



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

“Caracterización de la envoltura celular de *Ochrobactrum anthropi*: análisis del rol del sistema TAM”

ZIMMERMAN, Luciana Mariel

Tesina presentada para obtener el grado académico de
LICENCIADA EN QUÍMICA

Santa Rosa, La Pampa

Argentina

2023

Prólogo

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciada en Química de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Celular de la Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET (CABA) y en el Laboratorio de Microbiología dependiente del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, durante el período comprendido entre 26 de Diciembre de 2022 Res. N° 694/22 y el 26 de Marzo de 2023, bajo la dirección de la Dra. BIALER Magalí y bajo la codirección de la Dra. CASTAÑO Carolina.



ZIMMERMAN, Luciana Mariel

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron en este camino y que hicieron posible este logro personal.

Agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNLPam por el lugar y los valores que me brindaron en estos años, haciéndome mejor persona y dándome la oportunidad de obtener un título profesional. A mis docentes Caro y Gra por enseñarme tanto durante los últimos años, por apoyarme en cada decisión y por cada abrazo que me ayudaba a seguir adelante.

A Ángeles y Maga por recibirme con tanto cariño desde el primer día y darme la posibilidad de formar parte de su laboratorio. También a cada miembro del Lab 204 por acompañarme día a día, apoyarme y enseñarme tanto.

A mis amigos Wanda, Delfi, Carli, Sergio, Tomi, Juli, Cati, Bri, Ana y Dani por estar siempre presente y darme una amistad tan linda, y a Lu, Lucas, Luke y Gonza por ocupar el papel no sólo de amigos, sino también de familia en mi primer año viviendo en Buenos Aires.

A mis tíos, primos y abuelos por recibirme siempre con tanto cariño.

A mi novio Jona porque a pesar de la distancia y de las responsabilidades de cada uno siempre estuvo a mi lado, día tarde noche y madrugada bancando mis días de estudio y dándome fuerzas y ánimo para seguir y nunca decaer. También a su familia que me acompañaron siempre y festejaron siempre mis logros como suyos.

Agradecer finalmente a mi familia, mi mamá Susana, mi papá Hugo y mi hermana Cami, que fueron mi mayor pilar en este camino estando presente en cada final aprobado, en cada bajón, en cada momento de estrés, en cada festejo y apoyándome en cada decisión tomada. También a mi perra Blanquita que llegó a casa en febrero de 2017, el mes que empecé la carrera. Todos ellos ayudándome día a día, siempre juntos.

Resumen

La habilidad de los patógenos y simbiontes bacterianos Gram-negativos de tolerar condiciones adversas, modular su permeabilidad a compuestos tóxicos y secretar proteínas/efectores, depende del correcto ensamblado de la envoltura celular, especialmente de la membrana externa (OM). La OM de bacterias Gram-negativas está formada por una bicapa lipídica asimétrica: el lipopolisacárido (LPS) en la cara externa y fosfolípidos en la cara interna. Además, la OM contiene proteínas (OMPs) con estructura de barril β y lipoproteínas, algunas de las cuales interaccionan con otros componentes de la envoltura como el peptidoglicano (PG). Varios aspectos de la translocación y ensamblado de los componentes de la envoltura celular aún son poco comprendidos. En este punto, se estudia el sistema TAM (*Translocation and Assembly Module*), mediante la proteína TamB, la cual es necesaria para la estabilidad de la OM y la correcta translocación de un subgrupo de OMPs. El objetivo de este trabajo se centra en entender la importancia y el rol de TamB en alphaproteobacterias, utilizando como modelo bacteriano *Ochrobactrum anthropi*, especie cercana filogenéticamente al género *Brucella*. Para tal objetivo se evaluarán fenotipos asociados a la envoltura celular y la resistencia a antimicrobianos de dicha especie y la mutante $\Delta tamB$ correspondiente.

Abstract

The ability of Gram-negative bacterial pathogens and symbionts to tolerate adverse conditions, modulate their permeability to toxic compounds, and secrete proteins/effectors, depends on the correct assembly of the cell envelope, especially the outer membrane (OM). The OM of Gram-negative bacteria is formed by an asymmetric lipid bilayer: lipopolysaccharide (LPS) on the outside and phospholipids on the inside. In addition, OM contains proteins (OMPs) with a β -barrel structure and lipoproteins, some of which interact with other components of the envelope such as peptidoglycan (PG). Several aspects of the translocation and assembly of cell envelope components are still poorly understood. At this point, the TAM (*Translocation and Assembly Module*) system is studied, through the TamB protein, which is necessary for the stability of the OM and the correct translocation of a subgroup of OMPs. The objective of this work is focused on understanding the importance and role of TamB in alphaproteobacteria, using *Ochrobactrum anthropi* as a bacterial model, a species phylogenetically close to the genus *Brucella*. For this purpose, phenotypes associated with the cell envelope and resistance to antimicrobials of said species and the corresponding $\Delta tamB$ mutant will be evaluated.

Índice de contenidos

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Ochrobactrum anthropi</i> y filogenia.....	1
1.2 Envoltura celular en Gram-negativas.....	3
1.2.1 Identificación de Gram-negativas.....	3
1.2.2 Caracterización.....	4
1.3 Biogénesis de la OM en Gram-negativas: sistema TAM	6
1.4 Tolerancia a agentes antimicrobianos	9
1.5 Antecedentes del grupo de trabajo	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Microorganismos utilizados	20
3.2 Medios de cultivo y condiciones de cultivo	20
3.3 Antibióticos	21
3.4 Conservación de cepas	21
3.5 Curva de crecimiento	21
3.6 Fenotipos de mutantes defectivas en el sistema TAM de <i>O. anthropi</i>	22
3.6.1 Tolerancia a agentes disruptivos de membrana	22
3.6.2 Tolerancia a antibióticos	23
3.7 Fraccionamiento subcelular	24
3.8 Microscopía TEM	25
3.9 Análisis estadístico	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Generación de cepas	27
4.2 Caracterización de <i>O. anthropi</i>	28
4.3 Fenotipos de mutantes defectivas en el sistema TAM de <i>O. anthropi</i>	30
4.3.1 Tolerancia a agentes disruptivos de la membrana.....	31
4.3.1.1 Lisozima	31
4.3.1.2 Ensayos de tolerancia a detergentes y compuestos quelantes	32
4.3.2 Tolerancia a antimicrobianos	34
4.4 Microscopía TEM	36
4.5 Fraccionamiento subcelular	42
5. DISCUSIÓN	44
6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS A FUTURO	48
7. BIBLIOGRAFÍA	49

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Ochrobactrum anthropi* y filogenia

El género *Ochrobactrum* y, en particular, la especie *Ochrobactrum anthropi* fueron descritos por primera vez por Holmes en el año 1988 [1], con su nombre proveniente del griego *ochros*, que significa amarillo pálido, y *anthropi* porque se puede encontrar en material clínico de origen humano. Previamente, esta especie estaba incluida en el género *Achromobacter*.

Ochrobactrum anthropi es un bacilo gramnegativo, aerobio obligado, móvil por flagelos peritricos, oxidasa positiva, catalasa positiva e indol negativo, capaz de crecer entre los 20 y 37°C [1]. Luego de 24 h de cultivo en medio rico TSA, las colonias son circulares, lisas, brillantes, convexas y de 1 mm de diámetro con bordes enteros. La bacteria está ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose en el suelo y el agua [2].

Aunque *O. anthropi* es una bacteria con baja virulencia, es capaz de adherirse a superficies y por ello se asocia a contaminación de catéteres y dispositivos médicos, considerándose de tal forma un agente oportunista en pacientes inmunocomprometidos [3-5]. Los patógenos oportunistas producen daño solamente en determinadas ocasiones, coincidiendo con una disminución de los mecanismos inmunitarios, tanto locales como generales de dichos pacientes. Estos microorganismos forman parte de la flora microbiana habitual del hospedador o del ambiente que le rodea [2]. De esta manera, el microorganismo en estudio se ha aislado en casos de bacteriemia, endoftalmítis, shock séptico, endocarditis, osteomielítis, entre otras infecciones. Dentro de las especies del género, *O. anthropi* tiene un rol predominante en las enfermedades humanas [4]. Se han encontrado genes asociados a virulencia como aquellos involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos, al metabolismo de carbohidratos, síntesis de la pared celular y la formación de biofilms [6].

O. anthropi fue descrita como una de las especies Gram-negativas que presentan resistencia a un alto número de antibióticos, tales como a los β -lactámicos, lo cual genera dificultades en el tratamiento de las infecciones. En algunas ocasiones, se han empleado combinaciones de cotrimoxazol y gentamicina o amikacina, y más recientemente, ciprofloxacina para el tratamiento ante bacteriemia de *O. anthropi* [7].

El género *Ochrobactrum* está relacionado filogenéticamente con el género *Brucella*, formando parte de la familia Brucellaceae, la cual se encuentra dentro del orden Rhizobiales de la clase Alphaproteobacterias. [8, 9].

Las especies pertenecientes al género *Ochrobactrum* presentan similitudes por debajo del 95% por secuenciación del rARN 16S [6], conociéndose hasta el momento 9 de ellas, siendo sólo *O. anthropi*, *O. intermedium* y *O. pseudintermedium* reportadas en muestras clínicas. Por otra parte, se encuentran similitudes de secuencia rARN 16S mayores al 97% entre especies del género *Ochrobactrum* y *Brucella*, dicha cercanía filogenética se observa en la Figura 1. Sorpresivamente la divergencia genómica entre ambos géneros es incluso menor que entre especies del mismo género, por lo que podría considerarse un debate sobre la división entre los géneros *Brucella* y *Ochrobactrum*. Varias evidencias afirman que cuando se propuso *Ochrobactrum* [1] no se contemplaba un análisis de secuencias de rARN 16S que apoye la clasificación hoy en día conocida, y que incluso no se había realizado un análisis filogenético en relación a *Brucella* [10]. Además, en bases de datos tales como NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), algunas secuencias de *O. anthropi* se encuentran caracterizadas, aún en la actualidad, como secuencias de “*Brucella anthropi*” [11]. Se considera que esta definición se encuentra desestimada por las diferencias patogénicas y de estilos de vida que estos géneros presentan entre sí. Asimismo se sugiere que las diferencias fenotípicas asociadas podrían estar relacionadas a la adaptación evolutiva de la patogénesis de *Brucella* [10].

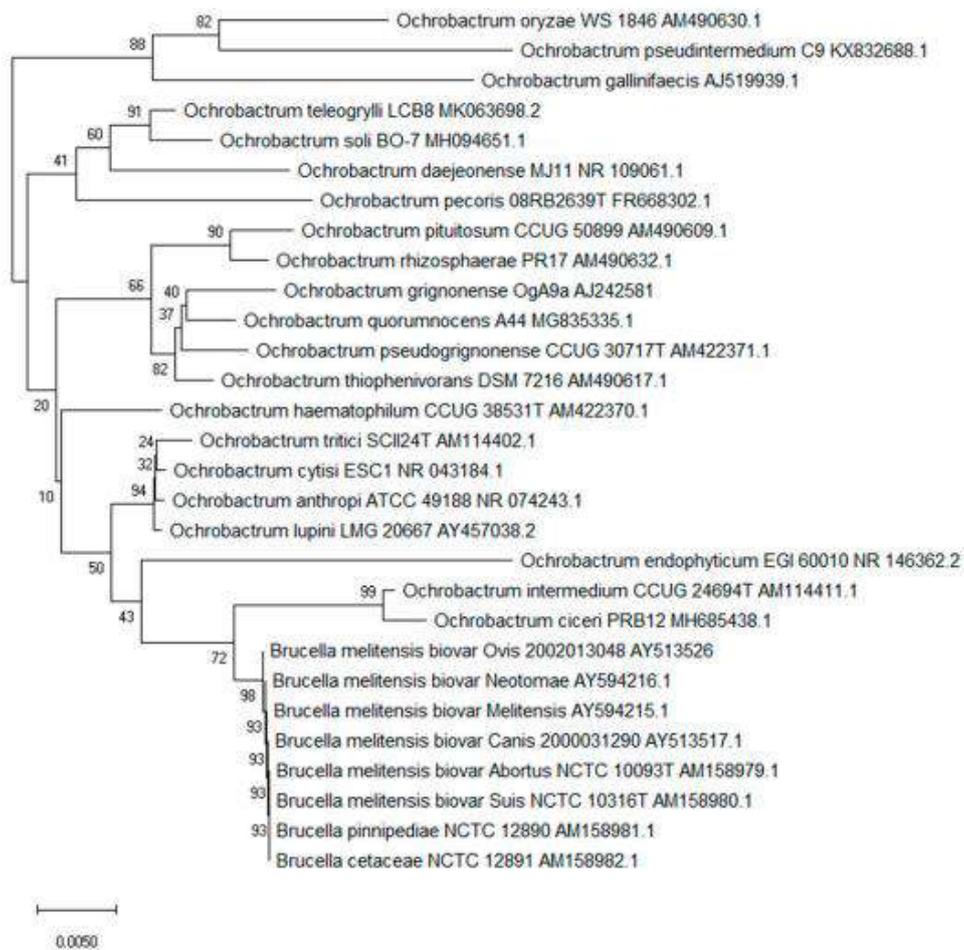


Figura 1: Estructura filogenética del género *Ochrobactrum* junto con *Brucella* basado en árboles de secuenciación de rARN 16S [6].

1.2 Envoltura celular en Gram-negativas

1.2.1 Identificación de Gram-negativas

La identificación de bacterias Gram-negativas está asociada en un primer término a la tinción Gram fundamentándose en las propiedades únicas de la membrana externa de las mismas. Durante la tinción Gram, el colorante cristal violeta penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram-positivas como Gram-negativas) a través de la pared bacteriana. A continuación, la mezcla de alcohol-acetona decolora las bacterias Gram-negativas (no así las Gram-positivas). Por último, un colorante de contraste, siendo safranina o fucsina, vuelve a las bacterias Gram-negativas de color rosado, mientras que las Gram-positivas permanecen con color violeta-azul oscuro.

1.2.2 Características

Un correcto ensamblado de la envoltura celular en patógenos le brinda la capacidad que tienen éstos de tolerar condiciones adversas, modular su permeabilidad a compuestos tóxicos y secretar proteínas/efectores, permitiendo una interacción con las células del hospedador. La envoltura celular bacteriana es el mayor punto de interacción entre los patógenos y la célula hospedadora; por lo tanto, las moléculas que forman parte de la misma tienen un rol fundamental en el éxito de la infección.

La envoltura celular de Gram-negativas está compuesta por la membrana interna (IM), un espacio periplásmico que contiene al peptidoglicano (PG), la membrana externa (OM) y el lipopolisacárido (LPS), como se indica en la Figura 2. La presencia de dos membranas es la característica que le brinda el nombre de didermas a dichos organismos. La IM consiste en una bicapa fosfolipídica, mientras que la OM se caracteriza por ser una membrana altamente asimétrica compuesta por fosfolípidos y lipoproteínas en la cara interna y LPS en la cara externa [12]. El LPS, representado en la Figura 3, está compuesto por el lípido A, el *core* y el antígeno O, en el que la presencia de éste último define a las cepas lisas, mientras que las cepas rugosas carecen de él o bien se encuentra reducido. Particularmente, el lípido A actúa como una endotoxina y contribuye a la capacidad patógena del microorganismo, desencadenando una respuesta inmune innata que se caracteriza por la producción de citocinas y la activación del sistema inmunológico. Por otro lado, el *core* es un núcleo de polisacáridos definidos, que posee en su fracción interna una composición en base de dos tipos de azúcares exclusivos de Gram-negativas: 2-ceto-3-desoxioctónico (KDO) y L-glicero-D-manoheptosa (Hep), pudiendo estar unidos a su vez a fosforil-etanolamina [13]. Esta región es muy rica en grupos cargados, especialmente con carga negativa por presencia de los fosfatos y el KDO.

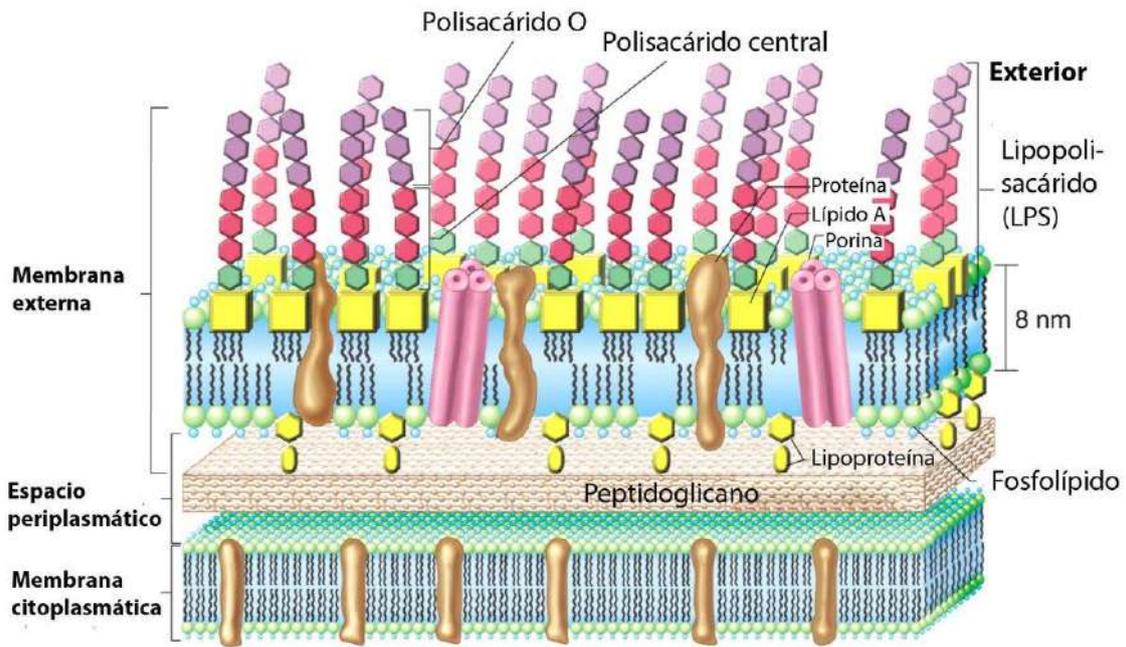


Figura 2: envoltura celular de Gram-negativas [14].

