figura 29-b). Este conjunto de observaciones permitió verificar la calidad de las preparaciones de vesículas obtenidas.

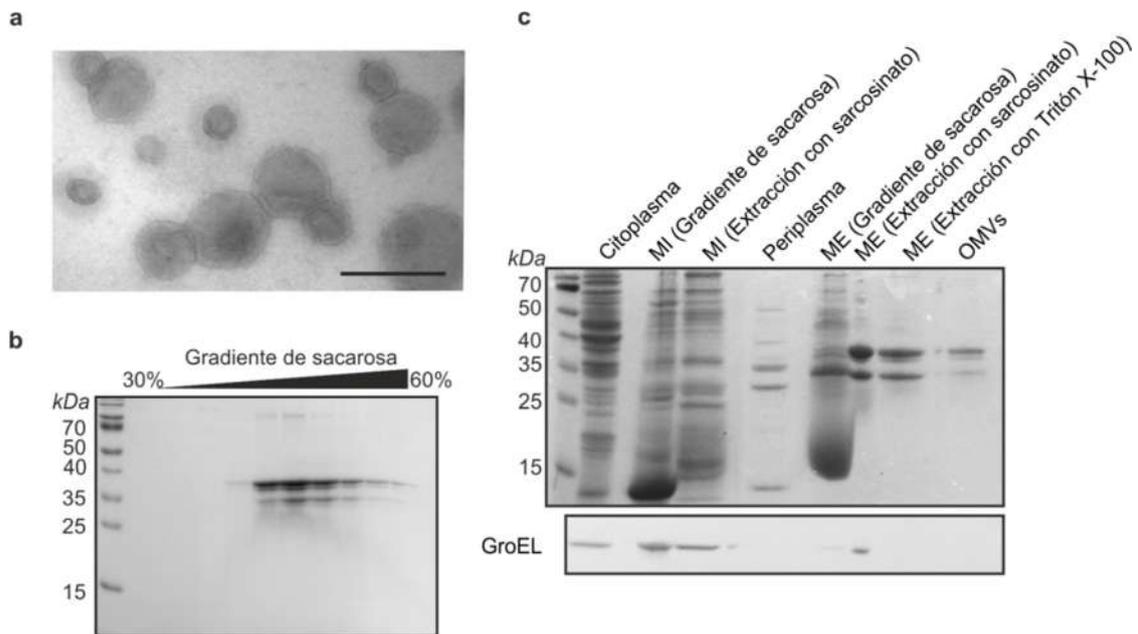


Figura 29. **a)** Microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa de OMVs obtenidas de células de *E. coli* DH5α expresando NDM-1. Barra de escala: 100 nm. **b)** SDS-PAGE de fracciones obtenidas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de OMVs provenientes de células de *E. coli* DH5α expresando NDM-1. **c)** Análisis por SDS-PAGE y western blot de OMVs y fracciones subcelulares obtenidas de células de *E. coli* DH5α expresando NDM-1. MI: membrana interna, ME: membrana externa.

5.2.2 Efecto de la localización celular de MBLs sobre secreción a OMVs

Para analizar si NDM-1 es secretada en OMVs y si su localización en la membrana externa afecta su inclusión en las mismas, se purificaron vesículas de membrana externa de cultivos de *E. coli* DH5α que expresaban NDM-1 salvaje, la enzima soluble NDM-1 C26A y el mutante N-VIM, anclado a membrana. Se compararon los niveles de proteína presentes en células totales y OMVs de dichas cepas, detectados mediante western blot. A pesar de que los niveles de expresión de ambas proteínas en células totales eran muy similares, la cantidad de NDM-1 presente en OMVs fue mucho mayor que la de NDM-1 C26A (Figura 30-b). Estas observaciones sugieren que la localización de NDM-1 en la membrana externa favorece su inclusión dentro de OMVs respecto a la enzima periplasmática soluble. Sorprendentemente, N-VIM no fue detectada en OMVs, indicando que la lipidación y anclaje a membrana externa no son condición suficiente para determinar la secreción de una MBL en estas vesículas. Este fenómeno podría implicar la existencia algún mecanismo de selección de carga que regula el contenido de las OMVs producidas en *E. coli* y que conduce a la exclusión de N-VIM. La existencia de selección de carga ha sido reportada previamente

en múltiples especies bacterianas^{151,155}, si bien se desconocen los mecanismos responsables.

Se analizó la orientación de NDM-1 dentro de las vesículas mediante tratamiento de las mismas con proteinasa K. Mientras que NDM-1 no se vio afectada en las vesículas intactas, la proteína fue rápidamente degradada cuando las vesículas se lisaron por agregado del detergente Tritón X-100 (Figura 30-c). Esto indica que NDM-1 se encuentra orientada hacia el interior (lumen) de las vesículas, de acuerdo a lo esperado para una proteína situada en la cara periplasmática de la membrana externa.

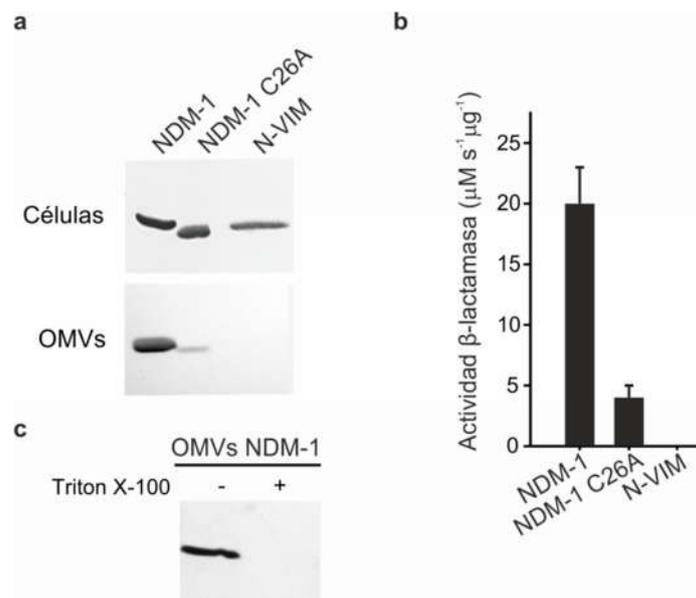


Figura 30. a) Determinación mediante western blot de niveles de MBL en células totales de *E. coli* expresando NDM-1, NDM-1 C26A o N-VIM y OMVs purificadas de los sobrenadantes de dichos cultivos. Se sembraron para cada tipo de muestra cantidades iguales de proteína total. **b)** Actividad β -lactamasa contra imipenem de OMVs purificadas a partir de células de *E. coli* expresando NDM-1, NDM-1 C26A o N-VIM. Los datos corresponden a tres experimentos independientes y se presentan como media \pm error estándar **c)** Western blot de OMVs de *E. coli* expresando NDM-1 luego de incubación con proteinasa K, con o sin tratamiento previo con Tritón X-100.

Se realizaron además medidas espectrofotométricas de actividad lactamasa de preparaciones de OMVs contra imipenem, comprobándose que las OMVs obtenidas de estas cepas productoras de MBLs poseen actividad lactamasa (Figura 30-b). La degradación del sustrato β -lactámico está posibilitada por las porinas derivadas de la membrana externa presentes en las vesículas, que permiten su acceso al lumen donde se encuentran las MBLs. Para cantidades equivalentes de vesículas, determinadas de acuerdo a su contenido total de proteína, aquellas obtenidas de células productoras de NDM-1 poseían una actividad lactamasa 5 veces mayor que las provenientes de células que expresaban el mutante soluble NDM-1 C26A. Mientras tanto, las vesículas obtenidas de células que producían N-VIM no mostraron actividad lactamasa

detectable, en concordancia con los niveles de proteína observados previamente mediante western blot.

5.2.3 Efecto de disponibilidad de Zn(II) sobre actividad β -lactamasa de OMVs

Luego se procedió a analizar el efecto de la limitación de Zn(II) sobre la actividad de MBLs contenidas en OMVs. Para ello se incubaron con distintas concentraciones de calprotectina a OMVs provenientes de cepas *E. coli* productoras de NDM-1 y NDM-1 C26A. Las cantidades utilizadas de cada preparación de OMVs se normalizaron de acuerdo al contenido de proteína total en OMVs. Luego de la incubación, se determinó espectrofotométricamente la actividad lactamasa remanente frente al sustrato imipenem. Adicionalmente, se realizó la determinación utilizando enzima NDM-1 purificada, expresada en forma soluble sin su secuencia de lipidación. La actividad de OMVs portadoras de NDM-1 salvaje mostró una menor susceptibilidad a la adición de calprotectina que la de aquellas vesículas que contienen NDM-1 C26A (Figura 30d). Esta diferencia sugiere que el anclaje a membrana permite mejorar la tolerancia de NDM-1 contenida en OMVs hacia condiciones de baja disponibilidad de zinc. Las disminuciones de actividad observadas no se modificaron al variar el tiempo de incubación con calprotectina previo a la determinación de actividad.

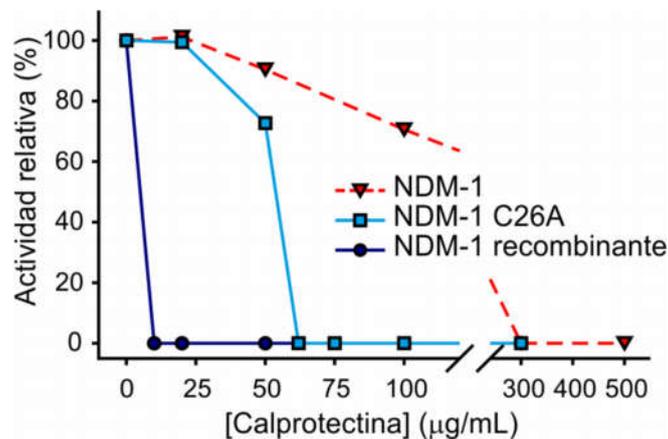


Figura 31. Efecto del agregado de calprotectina en la actividad imipenemasa de OMVs (0.8 ug de proteína total) conteniendo NDM-1 o NDM-1 C26A, comparada a NDM-1 recombinante (6 nM). Los datos corresponden a los valores medios de dos experimentos independientes.

5.2.4 Transferencia de resistencia mediada por OMVs

La presencia de una gran cantidad de enzima NDM-1 activa en OMVs planteó el interrogante acerca del potencial de las mismas de modular la respuesta de bacterias a antibióticos β -lactámicos. En particular, la capacidad de las vesículas de inactivar estas

drogas podría brindar protección a células sensibles que no producen beta-lactamasas. Las OMVs son liberadas naturalmente por todas las bacterias Gram Negativas a su entorno, y las vesículas producidas por una cepa que expresa MBLs podrían movilizarse desde su sitio de crecimiento y permitir que células susceptibles cercanas toleren la acción del antibiótico.

Para evaluar la capacidad protectora de OMVs portadoras de NDM-1 y la influencia de su localización en membrana sobre este fenómeno, se incubaron células de *E. coli* DH5 α no productoras lactamasas con OMVs provenientes de cultivos de *E. coli* DH5 α que expresaban NDM-1 salvaje, NDM-1 C26A o contenían el plásmido vacío, carente de gen lactamasa (indicadas como pMBLe). Se determinó la CIM de las células así tratadas frente a los antibióticos beta-lactámicos cefotaxima e imipenem, y se las comparó con las de células no tratadas.

