

Universidad de Costa Rica

Sede Rodrigo Facio

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en
Microbiología y Química Clínica

**Papel de la lipoproteína de membrana externa Nlpl en la respuesta de
Salmonella enterica serovar Typhimurium ante agentes estresantes de pared
celular y membrana externa**

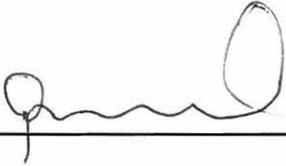
Nicole Vargas Víquez

A96631

Tutor: César Rodríguez Sánchez, PhD.

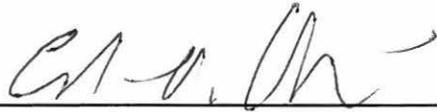
Julio, 2015

Los que aquí firmamos damos fe de que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación:



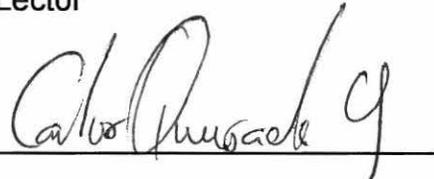
César Rodríguez Sánchez, PhD.

Tutor



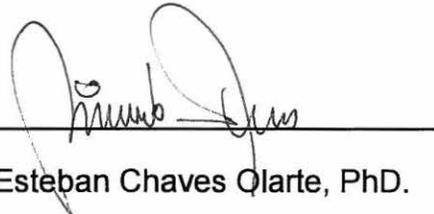
Carlos Chacón Díaz, MSc.

Lector



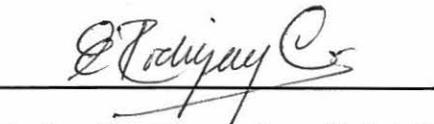
Carlos Quesada Gómez, MSc.

Lector



Esteban Chaves Olarte, PhD.

Presidente del Tribunal



Evelyn Rodríguez Cavallini, MSc.

Profesor designado

Índice

	Número de página
Agradecimientos.....	4
Resumen.....	5
Introducción.....	6
Justificación.....	9
Pregunta de investigación.....	9
Hipótesis.....	10
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
Materiales y Métodos.....	11
Resultados.....	19
Discusión.....	30
Anexos.....	37
Referencias.....	45

Agradecimientos.

Debo agradecer primero a Dios, porque es Él quien nos da fuerzas, nos mantiene firmes en el camino, nos regala días nuevos para luchar por nuestras metas y coloca personas excepcionales en nuestras vidas.

A mi papá, porque es mi gran ejemplo, mi maestro de vida, me enseñó que si algo se quiere, se puede y puedo decir que me trajo de la mano hasta donde he llegado.

A mi mamá, que además de madre dedicada es amiga, que sabe escuchar y aconsejar y sus palabras de aliento en este trayecto nunca faltaron.

A mi hermano, que su compañía y apoyo al estudiar no la cambio por nada. Y como hermana mayor deseo ser buen ejemplo también para su vida.

A mi tutor, porque desde años atrás puso su confianza en mí casi sin conocerme, me formó como profesional y me brindó tantas oportunidades y experiencias realmente valiosas. Tampoco faltaron conversaciones de vida y consejos, además de tutor, un amigo.

Al Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia (LIBA) y al Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) y a todas las personas que laboran en ellos, por abrirme las puertas y los brazos desde el inicio con tanta disposición a ayudar, tanta dedicación al trabajo y tanto cariño.

A todos y cada uno de ustedes, muchísimas gracias.

Resumen.

Nlpl es una lipoproteína de membrana externa de función aún desconocida pero ampliamente distribuida en la familia Enterobacteriaceae, donde se incluye *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Además de ocupar una localización genómica que sugiere algún vínculo funcional con el degradosoma bacteriano, esta lipoproteína parece jugar un papel en la modulación de la virulencia de algunas bacterias y estar relacionada de alguna manera con la división celular. Con el fin de generar el conocimiento que pueda contribuir a diseñar estrategias novedosas de control de la virulencia de este patógeno de importancia mundial, se pretende elucidar si esta lipoproteína juega algún papel en la preservación de la integridad funcional y estructural de la envoltura celular mediante la comparación curvas de crecimiento, el nivel de expresión de *nlpl*, la sensibilidad a antibióticos, ensayos de lisis, tinción de células con bocilina, determinación de la actividad betalactamasa y perfiles de ácidos grasos de una cepa salvaje de *Salmonella enterica* Typhimurium y un mutante de *nlpl* luego de exponerse a agentes estresantes de pared celular y membrana externa tales como bilis, bacitracina, cefalexina, cefsulodina, etanol, peróxido de hidrógeno, lisozima, polimixina B y deoxicolato de sodio. La integridad funcional de la pared celular está comprometida en el mutante de *nlpl*, por lo que es más sensible a estresantes que actúan sobre esta estructura, resulta menos resistente a la presión osmótica y a sustancias de alto peso molecular. No se observaron tendencias estables de la expresión de *nlpl* cuando el tipo salvaje se expuso a las concentraciones de agentes estresantes que dieron lugar a los fenotipos mencionados arriba. En conjunto con características estructurales y predicciones bioinformáticas, se concluye que Nlpl está relacionada con la síntesis y estabilidad del peptidoglicán septal, posiblemente a través del control de amidasas y otros efectores tardíos a través de una actividad chaperona.

Introducción.

Tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, se han identificado más de 130 lipoproteínas, a las cuales se les han atribuido distintas funciones tales como adhesión, translocación de factores de virulencia (Babu *et al.*, 2006), neutralización de los mecanismos de defensa del hospedero, transporte y transducción de señales, unión del peptidoglicán con la membrana externa (Koebnik *et al.*, 2000) y mantener la estabilidad de la pared celular (Cascales *et al.*, 2002). No obstante, la mayoría de este tipo de proteínas tiene su función aún en estudio.

Nlpl es una lipoproteína de membrana externa ampliamente distribuida en la familia Eubacteriaceae, donde se incluye *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Es una lipoproteína de 32 kDa con 294 residuos de aminoácidos que existe naturalmente en forma de dímero; los monómeros tienen un dominio de anclaje a la membrana externa y otro que se expone hacia el periplasma. En su estructura presenta cinco repeticiones en tándem de tetratricopéptidos (TRPs), que son dominios independientes y forman un motivo de hélice-vuelta-hélice (Wilson *et al.*, 2011).