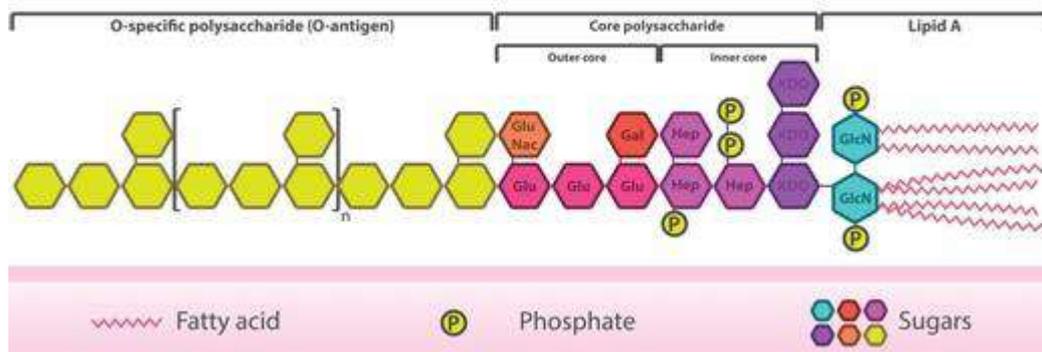


Figura 3: estructura del LPS [14].

La OM está compuesta principalmente por dos tipos de proteínas, las lipoproteínas y las proteínas integrales de membrana, tales como las porinas o canales proteicos que permiten el paso de ciertas sustancias [13]. Algunas de las proteínas integrales de membrana mantienen unida a la OM con el PG y la IM mediante enlaces covalentes, hidrófobos o bien iónicos mediante cationes divalentes. De esta forma, la OM está en contacto directo con la IM en numerosos puntos, denominados zonas de adhesión. Éstas pueden tratarse de regiones en las que produzca una fusión entre estos dos tipos de membrana, facilitando quizás el transporte de ciertas sustancias desde el exterior al interior celular [13].

La OM protege a las bacterias de ciertos antibióticos, colorantes y detergentes que normalmente dañarían la membrana interna o la pared celular de PG, proporcionando una mayor resistencia a compuestos como la lisozima y a la penicilina que actúan sobre el mismo. Se define, a la OM como un mosaico fluido que permite el desplazamiento lateral de los fosfolípidos, del LPS, y de las proteínas, pero no de las lipoproteínas unidas covalentemente al PG. Sin embargo, esta fluidez es menor que la de la membrana citoplásmica [15].

1.3 Biogénesis de la OM en Gram-negativas: sistema TAM

Todos los componentes que forman la envoltura celular, deben transportarse desde el citoplasma hasta la IM, o bien hasta la OM traspasando el periplasma en las bacterias Gram-negativas. Para lograr una correcta inserción de los componentes de membrana, las bacterias cuentan con diferentes maquinarias, las cuales toman aún mayor importancia en las bacterias didermas. Entre los componentes de la OM de bacterias didermas, las proteínas se sintetizan como precursores con secuencias señal en el N-terminal, que son esenciales para la translocación a través de la IM.

Una de las maquinarias proteicas que asiste a la inserción de proteínas en la OM es BAM (*β -barrel assembly machinery*). BAM asiste a aquellas que contienen barriles β , como las porinas y los autotransportadores. Particularmente, los autotransportadores son proteínas que conforman el SSTV (sistema de secreción tipo V) y se creía que contenían toda la información necesaria para su correcta translocación e inserción a la OM. Sin embargo, hoy en día varias evidencias indican que el término "auto" en realidad no contempla el mecanismo de translocación de los autotransportadores ya que se requieren otras proteínas para su correcta secreción, siendo el caso de BAM [16, 17].

El complejo BAM está compuesto por la proteína esencial BamA y proteínas accesorias. BamA pertenece a un subgrupo de la superfamilia de proteínas Omp85 que se caracteriza por poseer un dominio con estructura de barril β conservado en el extremo C-terminal insertado en la OM y 5 dominios periplásmicos en la región N-terminal denominados POTRA (por sus siglas en inglés, *polypeptide transport associated*), cuya función propuesta es mediar en la interacción inicial del complejo BAM con los sustratos polipeptídicos. El sistema BAM junto con otros complejos asociados a la envoltura

celular son cruciales en la biogénesis de la envoltura de bacterias didermas, en particular del ensamblado de la OM [18].

En los últimos años, se ha descrito que los genomas de *Escherichia coli* y bacterias filogenéticamente cercanas como *Citrobacter rodentium* codifican una proteína de la subfamilia de Omp85 denominada TamA, la cual forma parte de un complejo llamado TAM (*Translocation and Assembly Module*) que también sería necesario para la correcta translocación de autotransportadores [19]. El complejo TAM está compuesto por TamA, que posee estructura de barril β que se embebe en la OM y tres dominios POTRA que se orientan hacia el periplasma y a través de los cuales se propone que interactúa con TamB, como puede observarse en la Figura 4. TamB por su parte, es una proteína de gran tamaño (136 kDa en *E. coli* K12) que se inserta en la IM mediante un péptido señal codificado en el N-terminal que es no clivable; el resto de TamB exhibe una extensa estructura β -helicoidal que está inmersa en el periplasma [19-21]. TamB tendría un efecto regulador sobre la interacción del sistema TAM con sus sustratos, ya que recientemente se postuló que TamB posee una cavidad hidrofóbica denominada “taco β ” que podría servir como chaperona para guiar las cadenas hidrofóbicas β de los sustratos del sistema TAM a través del periplasma [20].

Por otro lado, las proteínas de la familia TamB se encontraron ampliamente distribuidas en la mayoría de los linajes bacterianos gramnegativos, incluso en numerosos géneros que no albergan autotransportadores, lo cual abriría un nuevo debate sobre posibles y desconocidas funciones del sistema TAM. Se propone incluso, que esta maquinaria podría estar actuando en conjunto o de manera coordinada con BAM. En la Figura 5 se presenta un modelo propuesto de los componentes y el funcionamiento de la maquinaria de TAM en la translocación de proteínas a la OM [22].

Trabajos más recientes, vinculan la función del sistema TAM con un rol general en la biogénesis de la envoltura celular [23-27]. Ruiz y colaboradores plantearon que TamB estaría involucrada, junto con otras proteínas con dominios AsmA, en el transporte de fosfolípidos hacia la OM y que estas proteínas cumplirían un rol redundante pero esencial en *E. coli* K-12 [26]. Poco se conoce sobre los mecanismos que rigen el ensamblaje de la OM en el grupo Alphaproteobacteria.

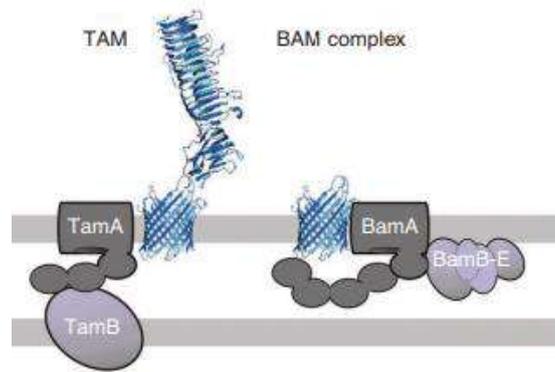


Figura 4: estructura de sistemas TAM (izquierda) y BAM (derecha). El sistema TAM conformado por TamA en la OM junto con los 3 dominios POTRA en el espacio periplasmático, y TamB en la IM. El sistema BAM conformado por BamA en la OM junto con los 5 dominios POTRA en el espacio periplasmático [19].

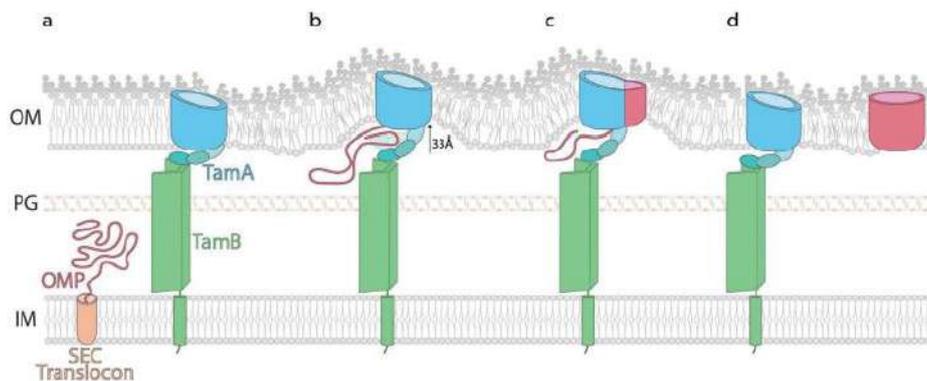


Figura 5: Modelo propuesto de maquinaria TAM. (a) un sustrato se transloca a través de la IM mediante un translocon SEC. TamB se encuentra en una conformación determinada esperando por el sustrato, donde a su vez, el barril β de TamA produce adelgazamiento de la membrana y una desorganización de los lípidos cercanos a la puerta de TamA. (b) el sustrato atraviesa el periplasma y se acopla a TAM, generando que los dominios POTRA y TamA produzcan un elevamiento de la OM mediante la desorganización de lípidos y disminución de la energía de activación necesaria para la inserción del sustrato. (c) el sustrato atraviesa TamA y comienza a plegarse en posición barril β . (d) el sustrato se libera en la OM y el sistema TAM vuelve a su conformación inicial para aceptar un nuevo sustrato [22].

Por otro lado, la correcta inserción de OMPs (proteínas de membrana externa) en la OM es crucial para la secreción de proteínas al medio extracelular ya que los sistemas involucrados están formados por al menos una o más OMPs. La secreción de proteínas en bacterias es esencial para una gran variedad de funciones, incluidas la interacción con el medio ambiente y el hospedador. Particularmente en los microorganismos patógenos,

el correcto funcionamiento de los sistemas de secreción de proteínas suele ser un factor determinante en la virulencia y en la colonización frente a las células del hospedador [19]. En bacterias Gram-negativas se han descrito once sistemas, enumerados del I al XI [28], los cuales median la secreción de sus proteínas sustrato al medio extracelular a través de diferentes mecanismos [16]. Uno de ellos es el sistema V, SSTV, mencionado anteriormente, constituido por los autotransportadores.

1.4 Tolerancia a antimicrobianos

El ensamblado y remodelación precisos de la OM son cruciales para preservar una barrera de permeabilidad ante posibles ataques durante el proceso de infección del patógeno. La OM de las bacterias Gram-negativas dificultan el acceso de los antibióticos a los sitios objetivos, reduciendo la susceptibilidad bacteriana a los mismos [29]. Particularmente, la OM de *Brucella abortus* es permeable a sondas hidrofóbicas y es particularmente resistente a lisozima, a la desestabilización por péptidos policatiónicos y EDTA (etilendiaminotetraacético) [30, 31]. La importancia de estas propiedades inusuales en *B. abortus* es un gran punto de interés, donde se desea profundizar en esta tesis y en trabajos futuros en estudios acerca de la composición de la OM en la especie *O. anthropi*, siendo el pariente más cercano al género *Brucella*.

O. anthropi es un patógeno con multiresistencia antibiótica, siendo resistente a la mayoría de las cefalosporinas, penicilinas y cefamicinas [32], a través de una clase de enzimas β -lactamasas (OCH). Los β -lactámicos son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis del PG o mureína, actuando sobre las etapas finales de la misma. La acción de estos antibióticos se debe a la similitud estereoquímica entre las moléculas de éstos y la D-alanil-D-alanina (precursores del PG) [33]. Además, al menos seis aislamientos de *O. anthropi* fueron resistentes también a los carbapenémicos [34].

Las polimixinas son antimicrobianos polipéptidos con actividad bactericida, siendo los más utilizados polimixina B y la polimixina E, también conocida como colistina. Para comprender el mecanismo de acción de las polimixinas es necesario conocer los componentes químicos presentes en la estructura de su molécula (Figura 6A). Las polimixinas se definen como lipopolipéptidos cíclicos, constituidas por una secuencia de diez péptidos, residuos hidrofóbicos y, por último, una molécula de ácido graso en su extremo N-terminal. Así como en otros antimicrobianos peptídicos, la presencia de

residuos lipofílicos e hidrofílicos en una misma molécula confiere a las polimixinas un carácter anfipático. Las polimixinas ejercen su actividad bactericida a partir de la atracción electrostática que establecen inicialmente con el lípido A presente en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas por la diferencia de cargas entre estas dos moléculas. Las polimixinas son compuestos catiónicos (carga positiva), mientras que el lípido A presenta carga predominantemente negativa. La interacción entre la polimixina y el lípido A promueve un desplazamiento de los iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} responsables del mantenimiento de la organización de la membrana externa. Tras el desplazamiento de estos iones y la desorganización del lípido A, el residuo de ácido graso en el extremo N-terminal de la molécula de polimixina se inserta en la membrana externa, causando lesiones en la misma. Al llegar al espacio periplasmático, la molécula de polimixina causa el mismo tipo de daño en la membrana interna bacteriana. Estas lesiones aumentan la permeabilidad de las membranas, la pérdida de componentes intracelulares y, en consecuencia, la muerte de la célula bacteriana. Se sugiere de este modo, que, ocasionando una disminución de la carga negativa de la membrana, habrá una menor atracción electrostática entre la molécula de polimixina y la membrana externa bacteriana. [35, 36]. En este sentido, *Brucella spp.* han mostrado una resistencia considerable a la polimixina B, probablemente debido a una disminución en la concentración de cargas negativas del LPS en comparación con otras bacterias Gram-negativas. Por su parte *Ochrobactrum anthropi* es considerado sensible a la polimixina B, aunque se observó que la OM se ve poco afectada luego del tratamiento con la polmixina B [9].

En otro trabajo se demostró que el EDTA y la polimixina B facilitaron sustancialmente la transferencia de moléculas NPN (sonda fluorescente hidrofóbica N-fenilnaftalina-1-amina) al entorno hidrofóbico de las membranas en *Bradyrhizobium japonicum*, *Ochrobactrum lupini* y *Escherichia coli* en comparación con las bacterias no tratadas. Se encontró únicamente que la envoltura de *O. lupini* fue susceptible a ambos agentes de la misma manera, lo cual indicaría que la polimixina B puede destruir por completo la barrera de permeabilidad de la OM por sí sola y que no sería necesaria la adición de EDTA. Así mismo, *O. lupini* podría clasificarse como una bacteria resistente a la polimixina B, pero la concentración de 1000 U/ml resultaría bactericida [12].

Otros antibióticos pueden ser empleados al evaluar la permeabilidad de la envoltura celular en Gram-negativas, tales como el tratamiento con eritromicina, vancomicina y gentamicina, cuyas estructuras químicas se observan en la Figura 6B, 6C y 6D

respectivamente. La eritromicina es un antimicrobiano macrólido, bacteriostático, compuestos por un anillo lactónico a los que se les une uno o varios azúcares mediante enlaces glucosídicos que tiene como mecanismo de acción inhibir la elongación de la cadena proteica actuando en el ribosoma bacteriano bloqueando de esta forma la traducción de proteínas en la bacteria. Los macrólidos son compuestos básicos capaces de atravesar las membranas lipídicas, confiriéndole la particularidad de concentrarse adecuadamente dentro de las células eucariotas y atravesar la membrana externa de los bacilos Gram-negativos [37]. La vancomicina es un antimicrobiano glicopéptido que actúa principalmente sobre las bacterias Gram-positivas inhibiendo la síntesis del PG al unirse a los terminales D-Ala-D-Ala como precursores del mismo [37]. La gentamicina y la amikacina, por su parte, son antimicrobianos de la clase de los aminoglucósidos que están compuestos por sustancias hidrofílicas formadas por dos o más amino azúcares que se enlazan mediante un puente glucosídico al núcleo aminociclitol de la molécula. El efecto bactericida de los aminoglucósidos se produce luego de su enlace al sitio A del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica como consecuencia. A pesar de su naturaleza altamente polar, que podría impedir su difusión por las membranas, los aminoglucósidos atraviesan la membrana externa de bacterias Gram-negativas por la ruptura de los enlaces de Mg^{2+} entre las moléculas de lipopolisacáridos. El enlace de los aminoglucósidos resulta en un desplazamiento de iones de Mg^{2+} y Ca^{2+} , los cuales se unen a las moléculas liposacáridicas adyacentes, dañificando la membrana celular externa, formando poros transitorios, con un consecuente aumento de la permeabilidad de la membrana celular externa [38].

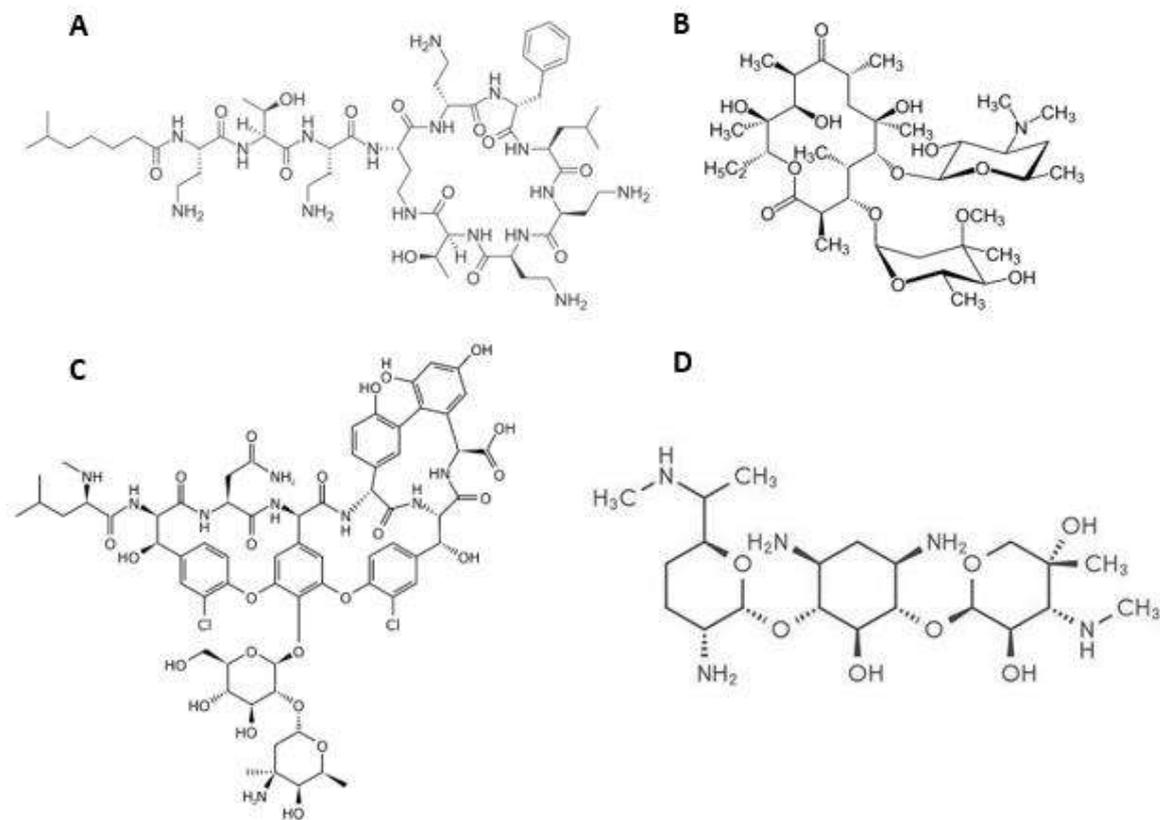


Figura 6: estructuras químicas de polimixina B (A), eritromicina (B), vancomicina (C) y gentamicina (D).