El tratamiento con vesículas que contienen NDM-1 provocó un marcado incremento en la resistencia tanto frente a cefotaxima como a imipenem, con un aumento entre 3 y 5 diluciones en la CIM para estos antibióticos (Figura 32-a). Esto que indica que las OMVs tienen el potencial de proteger a células que no producen lactamasas. En el caso de las vesículas portadoras de NDM-1 C26A, sólo se observó un pequeño incremento frente a imipenem, consistente con la menor cantidad de enzima y actividad lactamasa presente en las mismas. Finalmente, la adición de OMVs provenientes de una cepa que no expresa lactamasas (pMBLe) no provocó alteraciones en la resistencia a antibióticos.

Se comprobó adicionalmente que este incremento en las CIM no se debía a transferencia génica y posterior expresión de β -lactamasas por parte de las células analizadas, dado que cuando las mismas fueron repicadas y crecidas en medio de cultivo fresco, su CIM retornó al valor de la cepa control. Por lo tanto, el aumento transitorio de resistencia observado se debe a la degradación del antibiótico mediada por las metalo- β -lactamasas contenidas en las OMVs.

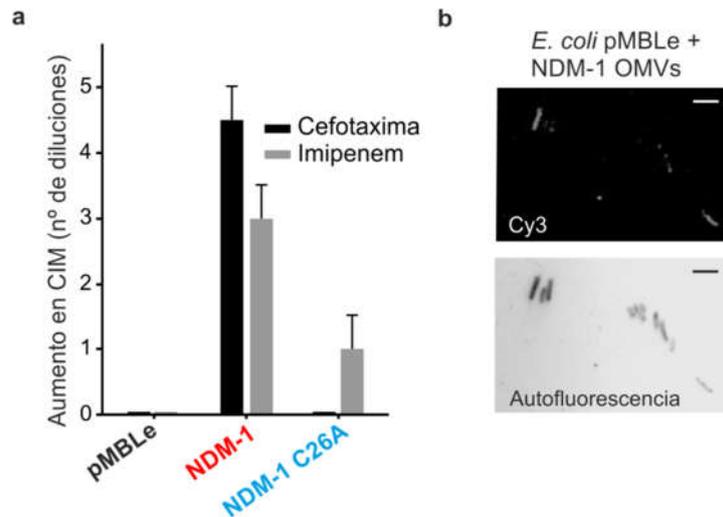


Figura 32 – a) Variación de CIM de células de *E. coli* tratadas con OMVs provenientes de cultivos que expresaban NDM-1, NDM-1 C26A o que no producían lactamasas (pMBLe). Los resultados se expresan como cambio de CIM, en número de diluciones binarias del antibiótico, respecto a células no tratadas con OMVs. Los datos corresponden a dos experimentos independientes y se presentan como media \pm error estándar **b)** Análisis por microscopía de inmunofluorescencia de células de *E. coli* sensibles a antibióticos β -lactámicos (no productoras de MBLs) luego de incubación durante 1h con OMVs purificadas de células expresando NDM-1. Las células fueron lavadas luego de la incubación, fijadas e incubadas con anticuerpos anti-StrepTag y anti-IgG conjugado a Cy3. Arriba: visualización de cy3. Abajo: Células detectadas mediante autofluorescencia. El control negativo con células de *E. coli* no expresando ninguna MBL no dio señal detectable de fluorescencia. Barras de escala: 3 μ m.

Para analizar la posibilidad de una interacción directa de las OMVs con las células de *E. coli* no productoras de lactamasas, se analizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia células sometidas al mismo tratamiento anterior con OMVs que contenían NDM-1. Para el marcaje fluorescente de la lactamasa se utilizó un anticuerpo primario dirigido contra StrepTag, seguido por un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Cy3. Se observó la presencia de una gran cantidad de señal fluorescente en células sometidas a dicho tratamiento con OMVs (Figura 32b), si bien hubo mucha heterogeneidad en cuanto al grado de marcaje de cada célula. La incubación las células de *E. coli* junto con OMVs parece llevar a la asociación de las vesículas a la superficie celular, pudiendo tratarse de una simple adsorción a la membrana externa de la célula, o bien de una fusión de las vesículas con dicha membrana.

5.2.5 Análisis de NDM-1 en OMVs de aislamientos clínicos

Como se discutió previamente, existe abundante evidencia de que las OMVs tienen un rol importante en procesos de patogénesis. En particular, existían numerosos reportes de la asociación de β -lactamasas de diversos organismos con estas vesículas de membrana. Sin embargo, hasta el momento de realizado este trabajo no se había evaluado la capacidad de cepas clínicas portadoras de NDM-1 de secretar esta enzima

hacia OMVs, lo cual podría tener implicancias para la capacidad de las mismas de resistir frente al tratamiento con antibióticos β -lactámicos.

Se decidió evaluar si las OMVs producidas por aislados clínicos productores de NDM-1 contenían la enzima. Para ello se trabajó en colaboración con investigadores del Instituto Malbrán, Buenos Aires. Se purificaron vesículas de aislamientos clínicos de *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri* y *Enterobacter cloacae* portadores del gen *bla*_{NDM-1}. Luego se analizaron mediante western blot muestras de OMVs y células totales de estos aislamientos en conjunto con muestras de *E. coli* DH5 α pMBLe-*bla*_{NDM-1} y *E. coli* DH5 α pMBLe-*bla*_{NDM-1} C26A. Dado que las enzimas producidas por los aislamientos clínicos carecen de la secuencia StrepTag-II que se había utilizado para la detección de MBLs, se emplearon en este caso anticuerpos policlonales de conejo anti-NDM. Se encontró presencia de NDM-1 en OMVs de *E. cloacae*, mientras que no fue observada en las muestras provenientes de *P. rettgeri* ni *S. marcescens*. Esto demuestra que NDM-1 tiene el potencial de ser secretada en OMVs en cepas clínicas, si bien no todas ellas tienen la misma capacidad de liberar a la enzima en ellas.

Los niveles de expresión de las enzimas en células totales fueron notablemente similares entre las cepas de laboratorio y las cepas clínicas, con la excepción de *P. rettgeri* en la que se observaron cantidades más reducidas de la proteína. Estos resultados demuestran que la expresión de MBLs a partir del vector pMBLe es capaz de dar lugar a niveles de proteína fisiológicos, similares a los observados en aislados clínicos.

Las OMVs también han sido propuestas como una vía potencial para transferencia génica horizontal, habiéndose detectado la presencia de ADN en las vesículas producidas por algunos organismos, y existiendo comprobación del potencial del mismo de ser incorporado por ciertas bacterias. Se evaluó por lo tanto la presencia del gen codificante para NDM-1 en OMVs de los aislados clínicos y *E. coli* DH5 α pMBLe-*bla*_{NDM-1}. Para evitar la posibilidad de interferencias por ADN asociado a la superficie de las vesículas, las mismas fueron tratadas con DNasa I previa a la extracción de ADN y amplificación del mismo por PCR usando oligos específicos para *bla*_{NDM-1}. Se comprobó que tanto las OMVs provenientes los aislados clínicos de *P. rettgeri* y *E. cloacae*, como las de la cepa de laboratorio productora de NDM-1 contenían el gen codificante para esta enzima. Esto plantea la posibilidad de que las OMVs hayan contribuido a la diseminación del gen *bla*_{NDM-1}, actuando en la transferencia horizontal del mismo entre distintas cepas patogénicas.

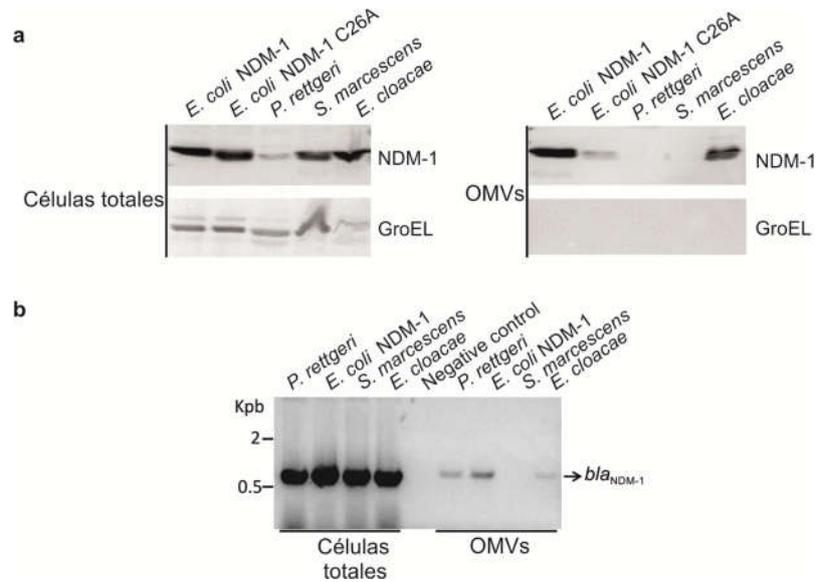


Figura 33. a) Western blots de muestras de células totales y OMVs purificadas de aislamientos clínicos de *P. rettgeri*, *S. marcescens* y *E. cloacae* y de *E. coli* DH5 α produciendo NDM-1 y NDM-1 C26A. Se realizó la detección de la β -lactamasa con anticuerpos anti-NDM-1, y además se utilizó inmunodetección de GroEL para evaluar la presencia de contaminantes citoplasmáticos en las preparaciones de vesículas. **b)** Análisis mediante electroforesis en agarosa de productos de amplificación por PCR del gen *bla*_{NDM-1} a partir de ADN extraído de células totales y OMVs de aislados clínicos y *E. coli* DH5 α productores de NDM-1.

5.2.6 Búsqueda bioinformática de posibles MBLs lipidadas

Previamente a la caracterización de NDM-1 como una lactamasa lipidada anclada a la membrana externa, todas las MBLs conocidas eran enzimas periplasmáticas solubles en bacterias Gram-negativas, o secretadas al medio extracelular en los pocos casos de estas proteínas en organismos Gram-positivos. Mientras que todos los alelos reportados de NDM mantienen la secuencia de lipidación dentro de su péptido líder, no se han detectado en ámbitos clínicos MBLs pertenecientes a otras familias que presenten esta característica. Sin embargo, en el año 2011 se reportó la existencia de una MBL de *Eritrobacter litoralis* denominada ElBla2, que posee un 57% de identidad de secuencia con NDM-1 y contiene un posible lipobox dentro de su extremo N-terminal¹⁹⁰. Considerando la alta divergencia de secuencia dentro de las MBLs, donde las enzimas de distintas subfamilias de la subclase B1 pueden compartir sólo un 20% de identidad de secuencia, ElBla2 presenta grado de homología respecto a NDM-1 sorprendentemente alto. Otras dos MBLs con potenciales sitios de lipidación, Hb de *Hirschia báltica* y Ho de *Haliangium ochraceum*, fueron detectadas en dicho estudio, con niveles de identidad de secuencia a NDM-1 del 49% y 37%, respectivamente.