Los dominios de TRPs se han descrito principalmente en eucariotas. Originalmente fueron implicados en proteínas de división celular en levaduras; sin embargo, actualmente se conoce que son ubicuos y que se encuentran en proteínas que median una gran variedad de interacciones proteína-proteína, es decir, funcionan como andamios para el ensamblaje de complejos supramoleculares (Blatch & Lässle, 1999). También se les ha descrito un papel en el control del plegamiento e internalización de proteínas (Blatch & Lässle, 1999), el ensamblaje de la membrana externa y la patogénesis (Zeytuni & Zarivach, 2012). En eucariotas se han identificado complejos supramoleculares que involucran proteínas con residuos de TRPs. A manera de ejemplo, el Complejo Promotor de Anafase (APC) y el Complejo de Importación de Proteínas. El primer complejo incluye las proteínas CDC16, CDC23 y CDC27 que contienen TRPs y se encargan de ubiquitinar proteínas para la degradación, al inicio de la anafase. El segundo

complejo transporta proteínas a través de las membranas de los peroxisomas, (Blatch & Lässle, 1999). En el caso de procariotas, el degradosoma, encargado de procesamiento de ARN y regulación de la expresión génica (Taghbalout & Rothfield, 2007) y el divisoma, responsable la formación del septo y separación de las células en división (Lutkenhaus *et al.*, 2012) son complejos supramoleculares que parecen ser ensamblados a través proteínas con dominios TRPs.

El gen que codifica por Nlpl se localiza corriente abajo de *pnp*, gen codificante de una polinucleótido fosforilasa (PNPasa); y corriente arriba de *deaD*, el cual codifica por una ARN helicasa dependiente de ATP; ambas proteínas que componen el degradosoma (Ohara *et al.*, 1999; Carpousis, 2007).

En *S. enterica* serovar Typhimurium se ha resaltado la importancia de PNPasa en la virulencia. Inactivaciones mutacionales en esta proteína resultan en el aumento de ARNm de genes de las islas de patogenicidad SPI1, que contiene genes para la invasión celular, y SPI2, que incluye genes para la vida intracelular (Clements *et al.*, 2002). La delección del gen que codifica por esta proteína también resulta en el aumento de la expresión de los genes de virulencia *spv*, los cuales son necesarios para la replicación y supervivencia intracelular. PNPasa no es necesaria para la inducción de la expresión de los genes de virulencia *spv*, pero restringe esa expresión cuando ya ha sido inducida (Eriksson *et al.*, 2006).

La cercanía entre genes del degradosoma y *nlpl*, unido al hecho de que *nlpl* se transcribe como un operón junto con *pnp*, sugiere fuertemente una relación funcional entre el degradosoma y Nlpl. A propósito, se comprobó que tanto *pnp* como *deaD* y *nlpl* contribuyen individualmente a la adaptación a bajas temperaturas y que esta respuesta especialmente recae sobre la lipoproteína (Rouf, Anwar, Clements y Rhen, 2011). También se ha logrado demostrar que la ausencia de Nlpl exacerba la formación de biopelículas, mientras que la ausencia de PNP retrasa esa formación. El desarrollo de biopelículas en *S. enterica* serovar Typhimurium es un proceso regulado por el segundo mensajero ácido-cíclico-diguanílico monofosfato (c-di-GMP) y tiene una conexión regulatoria desconocida con PNPasa (Rouf *et al.*, 2011).

Otro justificante importante para estudiar Nlpl es su relación con la virulencia. Por ejemplo, un mutante de *nlpl* en *Escherichia coli* LF82 aislada de una lesión crónica de un paciente con Enfermedad de Crohn, disminuye tanto su capacidad de adherencia y como la de invadir células epiteliales intestinales de la línea Intestine-407; además de que sintetiza poca cantidad de pili tipo 1 y no expresa flagelos (Barnich *et al.*, 2004). Otro caso es el de *Escherichia coli* K1 RS218, donde Nlpl determina la capacidad de esta bacteria de interactuar con células endoteliales de la microvasculatura del cerebro humano. Un mutante de *nlpl* tiene menor habilidad de interactuar con dichas células, pero Nlpl actúa independientemente de fimbrias, flagelos u OmpA, ya que la depleción de *nlpl* no afecta la expresión de estas estructuras. Más bien, se cree que la dificultad del mutante de *nlpl* para interactuar con las células endoteliales se debe a un defecto del mutante en la fosfolipasa citosólica $A_2\alpha$ conocida como cPLA $_2\alpha$ (Teng *et al.*, 2010).

Existe evidencia que relaciona Nlpl con la división celular. Cultivos líquidos de un mutante de *E. coli* de *nlpl* a 42°C muestran una pronunciada filamentación; mientras que cuando se sobreexpresa *nlpl* se observan elipsoides gruesos (Ohara *et al.*, 1999). Esta observación se fortalece con la reciente vinculación de lipoproteínas de *E. coli* en la síntesis de peptidoglicán. Por ejemplo, la lipoproteína LpoB estimula la actividad transpeptidasa de PBP1B. Su ausencia desencadena lisis celular, formación de protuberancias en la periferia celular y una sensibilidad aumentada a betalactamas. El complejo LpoB-PBP1B también parece promover la constricción de la membrana externa durante la división celular (Typas *et al.*, 2010).

En *E. coli* existe el sistema RcsCDB, un sistema de transducción de señales altamente conservado en las proteobacterias (Castanie, Cam & Jacq, 2006). Este sistema es utilizado por las bacterias para monitorear cambios en el ambiente para recurrir a adaptaciones, por ejemplo se ha visto que se activa ante péptidos catiónicos como la polimixina B y a bajas temperaturas; además de que controla la síntesis de cápsula, flagelos y biopelículas (Pescaretti *et al.*, 2013). Uno de los componentes de este sistema es RcsF, una lipoproteína de membrana externa

que funciona como un sensor y según el estímulo externo, se encarga de transmitir señales a RcsC, otro componente del sistema, para iniciar cadenas de fosforilación (Castanie, Cam & Jacq, 2006).

Con el fin de esclarecer si Nlpl participa en la adaptación de *S. enterica* serovar Typhimurium al estrés de la envoltura celular (pared celular y membrana externa), comparamos la respuesta de una cepa salvaje y de un mutante de *nlpl* a bilis, bacitracina, cefalexina, cefsulodina, etanol, peróxido de hidrógeno, lisozima, polimixina B y deoxicolato de sodio a través de curvas de crecimiento, curvas de lisis con agua destilada, pruebas de sensibilidad a antibióticos, tinción de células con bocilina, mediciones del nivel de expresión de *nlpl*, determinación del perfil de ácidos grasos y ensayos de hidrólisis de nitrocefina.

Justificación.

Este trabajo pretende dilucidar si la lipoproteína de membrana externa Nlpl influye en la respuesta de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ante estresantes de pared celular y membrana externa. Esta información es valiosa por cuanto engrosa el escaso conocimiento relacionado con la función de lipoproteínas de membrana externa en enterobacterias y, en caso de que Nlpl resulte importante en la respuesta a agentes estresantes de envoltura externa, otorga a la lipoproteína relevancia en estrategias de control de infecciones que no requieren la acción intracelular de potenciales efectores.