Por otro lado, se conoce que el puente de cationes divalentes establecido entre los grupos cargados negativamente del lípido A y KDO es esencial para que la OM actúe como una barrera eficaz, y se cree que la eliminación parcial de dichos cationes causada por EDTA causaría una desestabilización de la OM. Sin embargo, la observación de que el EDTA no tiene efecto sobre las células de *Brucella* y *Ochrobactrum* indicaría que la estabilización del LPS con cationes divalentes no jugaría un papel importante en la permeabilidad de estas bacterias ni sería necesaria para un anclaje firme del LPS en la OM [9]. La molécula de EDTA tiene un número de coordinación de seis en el que dos grupos son amino y cuatro son carboxilo, con la posibilidad de secuestrar iones metálicos, actuando como agente quelante (Figura 7). El EDTA quela iones metálicos en una proporción de 1:1 independientemente de la carga del catión, teniendo mayor afinidad con iones divalentes tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} .

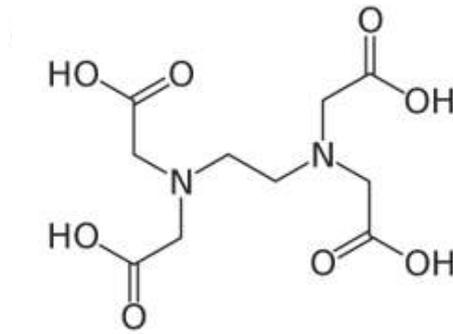


Figura 7: estructura química de EDTA.

Otros compuestos que podrían aportar información en cuanto a la permeabilidad de la OM de las bacterias en estudio son los detergentes como el SDS (dodecil sulfato sódico), Tritón X-100 y DOC (deoxicolato de sodio). Los detergentes son compuestos de característica anfipática, lo que implica estar formados por una parte hidrófoba y otra hidrófila. Debido a su composición y estructura molecular, tienen la capacidad de interaccionar con los fosfolípidos y proteínas de la membrana celular, incluso ocupando lugares en ella, provocando rompimiento de la capa lipídica [39]. Así mismo, actuando como agentes solubilizantes, se favorece la solubilidad de la membrana y de proteínas de membrana, aumentando la permeabilidad de ésta. La acción de los detergentes se caracteriza por disminuir la tensión superficial, denominándose de tal modo como agentes tensioactivos [39].

Particularmente, el SDS es un tensioactivo iónico formado por una cadena carbonada correspondiente a la parte apolar e hidrofóbica, y un grupo fosfato con carga negativa correspondiente a la parte polar e hidrofílica [39], como se puede observar en la Figura 8A. Por su parte, el Tritón X-100 es un tensioactivo no iónico cuya molécula presenta un polo hidrófobo, el resto *p-t*-octilfenílico que interacciona con la zona hidrocarbonada de la membrana, y un polo hidrófilo constituido por 9 o 10 unidades de oxietileno, cuya estructura química puede observarse en la Figura 8B. Los detergentes no iónicos actúan interrumpiendo los enlaces lipídicos y los enlaces lípido-proteína [39]. El DOC, representado en la Figura 8C, es una sal sódica del ácido biliar desoxicólico, tensioactivo iónico considerado un detergente suave, con la capacidad de interrumpir y disociar interacciones presentes en las proteínas, facilitando su solubilidad y por ende afectando la permeabilidad de la membrana [39].

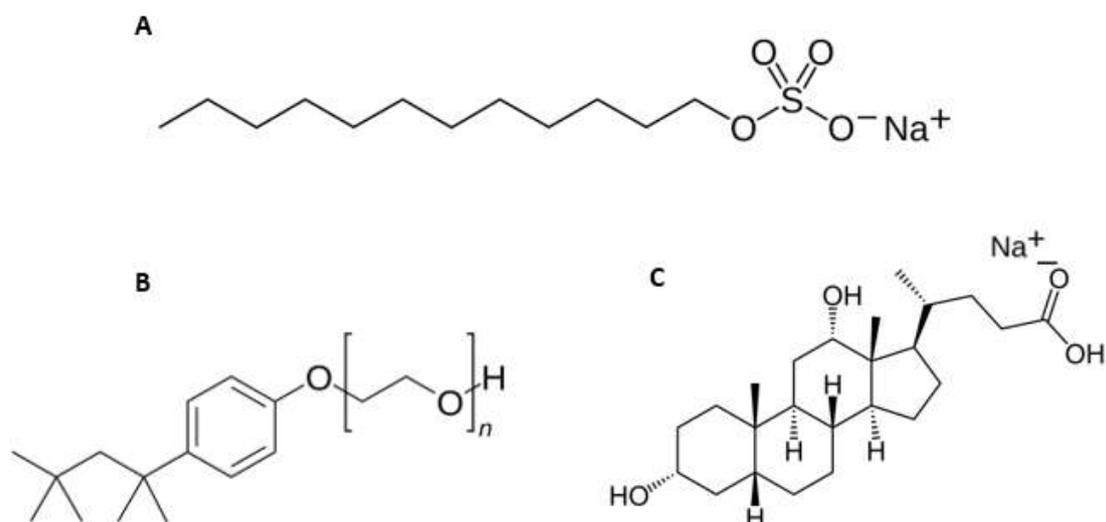


Figura 8: estructura química de SDS (A), Tritón X-100 con $n = 9$ o 10 (B) y DOC (C).

Por último, existen enzimas que afectan la integridad del PG. Particularmente, la lisozima es una enzima que cataliza la reacción de hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetil-D-glucosamina (NAG) en el PG, debilitando así la pared celular provocando la lisis bacteriana.

1.5 Antecedentes del grupo de trabajo

La OM de *Brucella* forma bicapas muy estables ya que varias proteínas de la membrana externa (OMPs) de *Brucella* mantienen interacciones hidrofóbicas con otros componentes de OM y pueden contener dominios hidrofílicos que permiten su unión al PG; incluso varios autores también han demostrado una interacción aparentemente covalente entre OMPs y el PG, resultando una mayor “rigidez de la OM” en *Brucella* con respecto a otras bacterias Gram-negativas [40, 41]. *Brucella* contiene un LPS no convencional poco endotóxico que confiere resistencia a los antimicrobianos del hospedador. Como ya se mencionó, tanto el lípido A como el núcleo del LPS de *Brucella* exhiben un menor número de grupos cargados negativamente en comparación con la mayoría de los LPS de otras bacterias, confiriéndole una baja permeabilidad (y por tanto una mayor resistencia) a policationes como la polimixina B y la lisozima, y una permeabilidad relativamente alta a los compuestos hidrofóbicos.

Nuestro grupo de trabajo (Laboratorio Microbiología molecular y celular – Fundación Instituto Leloir) ha identificado un locus de *B. suis* formado por los genes *mapA* (BR0048) y *mapB* (BR0049) (por *membrane altering proteins*), que son los ortólogos de *tamA* y *tamB* en gammaproteobacterias, respectivamente, como se muestra en la Figura 9A [23].

Demostramos que la proteína MapB está asociada a la membrana interna, aunque la mayor parte de la misma estaría inmersa en el periplasma, mientras que la proteína codificada por el gen homólogo a TamA (BR0048) estaría inmersa en la membrana externa anclado a los 3 dominios POTRA correspondientes; dicho modelo se ve representado en la Figura 9B. En conclusión, la organización del dominio proteico predicho, la localización subcelular y los análisis co-transcripcionales indican que las proteínas BR0048 y BR0049 conforman el sistema TAM de *Brucella spp.*

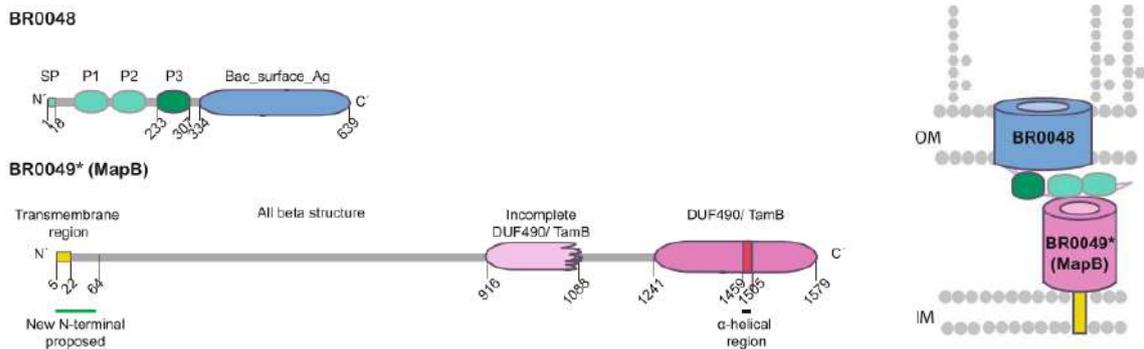


Figura 9: BR0048 y MapB son ortólogos a TAM en *B.suis*. (A) Esquema de la organización de los dominios de BR0048 predicho y MapB. (B) Esquema predicho de BR0048 y MapB en la envoltura celular bacteriana [23].

Por otro lado, se demostró que MapB es necesaria para la integridad de la envoltura celular ya que ante su ausencia (en la cepa mutante $\Delta mapB$), la bacteria pierde su típica resistencia a diferentes agentes tales como Tritón X-100 y polimixina B, y se lisa rápidamente en presencia de lisozima. En esta línea, para determinar si la cepa mutante $\Delta mapB$ conservaba las características en cuanto a composición del antígeno O de la OM, se realizó una tinción cristal violeta, demostrándose que la cepa no tenía características rugosas debido a que fue casi incapaz de retener el colorante como sí lo hizo su cepa silvestre. Estos resultados se presentan gráficamente en la Figura 10.

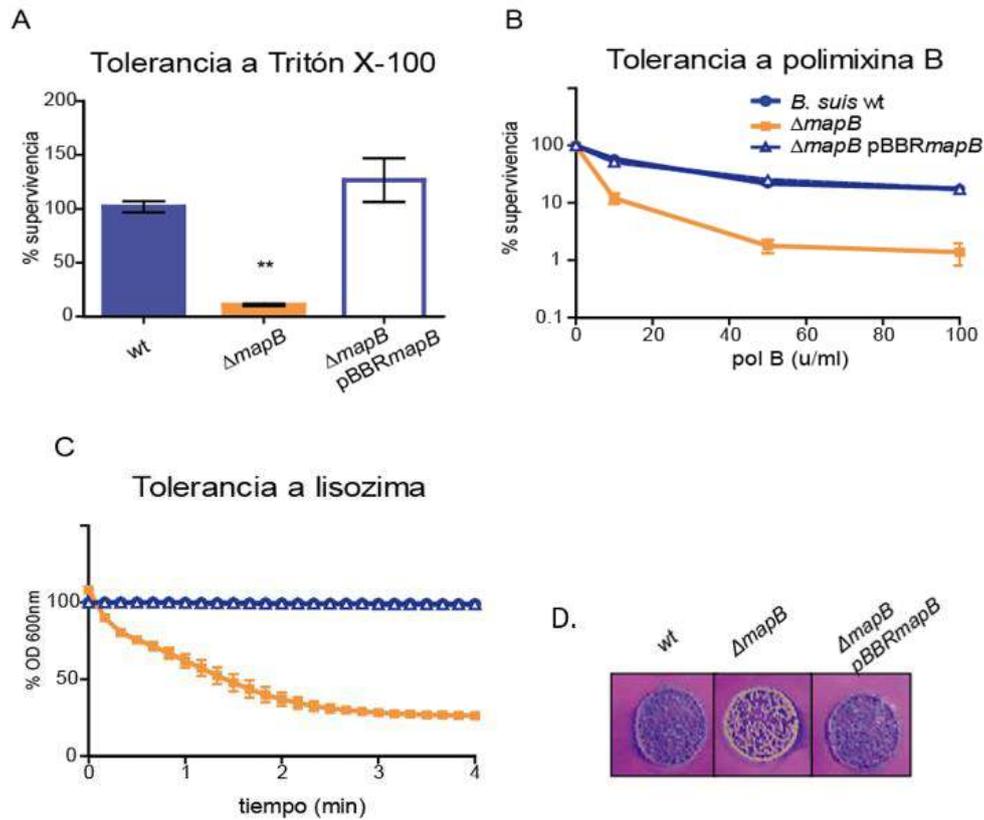


Figura 10: La disminución de la tolerancia a diferentes compuestos demuestra una alteración de la membrana en la mutante $\Delta mapB$. La cepa *B. suis* (wt), la mutante $\Delta mapB$ y la cepa complementada $\Delta mapB$ pBBRmapB fueron analizadas. (A) Las bacterias se incubaron con y sin Triton X. (B) Las bacterias fueron incubadas por 60 minutos a 37°C con 0 (control), 10, 50 o 100 Unidades/ml de polimixina B. (C) Las bacterias fueron tratadas con lisozima y medidas su OD_{600nm} cada 10 segundos. (D) Evaluación de disociación, tinción con Cristal violeta y oxalato de amonio de colonias en placas en medio rico (TSA) [23].

Se determinó que MapB (TamB) fue necesaria para la correcta y eficiente translocación de un conjunto de OMPs en la OM analizándose la abundancia relativa de OMPs por proteómica semi-cuantitativa de membranas totales (IM+OM) y por Western blot utilizando anticuerpos específicos. No se observó un efecto general en la abundancia de proteínas de membrana. Sin embargo, observamos que MapB fue necesaria para la correcta inserción de BmaB (autotransportador monomérico clásico) ya que la mayor parte del autotransportador se acumula en el periplasma de la cepa mutante. También se observó una reducción en las cantidades relativas de un subconjunto de proteínas Omp 25/31. Esta observación está en línea con la hipótesis de que la unión de estas proteínas (Omp 25/31) al PG y su fuerte interacción con el peptidoglicano contribuyen a las características rígidas de la envoltura de *Brucella*. Estas observaciones nos permiten proponer que la proteína TamB en *Brucella*, y probablemente en otras

alphaproteobacterias como *Ochrobactrum*, cumple un rol crucial en la biogénesis y estabilidad de la envoltura celular (Figura 11). Por otro lado, se demostró que la ausencia de MapB provoca defectos en la división celular, observándose mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) morfologías aberrantes en $\Delta mapB$, incluidas estructuras multi-ramificadas y del tipo “Y” (Figura 12).

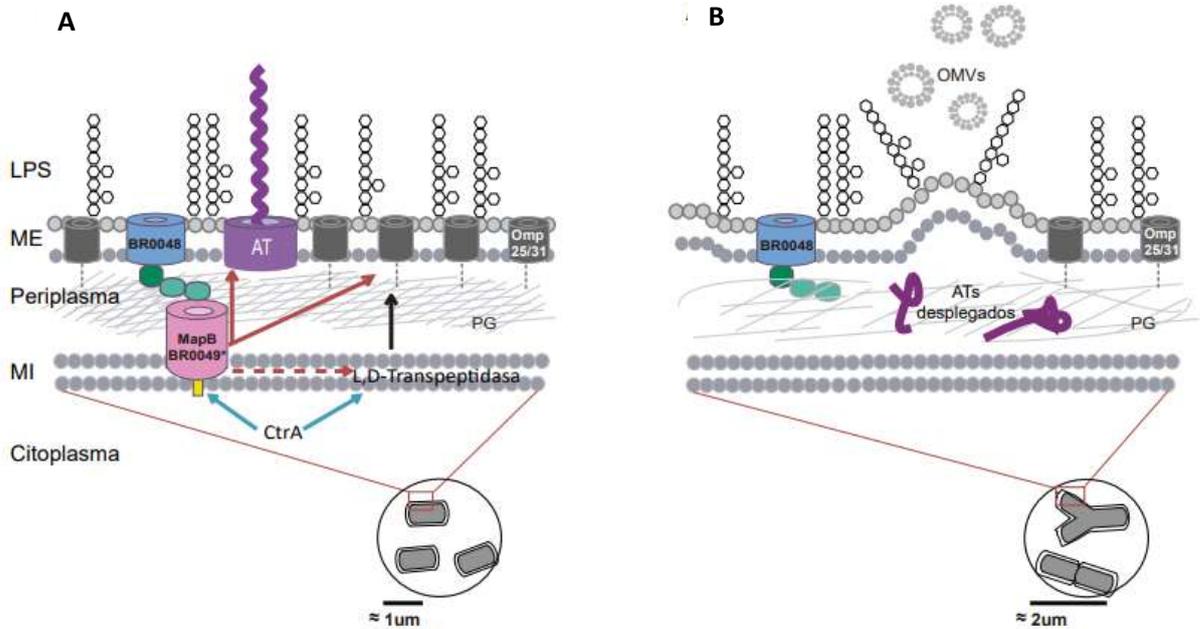


Figura 11: Modelo de la función del sistema TAM en *B. suis*. Se representan los principales componentes de la envoltura celular de la cepa silvestre (A) y la alteración propuesta en la mutante $\Delta mapB$ (B) [23].

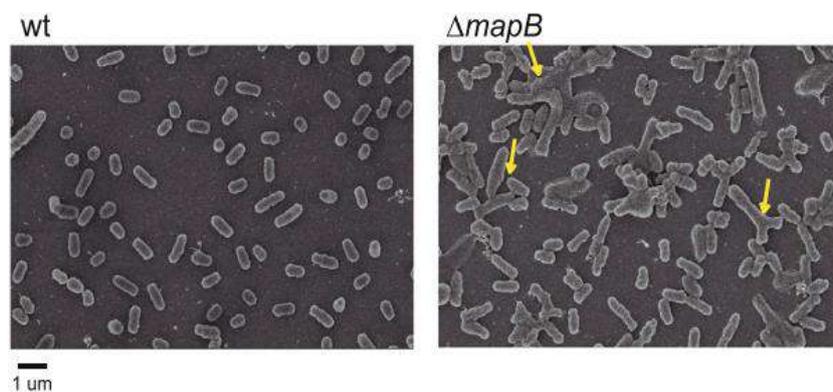


Figura 12: Análisis SEM en cepa wt y $\Delta mapB$. Se encuentran indicadas las morfologías en forma de “Y” asociadas a la división celular [23].