Tanto ElBla2 como Ho y Hb se encuentran codificadas en el cromosoma de bacterias marinos, lo que sugiere la posibilidad de que el gen de NDM-1 se haya originado en estos organismos ambientales y luego movilizado por transferencia génica horizontal hacia patógenos clínicos. Numerosos trabajos han descripto la existencia de genes de resistencia ancestrales que preceden largamente el descubrimiento y utilización de antibióticos para el tratamiento de infecciones, y que la resistencia a antibióticos no es infrecuente en organismos ambientales^{191,192}. Existía por lo tanto la posibilidad de que el resistoma ambiental contuviera otras MBLs con señales de lipidación, con las mismas ventajas adaptativas conferidas por el anclaje a membrana a NDM-1. Por ello se decidió evaluar la presencia de lipobox en secuencias de metalo- β -lactamasas contenidas en bases de datos de secuencias biológicas. Se utilizó la herramienta BLAST para realizar búsquedas por homología en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI, utilizando como secuencias de partida a las de enzimas representativas de las tres subclases de MBLs: NDM-1, VIM-2, IMP-1 y SPM-1 (B1), CphA (B2), GOB-1, L1 y BJP-1 (B3). Los resultados de estas búsquedas fueron filtrados para retener sólo aquellas secuencias que contuvieran motivos característicos de alguna de las tres subclases de metalo- β -lactamasas. Posteriormente, las secuencias fueron analizadas con la herramienta bioinformática LipoP¹⁹³ para detectar la presencia de lipobox en sus extremos N-terminales.

Las secuencias de aquellos homólogos de MBLs que contenían señales de lipidación fueron alineadas junto a un conjunto representativo de MBL solubles ya caracterizadas utilizando el software Expresso¹⁹⁴, que realiza alineamientos asistidos por información estructural. Dado que las subclases B1 y B2, y la subclase B3 de MBLs forman dos grupos filogenéticamente muy distantes y que comparten un grado muy limitado de identidad de secuencia entre sí, los homólogos identificados para uno y otro grupo fueron analizados por separado. Finalmente, se construyeron árboles filogenéticos a partir de los alineamientos obtenidos utilizando la herramienta PhyML¹⁹⁵, basada en el método de la máxima verosimilitud.

Los resultados obtenidos muestran la presencia de gran cantidad de homólogos a MBLs con sitios putativos de lipidación (Figura 34). La Tabla 10 resume la información correspondiente a cada uno de los homólogos a MBLs con secuencias de lipidación putativas encontrados. Las proteínas halladas poseen una gran variabilidad de secuencia, presentando una relación cercana a diversas MBLs solubles ya caracterizadas en distintos extremos de los árboles filogenéticos.

Se destaca la presencia de 4 homólogos con una identidad de secuencia respecto a NDM-1 igual o superior al 38%, un grado de homología relativamente alto dentro de

las MBLs, considerando por ejemplo que NDM-1 y VIM-2 poseen un 32% de identidad de secuencia. Este conjunto de secuencias podría brindar indicios de los orígenes e historia evolutiva de NDM-1. Adicionalmente, se detectaron secuencias con alto grado de homología a otras enzimas de relevancia clínica tales como VIM-2 y SPM-1.

A pesar de que estas observaciones bioinformáticas requieren de confirmación experimental, resulta razonable suponer que una proporción importante de las secuencias de homólogos de MBLs detectadas poseen secuencias de lipidación funcionales, dado que la herramienta LipoP posee una baja tasa de resultados falsos positivos (0,3%)¹⁹³. Además, si bien la mayoría de las proteínas identificadas no han sido caracterizadas o sólo de forma preliminar, las mismas provienen en muchos casos de estudios de metagenómica funcional, en los cuales se aislaron genes de resistencia provenientes de fuentes ambientales por su capacidad de otorgar resistencia a cepas de laboratorio. Esto aumenta la probabilidad de que las proteínas identificadas sean verdaderas MBLs y no miembros de la superfamilia de las MBLs con otras actividades biológicas.

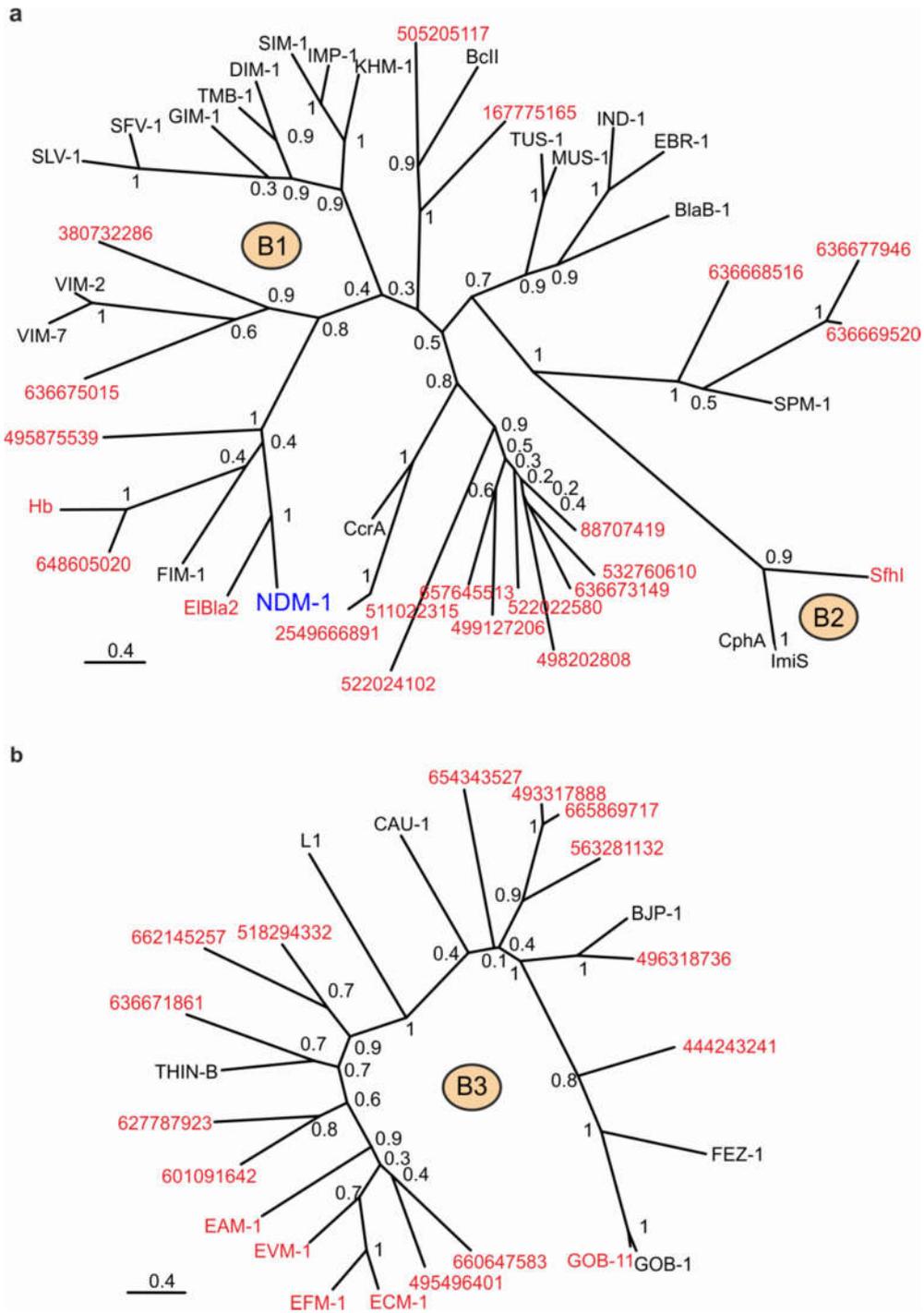


Figura 34 – Árboles filogenéticos para secuencias de homólogos a MBLs con sitios putativos de lipidación junto a MBLs caracterizadas de subclase B1 y B2 (a) y subclase B3 (b). Las MBLs con secuencias de lipidación putativas se representan en rojo, NDM-1 en azul, y las MBLs solubles en negro. En el caso de proteínas sin nombre asignado se indican los números de acceso de GenBank correspondientes. Los valores ubicados en los nodos del árbol corresponden a la confianza en la determinación de cada nodo, inferida mediante un procedimiento de bootstrapping.

Capítulo 5. Análisis de NDM-1 en Vesículas de Membrana Externa

Subclase MBL	Nombre	Número Genbank GI	¿Actividad lactamasa confirmada?	Secuencia Lipobox (incluyendo +2)	Organismo	
B1	NDM-1	GI:255031063	sí	LSGCM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	380732286	GI:380732286	no	LTACA	<i>Coralococcus coralloides</i>	
	636675015	GI:636675015	sí ¹⁹¹	IVACA	Organismo no cultivado	
	648605020	GI:648605020	no	LSGCA	<i>Hirschia maritima</i>	
	Hb	GI:254043948	no	LSGCM	<i>Hirschia báltica</i>	
	EIBla2	GI:499733708	sí ¹⁹⁰	LPACV	<i>Erythrobacter litoralis</i>	
	495875539	GI:495875539	no	VAGCT	<i>Alpha proteobacterium JLT2015</i>	
	505205117	GI:505205117	no	LIACS	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	
	167775165	GI:167775165	no	VSGCQ	<i>Leptospira biflexa</i>	
	511022315	GI:511022315	no	LTGCS	<i>Bacteroides massiliensis</i>	
	254966891	GI:254966891	sí ¹⁹⁶	LTGCT	Organismo no cultivado	
	522024102	GI:522024102	no	LVGCS	<i>Lewinella cohaerens</i>	
	88707419	GI:88707419	no	LIIGC	<i>Maribacter sp.</i>	
	498202808	GI:498202808	no	LTSCK	<i>Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens</i>	
	657645513	GI:657645513	no	ITGCK	<i>Cellulophaga baltica</i>	
	657642553	GI:657642553	no	ITGCK	<i>Cellulophaga baltica</i>	
	499127206	GI:499127206	no	LAGCS	<i>Cyclobacteriaceae bacterium AK24</i>	
	522022580	GI:522022580	no	IIGCT	<i>Flexithrix dorotheae</i>	
	532760610	GI:532760610	no	LSSCI	Organismo no cultivado	
	636673149	GI:636673149	sí ¹⁹¹	IVACC	Organismo no cultivado	
	636669520	GI:636669520	sí ¹⁹¹	LASCA	Organismo no cultivado	
	636669920	GI:636669920	sí ¹⁹¹	LASCA	Organismo no cultivado	
	636669520	GI:636669520	sí ¹⁹¹	LASCA	Organismo no cultivado	
	636677946	GI:636677946	sí ¹⁹¹	LAGCT	Organismo no cultivado	
	636668516	GI:636668516	sí ¹⁹¹	LSSCS	Organismo no cultivado	
	B2	Sfhl	GI:639192216	sí ¹⁹⁷	LIACE	<i>Serratia fonticola</i>
	B3	EAM-1	GI:396086049	sí ¹⁹⁸	IAACA	<i>Erythrobacter aquimaris</i>
EVM-1		GI:396086043	sí ¹⁹⁸	LSGCA	<i>Erythrobacter vulgaris</i>	
ECM-1		GI:396086047	sí ¹⁹⁸	LAGCA	<i>Erythrobacter citreus</i>	
EFM-1		GI:396086041	sí ¹⁹⁸	LAACA	<i>Erythrobacter flavus</i>	
627787923		GI:627787923	no	LAACR	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	
601091642		GI:601091642	no	LAACA	<i>Lysobacter capsici AZ78</i>	
518294332		GI:518294332	no	LSACL	<i>Dyella japonica</i>	
662145257		GI:662145257	no	VAGCT	<i>Mycobacterium abscessus</i>	
GOB-11		GI:49798147	sí ¹⁹⁹	LSACL	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	
444243241		GI:444243241	sí ²⁰⁰	VIGCA	Organismo no cultivado	
496318736		GI:496318736	no	LAACP	<i>Bradyrhizobium sp. ORS 375</i>	
654343527		GI:654343527	no	LAACS	<i>Mastigocoleus testarum</i>	
563281132		GI:563281132	no	VSSCA	<i>Blastomonas sp. CACIA14H2</i>	
665869717		GI:665869717	no	LVGCA	<i>Asticcacaulis sp. AC460</i>	
493317888		GI:493317888	no	LAGCT	<i>Asticcacaulis biprosthecium</i>	
636671861	GI:636671861	sí ¹⁹¹	VSSCA	Organismo no cultivado		
495496401	GI:495496401	no	LAGCS	<i>Rheinheimera nanhaiensis</i>		
660647583	GI:660647583	no	LAGCS	<i>Erythrobacter sp. JL475</i>		