Pregunta de Investigación.

¿Afecta la lipoproteína de membrana externa Nlpl la respuesta de *S. enterica* serovar Typhimurium a estresantes de la pared celular y membrana externa?

Hipótesis

Los factores estresantes de la pared celular y la membrana externa tienen un mayor impacto en un mutante de *nlpI* que en una cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium.

Objetivo General.

Comparar la respuesta ante estresantes de pared celular y membrana externa de una cepa salvaje y un mutante de *nlpI* de *S. enterica* serovar Typhimurium

Objetivos Específicos.

1. Comparar curvas de crecimiento de la cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium y un mutante de *nlpI* ante la presencia de estresantes de la pared celular y membrana externa, con el objetivo de verificar si el mutante de *nlpI* resulta más susceptible a dichos agentes.
2. Realizar ensayos de lisis, comparar la susceptibilidad a los antibióticos y realizar tinción de células con Bocilina de *S. enterica* serovar Typhimurium y un mutante del gen *nlpI*, en presencia de diversos estresantes de pared celular y membrana externa, para comprobar la integridad funcional y estructural de la pared celular.
3. Determinar si el nivel de expresión del gen *nlpI* de *S. enterica* serovar Typhimurium, varía en el tiempo ante la exposición a estresantes de pared celular y membrana externa.

4. Realizar ensayos de actividad betalactamasa y determinar el perfil de ácidos grasos de *S. enterica* serovar Typhimurium y un mutante de *nlpI* ante la presencia de diversos estresantes para verificar la integridad estructural y funcional de la membrana externa en el mutante de *nlpI*.

Materiales y Métodos.

Cepas.

Se trabajó con cinco cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium donadas por Prof. Mikael Rhen, MTC, Karolinska Institutet; una cepa tipo salvaje (SR11), la cepa SFR319 que es un mutante de *nlpI* obtenido mediante reemplazo alélico con genes del fago lambda ($\Delta nlpI$) (Datsenko & Wanner, 2000), la cepa SFR397 que es un mutante de *nlpI* complementada con el gen correspondiente en un plásmido de alto número de copias e inducible con L-arabinosa (pBAD33), la cepa tipo salvaje transformada con una TEM-betalactamasa plasmídica (SR11/pET32a) y el mutante de *nlpI* transformado con una TEM-betalactamasa plasmídica (319/pET32a). Las cepas fueron conservadas en caldo tripticasa soya con 15% de glicerol a -80°C y mantenidas en agar tripticasa soya en refrigeración. Para las cepas SR11/pET32a y 319/pET32a, el ATS debía ser suplementado con 100 µg/mL de ampicilina.

Curvas de crecimiento.

Con el fin de seleccionar las concentraciones de trabajo de los agentes estresantes a las cuales la cepa tipo salvaje y el mutante de *nlpI* mostraban mayor diferencia en el crecimiento, se realizaron cultivos de 24 horas en caldo tripticasa soya (CTS) de dichas cepas. Para ello se utilizaron platos de 96 hoyos de fondo plano con tapas impermeabilizadas mediante tratamiento con Tritón X-100 al 0,05% en etanol. Se ensayaron cinco concentraciones de bilis (0-9%), bacitracina

(0-1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cefalexina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cefsulodina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), etanol (0-2.5%), peróxido de hidrógeno (0-3 mM), lisozima (0-2250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), polimixina B (0-0.5%) y deoxicolato de sodio (0-5%), todos disueltos en agua destilada estéril. En todos los casos, el volumen final fue 200 μL por pocillo, obtenido mediante mezcla de 100 μL de medio de CTS con los volúmenes necesarios de los estresantes mencionados anteriormente y agua destilada hasta alcanzar la concentración de estresante deseada y un volumen de 90 μL . Para cefalexina y cefsulodina se ensayó solamente una concentración debido a que son las concentraciones que se reportan en la literatura, brindaron los resultados esperados y además de que se contaba con poco reactivo.

Todos los ensayos incluyeron un pocillo control sin agente estresante. A cada pocillo se le agregaron 10 μL de un suspensiones bacterianas ajustadas a la turbiedad de un estándar 0.5 McFarland en solución salina estéril, a partir de cultivos líquidos overnight de cada cepa, crecidas a 37°C en condiciones aerobias. Se colocó la placa en un lector de microplacas Biotek Synergy HT a 37°C y se realizaron lecturas de absorbancia a 600nm cada 15 minutos, por 5 horas. Finalmente, se seleccionó la concentración de los estímulos en donde se observó la mayor diferencia de crecimiento entre la cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium y el mutante de *npl*.

Una vez seleccionada la concentración de trabajo de cada uno de los estresantes mencionados anteriormente, se realizaron curvas de crecimiento de la cepa tipo salvaje y Δnpl en presencia de bacitracina (1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cefalexina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cefsulodina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. En cada caso se calculó el área bajo la curva desde el minuto 0 hasta el minuto 300 con el fin de integrar la cinética de crecimiento de cada cepa.

Curvas de lisis con agua destilada.

Dado que los estresantes con mayores efectos actúan sobre la pared celular, se realizaron pruebas de lisis en agua destilada y de sensibilidad a antibióticos de la cepa tipo salvaje y $\Delta nlpI$ en presencia de bacitracina (1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cefalexina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cefsulodina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con el fin de comprobar la integridad funcional de esta estructura. Para los ensayos de lisis con agua destilada se realizaron cultivos de 3, 6 y 24 horas de las cepas tipo salvaje y $\Delta nlpI$ en 5.0 mL de caldo tripticasa soya en presencia de bacitracina (1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cefalexina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cefsulodina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se realizó un cultivo sin estresante como control. Se centrifugaron 200 μL del cultivo y la biomasa se lavó dos veces con PBS 1X. El botón celular se resuspendió en 200 μL de agua destilada estéril y se colocó en platos de microtítulo de 96 hoyos de fondo plano. Se registró la absorbancia a 600nm cada 15 minutos por 5 horas en un lector de microplacas Biotek Synergy HT.

Pruebas de sensibilidad a antibióticos.