Otro hallazgo interesante aportado por el grupo de trabajo fue demostrar que *B. suis*, al igual que *B. abortus* y *B. melitensis*, liberan vesículas de membrana externa (OMVs) al

medio extracelular [23, 42, 43]. Las OMVs se producen en bacterias Gram-negativas por el abultamiento de OM que lleva contenido soluble periplásmico. Se propuso que mientras las bacterias jóvenes aumentan su tamaño y reciclan sus OM, las paredes celulares tienden a liberar más OMVs principalmente en los tabiques de división. Además, observamos que la fracción de OMVs recuperadas por ultracentrifugación del medio extracelular de $\Delta mapB$ tiene un mayor contenido de proteínas comparada con la de la cepa silvestre (wt). Es posible que los defectos en el ensamblado de la OM y una interacción deficiente con otros componentes de la envoltura como el PG en $\Delta mapB$ induzcan una producción exacerbada de OMVs. Se detectó un número considerable de proteínas en la fracción OMV de las células $\Delta mapB$, y alrededor del 60% de ellas correspondieron a OMPs y proteínas periplásmicas. Esta observación sugiere que los defectos en la homeostasis de la envoltura celular en las células $\Delta mapB$ favorecen la formación de vesículas en la OM o, alternativamente, provocan la fuga de proteínas periplásmicas y la liberación de fragmentos del OM. Se ha propuesto que las OMV se generan por la protuberancia hacia afuera de la OM en áreas donde las proteínas que unen la OM a la capa de PG están ausentes. Alternativamente, este defecto podría deberse a un desbalance entre la cantidad de fosfolípidos y LPS como se demostró en gammaproteobacterias [27]. En su conjunto, estas observaciones indican que TamB de *Brucella* es necesaria para la estabilidad de la envoltura celular. Propusimos que la proteína TamB en *Brucella*, y probablemente en otras alphaproteobacterias, cumple un rol crucial en la biogénesis de la envoltura celular de un modo coordinado con la división celular.

Recientemente, en una búsqueda bioinformática se identificó a los ortólogos de *mapA* y *mapB* de *O. anthropi* ATCC 49188. Los mismos corresponden a los genes *Oant_0053* (*tamA*) y *Oant_0054* (*tamB*) respectivamente, los cuales presentan 90% y 85% de identidad con MapA (BR0048) y MapB (BR0049) de *B. suis*. Con el objetivo de profundizar el estudio del rol del sistema TAM en alphaproteobacterias, como parte del trabajo de esta tesis se obtuvo la mutante en TamB de *O. anthropi* ATCC 49188. Esta mutante será denominada de acá en adelante como $\Delta 54$.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Varios aspectos de la translocación y ensamblado de los componentes de la OM de bacterias Gram-negativas y su interacción con otros componentes de la envoltura celular aún son poco comprendidos. El grupo de trabajo ha presentado evidencias que indican que el sistema TAM es requerido para la integridad de la OM de *B. suis*, un patógeno intracelular que pertenece al phylum Alphaproteobacteria [23]. En efecto, la proteína TamB (denominada MapB en *B. suis*) fue necesaria para la estabilidad de la OM y la correcta translocación de un subgrupo de OMPs, brindando conocimientos acerca del rol de TamB en la biogénesis de la OM en este grupo de bacterias. En esta tesis se estudiará la función del sistema TAM en dichos procesos, utilizando como modelo bacteriano la especie *O. anthropi* también perteneciente al grupo Alphaproteobacteria. Si bien *Brucella* y *Ochrobactrum* se encuentran muy emparentadas, algunas propiedades de sus envolturas difieren notablemente por lo que la utilización de *Ochrobactrum* como modelo de estudio puede aportar información valiosa en la comprensión de los procesos involucrados en la biogénesis de la OM en el grupo Alphaproteobacteria.

La hipótesis de trabajo propone que de manera similar a *Brucella*, el componente proteico TamB de *O. anthropi* es necesario para la homeostasis y estabilidad de la OM. Su ausencia podría provocar un ensamblado incorrecto de la OM, lo cual afectaría la permeabilidad, la estabilidad y las características propias de la envoltura de *Ochrobactrum*. Se plantea que el impacto de la ausencia de TamB en la envoltura celular dependerá de las características de la envoltura celular de cada especie, en particular de la OM.

En esta línea, **el objetivo general** de la tesis es aportar al conocimiento acerca de los factores involucrados en la biogénesis de la OM de alphaproteobacterias. **Específicamente** se desea evaluar la función del sistema TAM en la homeostasis de la envoltura de *O. anthropi*, mediante la realización de ensayos fenotípicos asociados a la envoltura celular y la resistencia a antimicrobianos en la mutante $\Delta mapB$ de *O. anthropi* ($\Delta 54$) y su respectiva cepa silvestre (wt).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos utilizados

El microorganismo utilizado como cepa salvaje fue *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188, definido como **wt** (*wild type*) en este trabajo de tesina. Código cepario lab 204-FIL: Y62.

Con el fin de evaluar los efectos generados por la ausencia de la proteína TamB en *O. anthropi*, se han generado, en colaboración con los miembros de nuestro grupo de trabajo, las siguientes cepas mutantes:

- *Ochrobactrum anthropi* $\Delta 0054$ con mutación en el gen *Oant_0054* mediante el método inserción-delección, definido como **$\Delta 54$** en este trabajo de tesina. Código cepario lab 204- FIL: Z58. La descripción detallada de la generación de esta mutante se desarrollará en la sección de Resultados.
- *Ochrobactrum anthropi* complementada KI mediante método *Knock-in* con inserción de la secuencia de ADN correspondiente al gen *Oant_0054* en el sitio donde se produjo la mutación partiendo de la cepa **$\Delta 54$** . Esta cepa está definida como **KI** en este trabajo de tesina. Código cepario lab 204-FIL: Z65
- *Ochrobactrum anthropi* complementada $\Delta 0054$ + pBBR1 *Oant_0054* mediante complementación de copias del gen *Oant_0054* clonado bajo el promotor lacZ en el plásmido de mediano número de copias pBBR-MCS1-CmR. Es definido como **$\Delta 54$ +pBBR54** en este trabajo de tesina. Código cepario lab 204- FIL: Z60

3.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Ochrobactrum anthropi fue cultivada en medio de cultivo rico *Tryptic Soy Broth* (TSB) a 37°C empleando agitación de 220 rpm. En el caso de medios de cultivo sólido se utilizó *Tryptic Soy Agar* (TSA) con 1,5% p/v de agar con incubación a 37°C durante 24-48 h.

Con respecto a las condiciones de cultivo, el Instituto cuenta con un cuarto de bioseguridad tipo 2 (BSL 2) equipado adecuadamente con cabina de bioseguridad y los protocolos de operación necesarios para trabajar con el microorganismo en estudio, el cual es considerado patógeno oportunista.

3.3 Antibióticos

Para el cultivo de las cepas mencionadas en la sección 3.1, se emplearon distintos antibióticos presentados en la Tabla 1 según las resistencias adecuadas para selección del crecimiento de las mismas.

Antibiótico	Concentración del stock (mg/ml)	Concentración final (µg/ml)			
		wt	Δ54	KI	Δ54 +pBBR54
Kanamicina	50	50	50	50	50
Espectinomicina	100	-	200	-	200
Cloranfenicol	50	-	-	-	25

Tabla 1: antibióticos y concentraciones utilizadas.

Para el desarrollo de los ensayos de tolerancia a antibióticos que se describe en la sección 3.6.2, se emplearon polimixina B, vancomicina, eritromicina, bacitracina, gentamicina y amikacina en distintas concentraciones según corresponda.

3.4 Conservación de cepas

Con el objetivo de conservar a largo plazo las cepas obtenidas las bacterias cultivadas en medio TSB se resuspendieron en glicerol estéril con concentración final 20% v/v en criotubos a -20°C y -80°C.

3.5 Curva de crecimiento

En primer lugar, para evaluar el comportamiento de las cepas *O. anthropi* wt y la mutante Δ54 respecto a su crecimiento en medio rico TSB se realizó una curva de crecimiento a 37°C. Para ello las bacterias se cultivaron en erlenmeyers de 500 ml, con 100 ml de medio de cultivo cada uno, respetando así la proporción de aireación del cultivo en 1:5. Se partió de inóculos por triplicado con una OD_{600nm} de 0,01 y de 0,001 para lograr una curva de crecimiento que abarque un rango de crecimiento de 34 h de medición. El procedimiento consistió en tomar una alícuota de volumen final de cubeta de 1ml (evitando de esta forma que el progresivo faltante de volumen a lo largo de las mediciones afecte al crecimiento) de cada cultivo cada 2 h y se midió la densidad óptica a 600 nm. En conjunto, en cada punto de medición, se realizaron diluciones seriadas de las alícuotas obtenidas para realizar recuento en placa y conocer las UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) correspondientes en cada caso.

3.6 Fenotipos de mutantes defectivas en el sistema TAM de *O. anthropi*

3.6.1 Tolerancia a agentes disruptivos de membrana

Con el objetivo de determinar la supervivencia de las cepas *O. anthropi* wt y la mutante $\Delta 54$ frente a distintos compuestos se realizaron tratamientos basados en la incubación con los mismos. Para ello, las bacterias se cultivaron en medio líquido rico TSB hasta su fase exponencial de crecimiento ($OD_{600nm} \approx 1$), se lavaron con *buffer Phosphate Buffered Saline* (PBS) estéril y se llevaron a una concentración final como solución de trabajo de 1×10^8 UFC/ml. Las bacterias fueron expuestas a diversos agentes disruptivos de membrana como los compuestos tensioactivos SDS en concentración 0,5%, Tritón X-100 y DOC en concentración 0,1%, y el agente quelante EDTA en concentración 10mM. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos, donde se colocaron 100 μ l de solución de trabajo del cultivo y 100 μ l de solución tratamiento, o 100 μ l de solución *buffer* PBS 1X para el control sin tratamiento, en la primera fila de la placa incubándose a 37°C durante 1 hora. Luego del tratamiento, se realizaron diluciones seriadas 1:10 sobre la misma placa con solución *buffer* PBS 1X sembrándose posteriormente en placa de Petri con medio TSA mediante el método microgota. Cabe destacar que para los tratamientos de EDTA, en lugar de utilizar solución *buffer* fosfato PBS 1X, se utilizó solución fisiológica NaCl 0,9% p/v debido a la posible precipitación de Ca_2PO_4 por la presencia del ión PO_4^{2-} en el *buffer* PBS. Para la cuantificación se utilizó recuento bacteriano y los resultados se expresaron por porcentaje de supervivencia relativos a la cepa wt.

Cada ensayo mencionado anteriormente en esta sección se evaluó con cada compuesto y con cada cepa por triplicado.

Por otro lado, para evaluar la tolerancia a lisozima se cultivaron las bacterias *overnight* hasta llegar a la OD deseada. Mediante centrifugación (5min a 5.000 rpm) se obtuvieron las células y se resuspendieron en una solución de lisozima 2 μ g/ml en 0.05M de Tris-HCl (pH 8.0 a 22°C). Se dispusieron las suspensiones en una cubeta para lectura en espectrofotómetro y se midieron las absorbancias a 600nm cada 30 segundos abarcando un rango de lectura hasta los 120 minutos.

3.6.2 Tolerancia a antibióticos

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la cepa *O. anthropi* wt y la cepa mutante $\Delta 54$ frente a polimixina B, vancomicina, eritromicina, bacitracina, gentamicina y amikacina, utilizándose como criterio de corte de la MIC los valores estándares recomendados por EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) [44] para bacilos Gram-negativos diferentes de Enterobacteriaceae [45-47]. Para ello, se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos con diluciones seriadas al medio (1:2) de cada antibiótico, trabajando con una concentración de bacterias de 1×10^6 UFC/ml (al mezclarse con la dilución de antibiótico correspondiente obtendremos una concentración final de 5×10^5 UFC/ml) y concentraciones de antibiótico entre 1 $\mu\text{g/ml}$ y 1024 $\mu\text{g/ml}$ según determinaciones estándar [32]. Cabe destacar que no todos los antibióticos presentaban la misma resistencia dentro del rango establecido, por lo que algunos rangos se modificaron según se presentan en la Tabla 2. El esquema de trabajo en la placa de cultivo de 96 pocillos se ve representada en la Figura 13. Una vez preparadas las placas, se incubaron 48 h a 37°C tomando la precaución de sellar las placas con parafilm para evitar la evaporación del medio de cultivo en estas temperaturas. Se midió la absorbancia a 600nm con lector de placas varioskan LUX. Se determinó como MIC a la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano.

Antibiótico	Rango de concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)
Polimixina B	0,25 – 128
Vancomicina	1 – 512
Eritromicina	0,125 – 64
Bacitracina	16 – 8192
Gentamicina	1 – 512
Amikacina	1 – 512

Tabla 2: rango de antibióticos y concentraciones utilizadas en el ensayo de tolerancia a antibióticos.

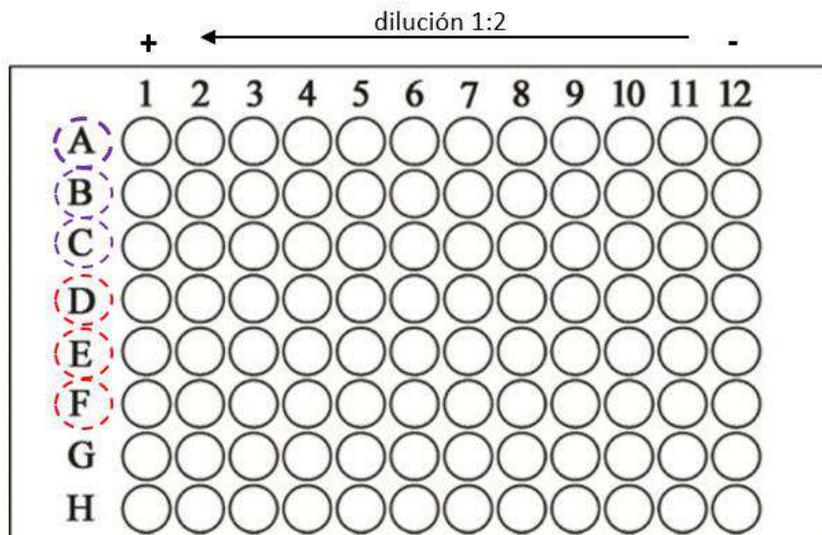


Figura 13: esquema de placa de cultivo de 96 pocillos para ensayo de tolerancia a antibióticos. En filas A, B y C se colocó el cultivo de la cepa wt, en filas D, E y F se colocó $\Delta 54$, y las filas G y H quedan libres. Se emplea una placa por ensayo por antibiótico. Diagrama de llenado de pocillos (el llenado se realiza de derecha a izquierda):
 Columna 12: 50 μ l TSB. Corresponde al control negativo.
 Columna 11: 50 μ l antibiótico sin dilución.
 Columna 10 a 2: 25 μ l TSB + 25 μ l de columna anterior (diluciones seriadas de 1;2).
 Columna 1: 25 μ l TSB. Corresponde al control positivo.
 Columna 1 a 11: se agregaron 25 μ l del cultivo correspondiente en todos los pocillos.

De manera complementaria, se determinó la supervivencia de la cepa wt y la cepa mutante frente al crecimiento en placa de vancomicina. Para tal propósito, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en solución *buffer* PBS 1X estéril de cultivos *overnight* de bacterias con concentración de solución de trabajo de 1×10^8 UFC/ml. Se sembraron mediante el método de microgota sobre placas de Petri con medio sólido TSA y el antibiótico a evaluar dispuesto también en placa en concentraciones de 64 μ g/ml y 128 μ g/ml. El método de cuantificación que se utilizó fue por recuento bacteriano de UFC/ml y los resultados se expresaron por porcentaje de supervivencia relativos a la cepa wt.

Cada ensayo mencionado anteriormente en esta sección se evaluó con cada compuesto y con cada cepa por triplicado.

3.7 Fraccionamiento subcelular

Haciendo referencia a la composición de la envoltura celular en bacterias Gram-negativas, se propuso como objetivo obtener la fracción de membranas totales en *O. anthropi* wt y *O. anthropi* $\Delta 54$, mediante el ensayo de fraccionamiento subcelular [48].

Se cosecharon 500ml de cultivo de ambas cepas en TSB (200ml de medio en erlenmeyers de 1L para mantener condiciones de aireación en proporción 1:5) hasta alcanzar una fase exponencial de crecimiento ($OD_{600nm} \approx 1$). Se centrifugó 10 minutos a 7000 x g y se resuspendieron las bacterias en *buffer* A (sacarosa 0,5M, Tris-HCl pH 7,5 10 mM) con agregado de lisozima 10 mg/ml dejándose en agitación en hielo durante 2 minutos. Se agregó EDTA 1,5 mM y se dejó agitar nuevamente en hielo durante 7 minutos. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 9000 x g y luego se resuspendieron en *buffer* B (sacarosa 0,2M, Tris-HCl pH 7,5 10mM) con agregado de $MgCl_2$ 1M, ARNasa/ADNasa EMD Milipore, PMSF 1mM, y se alicuotaron en eppendorf con bolitas de vidrio (Sigma, 400um). La lisis celular se llevó a cabo en Precellys24 (Bertin) con 4 ciclos de 3 x 30 segundos a 6500 rpm. El producto de la lisis celular se separó de las bolitas de vidrio y se centrifugó durante 10 minutos a 6000 x g a 4°C. El sobrenadante se ultracentrifugó durante 2 h a 100000 x g a 4°C, para obtener de esta manera la fracción de membranas totales en el pellet. Las muestras se lavaron y resuspendieron en Tris-HCl pH 7,5 para conservarse a -20°C para futuros análisis. Para la obtención de proteínas solubles, se precipitó el sobrenadante obtenido de la ultracentrífuga con 0,1 volumen de ácido tricloroacético y posterior lavado con acetona pura en frío.

3.8 Microscopía TEM (Transmission Electronic Microscopy)

Con el objetivo de analizar posibles alteraciones en la envoltura celular por ausencia de TamB, *O. anthropi* wt y *O. anthropi* $\Delta 54$ fueron observadas por Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM) en el servicio que brinda el LANAIS-MIE (CONICET-UBA).