Tabla 10 – Homólogos de MBLs con secuencias de lipidación putativas identificados mediante búsqueda bioinformática. Se incluyen a modo de comparación los datos correspondientes a NDM-1. En la columna que informa si la proteína posee actividad lactamasa confirmada, los números para los casos afirmativos indican la referencia bibliográfica correspondiente.

5.3 Discusión

Durante las últimas dos décadas se han puesto en evidencia los múltiples roles que las OMVs llevan a cabo en la fisiología bacteriana, siendo uno de ellos la contribución a la resistencia a antibióticos. Más allá de los múltiples reportes de secreción de β -lactamasas en OMVs, se desconocía si NDM-1 era liberada en estas vesículas. Adicionalmente, existía la posibilidad de que el anclaje de NDM-1 a la membrana externa, de la cual deriva la bicapa que rodea a las OMVs, pudiera influenciar el tránsito de la misma hacia las vesículas respecto de las demás MBLs solubles.

Para comprobar esta hipótesis, se purificaron OMVs de cepas de *E. coli* productoras de NDM-1, NDM-1 C26A o N-VIM y se evaluó su contenido de MBLs. Los resultados obtenidos demuestran que la localización de NDM-1 en la membrana externa aumenta la secreción de la misma hacia vesículas de membrana externa. A pesar de que el mutante soluble NDM-1 C26A es expresado en niveles similares, la proteína MBL y la actividad lactamasa son mucho menores en células de *E. coli* que producen esta variante con respecto a los que expresan la enzima salvaje. Esto no resultó inesperado, dado que las proteínas de membrana externa suelen representar una mayor proporción del total de proteínas en OMVs respecto a las proteínas periplasmáticas¹⁸⁹, como resulta evidente por comparación de los patrones de proteínas en SDS-PAGE (Figura 29). Por otro lado, sorprendentemente la quimera N-VIM no fue detectable en OMVs, lo que indica que la unión a membrana no es condición suficiente para el tránsito de la enzima a vesícula y sugiere la existencia de procesos de selección de carga en *E. coli*. En principio los determinantes de la exclusión o inclusión de estas MBLs en OMVs no participarían de forma directa del anclaje, ya los extremos N-terminales de NDM-1 y N-VIM son idénticos.

La mayor secreción de NDM-1 en OMVs debido a su anclaje a membrana resulta especialmente importante al haberse determinado que las vesículas que transportan la enzima tienen la capacidad de proteger a células sensibles frente a antibióticos β -lactámicos. La protección observada tiene lugar a través de la proteína transportada en las vesículas y no mediante transferencia génica horizontal, por lo que la resistencia adquirida por estas células es transitoria.

Las cantidades de OMVs utilizadas durante los experimentos de transferencia de resistencia fueron relativamente elevadas (8 μ g de proteína total en OMVs respecto a los 200-300 μ g obtenidos en promedio de 250 mL de cultivo de *E. coli*). Sin embargo, se debe destacar que mientras las cepas de laboratorio de *E. coli* producen niveles

relativamente bajos de OMVs, éstos varían fuertemente entre especies. Se ha reportado por ejemplo una cepa de *Neisseria meningitidis* que libera hasta 162 mg/L de cultivo de proteína total en OMVs²⁰¹. Adicionalmente, se ha reportado la producción de grandes cantidades de vesículas por parte de patógenos durante procesos de infección¹⁷³, y que las condiciones presentes dentro del hospedador estimulan la producción de OMVs¹⁷⁴. Por lo tanto, las concentraciones de vesículas empleadas en estos ensayos podrían aproximar a aquellas prevalentes en sitios de infección.

La liberación de NDM-1 OMVs también tiene lugar en cepas clínicas, donde además se encontró el gen codificante para la enzima, lo que sugiere un posible rol de estas vesículas en la transferencia de *bla*_{NDM-1} entre organismos patógenos. En este sentido, un estudio publicado recientemente demostró la presencia del gen *bla*_{NDM-1} en vesículas de un aislado clínico de *Acinetobacter baumannii*, y además la posibilidad de transferencia del mismo mediada por OMVs hacia células de *A. baumannii* sensibles a carbapenemes y *E. coli* JM109²⁰². Las OMVs constituyen un mecanismo que permite la liberación conjunta de proteínas de resistencia a antibióticos y sus correspondientes genes codificantes, protegidos de factores deletéreos presentes en el medio extracelular, tales como proteasas y DNasas. La actividad β -lactamasa de las OMVs podría por lo prolongar la sobrevivencia de organismos no resistentes durante un tratamiento con antibióticos, y aumentar las posibilidades de un evento de transferencia génica posterior, ya sea mediado por el ADN contenido en la vesícula o por los mecanismos tradicionales como conjugación o transformación. De esta forma, la secreción de NDM-1 en OMVs podría haber contribuido a su rápida dispersión a nivel mundial, la cual no se encuentra asociada a la diseminación de estructuras genéticas, plásmidos o clones específicos.

Todos los alelos caracterizados de NDM conservan el lipobox, por lo que las ventajas evolutivas asociadas al anclaje a membrana de NDM-1 serían comunes a todas las variantes de la enzima. Si bien todas las otras MBLs caracterizadas son enzimas solubles, se encontraron numerosos homólogos de MBLs que contienen una secuencia lipobox en las bases de datos bioinformáticas. Muchas de estas proteínas provienen de organismos ambientales o de análisis metagenómicos de muestras de suelo, lo que sugiere la existencia de un reservorio de carbapenemasas que comparten las ventajas del anclaje a membrana dentro del “resistoma” ambiental. La presencia de homólogos con alta identidad de secuencia a NDM-1 y con señales de lipidación en estos organismos refuerza la noción de que los determinantes de resistencia encontrados en la clínica representan sólo una pequeña fracción de aquellos presentes en la naturaleza, generados por cientos de millones de años de evolución de estas enzimas.

Como perspectivas para continuar los estudios presentados en este capítulo, se puede destacar la exploración de los factores que determinan la selección de carga encontrada para la secreción en OMVs de NDM-1 con respecto a N-VIM, además de establecer si este fenómeno también tiene lugar cuando se expresa a estas MBLs en otras bacterias como *P. aeruginosa*. Asimismo, resultaría importante caracterizar la secreción de las variantes naturales de NDM en OMVs, de manera de determinar si las mutaciones presentes en las mismas tienen la capacidad de incrementar o disminuir los niveles de la enzima que son enviados a OMVs.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis nos permiten arribar a las siguientes conclusiones:

- La capacidad de las MBLs de conferir resistencia está fuertemente influenciada por la disponibilidad de Zn(II) en el medio externo de la bacteria productora. Sin embargo, las diversas enzimas presentan distintos grados de susceptibilidad a una reducción en los niveles de este metal. La pérdida de Zn(II) del sitio activo de las MBLs no sólo provoca su inactivación y remueve su capacidad de conferir resistencia, sino que además produce una disminución en la estabilidad *in vivo* de la enzima y lleva a su degradación por proteólisis en el espacio periplasmático.
- El anclaje a membrana de NDM-1 no es esencial para su actividad, ya que dos variantes solubles de la enzima demostraron ser capaces de brindar resistencia a diversos β -lactámicos, incluso a niveles mayores a los de la enzima salvaje en medio rico LB. La localización de NDM-1 en la membrana externa incrementa la capacidad de la enzima de otorgar resistencia en medios con baja disponibilidad de Zn(II), y la protege de la degradación en dichas condiciones. La mayor estabilidad otorgada por el anclaje también fue observada en la quimera N-VIM unida a membrana respecto a la proteína VIM-2 salvaje soluble. El anclaje a membrana por lo tanto constituye un mecanismo para incrementar la estabilidad *in vivo* de las MBLs.
- Las primeras 16 variantes clínicas detectadas para NDM no presentan diferencias importantes en su capacidad de conferir resistencia, con excepción de la marcada reducción observada para el quintuple mutante NDM-10 respecto a las demás enzimas. Sin embargo, existen variaciones importantes en el comportamiento de los distintos alelos bajo limitación de Zn(II), y gran parte de ellos da lugar a mayores niveles de resistencia que NDM-1 en estas condiciones. Muchos alelos presentan además una estabilidad *in vivo* incrementada respecto a NDM-1.
- La adaptación observada para los alelos de NDM a condiciones de baja disponibilidad de Zn(II) tiene contribuciones de dos mecanismos: el incremento de la estabilidad de la enzima en su forma desprovista de metal, y por otro lado el aumento de la afinidad de unión a Zn(II). Las mutaciones A233V y E152K actúan mediante el primer mecanismo, mientras que la sustitución M154L, la más frecuente entre las variantes de la enzima, actúa a través del segundo.

- NDM-1 es secretada en vesículas de membrana externa. La localización de la enzima en membrana incrementa los niveles que son enviados a OMVs en comparación a variantes solubles de la misma. Sin embargo, de acuerdo a lo observado para N-VIM, el anclaje a membrana no es condición suficiente para la secreción de una MBL en estas vesículas, y parecen existir factores adicionales de selección de carga. La enzima NDM-1 contenida en vesículas es activa, lo que permite que estas OMVs degraden antibióticos β -lactámicos. Esta actividad β -lactamasa posibilita que las OMVs portadoras de NDM-1 protejan a cepas sensibles a estos antibióticos.
- Tanto la proteína como el gen codificante para NDM-1 se encuentran presentes en OMVs producidas por aislamientos clínicos. Las OMVs liberadas por bacterias productoras de NDM-1 podrían haber contribuido por lo tanto a la dispersión mundial de la enzima, participando en eventos de transferencia génica horizontal mediante el ADN contenido en las mismas, o protegiendo a cepas sensibles a antibióticos a través de su actividad β -lactamasa para incrementar sus posibilidades de supervivencia y permitir la transferencia del gen mediante los mecanismos tradicionales.
- Si bien NDM-1 es la única MBL de relevancia clínica unida a membrana, existen numerosos homólogos a MBLs en organismos ambientales que poseen secuencias de lipidación en sus extremos N-terminales, y posiblemente se encuentren anclados a membrana.