También se realizaron tres distintas pruebas de sensibilidad a antibióticos: (i) macrodilución en plato utilizando vancomicina, (ii) crecimiento en cristal violeta y (iii) un método de difusión en los que la cepa tipo salvaje y $\Delta nlpI$ se enfrentaron a discos impregnados con antibióticos de diferentes familias. Para la macrodilución en vancomicina, se realizaron tres diluciones de vancomicina y se mezclaron con el medio de cultivo para obtener platos de agar tripticasa soya con concentraciones finales de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de un cultivo en agar tripticasa soya de 24 horas de la cepa tipo salvaje y el mutante de $nlpI$, se realizaron suspensiones ajustadas a un estándar 0.5 Mc Farland y se diluyeron 1:10, 1:100 y 1:1000. De cada dilución y de la suspensión sin diluir se colocaron 2 μL sobre los medios de cultivo arriba mencionados. El crecimiento de las cepas se documentó tras una incubación de 24 horas a 37°C. Para comparar la capacidad del tipo salvaje y el mutante de $nlpI$ de crecer en presencia de cristal violeta, se utilizó el agar bilis rojo violeta (ABRV, Pouch & Ito, 2001) que tiene una

concentración de este compuesto de 2 µg/mL y se inoculó de igual forma a como se realizó el ensayo con vancomicina. Brevemente, los platos de ABRV fueron inoculados con 2µL de suspensiones de cultivos por 24 horas de la cepa tipo salvaje y el mutante de *nlpI* (ajustadas a un estándar 0.5 Mc Farland y diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000). Estos platos se incubaron por 24 horas a 37°C.

Para el método de difusión, se inocularon suspensiones de la cepa tipo salvaje y $\Delta nlpI$ ajustadas a la turbiedad de un estándar 0.5 Mc Farland sobre platos de agar tripticasa soya (ATS) con bacitracina (1024 µg/mL), cefalexina (2 µg/mL) y cefsulodina (10 µg/mL). En paralelo se ensayó un control sin estresante. Sobre estos platos inoculados se colocaron discos impregnados con los siguientes antibióticos (Oxoid®): ciprofloxacina (5µg), sulfametoxazole (25µg), colistina sulfato (10µg), kanamicina (1000µg), gentamicina (10µg), piperacilina (110µg), tetraciclina (30µg) y vancomicina (5µg). Se prueban fluoroquinolonas, sulfonamidas, polimixinas, aminoglucósidos, betalactámicos, glicopéptidos y tetraciclinas, con el fin de evaluar familias de antibióticos con diferentes mecanismos de acción. Se incubaron los platos inoculados y con los antibióticos a 37°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se midió el diámetro de los halos de inhibición, determinando en cuáles antibióticos y estresantes se observaba una diferencia de más o menos del 25% con respecto al cultivo sin estresante de ambas cepas.

Tinción de células con bocilina.

Además de comprobar la integridad funcional de la membrana externa, se comprobó su integridad estructural mediante tinción con bocilina de células de la cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium, el mutante de *nlpI*, y la cepa mutante de *nlpI* complementada con el gen correspondiente en pBAD33, esto con el fin de comparar la ausencia de NlpI y la sobreexpresión de la misma con respecto a la cepa tipo salvaje. La bocilina es un análogo de penicilina que fluoresce a 511 nm después de ser excitada a 504 nm y se utiliza para marcar proteínas de unión a penicilinas (PBPs) (Zhao *et al.*, 1999). En esta serie de

experimentos se utilizaron cultivos de 24 horas en 25.0 mL de caldo LB con 0.2% de L-arabinosa. Se centrifugaron 5.0 mL del cultivo a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C y el botón resultante fue resuspendido en 2.0 mL de PBS 1X con 0.2% de Tritón X-100 con el fin de permeabilizar las células. Un mililitro de las suspensiones de células permeabilizadas se mezclaron con 30 µL de un stock de bocilina de una concentración de 500 µM (330.8 µg/mL) para obtener una concentración final de 10 µg/mL. Se realizó una incubación de 30 minutos a 37°C. Las suspensiones se lavaron dos veces y se resuspendieron con PBS 1X. Se realizaron diluciones en PBS 1X de 1:10, 1:100, 1:10000 y 1:100000. En el lector de microplacas Biotek Synergy HT en un plato de 96 hoyos transparente se realizaron las mediciones de absorbancia a 600 nm para obtener la densidad celular y en un plato de 96 hoyos oscuro se realizaron mediciones de fluorescencia a 485/528 nm, a 37°C cada 15 minutos. Se calcularon las relaciones entre fluorescencia y absorbancia (fluorescencia/absorbancia) para cada cepa.

Determinación del nivel de expresión de *npl*.

Para determinar el nivel de expresión del gen *npl* de la cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium y observar posibles cambios en el tiempo, se realizaron cultivos de esa cepa a 37°C y en agitación de 3, 6 y 24 horas en 5.0 mL de CTS sin estresante (condiciones basales) y en presencia de bacitracina (1024 µg/mL), cefalexina (2 µg/mL) y cefsulodina (10 µg/mL). Estos cultivos se centrifugaron hasta obtener un botón y seguidamente se realizaron cuatro procedimientos: extracción de ARN total, tratamiento de los ARN con DNasa, retrotranscripción para la obtención de ADN copia (ADNc) y PCR en tiempo real. Para la extracción de ARN se utilizó el kit RNeasy Mini de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el tratamiento con DNasa de los ARN ya extraídos, se utilizó el kit de Ambion® DNA-free kit: Dnase Treatment and Removal Reagents, siguiendo las instrucciones del inserto. Una vez obtenidos los ARN libres de ADN, se sintetizó ADNc utilizando 6.0 µL del ARN extraído y tratado con DNasa, siguiendo las instrucciones del kit Maxima H Minus First Strand cDNA

Synthesis (Thermo Scientific). A partir del ADNc se llevó a cabo una reacción de PCR cuantitativo con el kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X de la casa comercial Thermo Scientific y un termociclador StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems®). Esta reacción incluyó los iniciadores “forward” y “reverse” para el gen *nlpI* (Invitrogen®, U.S.A.) y como control endógeno, oligonucleótidos para el gen *rfaH* (Invitrogen®, U.S.A.). La amplificación siguió el siguiente esquema (condiciones estandarizadas en el laboratorio): un primer ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido por 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C por 40 ciclos, un tercer ciclo de 15 segundos a 95°C y un último ciclo de un minuto a 45°C. La especificidad de la reacción de PCR se comprobó mediante un “Melting Curve” en el cual se observó que la temperatura de desdoblamiento del amplicón era la esperada.

La expresión de *nlpI* en cultivos del tipo salvaje expuestos por 3, 6 y 24 horas a bacitracina (1024 µg/mL), cefalexina (2 µg/mL) y cefsulodina (10 µg/mL) fue comparada mediante el cálculo de valores RQ con la siguiente fórmula:

$$\Delta C_t = C_t \text{ nlpI} - C_t \text{ rfaH}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ estímulo} - \Delta C_t \text{ control sin estímulo}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Aquí, C_t corresponde a la intersección entre la curva de amplificación y un umbral de fluorescencia previamente establecido. A partir de los valores de C_t se determinó la diferencia entre la expresión del gen de interés y el de un control endógeno y posteriormente se calculó la diferencia entre el ΔC_t en presencia del estímulo contra el ΔC_t de un control, que en este caso corresponde al cultivo de la cepa tipo salvaje a las 3 horas. Se reporta la expresión relativa del gen *nlpI* (Pfaffl, 2006).