Brevemente, se cosecharon 25ml de cultivo de ambas cepas en TSB hasta alcanzar una fase exponencial de crecimiento ($OD_{600nm} \approx 1$). Se centrifugó durante 10 minutos a 4500 rpm y se realizó un doble lavado con *buffer* PBS 1X en un volumen de 20ml. Se centrifugó nuevamente y al pellet resultante se lo cubrió con 1 ml de solución fijadora glutaraldehído 2%, se resuspendió suavemente en la misma y se dejó fijando 4 h a 4°C. Luego de la primera fijación se centrifugó, se descartó la solución fijadora y se cubrió con solución de lavados (*buffer* fosfato 0,2 M) durante 15 minutos a 4°C. Por último, se retiró el *buffer* de lavado y se cubrió con un nuevo volumen de *buffer* manteniéndose en hielo o heladera hasta su segunda fijación con tetróxido de osmio 1%. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol e incluidas en una resina epoxy donde se realizaron cortes ultrafinos (70-90 nm). Las muestras fueron examinadas con el microscopio electrónico de transmisión ZEISS EM 109T equipado con cámara digital

Gatan ES1000W. Este enfoque permite observar alteraciones en la doble membrana tales como la separación, turgencia y rugosidad, entre otras características.

En línea con los antecedentes brindados por Velasco et. al [9] sobre la acción de la polimixina B en *Brucella* y *Ochrobactrum* observadas en microscopía electrónica de transmisión, se decidió evaluar a *O. anthropi* wt y *O. anthropi* $\Delta 54$ también en presencia de dicho antibiótico. Para ello, previo a la fijación, las muestras fueron resuspendidas en solución *buffer* PBS 1X con concentración de polimixina B 100 U/ml y dejándose en tratamiento durante 1 h a 37°C. Luego, las muestras fueron lavadas con *buffer* PBS 1X y se continuó con el procedimiento de fijación según lo planteado anteriormente.

3.9 Análisis estadístico

Para la realización de gráficos y análisis estadísticos se empleó el programa Excel versión 2016 y el programa GraphPad Prism versión 8.0. Al comparar dos grupos, la diferencia estadística se determinó con el test de Student (T test), mientras que en las comparaciones de 3 o más grupos se utilizó el test ANOVA de una vía, seguido por el test a posteriori de Tukey. El criterio adoptado para determinar que una diferencia fuera estadísticamente significativa fue que p sea < 0.05 .

4. RESULTADOS

4.1 Generación de cepas

Como se mencionó anteriormente en la sección 3.1 de Materiales y Métodos, con el fin de evaluar los efectos producidos por la ausencia de la proteína TamB en *Ochrobactrum anthropi*, se han generado, en colaboración con los miembros de nuestro grupo de trabajo, las siguientes cepas:

- *Ochrobactrum anthropi* $\Delta 54$
- *Ochrobactrum anthropi* complementada KI
- *Ochrobactrum anthropi* complementada $\Delta 54$ +pBBR54

Para el caso particular de la generación de la cepa mutante *O. anthropi* $\Delta 54$, se clonaron aproximadamente 700 pb de las regiones río arriba y río abajo flanqueantes al gen de interés, interrumpida por un cassette que confiere resistencia a espectinomicina (cassette omega). Se clonó esta construcción obtenida en el plásmido PJQ200. Dicho plásmido contiene el gen *sacB* que le confiere a la bacteria que lo porta sensibilidad a sacarosa y a su vez posee una resistencia a gentamicina (Gm^R) y es replicativo en *Ochrobactrum*. En primer lugar, al introducir el plásmido en la cepa wt se aislaron las colonias (simples recombinantes) kanamicina (resistencia natural de *O. anthropi*), espectinomicina y gentamicina resistentes, y sacarosa sensibles. De estas colonias luego se repicaron en grilla y se seleccionaron aquellas resistentes a kanamicina, espectinomicina y sacarosa, pero gentamicina sensibles, es decir, aquellas que hayan perdido el plásmido, pero ganado la resistencia a espectinomicina por doble recombinación homóloga. En la Figura 14 se resume en un esquema la generación de dicha mutante.

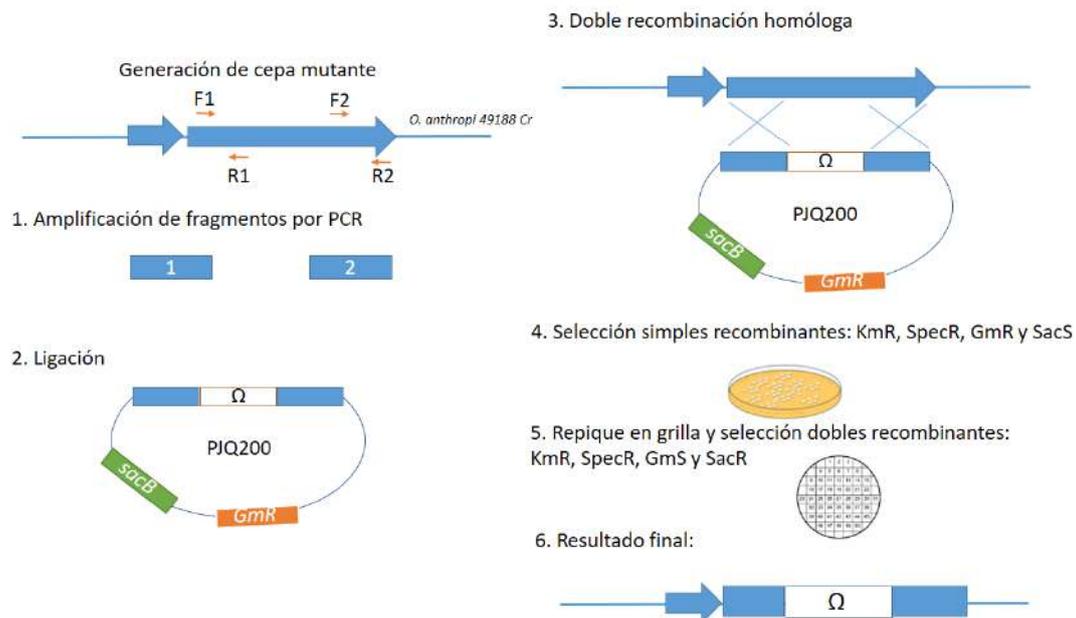


Figura 14: resumen de la generación de la cepa mutante *O. anthropi* $\Delta 54$

4.2 Caracterización de *O. anthropi*

Con el objetivo de obtener una caracterización fenotípica global de las colonias, las cepas wt y $\Delta 54$ de *O. anthropi*, fueron cultivadas durante 16 h en medio rico TSB con agitación a 37°C y cultivadas durante 48 h en medio rico TSA a la misma temperatura, respetando las resistencias a los antibióticos correspondientes en cada caso como se indicó en la sección 3.3 de Materiales y Métodos. Las colonias en estas condiciones de crecimiento fueron redondas, lisas, convexas y con bordes enteros, observándose una notable mucosidad tanto en la cepa wt como en $\Delta 54$ (Figura 15A y 15B).

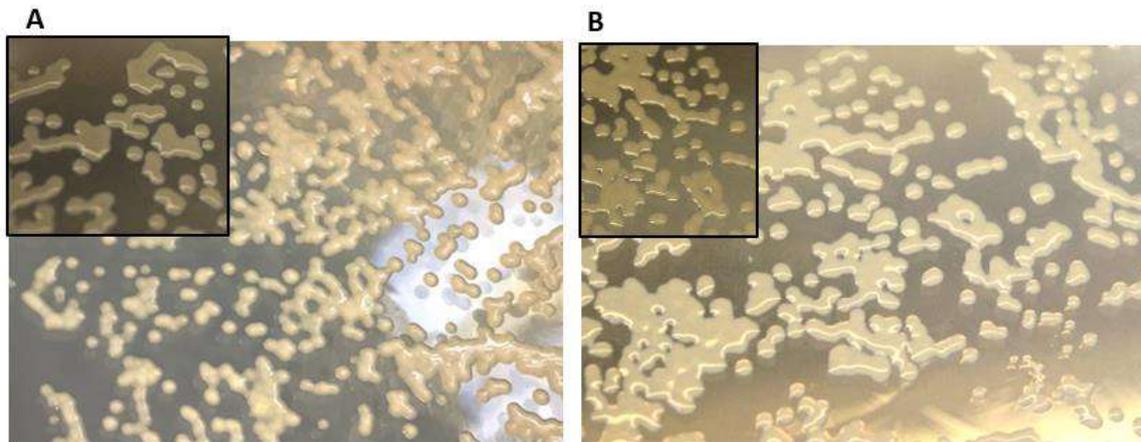


Figura 15: morfologías observadas en *O. anthropi* wt (A) y en *O. anthropi* $\Delta 54$ (B).

Para determinar si la ausencia de TamB en *Ochrobactrum* afecta el crecimiento de las bacterias, se midió la OD a 600nm a lo largo de 34 h de cultivo en medio TSB con agitación. La curva de crecimiento resultante, representada en la Figura 16, mostró que $\Delta 54$ presenta una fase lag levemente incrementada con respecto a la wt, igualándose en el resto de las fases de crecimiento. Esta pequeña diferencia podría deberse a implicancias del rol de TamB en la división celular.

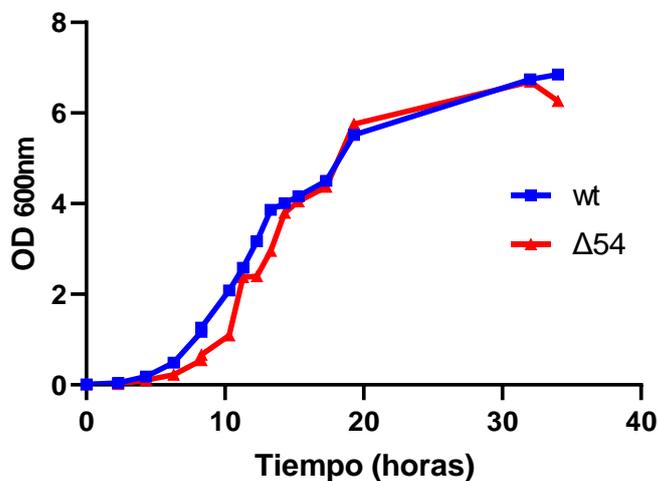


Figura 16: curva de crecimiento correspondiente a wt (línea azul) y $\Delta 54$ (línea roja).

Del análisis de la curva de crecimiento, se observa que la cepa wt consigue una OD_{600nm} de 1 a las 8 h de cultivo mientras que la cepa $\Delta 54$ lo hace en 10,30 h partiendo ambas de una OD inicial de 0,01. Así mismo, en cada punto de medición se plaqueó en medio TSA diluciones seriadas de los cultivos con el fin de realizar un recuento en placa y determinar las UFC/ml correspondientes en cada caso. Se presenta a continuación un cálculo modelo

del procedimiento realizado en base al recuento en placa para conocer el valor promedio de UFC/ml en una OD_{600nm} de 1 (ver Tabla 3). Dado que para la medición se realizaron 3 réplicas por cepa, los datos obtenidos resultaron de un promedio de las mismas.

Punto 11 de medición a las 14,30 h				
	OD wt	UFC/ml wt	OD Δ54	UFC/ml Δ54
Réplica 1	3,85	3,73x10 ⁹	3,5	3,76x10 ⁹
Réplica 2	4,15	3,2x10 ⁹	3,85	2,96x10 ⁹
Réplica 3	4,05	4x10 ⁹	4,05	3,6x10 ⁹

Tabla 3: resumen de los datos obtenidos en el punto 11 de medición de la curva de crecimiento.

De esta forma para la réplica 1 de wt planteamos:

OD 3,85 _____ 3,73x10⁹ UF/ml

OD 1 _____ x= 9,7x10⁸ UFC/ml

El mismo procedimiento se realizó para todas las réplicas de ambas cepas en cada punto de medición, y se obtuvo en promedio que en una OD =1 para la cepa wt encontramos 1,5x10⁹ UFC/ml y en una OD =1 para Δ54 corresponden a 1,15x10⁹ UFC/ml.

4.3 Fenotipos de mutantes defectivas en el sistema TAM de *O. anthropi*

Tal como se describió en la sección 3.6 de Materiales y Métodos, se realizaron ensayos de supervivencia de las cepas *O. anthropi* wt y Δ54 frente a la acción de agentes disruptivos de la membrana y de distintos antibióticos.

4.3.1 Tolerancia a agentes disruptivos de la membrana

4.3.1.1 Lisozima

En primera instancia se decidió evaluar la resistencia de *O. anthropi* a la lisozima, dado que se había descrito una alta sensibilidad de la cepa mutante $\Delta mapB$ en *B. suis* frente a la misma [23]. Luego de someter las bacterias a una concentración de lisozima de 0,1 mg/ml se midió la OD a 600nm con el objetivo de cuantificar la lisis bacteriana debido a un debilitamiento de la envoltura celular provocado por la enzima. En los primeros minutos de medición, la OD de la cepa wt se mantuvo constante mientras que se observó un leve pero no esperado aumento en la cepa $\Delta 54$ (Figura 17A). A partir del minuto 20 de medición los valores de OD de $\Delta 54$ comenzaron a disminuir lentamente observándose una caída abrupta desde el minuto 40. La cepa wt también mostró una disminución en la OD, pero ésta fue considerablemente más lenta. Estas observaciones sugieren que la cepa mutante es más sensible a la lisis provocada por la lisozima en comparación con la cepa wt. El aumento de OD inicial en la mutante pudo haberse producido por la formación de agregados en solución de restos celulares provocados por la lisis que luego sedimentaron. En la Figura 17B se presentan fotografías de las cubetas mostrando los efectos mencionados. Con el objetivo de confirmar fenotípicamente el efecto observado en la mutante, se generó una cepa complementada por knock-in (KI) restaurando el gen silvestre *Oant_0054* en la cepa $\Delta 54$ como se explica en Materiales y Métodos. La cepa complementada mostró un fenotipo similar a la wt, confirmando que la sensibilidad a la lisozima se debe a la mutación en el gen *tamB*.

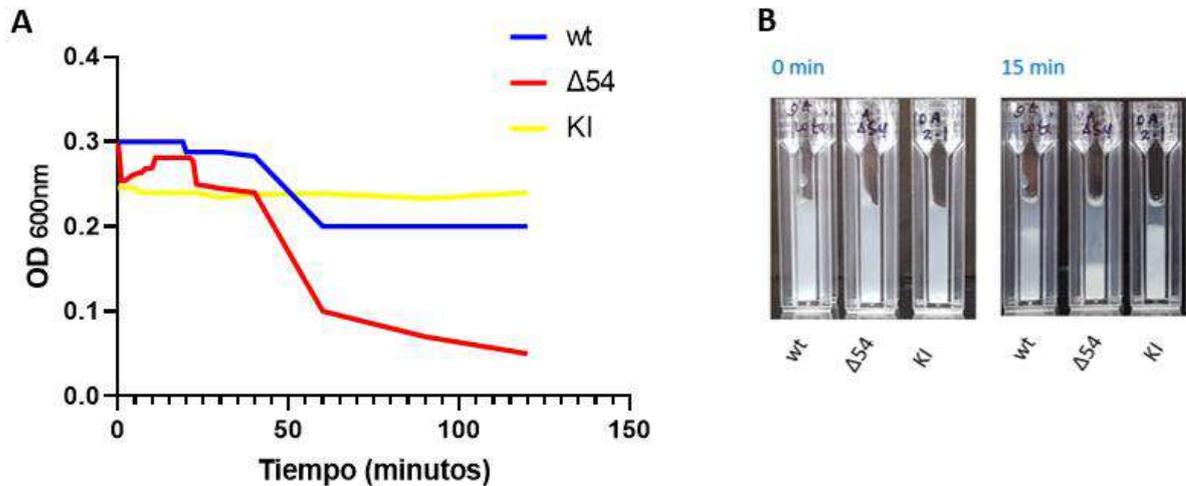


Figura 17: curva de sensibilidad de la cepa wt (azul), $\Delta 54$ rojo y KI (amarillo) frente a la exposición de la lisozima 0,1 mg/ml (A) y fotografías de las cubetas iniciado el ensayo y a los 15 minutos (B).

4.3.1.2 Ensayos de tolerancia a detergentes y compuestos quelantes

El tratamiento de bacterias con detergentes y su posterior análisis de supervivencia aportan información sobre el grado de permeabilidad y estabilidad de la envoltura celular. En este sentido, se realizaron ensayos de tolerancia a diversos agentes disruptivos de membrana como los compuestos tensioactivos SDS en concentración 0,5%, Tritón X-100 y DOC en concentración 0,1%, y el agente quelante EDTA en concentración 10mM.

Luego de la exposición, se determinó el número total de bacterias tolerantes al tratamiento en función del total de bacterias inoculadas por pocillo, mediante recuento de UFC en placa por triplicado de cada ensayo. El porcentaje de supervivencia de bacterias a cada tratamiento se expresó relativo a la cepa control (wt), a la cual se le asignó el valor de 100%. Los resultados obtenidos de los ensayos de tolerancia y su análisis estadístico son representados en la Figura 18, Figura 19 y Tabla 4 respectivamente.

En la Figura 18, se presenta el efecto del DOC 0,1% que es un tensioactivo iónico suave. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la resistencia de $\Delta 54$ en relación a wt. Por su parte, la cepa $\Delta 54$ mostró un 26% de sensibilidad en relación a la cepa wt en presencia del tensioactivo no iónico Tritón X-100 0,1%, aunque esta disminución de la resistencia no fue estadísticamente significativa.

En la Figura 19 se ve representado el efecto del SDS 0,5%, un tensioactivo iónico con carga neta negativa. La cepa $\Delta 54$ mostró un 40% de sensibilidad en relación a la cepa wt, indicando que $\Delta 54$ es menos resistente a la acción de este detergente en comparación a la cepa wt. La cepa complementada KI mostró un fenotipo similar a al wt confirmando el fenotipo de sensibilidad de la cepa mutante.