Resumen

Los carbapenemes son potentes antibióticos β -lactámicos, reservados como drogas de último recurso para el tratamiento de infecciones severas o por parte de organismos resistentes. Desafortunadamente, la creciente prevalencia en las últimas dos décadas de organismos con resistencia a estas drogas, en particular de las Enterobacterias Resistentes a Carbapenemes (CRE), constituye una seria amenaza a la efectividad del uso terapéutico de los mismos. El principal mecanismo de resistencia a carbapenemes es la producción de carbapenemasas, β -lactamasas capaces de degradar el antibiótico e inactivarlo. De acuerdo a su mecanismo catalítico se distinguen dos tipos de estas enzimas: las serín- β -lactamasas que utilizan un residuo de serina en su sitio activo para formar un intermediario covalente con el antibiótico y luego hidrolizarlo, y las metalo- β -lactamasas (MBLs), que utilizan iones Zn(II) para posicionar el sustrato y generar el hidroxilo que actúa como nucleófilo, sin formación de un intermediario covalente.

NDM-1 es una de las MBLs de relevancia clínica de más reciente aparición. Desde su identificación en el año 2008, se ha expandido con gran rapidez a nivel mundial, y ya ha sido detectada en más de 70 países. NDM-1 difiere de las demás enzimas de su clase debido a su localización celular: es una lipoproteína anclada a la cara interna de la membrana externa de organismos Gram-negativos, mientras que las demás MBLs caracterizadas son enzimas periplasmáticas solubles. Esta localización celular se debe a la presencia de una señal de lipidación denominada lipobox dentro del péptido líder de NDM-1, reconocida por un sistema biosíntesis de lipoproteínas altamente conservado en bacterias. Hasta el momento se han descrito 19 variantes naturales de NDM, las cuales difieren entre sí por un número reducido de mutaciones puntuales.

La presencia de Zn(II) en el sitio activo de las MBLs es indispensable para su funcionamiento. El espacio periplasmático, donde actúan estas enzimas en Gram-negativos, carece de mecanismos capaces de mantener la homeostasis de este metal, por lo que el Zn(II) disponible para las MBLs se encuentra directamente ligado a su concentración extracelular. Esto adquiere importancia durante una infección, dado que el sistema inmune utiliza la respuesta de Inmunidad Nutricional para restringir la disponibilidad de Zn(II) y otros cationes metálicos para el patógeno invasor. Como parte de este mecanismo, los neutrófilos liberan en los sitios de infección grandes concentraciones de calprotectina (CP), una proteína capaz de quelar con alta afinidad Zn(II) y Mn(II).

En el presente trabajo de tesis se estudió el efecto de la disponibilidad de Zn(II) sobre la capacidad de conferir resistencia de las MBLs. En particular, se evaluó el efecto del anclaje a membrana de NDM-1 sobre las propiedades de la enzima, haciendo foco en su tolerancia a baja disponibilidad de Zn(II). Además, se buscó evaluar qué características de la enzima se encuentran bajo presión de selección mediante un análisis comparativo de sus alelos clínicos.

Para determinar el efecto de la disponibilidad de Zn(II) sobre la funcionalidad de las MBLs, se compararon las resistencias de células de *E. coli* productoras de las MBLs de mayor relevancia clínica (NDM-1, VIM-2, IMP-1 y SPM-1) en medio de crecimiento suplementado con distintas concentraciones del quelante ácido dipicolínico (DPA). Si bien la resistencia de todas las MBLs se vio reducida gradualmente por adición de cantidades crecientes de DPA, se observó que distintas MBLs presentaban distintos grados de susceptibilidad a la limitación de Zn(II). Se encontró además que la adición de quelantes al medio de crecimiento lleva a la degradación de las MBLs, debido a que las formas desprovistas de metal de las mismas son más sensibles a la proteólisis.

Se construyeron mutantes solubles de NDM-1 para analizar cómo afecta el anclaje a membrana las propiedades de la enzima. Si bien estas variantes eran activas y brindaban niveles de resistencia similares a los de NDM-1 salvaje en medio rico, resultaban más sensibles a la reducción en los niveles de Zn(II) extracelulares, y eran degradadas más rápidamente que la enzima salvaje cuando perdían metal. Por lo tanto el anclaje a membrana en NDM-1 contribuye a la adaptación de la enzima a baja disponibilidad de Zn(II), incrementando su estabilidad frente a la proteólisis.

La caracterización de los primeros 16 alelos clínicos de NDM-1 demostró que no existen diferencias importantes entre los mismos en cuanto a la resistencia que otorgan en medio de cultivo rico con elevada disponibilidad de Zn(II), en concordancia con reportes previos. Sin embargo, las propiedades de los alelos difieren marcadamente bajo limitación de Zn(II), y gran parte de ellos tienen mayor capacidad de conferir resistencia bajo estas condiciones respecto a NDM-1. Asimismo, muchos de los alelos presentan mayor estabilidad *in vivo* que NDM-1, observándose los mayores incrementos en esta propiedad a causa de las mutaciones A233V y E152K. Por otro lado, la mutación más frecuente entre los alelos, M154L, contribuye a la adaptación de la enzima a condiciones de baja disponibilidad de Zn(II) mediante el incremento en la afinidad de unión de este metal.

Se comprobó también que la localización de NDM-1 en la membrana externa incrementa su secreción a OMVs respecto a las formas solubles de la enzima. Las OMVs

(vesículas de membrana externa) son partículas esféricas formadas a partir de protrusiones de la membrana externa de Gram-negativos, que se escinden y liberan de la célula generando una vesícula cerrada rodeada de membrana externa y que contiene en su lumen componentes periplasmáticos. Las OMVs son producidas por todas las bacterias Gram-negativas, bajo todas las condiciones de crecimiento, y se encuentran asociadas a una amplia variedad de procesos tales como adquisición de nutrientes, formación de biofilms, comunicación celular, resistencia a antibióticos y patogénesis. Se encontró que las OMVs que transportan NDM-1 poseen actividad β -lactamasa, y que son capaces de proteger a células sensibles a antibióticos β -lactámicos de la acción de los mismos. Además, la caracterización de OMVs generadas por distintos aislamientos clínicos productores de NDM-1 demostró que estas vesículas pueden contener la enzima así como el gen codificante para la misma. Las OMVs por lo tanto podrían haber contribuido a la rápida diseminación de NDM-1 a nivel mundial.

Referencias bibliográficas

- 1 Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K. & Grossart, H. P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in microbiology* **4**, 47, doi:10.3389/fmicb.2013.00047 (2013).
- 2 Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* **40**, 277-283 (2015).
- 3 Mohr, K. I. History of Antibiotics Research. *Current topics in microbiology and immunology* **398**, 237-272, doi:10.1007/82_2016_499 (2016).
- 4 Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **12**, 371-387, doi:10.1038/nrd3975 (2013).
- 5 Fowler, T., Walker, D. & Davies, S. C. The risk/benefit of predicting a post-antibiotic era: is the alarm working? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1323**, 1-10, doi:10.1111/nyas.12399 (2014).
- 6 Davies, J. & Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **74**, 417-433, doi:10.1128/MMBR.00016-10 (2010).
- 7 Perry, J., Waglechner, N. & Wright, G. The Prehistory of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **6**, doi:10.1101/cshperspect.a025197 (2016).
- 8 Hede, K. Antibiotic resistance: An infectious arms race. *Nature* **509**, S2-3, doi:10.1038/509S2a (2014).
- 9 Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., Elseviers, M. & Group, E. P. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* **365**, 579-587, doi:10.1016/S0140-6736(05)17907-0 (2005).
- 10 Bell, B. G., Schellevis, F., Stobberingh, E., Goossens, H. & Pringle, M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC infectious diseases* **14**, 13, doi:10.1186/1471-2334-14-13 (2014).
- 11 Bartlett, J. G., Gilbert, D. N. & Spellberg, B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **56**, 1445-1450, doi:10.1093/cid/cit070 (2013).
- 12 Wright, G. D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current opinion in microbiology* **13**, 589-594, doi:10.1016/j.mib.2010.08.005 (2010).
- 13 Wright, G. D. Antibiotics: a new hope. *Chemistry & biology* **19**, 3-10, doi:10.1016/j.chembiol.2011.10.019 (2012).

- 14 Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J. & Pompliano, D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 29-40, doi:10.1038/nrd2201 (2007).
- 15 Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. & Bonomo, R. A. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 4943-4960, doi:10.1128/AAC.00296-11 (2011).
- 16 Patel, G. & Bonomo, R. A. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Frontiers in microbiology* **4**, 48, doi:10.3389/fmicb.2013.00048 (2013).
- 17 Nordmann, P., Dortet, L. & Poirel, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine* **18**, 263-272, doi:10.1016/j.molmed.2012.03.003 (2012).
- 18 Temkin, E., Adler, A., Lerner, A. & Carmeli, Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: biology, epidemiology, and management. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1323**, 22-42, doi:10.1111/nyas.12537 (2014).
- 19 Prevention, C. f. D. C. a. *Antibiotic Resistance Threats in the United States 2013*. (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).
- 20 Iovleva, A. & Doi, Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinics in laboratory medicine* **37**, 303-315, doi:10.1016/j.cll.2017.01.005 (2017).
- 21 Bush, K. & Jacoby, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 969-976, doi:10.1128/AAC.01009-09 (2010).
- 22 Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**, 321-331, doi:10.1098/rstb.1980.0049 (1980).
- 23 Fisher, J. F., Meroueh, S. O. & Mobashery, S. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical reviews* **105**, 395-424, doi:10.1021/cr030102i (2005).
- 24 Bonomo, R. A. beta-Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **7**, doi:10.1101/cshperspect.a025239 (2017).
- 25 Crowder, M. W., Spencer, J. & Vila, A. J. Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Accounts of chemical research* **39**, 721-728, doi:10.1021/ar040024i (2006).
- 26 Meini, M. R., Llarrull, L. I. & Vila, A. J. Overcoming differences: The catalytic mechanism of metallo-beta-lactamases. *FEBS letters* **589**, 3419-3432, doi:10.1016/j.febslet.2015.08.015 (2015).
- 27 Lisa, M. N. *et al.* A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo-beta-lactamases. *Nature communications* **8**, 538, doi:10.1038/s41467-017-00601-9 (2017).