Determinación del perfil de ácidos grasos.

Al igual que con la pared celular, se deseaba comprobar la integridad estructural y funcional de la membrana externa; para lo cual se determinó el perfil de ácidos grasos y la actividad betalactamasa de cultivos de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y un mutante de *npl*. Lo primero se indagó determinando el perfil de ácidos grasos de la cepa tipo salvaje y el mutante Δnpl mediante cromatografía de gases. Brevemente, biomasa derivada de cultivos de 24 horas de las cepas tipo salvaje y Δnpl en platos de ATS con bacitracina (1024 $\mu\text{g/mL}$), cefalexina (2 $\mu\text{g/mL}$) y cefsulodina (10 $\mu\text{g/mL}$). Se realizó un cultivo sin estresante como control. Se siguieron las instrucciones de MIDI Sherlock® Microbial Identification System, Version 6.1, MIS Operating Manual. Para la saponificación, se agregaron a tubos de vidrio, dos asadas de cultivo y 1.0 mL del Reactivo 1 (hidróxido de sodio, metanol y agua desionizada), se mezclaron con el vórtex por 5-10 segundos y se colocaron en un baño a 100°C por 5 minutos. Se mezclaron nuevamente con el vórtex por 5-10 segundos y se colocaron de nuevo en un baño a 100°C por 25 minutos. Se dejaron enfriar. Para la metilación se agregaron 2.0 mL del Reactivo 2 (metanol y ácido clorhídrico 6.00N), se mezclaron con el vórtex por 5-10 segundos y se colocaron en un baño a 80°C por 10 minutos e inmediatamente se pasaron a un recipiente con hielo para enfriar. Para la extracción se agregaron 1.25 mL del Reactivo 3 (hexano y metil-terbutil-éter) y se mezclaron girando suavemente por 10 minutos. Se dejaron reposar y se removió la fase inferior. Por último, esta extracción orgánica se lavó agregando 3.0 mL del Reactivo 4 (hidróxido de sodio y agua desionizada) y mezclando suavemente por 5 minutos. Los tubos se dejaron reposar y se removió la fase superior, conservando la fase interior que se transfirió a un vial para cromatografía de gases. Los perfiles de ácidos grasos fueron obtenidos con un equipo 6850 Network GC (Agilent Technologies).

Determinación de la actividad betalactamasa.

Para evaluar el escape de componentes periplásmicos debido a lesiones en la membrana externa se realizó la determinación de la actividad betalactamasa, para lo cual se tomaron cultivos de 24 horas en 5.0 mL de CTS con una concentración final de ampicilina de 100 µg/mL con 1024 µg/mL de bacitracina o 2 µg/mL de cefalexina o 10 µg/mL de cefsulodina de las cepas tipo salvaje y mutante de *nlp* transformados con una TEM-betalactamasa plasmídica, SR11/pET32a y 319/pET32a respectivamente. Se realizó un cultivo sin estresante como control.

Se utilizaron estas cepas debido a que están transformadas con el plásmido pET32a, un plásmido de alto número de copias en el cual se expresa una TEM betalactamasa que es la más comúnmente encontrada en bacterias Gram-negativas y les confiere resistencia a penicilinas (Bush & Jacoby, 2010).

Se centrifugó 1.0 mL de cada cultivo y se realizaron dos lavados con 1.0 mL de PBS 1X. El botón se resuspendió en 1.0 mL de PBS 1X y se realizó una dilución 1:10. A esta última dilución se le midió la absorbancia a 600 nm utilizando PBS como blanco. Se mezclaron 1.2 mL de PBS con 150 µL de la muestra sin diluir y 150 µL de 0.5 mg/mL de nitrocefina (Oxoid™ Thermo Scientific™). Se dejó reaccionar por dos minutos, se centrifugó un minuto a 14000 rpm para remover las células y la absorbancia de los sobrenadantes a 486 nm se midió a los 0, 30, 60, 90, 120 y 150 segundos, utilizando como blanco una mezcla de 1.35 mL de PBS con 150 µL de nitrocefina.

Los resultados se determinaron con la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta 150'' \text{ OD}_{486\text{nm}}}{\text{OD}_{600\text{nm}} \text{ Dilución } 1:10}$$

Donde: $\Delta 150'' \text{ OD}_{486\text{nm}}$ se refiere a la diferencia entre la absorbancia a 486 nm a los 150 segundos y a los 0 segundos. Y el denominador se refiere a la absorbancia de la dilución 1:10 a 600 nm. Se reporta el cociente de esta división para cada estímulo y para cada cepa.

Resultados

Con el fin de observar si la lipoproteína Nlpl está implicada en la respuesta a lesiones de la envoltura celular, una cepa salvaje y una cepa mutante de *S. enterica* Typhimurium fueron expuestas a agentes estresantes tales como bacitracina, bilis, cefalexina, cefsulodina, deoxicolato de sodio, etanol, peróxido de hidrógeno, lisozima y polimixina, en concentraciones para las cuáles la diferencia en el crecimiento de ambas cepas fue máxima con respecto a un control sin estresante (ver Anexo 1). Solamente se notaron diferencias estadísticamente significativas según un análisis de varianza (ANOVA, $p \leq 0.05$) para bacitracina (1024 $\mu\text{g/mL}$), cefalexina (2 $\mu\text{g/mL}$) y cefsulodina (10 $\mu\text{g/mL}$); todos relacionados con síntesis de pared celular (Figura 1).