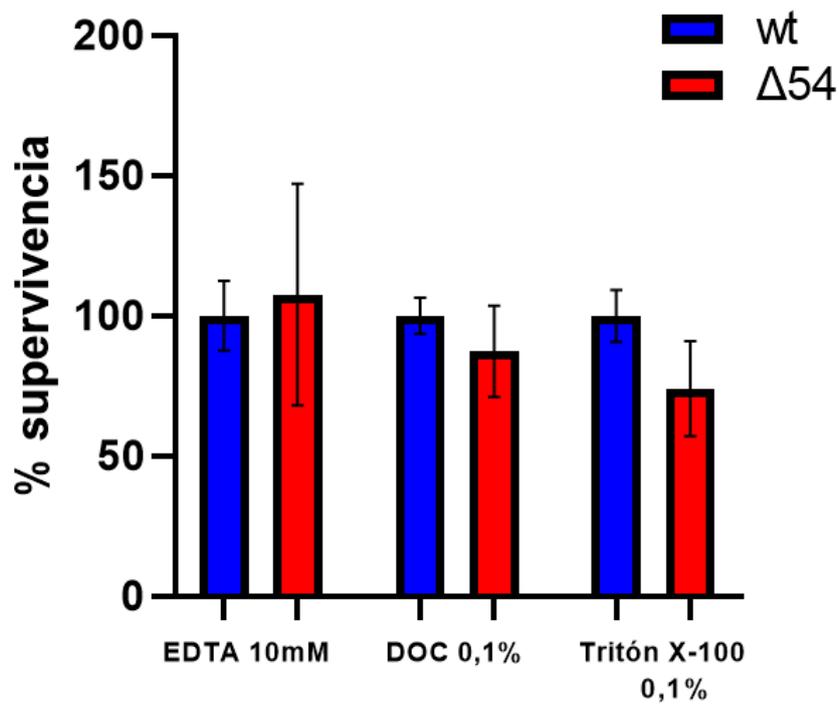


Figura 18: ensayo de tolerancia a distintos agentes disruptivos de la membrana. Los resultados son expresados en términos de porcentajes de supervivencias relativos a la cepa wt.

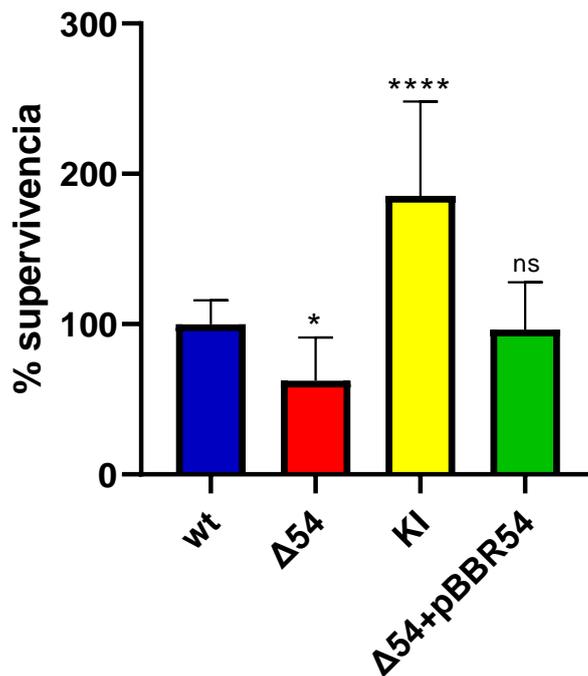


Figura 19: ensayo de tolerancia frente a SDS 0,5% de las cepas wt, $\Delta 54$, KI y $\Delta 54$ +pBBR54. Los resultados son expresados en términos de porcentajes de supervivencia relativos a la cepa wt.

	Significancia	P value	Promedio de wt	Promedio de $\Delta 54$	Promedio de complementada KI	Promedio de complementada $\Delta 54$ +pBBR54
SDS	Yes	0,000069	100,0	60,70	197,2	96,47
EDTA	No	0,205302	100,0	107,58	-	-
DOC	No	0,275521	100,0	87,31	-	-
Tritón X-100	No	0,079480	100,0	73,99	-	-

Tabla 4: análisis estadístico de los ensayos de tolerancia realizados.

Por último, se evaluó el efecto del EDTA en la supervivencia de $\Delta 54$ con respecto a wt (Figura 18). Los agentes quelantes tales como el EDTA tienen la capacidad de retener iones metálicos lo cual puede desestabilizar la OM principalmente por cambios generados en las cargas netas totales. El tratamiento con EDTA no mostró diferencias significativas entre $\Delta 54$ y la wt.

4.3.2 Tolerancia a antimicrobianos

Se estudió el efecto de antibióticos con propiedades y mecanismos de acción diferentes sobre las cepas wt y $\Delta 54$. Particularmente, se analizaron los efectos de: polimixina B

(polipéptido catiónico), eritromicina (macrólido), vancomicina (glicopéptido), gentamicina y amikacina (aminoglicósidos), y bacitracina (polipéptido cíclico), determinándose su MIC como puede observarse en la Tabla 5.

Antibiótico	MIC (ug/ml)	
	<i>O.anthropi</i> wt	<i>O.anthropi</i> $\Delta 54$
Polimixina B	2	2
Eritromicina	< 1	< 1
Vancomicina	256	128
Bacitracina	>1000	>1000
Gentamicina	2	2
Amikacina	128	128

Tabla 5: concentraciones mínimas inhibitorias de los antibióticos mencionados en la cepa wt y $\Delta 54$.

Como indica la Tabla 5, se observaron diferencias en los valores de MIC de vancomicina siendo 256 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa wt y 128 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa $\Delta 54$. Para el resto de los antibióticos analizados no se encontraron diferencias.

Dados los resultados mencionados, se decidió ampliar los estudios sobre la resistencia de vancomicina. Para ello, se sembraron las bacterias en placas TSA conteniendo vancomicina en una concentración sub-inhibitoria de 64 $\mu\text{g/ml}$. En línea con los resultados mostrados en el ensayo de MIC, se observó una disminución en el crecimiento en la cepa mutante $\Delta 54$ con respecto a la cepa wt (Figura 20). Como se mencionó en la sección 1.4 de la Introducción, la vancomicina es un antibiótico que interfiere en la síntesis del PG, particularmente en las uniones D-Ala-D-Ala del mismo, por lo que podría llegar a deducirse que la estructura del PG estaría modificada o debilitada en la cepa

mutante $\Delta 54$. Otra posibilidad es que la vancomicina pueda acceder más fácilmente a dichas uniones del PG en la cepa mutante en comparación con la wt.

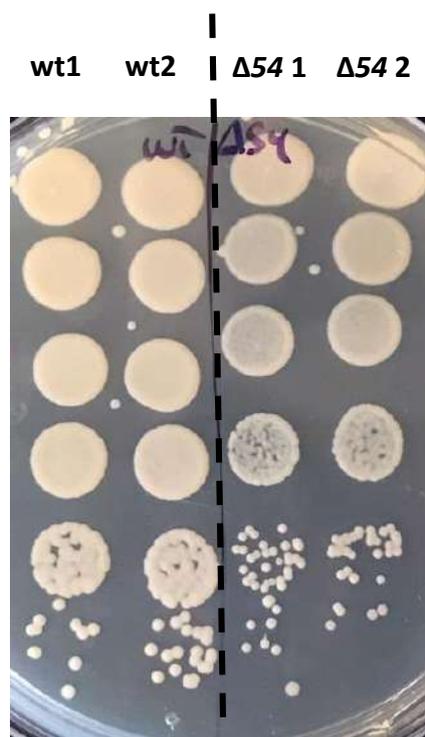


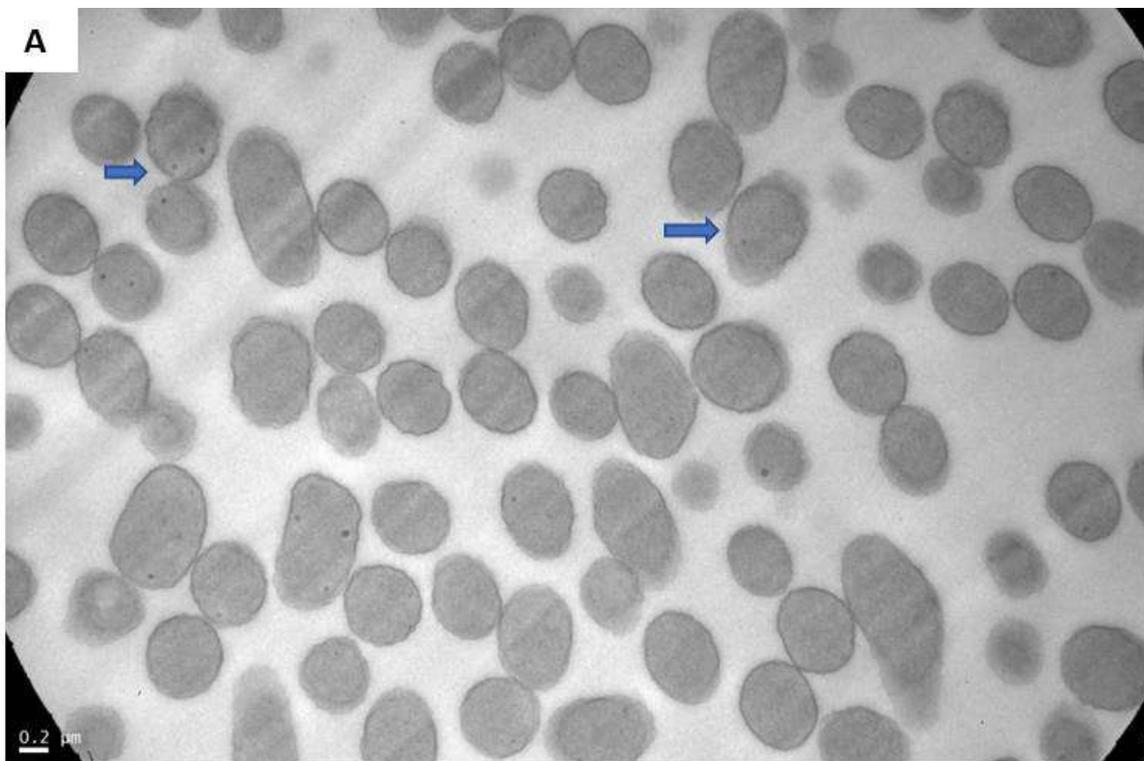
Figura 20: resistencia de cepa wt y $\Delta 54$ a vancomicina 64 µg/ml en placa TSA, con dos repeticiones. Se observa, en una misma dilución, una densidad de crecimiento mayor en wt (izquierda), respecto a la cepa $\Delta 54$ (derecha).

4.4 Microscopía TEM (Transmission Electronic Microscopy)

La microscopía de transmisión electrónica (TEM) es una herramienta que nos permite conocer visualmente la estructura de ciertos microorganismos como las bacterias. En el presente trabajo de tesis, empleamos TEM con el objetivo de identificar diferencias estructurales de la envoltura celular entre *O. anthropi* wt y *O. anthropi* $\Delta 54$. Cabe destacar que esta técnica es únicamente de observación, y no otorga información acerca de la viabilidad celular. En las Figuras 21 y 22 se presentan las micrografías de cortes ultrafinos de la resina en la cual se encontraba la suspensión de bacterias. En la Figura 21A y 21B se muestra a *O. anthropi* wt con un aumento de 20000x y 50000x respectivamente. En ambas imágenes se observa que la bacteria presenta bordes definidos y prolijamente delimitados, sugiriendo un correcto ensamblado de la envoltura celular y por ende estabilidad de la misma. Sin embargo, en la Figura 21B pueden observarse algunas bacterias con bordes desparejos no definidos y ondulaciones, que podrían asociarse con aquellas bacterias que presentaron lisis durante la observación, donde incluso puede

observarse como la envoltura se encuentra totalmente disgregada, las cuales identificamos con flechas de color azul.

Por otro lado, la Figura 22A y 22B se observan bacterias de la cepa *O. anthropi* $\Delta 54$ con un aumento de 20000x y 50000x respectivamente. En ambos casos las bacterias presentan bordes con apariencia rugosa, y con ondulaciones que a diferencia de la cepa wt se encuentran bien marcadas. A su vez, tanto en la Figura 22A como 22B pueden observarse numerosas bacterias que presentan morfologías intracelulares desordenadas pareciendo a la presencia de una delimitación o membrana interna, a las cuales hemos decidido identificar como bacterias con desorganización interna y se encuentran marcadas con flechas de color rojo.



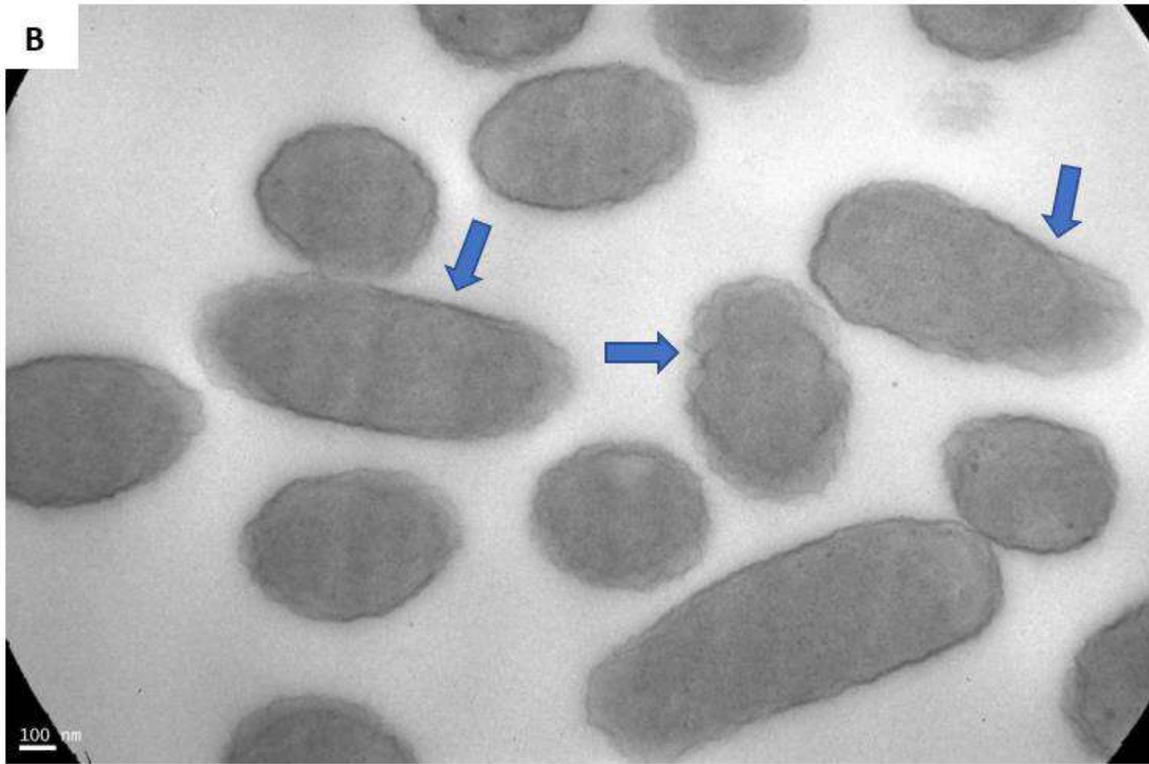


Figura 21: micrografías obtenidas por TEM de *O. anthropi* wt con aumento 20000x (A) y 50000x (B). Las flechas azules en ambas imágenes indican las bacterias con deformaciones en sus envolturas producto de la lisis celular.

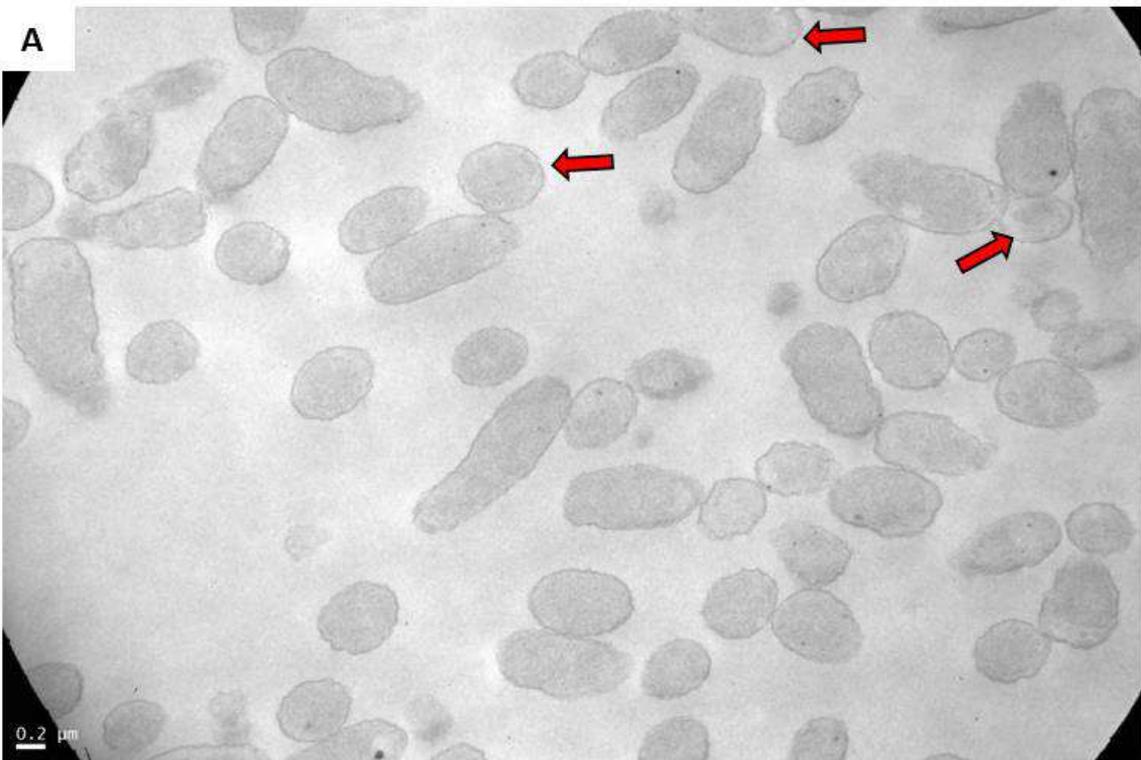




Figura 22: micrografías obtenidas por TEM de *O. anthropi* $\Delta 54$ con aumento 20000x (A) y 50000x (B). Las flechas rojas en ambas imágenes indican las bacterias con desorganización interna.