- 28 Palzkill, T. Metallo-beta-lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1277**, 91-104, doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x (2013).
- 29 Lohans, C. T., Brem, J. & Schofield, C. J. New Delhi Metallo-beta-Lactamase 1 Catalyzes Avibactam and Aztreonam Hydrolysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **61**, doi:10.1128/AAC.01224-17 (2017).
- 30 Abboud, M. I. *et al.* Interaction of Avibactam with Class B Metallo-beta-Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**, 5655-5662, doi:10.1128/AAC.00897-16 (2016).
- 31 Daiyasu, H., Osaka, K., Ishino, Y. & Toh, H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta-lactamase fold. *FEBS letters* **503**, 1-6 (2001).
- 32 Rasia, R. M. & Vila, A. J. Structural determinants of substrate binding to *Bacillus cereus* metallo-beta-lactamase. *The Journal of biological chemistry* **279**, 26046-26051, doi:10.1074/jbc.M311373200 (2004).
- 33 Cerasi, M., Ammendola, S. & Battistoni, A. Competition for zinc binding in the host-pathogen interaction. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **3**, 108, doi:10.3389/fcimb.2013.00108 (2013).
- 34 Meini, M. R., Tomatis, P. E., Weinreich, D. M. & Vila, A. J. Quantitative Description of a Protein Fitness Landscape Based on Molecular Features. *Molecular biology and evolution* **32**, 1774-1787, doi:10.1093/molbev/msv059 (2015).
- 35 Hu, Z., Gunasekera, T. S., Spadafora, L., Bennett, B. & Crowder, M. W. Metal content of metallo-beta-lactamase L1 is determined by the bioavailability of metal ions. *Biochemistry* **47**, 7947-7953, doi:10.1021/bi8004768 (2008).
- 36 Garau, G. *et al.* Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**, 2347-2349, doi:10.1128/AAC.48.7.2347-2349.2004 (2004).
- 37 Hall, B. G., Salipante, S. J. & Barlow, M. Independent origins of subgroup B1 + B2 and subgroup B3 metallo-beta-lactamases. *Journal of molecular evolution* **59**, 133-141, doi:10.1007/s00239-003-2572-9 (2004).
- 38 Alderson, R. G., Barker, D. & Mitchell, J. B. One origin for metallo-beta-lactamase activity, or two? An investigation assessing a diverse set of reconstructed ancestral sequences based on a sample of phylogenetic trees. *Journal of molecular evolution* **79**, 117-129, doi:10.1007/s00239-014-9639-7 (2014).
- 39 Sabath, L. D. & Abraham, E. P. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *The Biochemical journal* **98**, 11C-13C (1966).
- 40 Karsisiotis, A. I., Damblon, C. F. & Roberts, G. C. A variety of roles for versatile zinc in metallo-beta-lactamases. *Metallomics : integrated biometal science* **6**, 1181-1197, doi:10.1039/c4mt00066h (2014).

- 41 Yong, D. *et al.* Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-beta-lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 6154-6159, doi:10.1128/AAC.05654-11 (2012).
- 42 Yong, D. *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**, 5046-5054, doi:10.1128/AAC.00774-09 (2009).
- 43 Castanheira, M. *et al.* Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 1274-1278, doi:10.1128/AAC.01497-10 (2011).
- 44 Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M. & Toleman, M. A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet infectious diseases* **11**, 355-362, doi:10.1016/S1473-3099(11)70059-7 (2011).
- 45 Leverstein-Van Hall, M. A. *et al.* Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *The Lancet infectious diseases* **10**, 830-831, doi:10.1016/S1473-3099(10)70277-2 (2010).
- 46 Luo, Y. *et al.* Proliferation of Multidrug-Resistant New Delhi Metallo- β -lactamase Genes in Municipal Wastewater Treatment Plants in Northern China. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **1**, 26-30, doi:10.1021/ez400152e (2014).
- 47 Zhang, C. *et al.* Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. *PloS one* **8**, e64857, doi:10.1371/journal.pone.0064857 (2014).
- 48 Isozumi, R. *et al.* bla(NDM-1)-positive *Klebsiella pneumoniae* from environment, Vietnam. *Emerging infectious diseases* **18**, 1383-1385, doi:10.3201/eid1808.111816 (2012).
- 49 Dortet, L., Poirel, L. & Nordmann, P. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. *BioMed research international* **2014**, 249856, doi:10.1155/2014/249856 (2014).
- 50 Johnson, A. P. & Woodford, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of medical microbiology* **62**, 499-513, doi:10.1099/jmm.0.052555-0 (2013).
- 51 Poirel, L., Dortet, L., Bernabeu, S. & Nordmann, P. Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 5403-5407, doi:10.1128/AAC.00585-11 (2011).
- 52 Zheng, B. *et al.* Coexistence of MCR-1 and NDM-1 in Clinical *Escherichia coli* Isolates. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **63**, 1393-1395, doi:10.1093/cid/ciw553 (2016).

- 53 King, D. & Strynadka, N. Crystal structure of New Delhi metallo-beta-lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance. *Protein science : a publication of the Protein Society* **20**, 1484-1491, doi:10.1002/pro.697 (2011).
- 54 Narita, S. I. & Tokuda, H. Bacterial lipoproteins; biogenesis, sorting and quality control. *Biochimica et biophysica acta* **1862**, 1414-1423, doi:10.1016/j.bbali.2016.11.009 (2017).
- 55 Babu, M. M. *et al.* A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *Journal of bacteriology* **188**, 2761-2773, doi:10.1128/JB.188.8.2761-2773.2006 (2006).
- 56 Buddelmeijer, N. The molecular mechanism of bacterial lipoprotein modification-how, when and why? *FEMS microbiology reviews* **39**, 246-261, doi:10.1093/femsre/fuu006 (2015).
- 57 Kovacs-Simon, A., Titball, R. W. & Michell, S. L. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infection and immunity* **79**, 548-561, doi:10.1128/IAI.00682-10 (2011).
- 58 Zuckert, W. R. Secretion of bacterial lipoproteins: through the cytoplasmic membrane, the periplasm and beyond. *Biochimica et biophysica acta* **1843**, 1509-1516, doi:10.1016/j.bbamcr.2014.04.022 (2014).
- 59 Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J. C. & Lloubes, R. Pal lipoprotein of Escherichia coli plays a major role in outer membrane integrity. *Journal of bacteriology* **184**, 754-759 (2002).
- 60 O'Neil, P. K., Rollauer, S. E., Noinaj, N. & Buchanan, S. K. Fitting the Pieces of the beta-Barrel Assembly Machinery Complex. *Biochemistry* **54**, 6303-6311, doi:10.1021/acs.biochem.5b00852 (2015).
- 61 Botos, I., Noinaj, N. & Buchanan, S. K. Insertion of proteins and lipopolysaccharide into the bacterial outer membrane. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **372**, doi:10.1098/rstb.2016.0224 (2017).
- 62 Laloux, G. & Collet, J. F. Major Tom to Ground Control: How Lipoproteins Communicate Extracytoplasmic Stress to the Decision Center of the Cell. *Journal of bacteriology* **199**, doi:10.1128/JB.00216-17 (2017).
- 63 Sutcliffe, I. C. & Russell, R. R. Lipoproteins of gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* **177**, 1123-1128 (1995).
- 64 Walsh, C. T. & Wencewicz, T. A. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *The Journal of antibiotics* **67**, 7-22, doi:10.1038/ja.2013.49 (2014).
- 65 Hussain, M., Ichihara, S. & Mizushima, S. Accumulation of glyceride-containing precursor of the outer membrane lipoprotein in the cytoplasmic membrane of Escherichia coli treated with globomycin. *The Journal of biological chemistry* **255**, 3707-3712 (1980).

- 66 Brown, D. G. Drug discovery strategies to outer membrane targets in Gram-negative pathogens. *Bioorganic & medicinal chemistry*, doi:10.1016/j.bmc.2016.05.004 (2016).
- 67 Pollock, M. R. The cell-bound penicillinase of *Bacillus cereus*. *Journal of general microbiology* **15**, 154-169, doi:10.1099/00221287-15-1-154 (1956).
- 68 Nielsen, J. B. & Lampen, J. O. Beta-lactamase III of *Bacillus cereus* 569: membrane lipoprotein and secreted protein. *Biochemistry* **22**, 4652-4656 (1983).
- 69 Nielsen, J. B. & Lampen, J. O. Membrane-bound penicillinases in Gram-positive bacteria. *The Journal of biological chemistry* **257**, 4490-4495 (1982).
- 70 Nielsen, J. B., Caulfield, M. P. & Lampen, J. O. Lipoprotein nature of *Bacillus licheniformis* membrane penicillinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 3511-3515 (1981).
- 71 East, A. K. & Dyke, K. G. Cloning and sequence determination of six *Staphylococcus aureus* beta-lactamases and their expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of general microbiology* **135**, 1001-1015, doi:10.1099/00221287-135-4-1001 (1989).
- 72 Bootsma, H. J. *et al.* *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* BRO beta-lactamase: a lipoprotein of gram-positive origin? *Journal of bacteriology* **181**, 5090-5093 (1999).
- 73 Bootsma, H. J., van Dijk, H., Verhoef, J., Fleer, A. & Mooi, F. R. Molecular characterization of the BRO beta-lactamase of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**, 966-972 (1996).
- 74 Randall, L. B., Dobos, K., Papp-Wallace, K. M., Bonomo, R. A. & Schweizer, H. P. Membrane-Bound PenA beta-Lactamase of *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**, 1509-1514, doi:10.1128/AAC.02444-15 (2016).
- 75 Murphy, T. A., Simm, A. M., Toleman, M. A., Jones, R. N. & Walsh, T. R. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**, 582-587 (2003).
- 76 Fiorilli, G. *et al.* Emergence of metallo-beta-lactamases in *Acinetobacter* spp clinical isolates from Argentina. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia* **23**, 100-102 (2010).
- 77 Marchiaro, P. *et al.* Biochemical characterization of metallo-beta-lactamase VIM-11 from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**, 2250-2252, doi:10.1128/AAC.01025-07 (2008).
- 78 Ravasi, P., Peiru, S., Gramajo, H. & Menzella, H. G. Design and testing of a synthetic biology framework for genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial cell factories* **11**, 147, doi:10.1186/1475-2859-11-147 (2012).

- 79 Kovach, M. E. *et al.* Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176 (1995).
- 80 Choi, K. H., Kumar, A. & Schweizer, H. P. 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**, 391-397, doi:10.1016/j.mimet.2005.06.001 (2006).
- 81 Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd edn, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).
- 82 Moran-Barrio, J., Limansky, A. S. & Viale, A. M. Secretion of GOB metallo-beta-lactamase in *Escherichia coli* depends strictly on the cooperation between the cytoplasmic DnaK chaperone system and the Sec machinery: completion of folding and Zn(II) ion acquisition occur in the bacterial periplasm. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**, 2908-2917, doi:10.1128/AAC.01637-08 (2009).
- 83 Chen, X., Brown, T. & Tai, P. C. Identification and characterization of protease-resistant SecA fragments: secA has two membrane-integral forms. *Journal of bacteriology* **180**, 527-537 (1998).
- 84 Okamoto, T., Schwab, R. B., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P. Analysis of the association of proteins with membranes. *Current protocols in cell biology* **Chapter 5**, Unit 5 4, doi:10.1002/0471143030.cb0101s05 (2001).
- 85 Aschtgen, M. S., Bernard, C. S., De Bentzmann, S., Llobes, R. & Cascales, E. SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **190**, 7523-7531, doi:10.1128/JB.00945-08 (2008).
- 86 Rumbo, C. *et al.* Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 3084-3090, doi:10.1128/AAC.00929-10 (2011).
- 87 Park, M. *et al.* Isolation and characterization of the outer membrane of *Escherichia coli* with autodisplayed Z-domains. *Biochimica et biophysica acta* **1848**, 842-847, doi:10.1016/j.bbamem.2014.12.011 (2015).
- 88 Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**, 671-675 (2012).
- 89 CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. CLSI Document M07-A9*. (Clinical Laboratory Standards Institute, 2012).
- 90 Brophy, M. B., Hayden, J. A. & Nolan, E. M. Calcium ion gradients modulate the zinc affinity and antibacterial activity of human calprotectin. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 18089-18100, doi:10.1021/ja307974e (2012).