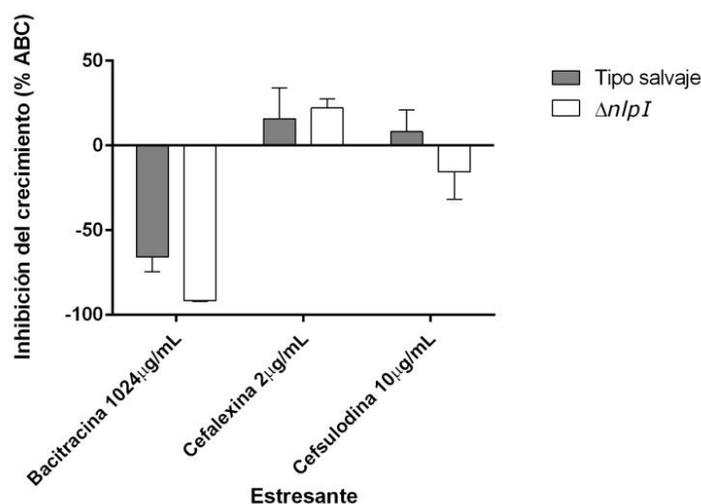


Figura 1. Inhibición relativa del crecimiento (porcentaje del área bajo la curva), tomando como referencia el crecimiento de cada cepa sin la presencia del estresante, de una cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium y un mutante de *nlpl* en presencia de bacitracina, cefalexina y cefsulodina. Para el cálculo de la inhibición relativa se tomó como referencia el crecimiento de cada cepa en ausencia de agentes estresantes. Se muestran los estímulos donde se observaron diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de bacitracina, ambas cepas disminuyeron su crecimiento de forma notable. La cepa tipo salvaje disminuyó su crecimiento en un 66% y el mutante de *nlpI* en un $92 \pm 9\%$, es decir, en un 26% más que la tipo salvaje. Por el contrario, tanto la cepa salvaje como el mutante mejoran su crecimiento en presencia de cefalexina con respecto al control en un $16 \pm 10\%$ y $22 \pm 6\%$, respectivamente, siendo el mutante el que más se ve favorecido. Este efecto potenciador del crecimiento se mantiene en el caso de cefsulodina para la cepa salvaje ($8 \pm 10\%$ más de crecimiento con respecto al control), pero no para el mutante, que se vió inhibido por esta betalactama en un $16 \pm 12\%$. Para esta betalactama, el porcentaje de diferencia entre ambas cepas fue de 24% (Figura 1).

Debido a que en las curvas de crecimiento con bacitracina ($1024 \mu\text{g/mL}$), cefalexina ($2 \mu\text{g/mL}$) y cefsulodina ($10 \mu\text{g/mL}$), agentes estresantes que actúan sobre la pared celular, fue donde se observó mayor diferencia entre las cepas, se analizan los experimentos siguientes con estos tres estresantes para permitir un mejor análisis de los resultados.

La integridad funcional de la pared celular, estructura que fue más afectada por los estresantes, fue corroborada mediante ensayos de lisis en agua destilada, exposición a vancomicina o cristal violeta y pruebas de sensibilidad a los antibióticos.

Al resuspender biomasa procedente de cultivos de 3, 6 y 24 horas de las cepas salvaje y el mutante de *nlpI* en agua destilada, las células del tipo salvaje se lisan transitoriamente pero logran retomar el crecimiento (Figura 2A). Lo contrario sucede con el mutante de *nlpI*, cuyo grado de lisis es proporcional al tiempo de cultivo transcurrido (Figura 2B).

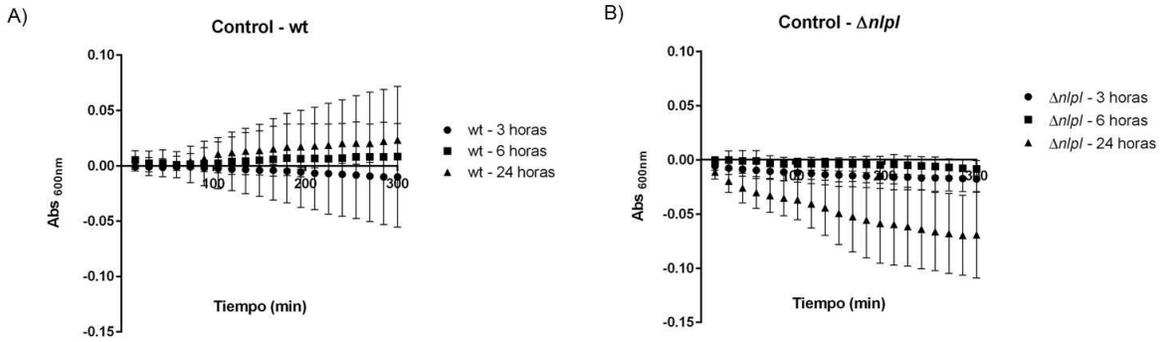


Figura 2. Cinética de lisis de biomasa de una cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium (wt) (A) y un mutante de *nlpI* (B) procedente de cultivos en CTS de 3, 6 y 24 horas resuspendidos en agua destilada.

Al repetir este experimento con biomasa obtenida a partir de cultivos expuestos a bacitracina, los cultivos de 3 y 6 horas de la cepa tipo salvaje se lisan, pero el de 24 horas logra retomar el crecimiento (Figura 3A). En estas mismas condiciones, los cultivos de la cepa mutante se lisan (Figura 3B), tal y como sucedió con el cultivo control.

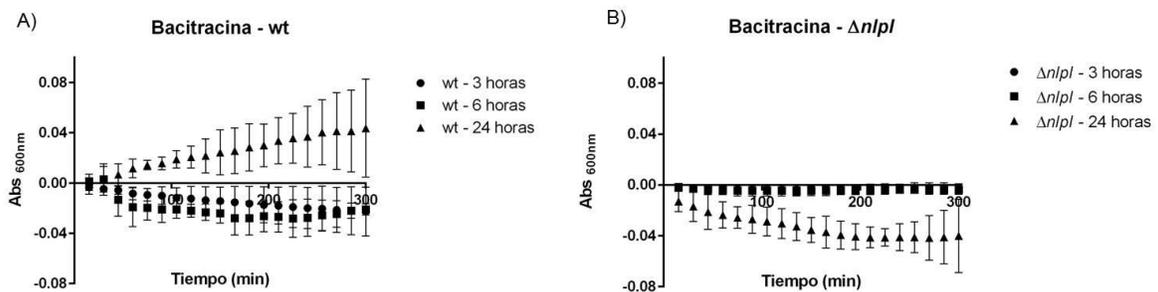


Figura 3. Cinética de lisis de biomasa de una cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium (wt) (A) y un mutante de *nlpI* (B) procedente de cultivos en CTS + bacitracina (1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de 3, 6 y 24 horas resuspendidos en agua destilada.

Los cultivos expuestos a cefalexina se comportaron como los cultivos control, es decir, cultivos de 6 y 24 horas del tipo salvaje se logran adaptar (Figura 4A) mientras que cultivos del mutante se lisan de forma proporcional al tiempo de exposición a la cefalexina (Figura 4B).

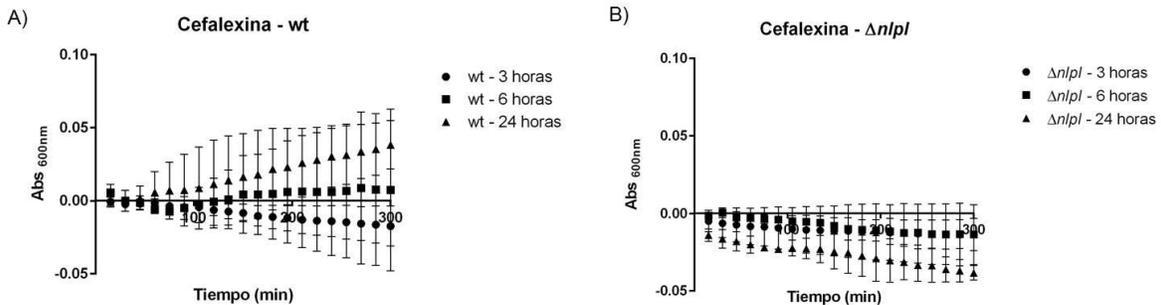


Figura 4. Cinética de lisis de biomasa de una cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium (wt) (A) y un mutante de *nlpI* (B) procedente de cultivos en CTS + cefalexina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de 3, 6 y 24 horas resuspendidos en agua destilada.