Como parte del mismo análisis y tomando como referencia las observaciones frente al tratamiento con polimixina B y posterior análisis por TEM realizadas por Komaniecka et al. [12] y Velasco et al. [9] de *O. lupini* y *O. intermedium* respectivamente, frente al tratamiento con polimixina B, se decidió observar a *O. anthropi* luego del mismo tratamiento. Las Figuras 23 y 24 corresponden a las micrografías tomadas con distintos aumentos de *O. anthropi* wt (12000x y 30000x) y *O. anthropi* $\Delta 54$ (20000x y 50000x) luego del mismo tratamiento de polimixina B 100 U/ml. En la Figura 23A y 23B se observa que la bacteria presenta bordes definidos y con una morfología interna que aparenta coagulación del citoplasma formándose agregados visiblemente notables. Puede destacarse que la envoltura celular no se vio comprometida por la presencia del antibiótico debido a que no se observa a simple vista lisis celular. Por otro lado, en las Figuras 24A y 24B puede describirse que las bacterias presentan las mismas morfologías que se indicaron para la cepa wt con tratamiento, pero en este caso pareciera que los bordes rugosos y ondulaciones características de la cepa $\Delta 54$ control (sin tratamiento) desaparecen. Sin embargo, cabe mencionar que estas observaciones son preliminares, debiéndose realizar estudios complementarios a futuro.

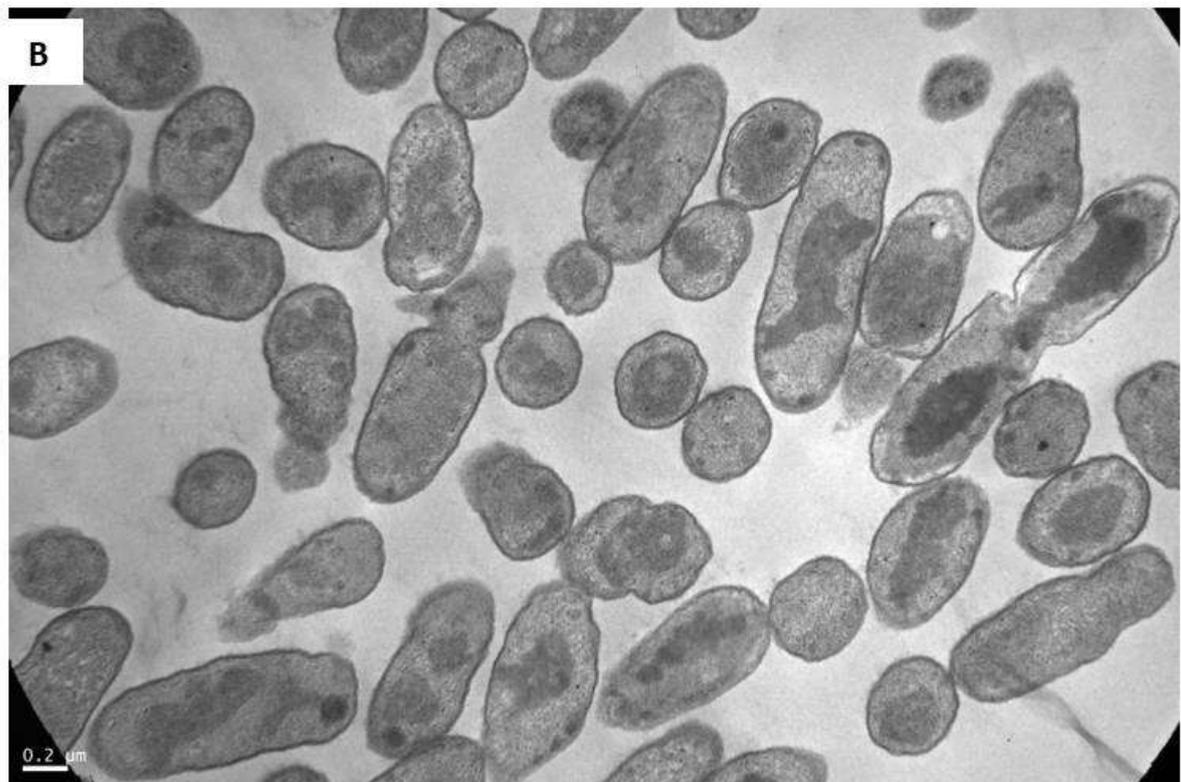
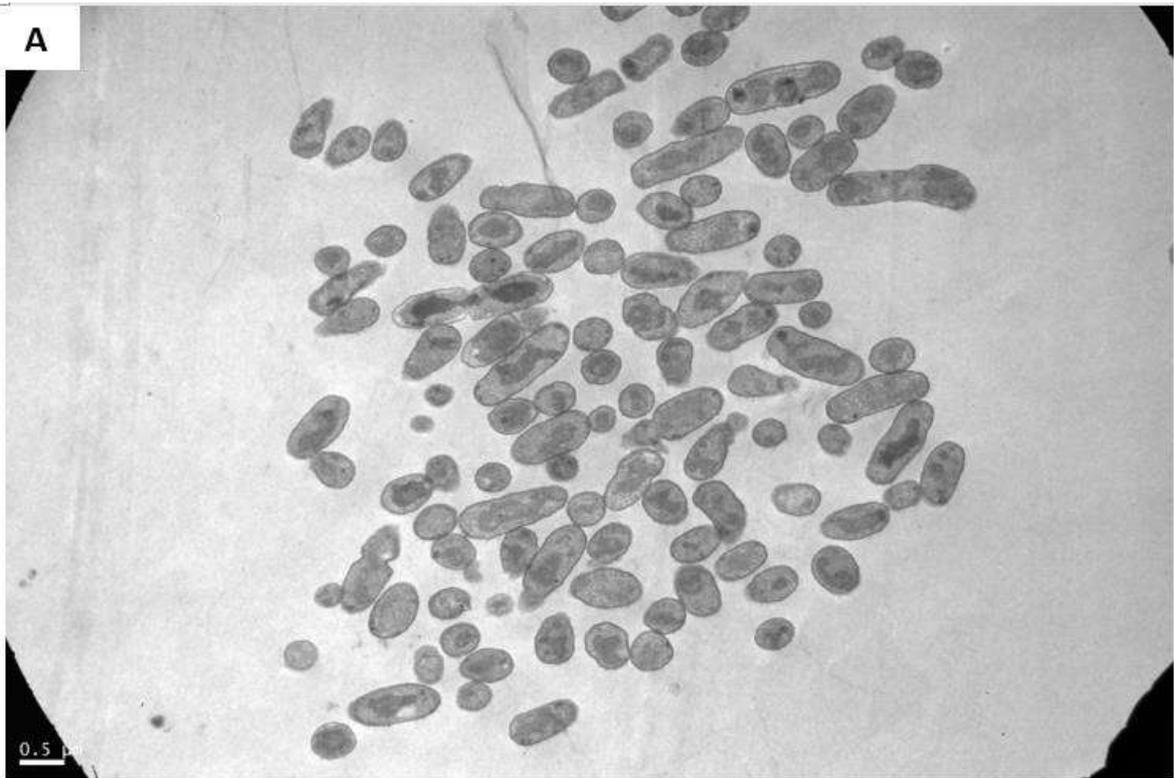


Figura 23: micrografías obtenidas por TEM de *O. anthropi* wt con aumento 12000x (A) y 30000x (B) frente al tratamiento con polimixina B 100 U/ml.

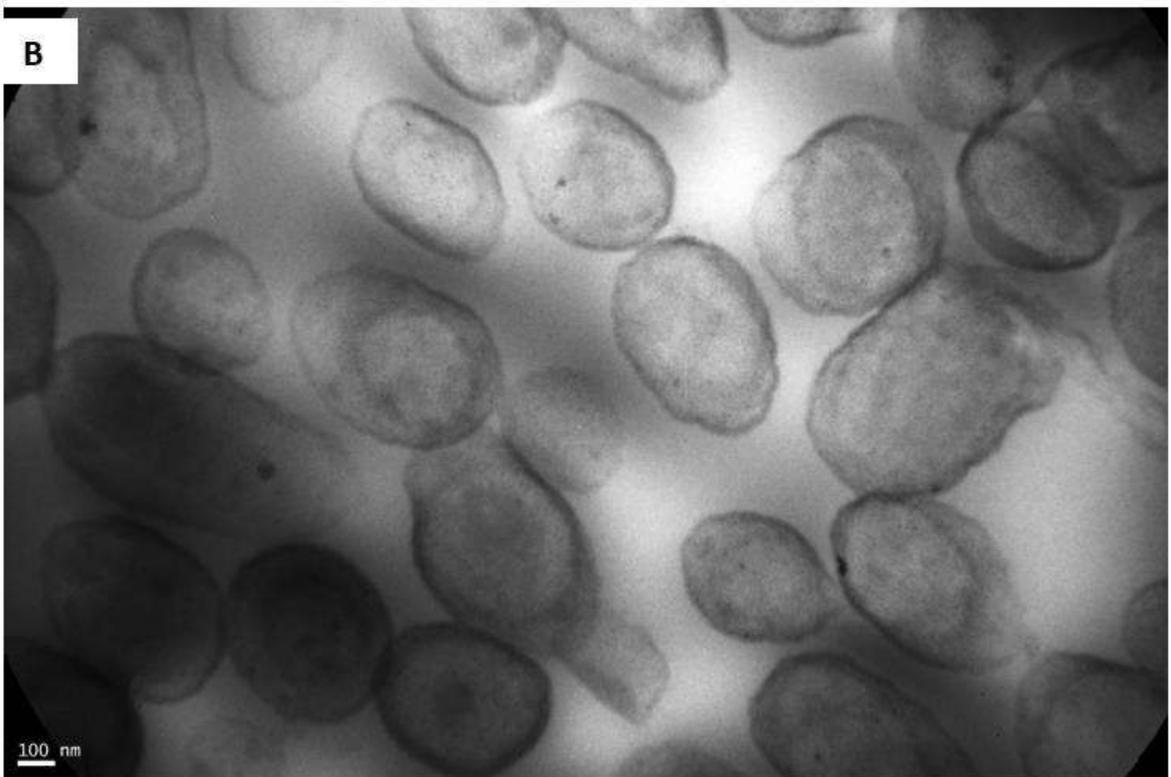
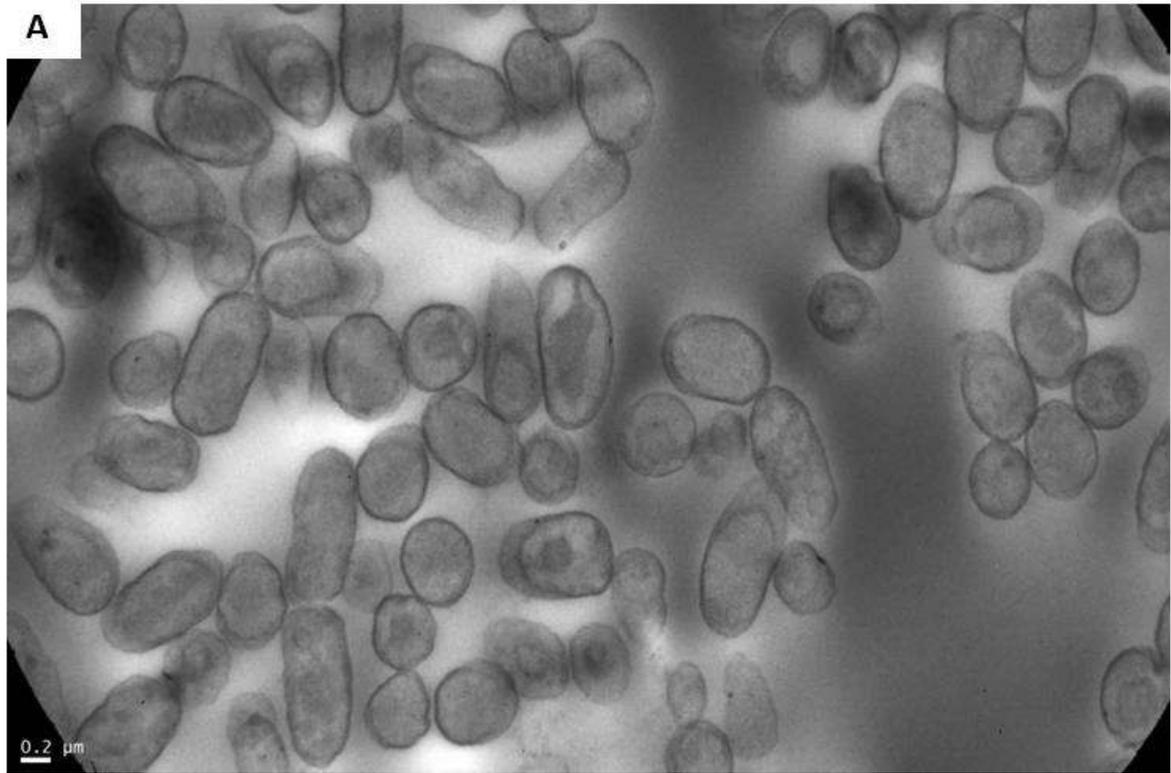


Figura 24: micrografías obtenidas por TEM de *O. anthropi* $\Delta 54$ con aumento 20000x (A) y 50000x (B) frente al tratamiento con polimixina B 100 U/ml.

A continuación, y a modo de comparación, en la Figura 25 se encuentran resumidas las observaciones realizadas por la técnica TEM en *O. anthropi*, eligiéndose algunas bacterias de cada condición que representan los resultados obtenidos.

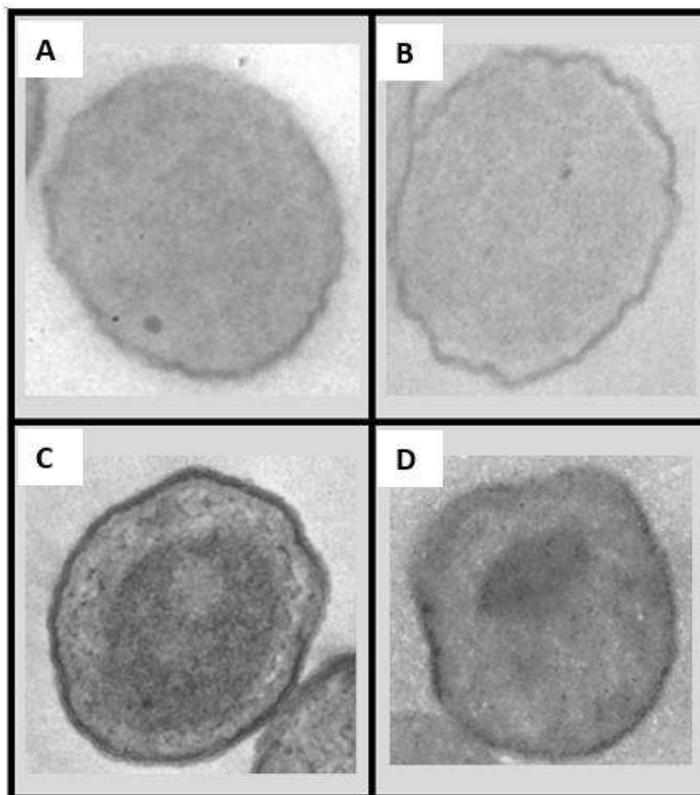


Figura 25: morfologías observadas mediante TEM en *O. anthropi* wt sin tratamiento (A), $\Delta 54$ sin tratamiento (B), wt con tratamiento polimixina B (C) y $\Delta 54$ con tratamiento (D).

4.5 Fraccionamiento subcelular

Con el objetivo de analizar el efecto de la ausencia de TamB en los componentes de las membranas se propuso realizar fraccionamiento subcelular basado en la obtención de membranas totales y fracciones purificadas de OM y IM, para luego determinar las proteínas presentes en cada una de ellas (y eventualmente otros componentes). Hasta el momento no hemos podido separar eficientemente la OM y la IM. Sin embargo, se obtuvo exitosamente la fracción de membranas totales y proteínas solubles. En la Figura 26A y 26B se observa el pellet correspondiente a las membranas totales obtenidas luego de la ultracentrifugación del producto de lisis celular, distinguiéndose claramente dos fracciones correspondientes a la OM e IM. El pellet obtenido se caracteriza por tener predominantemente un color marrón el cual se asocia a la fracción de IM debido a la presencia de citocromos. Sobre la fracción de IM se observa un halo de color transparente

asociado a la fracción de OM. En la Figura 26A y 26B se presenta el pellet obtenido de la cepa wt a la izquierda y el pellet de la cepa mutante $\Delta 54$ a la derecha. Cabe destacar que el pellet de la mutante fue de mayor volumen, sugiriendo una mayor inestabilidad de la envoltura celular en la cepa mutante lo cual facilitaría la ruptura celular.

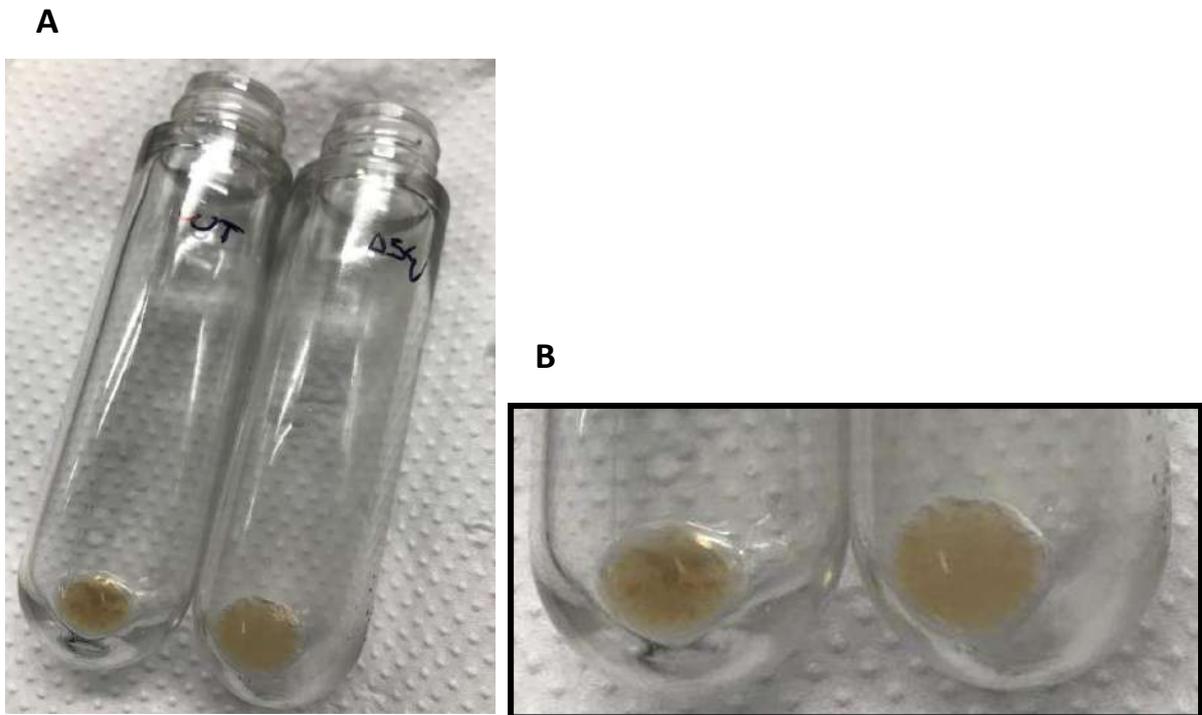


Figura 26: fracción de membranas totales de cepa wt (izquierda) y cepa mutante $\Delta 54$ (derecha) como resultado de fraccionamiento subcelular (A), e imagen agrandada donde se puede observar con mayor detalle la fracción de OM (halo transparente) y de IM (marrón) (B).