- 91 Bachmann, B. J. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological reviews* **36**, 525-557 (1972).
- 92 Humbert, M. V., Rasia, R. M., Checa, S. K. & Soncini, F. C. Protein signatures that promote operator selectivity among paralog MerR monovalent metal ion regulators. *The Journal of biological chemistry* **288**, 20510-20519, doi:10.1074/jbc.M113.452797 (2013).
- 93 Capdevila, D. A., Wang, J. & Giedroc, D. P. Bacterial Strategies to Maintain Zinc Metallostasis at the Host-Pathogen Interface. *The Journal of biological chemistry* **291**, 20858-20868, doi:10.1074/jbc.R116.742023 (2016).
- 94 Ma, Z., Jacobsen, F. E. & Giedroc, D. P. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chemical reviews* **109**, 4644-4681, doi:10.1021/cr900077w (2009).
- 95 Nies, D. H. in *Molecular microbiology of heavy metals* 117-142 (Springer, 2007).
- 96 Delcour, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et biophysica acta* **1794**, 808-816, doi:10.1016/j.bbapap.2008.11.005 (2009).
- 97 Cornelissen, C. N. Subversion of Nutritional Immunity by the Pathogenic *Neisseriae*. *Pathogens and disease*, doi:10.1093/femspd/ftx112 (2017).
- 98 Grim, K. P. *et al.* The Metallophore Staphylopine Enables *Staphylococcus aureus* To Compete with the Host for Zinc and Overcome Nutritional Immunity. *mBio* **8**, doi:10.1128/mBio.01281-17 (2017).
- 99 Bobrov, A. G. *et al.* The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicaemic plague in mice. *Molecular microbiology* **93**, 759-775, doi:10.1111/mmi.12693 (2014).
- 100 Gonzalez, J. M. *et al.* Metallo-beta-lactamases withstand low Zn(II) conditions by tuning metal-ligand interactions. *Nature chemical biology* **8**, 698-700, doi:10.1038/nchembio.1005 (2012).
- 101 Gonzalez, L. J., Moreno, D. M., Bonomo, R. A. & Vila, A. J. Host-specific enzyme-substrate interactions in SPM-1 metallo-beta-lactamase are modulated by second sphere residues. *PLoS pathogens* **10**, e1003817, doi:10.1371/journal.ppat.1003817 (2014).
- 102 Tomatis, P. E., Rasia, R. M., Segovia, L. & Vila, A. J. Mimicking natural evolution in metallo-beta-lactamases through second-shell ligand mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13761-13766, doi:10.1073/pnas.0503495102 (2005).
- 103 Kehl-Fie, T. E. & Skaar, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Current opinion in chemical biology* **14**, 218-224, doi:10.1016/j.cbpa.2009.11.008 (2010).

- 104 Cassat, J. E. & Skaar, E. P. Iron in infection and immunity. *Cell host & microbe* **13**, 509-519, doi:10.1016/j.chom.2013.04.010 (2013).
- 105 Hood, M. I. & Skaar, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature reviews. Microbiology* **10**, 525-537, doi:10.1038/nrmicro2836 (2012).
- 106 Liuzzi, J. P. *et al.* Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6843-6848, doi:10.1073/pnas.0502257102 (2005).
- 107 Zackular, J. P., Chazin, W. J. & Skaar, E. P. Nutritional Immunity: S100 Proteins at the Host-Pathogen Interface. *The Journal of biological chemistry* **290**, 18991-18998, doi:10.1074/jbc.R115.645085 (2015).
- 108 Haley, K. P. *et al.* The Human Antimicrobial Protein Calgranulin C Participates in Control of Helicobacter pylori Growth and Regulation of Virulence. *Infection and immunity* **83**, 2944-2956, doi:10.1128/IAI.00544-15 (2015).
- 109 Glaser, R. *et al.* Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection. *Nature immunology* **6**, 57-64, doi:10.1038/ni1142 (2005).
- 110 Schmidt, T. G. & Skerra, A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature protocols* **2**, 1528-1535, doi:10.1038/nprot.2007.209 (2007).
- 111 Dev, I. K., Harvey, R. J. & Ray, P. H. Inhibition of prolipoprotein signal peptidase by globomycin. *The Journal of biological chemistry* **260**, 5891-5894 (1985).
- 112 Chatzi, K. E., Sardis, M. F., Karamanou, S. & Economou, A. Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system. *The Biochemical journal* **449**, 25-37, doi:10.1042/BJ20121227 (2013).
- 113 Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* **8**, 785-786, doi:10.1038/nmeth.1701 (2011).
- 114 Pasteran, F. *et al.* Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. *Journal of clinical microbiology* **54**, 640-649, doi:10.1128/JCM.01298-15 (2016).
- 115 Kim, Y. *et al.* Structure of apo- and monometalated forms of NDM-1--a highly potent carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase. *PloS one* **6**, e24621, doi:10.1371/journal.pone.0024621 (2011).
- 116 Gonzalez, J. M., Buschiazzi, A. & Vila, A. J. Evidence of adaptability in metal coordination geometry and active-site loop conformation among B1 metallo-beta-lactamases. *Biochemistry* **49**, 7930-7938, doi:10.1021/bi100894r (2010).

- 117 Borra, P. S. *et al.* Crystal structures of *Pseudomonas aeruginosa* GIM-1: active-site plasticity in metallo-beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 848-854, doi:10.1128/AAC.02227-12 (2013).
- 118 Hernandez Valladares, M. *et al.* Zn(II) dependence of the *Aeromonas hydrophila* AE036 metallo-beta-lactamase activity and stability. *Biochemistry* **36**, 11534-11541, doi:10.1021/bi971056h (1997).
- 119 Selevsek, N. *et al.* Zinc ion-induced domain organization in metallo-beta-lactamases: a flexible "zinc arm" for rapid metal ion transfer? *The Journal of biological chemistry* **284**, 16419-16431, doi:10.1074/jbc.M109.001305 (2009).
- 120 Periyannan, G., Shaw, P. J., Sigdel, T. & Crowder, M. W. In vivo folding of recombinant metallo-beta-lactamase L1 requires the presence of Zn(II). *Protein science : a publication of the Protein Society* **13**, 2236-2243, doi:10.1110/ps.04742704 (2004).
- 121 Vollmer, W. & Bertsche, U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 1714-1734, doi:10.1016/j.bbamem.2007.06.007 (2008).
- 122 Thompson, N. J., Merdanovic, M., Ehrmann, M., van Duijn, E. & Heck, A. J. Substrate occupancy at the onset of oligomeric transitions of DegP. *Structure* **22**, 281-290, doi:10.1016/j.str.2013.11.010 (2014).
- 123 Aoki, N. *et al.* Efficacy of calcium-EDTA as an inhibitor for metallo-beta-lactamase in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 4582-4588, doi:10.1128/AAC.00511-10 (2010).
- 124 King, A. M. *et al.* Aspergillomarasmine A overcomes metallo-beta-lactamase antibiotic resistance. *Nature* **510**, 503-506, doi:10.1038/nature13445 (2014).
- 125 Wiskirchen, D. E., Nordmann, P., Crandon, J. L. & Nicolau, D. P. Efficacy of humanized carbapenem exposures against New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-producing enterobacteriaceae in a murine infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 3936-3940, doi:10.1128/AAC.00708-13 (2013).
- 126 Wiskirchen, D. E., Nordmann, P., Crandon, J. L. & Nicolau, D. P. In vivo efficacy of human simulated regimens of carbapenems and comparator agents against NDM-1-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 1671-1677, doi:10.1128/AAC.01946-13 (2014).
- 127 Khan, A. U., Maryam, L. & Zarrilli, R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC microbiology* **17**, 101, doi:10.1186/s12866-017-1012-8 (2017).
- 128 Meini, M. R., Llarrull, L. I. & Vila, A. J. Evolution of Metallo-beta-lactamases: Trends Revealed by Natural Diversity and in vitro Evolution. *Antibiotics* **3**, 285-316 (2014).

- 129 Pal, A. & Tripathi, A. An in silico approach for understanding the molecular evolution of clinically important metallo-beta-lactamases. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **20**, 39-47, doi:10.1016/j.meegid.2013.07.028 (2013).
- 130 Kazmierczak, K. M. *et al.* Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**, 1067-1078, doi:10.1128/AAC.02379-15 (2016).
- 131 Makena, A. *et al.* Biochemical characterization of New Delhi metallo-beta-lactamase variants reveals differences in protein stability. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **70**, 463-469, doi:10.1093/jac/dku403 (2015).
- 132 Kaase, M. *et al.* NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **66**, 1260-1262, doi:10.1093/jac/dkr135 (2011).
- 133 Rogers, B. A. *et al.* Treatment options for New Delhi metallo-beta-lactamase-harboring enterobacteriaceae. *Microbial drug resistance* **19**, 100-103, doi:10.1089/mdr.2012.0063 (2013).
- 134 Nordmann, P., Boulanger, A. E. & Poirel, L. NDM-4 metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 2184-2186, doi:10.1128/AAC.05961-11 (2012).
- 135 Hornsey, M., Phee, L. & Wareham, D. W. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 5952-5954, doi:10.1128/AAC.05108-11 (2011).
- 136 Rasheed, J. K. *et al.* New Delhi metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, United States. *Emerging infectious diseases* **19**, 870-878, doi:10.3201/eid1906.121515 (2013).
- 137 Gottig, S., Hamprecht, A. G., Christ, S., Kempf, V. A. & Wichelhaus, T. A. Detection of NDM-7 in Germany, a new variant of the New Delhi metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68**, 1737-1740, doi:10.1093/jac/dkt088 (2013).
- 138 Tada, T. *et al.* NDM-8 metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 2394-2396, doi:10.1128/AAC.02553-12 (2013).
- 139 Wang, X. *et al.* Novel NDM-9 metallo-beta-lactamase identified from a ST107 *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in China. *International journal of antimicrobial agents* **44**, 90-91, doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.04.010 (2014).
- 140 Khajuria, A., Praharaj, A. K., Kumar, M. & Grover, N. Presence of a novel variant NDM-10, of the New Delhi metallo-beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Indian journal of medical microbiology* **34**, 121-123, doi:10.4103/0255-0857.174101 (2016).