Células del tipo salvaje crecidas por 3 horas en presencia de cefsulodina se lisa al ser resuspendidas en agua destilada. Por el contrario, las procedentes de un de 6 horas crecen al final del experimento y el cultivo de 24 horas crece bien (Figura 5A). Por su parte, células de la cepa mutante crecidas por 3, 6 y 24 horas en presencia de este antibiótico se lisan rápidamente (Figura 5B).

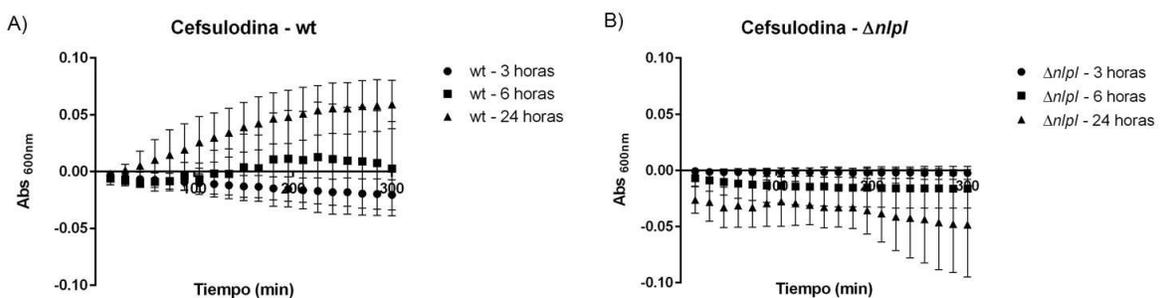


Figura 5. Cinética de lisis de biomasa de una cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium (wt) (A) y un mutante de *nlpI* (B) procedente de cultivos en CTS + cefsulodina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de 3, 6 y 24 horas resuspendidos en agua destilada.

El tipo salvaje resultó sensible a 500 µg/mL de vancomicina, mientras que el mutante de *npl* toleró esta concentración aún a una densidad celular de 1.5×10^4 UFC/mL (Figura 6A). Cuando ambas cepas se exponen a cristal violeta en un plato de agar bilis rojo violeta, la cepa tipo salvaje crece, pero el mutante comienza a ser sensible a una densidad de 1.5×10^6 UFC/mL y ya con 1.5×10^4 UFC/mL no puede crecer (Figura 6B).

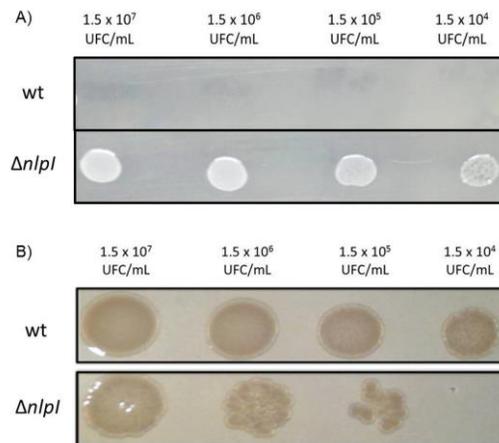


Figura 6. Macrodilución en plato para demostrar la susceptibilidad de una cepa salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium (wt) y de un mutante de *npl* a 500 µg/mL de vancomicina (A) y 2 µg/mL de cristal violeta (B).

En pruebas de sensibilidad donde células estresadas fueron expuestas a ciprofloxacina, sulfametoxazole, colistina sulfato, kanamicina, gentamicina, piperacilina, tetraciclina y vancomicina se observó que la exposición previa de la cepa salvaje a bacitracina, cefalexina y cefsulodina no cambió su perfil de susceptibilidad (diferencia menor al 25%). El mutante de *npl*, por su parte, mostró un incremento $\geq 25\%$ en su grado de inhibición a colistina luego de haberle expuesto a bacitracina, cefalexina y cefsulodina y a tetraciclina luego de haberle expuesto a bacitracina y a cefsulodina (Cuadro I).

Cuadro I. Diámetro de halos de inhibición exhibidos por una cepa salvaje de *Salmonella enterica* Typhimurium y una cepa mutante de *nlpI*, al ser expuestas a diferentes antibióticos en condiciones basales y luego de exponerlas a tres agentes estresantes de pared celular.

Antibiótico	(µg)	Diámetro de inhibición (mm)			
		Tipo salvaje / $\Delta nlpI$			
		Control	Bacitracina	Cefalexina	Cefsulodina
Ciprofloxacina	5	34 / 36	39 / 40	36 / 38	36 / 38
Sulfametoxazole	25	0 / 0	0 / 0	3 / 3	0 / 0
Colistin sulfato	10	16 / 14	17 / 22	16 / 20	15 / 22
Kanamicina	1000	30 / 30	31 / 25	29 / 26	30 / 27
Gentamicina	10	17 / 18	19 / 20	20 / 20	20 / 22
Piperacilina	110	28 / 28	33 / 33	28 / 30	32 / 34
Tetraciclina	30	22 / 23	26 / 29	24 / 25	24 / 29
Vancomicina	5	0 / 0	0 / 0	0 / 3	6 / 0

Para estimar de forma indirecta la integridad estructural de membrana externa, se tiñeron células del tipo salvaje y del mutante con bocilina; un análogo fluorescente de betalactamas que se une irreversiblemente a las proteínas de unión a betalactamas. En este ensayo, el grado de marcaje del mutante de *nlpI* fue ligeramente menor, aunque no significativamente, que el del tipo salvaje. Una sobreexpresión de *nlpI* se tradujo en mayor marcaje (Figura 7).

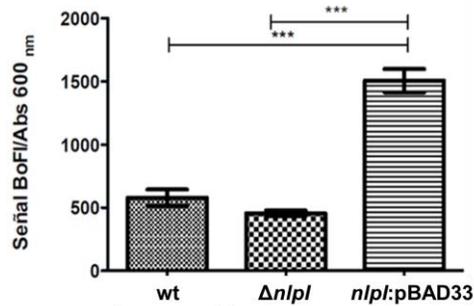


Figura 7. Marcaje de proteínas de unión a penicilina de cultivos de 3 horas de una cepa salvaje de *S. enterica* Typhimurium (wt), un mutante de *nlpI* y una cepa complementada con *nlpI* en el plásmido pBAD33. Se grafica la relación entre la fluorescencia de bocilina y la absorbancia de la suspensión celular ensayada para normalizar el número de moléculas teñidas/célula.