Los ensayos de fraccionamiento subcelular realizados se detuvieron en este punto (conservando los productos en freezer a -20°C), quedando como objetivo pendiente poner a punto la separación de la OM e IM, y el estudio de las proteínas presentes en cada fracción.

5. DISCUSIÓN

La habilidad de los patógenos y simbiontes bacterianos Gram-negativos de tolerar condiciones adversas, modular su permeabilidad a compuestos tóxicos y secretar proteínas/efectores, depende del correcto ensamblado de la envoltura celular, especialmente de la OM. Todos los componentes que forman la envoltura celular, deben transportarse desde el citoplasma hasta la IM, o bien hasta la OM traspasando el periplasma. Para lograr una correcta inserción de los componentes de membrana, por ejemplo, las proteínas, las bacterias cuentan con distintas maquinarias, siendo los sistemas BAM y TAM ejemplos de ello. Particularmente en los microorganismos patógenos o patógenos oportunistas, como es el caso de *Brucella* y *Ochrobactrum*, respectivamente el correcto funcionamiento de estos sistemas y de la inserción de proteínas suele ser un factor determinante en la virulencia y en la colonización frente a las células del hospedador [19]. *Ochrobactrum* es un género bacteriano el cual está formado por microorganismos ambientales de vida libre con baja virulencia que no se replican dentro de las células humanas o animales y solo recientemente y ocasionalmente se han descrito como una causa ocasional de enfermedad humana, mientras que *Brucella* es un patógeno bien reconocido. con la capacidad de supervivencia intracelular y replicación que frecuentemente afecta a animales y humanos [2].

Como se mencionó en la sección 1.4 de la Introducción, la OM de las bacterias Gram-negativas funciona como barrera al dificultar el acceso de los antibióticos a los sitios objetivos, reduciendo la susceptibilidad bacteriana a los mismos [29]. Particularmente, se demostró que la OM de *B. abortus* es permeable a sondas hidrofóbicas y es notablemente resistente a la acción de la lisozima, a la desestabilización por péptidos policatiónicos y EDTA [30, 31]. La importancia de estas propiedades inusuales es un gran punto de interés, y es por ello que se comenzó a explorar en esta tesis acerca de la estabilidad de la envoltura celular en bacterias del género *Ochrobactrum*, siendo éste el pariente más cercano al género *Brucella*. *O. anthropi* ha sido en este trabajo de tesis la especie modelo para el estudio del rol del sistema TAM. Para tal fin se ha generado la cepa mutante defectiva en TamB, denominada en este trabajo de tesis como *O. anthropi* $\Delta 54$. Con el fin de comprender el rol de dicha proteína en la biogénesis de la envoltura, se comparó la sensibilidad frente a diferentes tratamientos de la mutante en relación a la wt.

Se ha demostrado que, a pesar de su estrecha relación filogenética, *B. abortus* y *O. anthropi* difieren en las propiedades de la OM y que estas diferencias son causadas, en

un primer término por pequeños cambios en el LPS [9]. A pesar de las diferencias mencionadas, se observó coincidencia en cuanto a la resistencia a EDTA tanto por *B. suis* [23] como por *O. anthropi* (este trabajo de tesis). Dicha resistencia resulta interesante ya que se propone que la eliminación de cationes divalentes que estabilizan la OM en bacterias Gram-negativas por acción de agentes externos, provocarían un aumento en la permeabilidad de la misma. De todas formas, no se puede descartar que las diferencias en los grupos aniónicos del núcleo de LPS puedan contribuir a las diferencias de permeabilidad entre ambas especies.

Por otra parte, se observó una marcada sensibilidad por parte de la mutante $\Delta 54$ a la lisozima, que se recupera en la cepa complementada KI. Estos resultados son consistentes con lo observado previamente en nuestro laboratorio [23] respecto a la sensibilidad de la cepa $\Delta mapB$ en *B. suis*, indicando que el rol de la proteína TamB en ambas especies podría estar conservado.

Además, se observó sensibilidad por parte de la mutante $\Delta 54$ frente al compuesto SDS mostrando un 60% de supervivencia respecto la wt. Sorpresivamente y de manera similar con los resultados obtenidos en presencia de lisozima, la complementada KI no sólo resultó ser resistente al SDS, sino que también mostró un crecimiento incrementado con respecto a la cepa wt. Se cree que la molécula de SDS, formada por una parte hidrófoba y una parte polar aniónica, interacciona con la membrana mediante la inserción de la cadena carbonada que presenta, y que una vez localizada, las cargas aniónicas de la parte polar desestabilizan la membrana por repulsión de cargas con las cargas aniónicas que ya presenta la membrana (cargas brindadas principalmente por el KDO). Además, en la Figura 8 de la sección de Introducción, pueden compararse las estructuras químicas del SDS y del DOC (el otro tensioactivo iónico evaluado) y se puede observar que la cadena carbonada del SDS presenta mayor afinidad y facilidad de introducirse en la membrana que la parte hidrófoba del DOC, debido a su mayor tamaño, por lo que se cree que es la razón principal por la que el SDS puede afectar y provoca disrupción de la membrana.

En contraste con los resultados descritos por Bialer et al. 2019 en *Brucella suis*, se destaca la resistencia que tiene la mutante $\Delta mapB$ de *B. suis* frente a SDS y la marcada sensibilidad que presentó frente a Tritón X-100. Estas observaciones abren interesantes interrogantes sobre posibles diferencias en la envoltura celular y/o la función del sistema TAM en ambas especies a pesar de su cercanía filogenética [23].

La cepa mutante $\Delta 54$ mostró una mayor sensibilidad frente al antimicrobiano vancomicina en comparación con la cepa wt. La vancomicina actúa sobre la unión entre D-Alanina-D-Alanina en la formación del PG. Es posible que la ausencia de TamB afecte no solo la inserción de proteínas en la OM, sino también que genere cambios aún más generales en la biogénesis de la envoltura celular. Las posibles hipótesis que podrían explicar esta sensibilidad son (i) modificaciones estructurales en la síntesis de la molécula D-Alanina que resulten en una mayor sensibilidad ante la acción de la vancomicina, o (ii) modificaciones en el transporte o inserción de diversos componentes en la envoltura celular, principalmente en la OM, que provoquen una mayor permeabilidad a la vancomicina y acceso al PG.

Por otra parte, continuando con el análisis de la estabilización electrostática de la membrana, Velasco et al. 2000, afirman que no existen diferencias cualitativas en cuanto a los fosfatos y ácidos grasos entre *B. abortus* y *Ochrobactrum*, aunque sí encontraron que el LPS de *Ochrobactrum*, a diferencia del LPS de *B. abortus*, contiene ácido galacturónico. A su vez, Vila et al. 2016 aseguran que la estructura química del lípido A y del core difieren entre ambos géneros. *Ochrobactrum* y *Brucella* también difieren en su membrana externa; *Brucella* es altamente permeable a sustancias hidrofóbicas mientras que *Ochrobactrum* no lo es, lo que lleva a un patrón diferente de susceptibilidad. Esta última observación pone en debate la idea de que las membranas de *Brucella* y *Ochrobactrum* pueden diferir en valores de potencial de membrana. Como perspectiva a futuro, se desea profundizar en el análisis de las diferencias estructurales de la envoltura celular en *O. anthropi* en relación a *Brucella* [2, 9] .

La microscopía TEM permitió observar las distintas morfologías de las envolturas celulares de la cepa wt y la cepa mutante de *O. anthropi*. Aunque fueron experimentos preliminares, se observaron algunas diferencias que están en concordancia con la hipótesis inicial acerca de la desestabilización estructural de la membrana. La ausencia de TamB en *O. anthropi* generó envolturas celulares desparejas, con bordes que no se encontraban bien definidos, con morfologías internas algo desorganizadas e incluso algunas de ellas presentaban una especie de doble membrana difusa (marcadas con flechas color rojo en la Figura 22A y 22B). Estas observaciones dan idea y alimentan la hipótesis inicial acerca del rol que tiene el sistema TAM en la biogénesis de la envoltura celular, en la que proponemos que participa no solo en la correcta inserción de proteínas sino también en la translocación de otro tipo de componentes de membrana. Con respecto

a las imágenes de TEM luego del tratamiento con polimixina B, se confirmó lo observado por Velasco et al. 2000 para *Ochrobactrum intermedium*, una desorganización interna y colapso del citoplasma, pero sin alterar la membrana externa. La cepa mutante $\Delta 54$ de *O. anthropi* mostró un fenotipo similar. Por el otro lado, Komaniecka et al. 2016 no obtuvieron alteración de la membrana ni coagulación del citoplasma interna en *O. lupini* luego del tratamiento con polimixina B, apoyando la idea de que la envoltura celular difiere incluso entre especies dentro del género *Ochrobactrum* [9, 12].

6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS A FUTURO

Las observaciones obtenidas en este trabajo de tesis apoyan la hipótesis sobre la importancia de la función de TAM en la homeostasis de la envoltura, en particular de la OM en bacterias del grupo Alphaproteobacterias. Además, apoya la idea de diferencias estructurales entre el género *Brucella* y *Ochrobactrum*, y su impacto sobre la función de TAM. Estas diferencias contribuirán a comprender el rol de TAM en este grupo de bacterias. La ausencia de TamB mostró una disminución general en la estabilidad y permeabilidad de la OM. Se sugiere que la incorrecta inserción de proteínas en la OM, o bien por la incorrecta translocación de otro tipo de sustratos de membrana, provocaría desestabilización principalmente de la OM generando nuevos espacios susceptibles para el ingreso de diversos compuestos.

En estos términos, se enumeran a continuación los aspectos sobre los cuales se desea seguir trabajando:

- Realizar curvas de crecimiento en medio mínimo con el objetivo de observar diferencias en cuanto a tiempos de adaptación al medio, crecimiento y división celular.
- Realizar análisis proteómico tanto cuali como cuantitativamente en las fracciones de OM de *O. anthropi* wt y $\Delta 54$.
- Profundizar en el análisis de la composición de la envoltura celular en *B. suis* y *O. anthropi* frente a la ausencia de TamB: análisis del LPS, PG, ácidos grasos y fosfolípidos.
- Generación de cepas simples y dobles mutantes en las proteínas de la familia AsmA de *B. suis*, y *O. anthropi* (BR1408 y BR0925, Oant_1769 y Oant_2261, respectivamente) y de ser posible, generar las triples mutantes partiendo de la cepa $\Delta 54$.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Holmes B., P.M., Kiredjian M., Kersters K., *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from Human Clinical Specimens and Previously Known as Group Vd. 1998.
2. Vila, A., et al., *Brucella suis* bacteremia misidentified as *Ochrobactrum anthropi* by the VITEK 2 system. J Infect Dev Ctries, 2016. **10**(4): p. 432-6.
3. Ezzedine, H., et al., *An outbreak of Ochrobactrum anthropi bacteraemia in five organ transplant patients*. J Hosp Infect, 1994. **27**(1): p. 35-42.
4. Teyssier, C., et al., *Molecular and phenotypic features for identification of the opportunistic pathogens Ochrobactrum spp.* J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 10): p. 945-953.
5. Yague-Munoz, A., et al., *[Ochrobactrum anthropi bacteremia in a child with cystic fibrosis]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010. **28**(2): p. 137-8.
6. Ryan, M.P. and J.T. Pembroke, *The Genus Ochrobactrum as Major Opportunistic Pathogens*. Microorganisms, 2020. **8**(11).
7. Aguilera-Arreola, M.G., et al., *Correct Identification of Ochrobactrum anthropi From Blood Culture Using 16rRNA Sequencing: A First Case Report in an Immunocompromised Patient in Mexico*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 205.
8. Lebuhn, M., et al., *Taxonomic characterization of Ochrobactrum sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of Ochrobactrum tritici sp. nov. and Ochrobactrum grignonense sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2000. **50 Pt 6**: p. 2207-2223.
9. Velasco, J., et al., *Brucella abortus and its closest phylogenetic relative, Ochrobactrum spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance*. Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3210-8.
10. Hordt, A., et al., *Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 468.
11. Lama, M., et al., *Genomic analysis of a multidrug-resistant Brucella anthropi strain isolated from a 4-day-old neonatal sepsis patient*. J Glob Antimicrob Resist, 2021. **26**: p. 227-229.
12. Komanięcka, I., et al., *Rhizobium strains differ considerably in outer membrane permeability and polymyxin B resistance*. Acta Biochim Pol, 2016. **63**(3): p. 517-25.
13. Nikaido, H., *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(4): p. 593-656.
14. Madigan MT, M.J., Dunlap P V., Clark DP, *Brock, biología de los microorganismos. 12th edition*. 2009.
15. Sun, J., et al., *Physical properties of the bacterial outer membrane*. Nat Rev Microbiol, 2022. **20**(4): p. 236-248.
16. Costa, T.R., et al., *Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(6): p. 343-59.
17. Ieva, R. and H.D. Bernstein, *Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(45): p. 19120-5.
18. Hagan, C.L., S. Kim, and D. Kahne, *Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components*. Science, 2010. **328**(5980): p. 890-2.
19. Selkrig, J., et al., *Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(5): p. 506-10, S1.
20. Josts, I., et al., *The Structure of a Conserved Domain of TamB Reveals a Hydrophobic beta Taco Fold*. Structure, 2017. **25**(12): p. 1898-1906 e5.
21. Gruss, F., et al., *The structural basis of autotransporter translocation by TamA*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(11): p. 1318-20.

22. Stubenrauch, C.J. and T. Lithgow, *The TAM: A Translocation and Assembly Module of the beta-Barrel Assembly Machinery in Bacterial Outer Membranes*. EcoSal Plus, 2019. **8**(2).
23. Bialer, M.G., et al., *MapB, the Brucella suis TamB homologue, is involved in cell envelope biogenesis, cell division and virulence*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 2158.
24. Smith, K.P., et al., *Alteration in abundance of specific membrane proteins of Aggregatibacter actinomycetemcomitans is attributed to deletion of the inner membrane protein MorC*. Proteomics, 2015. **15**(11): p. 1859-67.
25. Smith, K.P., et al., *The cell envelope proteome of Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Mol Oral Microbiol, 2015. **30**(2): p. 97-110.
26. Ruiz, N., R.M. Davis, and S. Kumar, *YhdP, TamB, and YdbH Are Redundant but Essential for Growth and Lipid Homeostasis of the Gram-Negative Outer Membrane*. mBio, 2021. **12**(6): p. e0271421.
27. Douglass, M.V., A.B. McLean, and M.S. Trent, *Absence of YhdP, TamB, and YdbH leads to defects in glycerophospholipid transport and cell morphology in Gram-negative bacteria*. PLoS Genet, 2022. **18**(2): p. e1010096.
28. Filloux, A., *Bacterial protein secretion systems: Game of types*. Microbiology (Reading), 2022. **168**(5).
29. Goode, A., V. Yeh, and B.B. Bonev, *Interactions of polymyxin B with lipopolysaccharide-containing membranes*. Faraday Discuss, 2021. **232**(0): p. 317-329.
30. Barquero-Calvo, E., et al., *The differential interaction of Brucella and ochrobactrum with innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5893.
31. Martinez de Tejada, G., et al., *The outer membranes of Brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides*. Infect Immun, 1995. **63**(8): p. 3054-61.
32. Thoma, B., et al., *Identification and antimicrobial susceptibilities of Ochrobactrum spp.* Int J Med Microbiol, 2009. **299**(3): p. 209-20.
33. Chmelar, D., et al., *Antibiotic susceptibility and production of endotoxin by Ochrobactrum anthropi isolated from environment and from patients with cystic fibrosis*. Folia Microbiol (Praha), 2019. **64**(6): p. 861-865.
34. Yagel, Y., et al., *Genomic Characterization of Antimicrobial Resistance, Virulence, and Phylogeny of the Genus Ochrobactrum*. Antibiotics (Basel), 2020. **9**(4).
35. Velkov, T., et al., *Molecular basis for the increased polymyxin susceptibility of Klebsiella pneumoniae strains with under-acylated lipid A*. Innate Immun, 2013. **19**(3): p. 265-77.
36. Velkov, T., et al., *Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of Klebsiella pneumoniae*. Innate Immun, 2014. **20**(4): p. 350-63.
37. Gales A., V.R., *Mecanismos de la resistencia a antibióticos*. 2018.
38. Martin, N.L. and T.J. Beveridge, *Gentamicin interaction with Pseudomonas aeruginosa cell envelope*. Antimicrob Agents Chemother, 1986. **29**(6): p. 1079-87.
39. Bhairi S. M., M.C., *Merck: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems*. 2017.
40. Vassen, V., et al., *Localized incorporation of outer membrane components in the pathogen Brucella abortus*. EMBO J, 2019. **38**(5).
41. Cloeckert, A., et al., *Demonstration of peptidoglycan-associated Brucella outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies*. J Gen Microbiol, 1992. **138**(7): p. 1543-50.
42. Gamazo, C. and I. Moriyon, *Release of outer membrane fragments by exponentially growing Brucella melitensis cells*. Infect Immun, 1987. **55**(3): p. 609-15.
43. Lamontagne, J., et al., *Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in Brucella abortus*. J Proteome Res, 2007. **6**(4): p. 1519-29.
44. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0*. 2023.

45. Vay, C.A., et al., [*In vitro*] activity of different antimicrobial agents on Gram-negative nonfermentative bacilli, excluding *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp]. *Rev Argent Microbiol*, 2005. **37**(1): p. 34-45.
46. M7-A10, C., *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 2015.
47. M100, C., *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testin*. 2017.
48. Cian, M.B., et al., *Separation of the Cell Envelope for Gram-negative Bacteria into Inner and Outer Membrane Fractions with Technical Adjustments for Acinetobacter baumannii*. *J Vis Exp*, 2020(158).