- 141 Tada, T. *et al.* NDM-12, a novel New Delhi metallo-beta-lactamase variant from a carbapenem-resistant *Escherichia coli* clinical isolate in Nepal. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 6302-6305, doi:10.1128/AAC.03355-14 (2014).
- 142 Shrestha, B. *et al.* Identification of a novel NDM variant, NDM-13, from a multidrug-resistant *Escherichia coli* clinical isolate in Nepal. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **59**, 5847-5850, doi:10.1128/AAC.00332-15 (2015).
- 143 Zou, D. *et al.* A novel New Delhi metallo-beta-lactamase variant, NDM-14, isolated in a Chinese Hospital possesses increased enzymatic activity against carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **59**, 2450-2453, doi:10.1128/AAC.05168-14 (2015).
- 144 Liu, Z. *et al.* Plasmid-Mediated Novel blaNDM-17 Gene Encoding a Carbapenemase with Enhanced Activity in a Sequence Type 48 *Escherichia coli* Strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **61**, doi:10.1128/AAC.02233-16 (2017).
- 145 Naas, T. *et al.* Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **32**, 917-919, doi:10.1080/14756366.2017.1344235 (2017).
- 146 Outten, C. E. & O'Halloran, T. V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**, 2488-2492, doi:10.1126/science.1060331 (2001).
- 147 Corbin, B. D. *et al.* Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* **319**, 962-965, doi:10.1126/science.1152449 (2008).
- 148 Stewart, A. C. *et al.* Clinical Variants of New Delhi Metallo-beta-Lactamase Are Evolving To Overcome Zinc Scarcity. *ACS infectious diseases* **3**, 927-940, doi:10.1021/acsinfecdis.7b00128 (2017).
- 149 Bishop, D. G. & Work, E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. *The Biochemical journal* **96**, 567-576 (1965).
- 150 Knox, K. W., Vesik, M. & Work, E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **92**, 1206-1217 (1966).
- 151 Schwechheimer, C. & Kuehn, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews. Microbiology* **13**, 605-619, doi:10.1038/nrmicro3525 (2015).
- 152 Guerrero-Mandujano, A., Hernandez-Cortez, C., Ibarra, J. A. & Castro-Escarpulli, G. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic* **18**, 425-432, doi:10.1111/tra.12488 (2017).
- 153 Kulp, A. & Kuehn, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual review of microbiology* **64**, 163-184, doi:10.1146/annurev.micro.091208.073413 (2010).

- 154 Li, Z., Clarke, A. J. & Beveridge, T. J. A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles. *Journal of bacteriology* **178**, 2479-2488 (1996).
- 155 Haurat, M. F. *et al.* Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *The Journal of biological chemistry* **286**, 1269-1276, doi:10.1074/jbc.M110.185744 (2011).
- 156 Deatherage, B. L. *et al.* Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Molecular microbiology* **72**, 1395-1407, doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x (2009).
- 157 Moon, D. C. *et al.* *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *Journal of microbiology* **50**, 155-160, doi:10.1007/s12275-012-1589-4 (2012).
- 158 Elhenawy, W. *et al.* LPS Remodeling Triggers Formation of Outer Membrane Vesicles in *Salmonella*. *mBio* **7**, doi:10.1128/mBio.00940-16 (2016).
- 159 Deatherage, B. L. & Cookson, B. T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and immunity* **80**, 1948-1957, doi:10.1128/IAI.06014-11 (2012).
- 160 McBroom, A. J., Johnson, A. P., Vemulapalli, S. & Kuehn, M. J. Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *Journal of bacteriology* **188**, 5385-5392, doi:10.1128/JB.00498-06 (2006).
- 161 McBroom, A. J. & Kuehn, M. J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular microbiology* **63**, 545-558, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x (2007).
- 162 Schwechheimer, C. & Kuehn, M. J. Synthetic effect between envelope stress and lack of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **195**, 4161-4173, doi:10.1128/JB.02192-12 (2013).
- 163 Lappann, M., Otto, A., Becher, D. & Vogel, U. Comparative proteome analysis of spontaneous outer membrane vesicles and purified outer membranes of *Neisseria meningitidis*. *Journal of bacteriology* **195**, 4425-4435, doi:10.1128/JB.00625-13 (2013).
- 164 Veith, P. D. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors. *Journal of proteome research* **13**, 2420-2432, doi:10.1021/pr401227e (2014).
- 165 Biller, S. J. *et al.* Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science* **343**, 183-186, doi:10.1126/science.1243457 (2014).
- 166 Berleman, J. E. *et al.* The lethal cargo of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicles. *Frontiers in microbiology* **5**, 474, doi:10.3389/fmicb.2014.00474 (2014).

- 167 Rakoff-Nahoum, S., Coyne, M. J. & Comstock, L. E. An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Current biology : CB* **24**, 40-49, doi:10.1016/j.cub.2013.10.077 (2014).
- 168 Schooling, S. R. & Beveridge, T. J. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of bacteriology* **188**, 5945-5957, doi:10.1128/JB.00257-06 (2006).
- 169 Zhu, Y. *et al.* Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola synergistic polymicrobial biofilm development. *PloS one* **8**, e71727, doi:10.1371/journal.pone.0071727 (2013).
- 170 Mashburn, L. M. & Whiteley, M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* **437**, 422-425, doi:10.1038/nature03925 (2005).
- 171 Yonezawa, H. *et al.* Outer membrane vesicles of Helicobacter pylori TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC microbiology* **9**, 197, doi:10.1186/1471-2180-9-197 (2009).
- 172 Manning, A. J. & Kuehn, M. J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC microbiology* **11**, 258, doi:10.1186/1471-2180-11-258 (2011).
- 173 Irazoqui, J. E. *et al.* Distinct pathogenesis and host responses during infection of C. elegans by P. aeruginosa and S. aureus. *PLoS pathogens* **6**, e1000982, doi:10.1371/journal.ppat.1000982 (2010).
- 174 Kitagawa, R. *et al.* Biogenesis of Salmonella enterica serovar typhimurium membrane vesicles provoked by induction of PagC. *Journal of bacteriology* **192**, 5645-5656, doi:10.1128/JB.00590-10 (2010).
- 175 Bonnington, K. E. & Kuehn, M. J. Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica et biophysica acta* **1843**, 1612-1619, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.12.011 (2014).
- 176 Fiocca, R. *et al.* Release of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *The Journal of pathology* **188**, 220-226, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199906)188:2<220::AID-PATH307>3.0.CO;2-C (1999).
- 177 Bomberger, J. M. *et al.* Long-distance delivery of bacterial virulence factors by Pseudomonas aeruginosa outer membrane vesicles. *PLoS pathogens* **5**, e1000382, doi:10.1371/journal.ppat.1000382 (2009).
- 178 Kolling, G. L. & Matthews, K. R. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of Escherichia coli O157:H7. *Applied and environmental microbiology* **65**, 1843-1848 (1999).
- 179 Fulsundar, S. *et al.* Gene transfer potential of outer membrane vesicles of Acinetobacter baylyi and effects of stress on vesiculation. *Applied and*

- environmental microbiology* **80**, 3469-3483, doi:10.1128/AEM.04248-13 (2014).
- 180 Renelli, M., Matias, V., Lo, R. Y. & Beveridge, T. J. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* **150**, 2161-2169, doi:10.1099/mic.0.26841-0 (2004).
- 181 Koeppen, K. *et al.* A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLoS pathogens* **12**, e1005672, doi:10.1371/journal.ppat.1005672 (2016).
- 182 Chattopadhyay, M. K. & Jaganandham, M. V. Vesicles-mediated resistance to antibiotics in bacteria. *Frontiers in microbiology* **6**, 758, doi:10.3389/fmicb.2015.00758 (2015).
- 183 Ciofu, O., Beveridge, T. J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J. & Hoiby, N. Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **45**, 9-13 (2000).
- 184 Devos, S. *et al.* The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in microbiology* **6**, 298, doi:10.3389/fmicb.2015.00298 (2015).
- 185 Schaar, V., Paulsson, M., Morgelin, M. & Riesbeck, K. Outer membrane vesicles shield *Moraxella catarrhalis* beta-lactamase from neutralization by serum IgG. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68**, 593-600, doi:10.1093/jac/dks444 (2013).
- 186 Stentz, R. *et al.* Cephalosporinases associated with outer membrane vesicles released by *Bacteroides* spp. protect gut pathogens and commensals against beta-lactam antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **70**, 701-709, doi:10.1093/jac/dku466 (2015).
- 187 Perlin, M. H. *et al.* Protection of *Salmonella* by ampicillin-resistant *Escherichia coli* in the presence of otherwise lethal drug concentrations. *Proceedings. Biological sciences* **276**, 3759-3768, doi:10.1098/rspb.2009.0997 (2009).
- 188 Dorward, D. W., Garon, C. F. & Judd, R. C. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of bacteriology* **171**, 2499-2505 (1989).
- 189 Kesty, N. C. & Kuehn, M. J. Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *The Journal of biological chemistry* **279**, 2069-2076, doi:10.1074/jbc.M307628200 (2004).
- 190 Zheng, B. *et al.* An unexpected similarity between antibiotic-resistant NDM-1 and beta-lactamase II from *Erythrobacter litoralis*. *Protein & cell* **2**, 250-258, doi:10.1007/s13238-011-1027-0 (2011).

- 191 Forsberg, K. J. *et al.* Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature* **509**, 612-616, doi:10.1038/nature13377 (2014).
- 192 D'Costa, V. M. *et al.* Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **477**, 457-461, doi:10.1038/nature10388 (2011).
- 193 Juncker, A. S. *et al.* Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein science : a publication of the Protein Society* **12**, 1652-1662, doi:10.1110/ps.0303703 (2003).
- 194 Armougom, F. *et al.* Espresso: automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic acids research* **34**, W604-608, doi:10.1093/nar/gklo92 (2006).
- 195 Guindon, S. *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* **59**, 307-321, doi:10.1093/sysbio/syq010 (2010).
- 196 Sommer, M. O., Dantas, G. & Church, G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* **325**, 1128-1131, doi:10.1126/science.1176950 (2009).
- 197 Saavedra, M. J. *et al.* Sfh-I, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**, 2330-2333 (2003).
- 198 Girlich, D., Poirel, L. & Nordmann, P. Diversity of naturally occurring Ambler class B metallo-beta-lactamases in *Erythrobacter* spp. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **67**, 2661-2664, doi:10.1093/jac/dks289 (2012).
- 199 Yum, J. H. *et al.* Genetic diversity of chromosomal metallo-beta-lactamase genes in clinical isolates of *Elizabethkingia meningoseptica* from Korea. *Journal of microbiology* **48**, 358-364, doi:10.1007/s12275-010-9308-5 (2010).
- 200 Terron-Gonzalez, L., Medina, C., Limon-Mortes, M. C. & Santero, E. Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Scientific reports* **3**, 1107, doi:10.1038/srep01107 (2013).
- 201 Santos, S. *et al.* Outer membrane vesicles (OMV) production of *Neisseria meningitidis* serogroup B in batch process. *Vaccine* **30**, 6064-6069, doi:10.1016/j.vaccine.2012.07.052 (2012).
- 202 Chatterjee, S., Mondal, A., Mitra, S. & Basu, S. *Acinetobacter baumannii* transfers the bla_{NDM-1} gene via outer membrane vesicles. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **72**, 2201-2207, doi:10.1093/jac/dkx131 (2017).