Para investigar a nivel transcripcional si *NlpI* se sobreexpresa en consecuencia a lesiones de la envoltura celular, tal y como podría suceder en el caso de un sensor o efector de respuesta, se determinó el nivel de expresión de *nlpI* en condiciones basales y en presencia de bacitracina (1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cefalexina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cefsulodina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a las 3, 6 y 24 horas de crecimiento. En condiciones basales, la expresión de *nlpI* es máxima a las 6 horas (RQ=1.8) y disminuye a las 24 horas de crecimiento (RQ=1.6). En presencia de bacitracina, la expresión de *nlpI* alcanza casi los valores máximos que tiene el cultivo control (RQ=1.7) desde las 3 horas de crecimiento y se mantiene aumentada a las 6 horas (RQ=1.6), pero a las 24 horas de cultivo es menor que la del control (RQ=0.7). Con cefalexina, la expresión de este gen va aumentando a través del tiempo: a las 3 horas de crecimiento la expresión de *nlpI* ya ha aumentado un 20% (RQ=1.2), a las 6 horas tiene una expresión aún mayor (RQ=1.4) y a las 24 horas ya ha superado casi tres veces el nivel basal (RQ=2.7). Con cefsulodina sucede algo diferente; a las 3 horas de crecimiento la expresión de *nlpI* está inhibida con respecto al control (RQ=0.6); pero a las 6 horas se observa un aumento de la expresión (RQ=1.6) que se mantiene hasta a las 24 horas (RQ=1.6) (Figura 8).

Según el modelo matemático para la determinación del RQ, una diferencia de 1 ya se considera una diferencia significativa (Pfaffl, 2006).

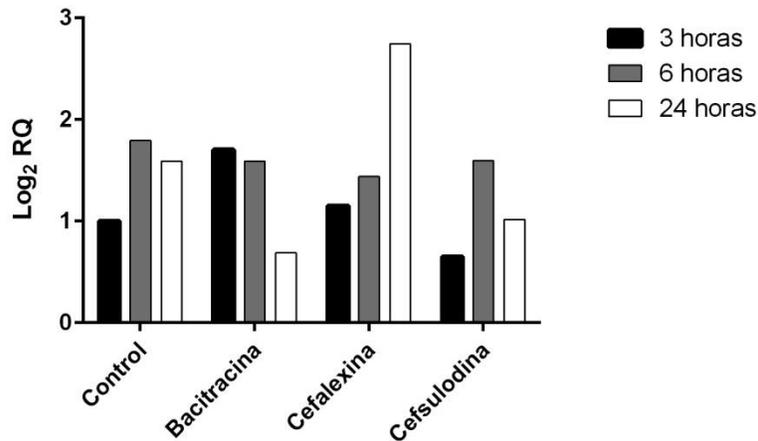


Figura 8. Nivel de expresión de *npl* a las 3, 6 y 24 horas en cultivos control y en presencia de bacitracina, cefalexina y cefsulodina.

Entonces, si se analiza por horas se puede percibir que a las 3 horas de la curva de crecimiento los cultivos expuestos a bacitracina y a cefalexina presentan un aumento significativo de la expresión de *npl*, mientras que los cultivos con cefsulodina tienen una expresión menor que el control. A las 6 horas de crecimiento, tanto los cultivos que fueron expuestos a bacitracina como a cefalexina y cefsulodina presentan una expresión de *npl* disminuida significativamente con respecto al control y al nivel basal. Por último, los cultivos de 24 horas con bacitracina y cefsulodina exhibieron una expresión disminuida de *npl*, mientras que los cultivos con cefalexina sobreexpresan este gen en comparación con el control (Figura 9).

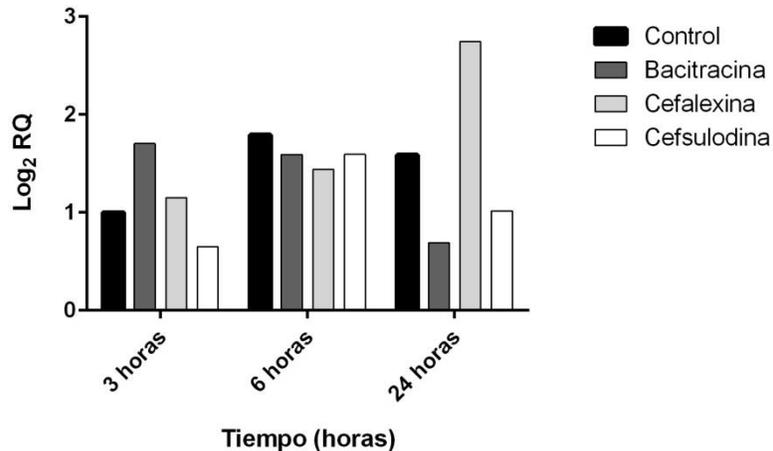


Figura 9. Nivel de expresión de *nlpI* en condiciones basales y en presencia de bacitracina, cefalexina y cefsulodina según el tiempo de cultivo

Con el fin de descartar si los cambios arriba expuestos pueden ser desencadenados por cambios estructurales y funcionales de la membrana externa, se compararon perfiles de ácidos grasos de las cepas en estudio bajo condiciones basales y en presencia de estresantes y se realizaron ensayos de hidrólisis de nitrocefina en cepas transformadas con un plásmido que sobreexpresa una betalactamasa, respectivamente.

El perfil de ácidos grasos de la cepa salvaje en condiciones basales fue dominado, en orden descendente, por los ácidos grasos 16:0 ($24.5 \pm 2.5\%$), 18:1 w7c ($14.2 \pm 2.3\%$), 16:1 w7c ($13.1 \pm 2.8\%$), 17:0 cyclo ($12.2 \pm 2.5\%$) y 14:0 3OH ($11.4 \pm 0.5\%$) (Figura 10). Este orden se mantiene cuando esta cepa se expone a bacitracina; sin embargo, cuando se expone a cefalexina se observa un aumento en la abundancia relativa de los ácidos grasos 11:0 ($12.3 \pm 0.0\%$) y 16:0 10-metil ($10.3 \pm 0.0\%$). Cuando la cepa tipo salvaje se expone a cefsulodina incrementa considerablemente la cantidad de 16:0 N-alcohol ($49.7 \pm 0.0\%$) y 12:0 aldehído ($12.6 \pm 11.0\%$) (Figura 10).

En la cepa mutante se observan, tanto en condiciones basales como en presencia de agentes estresantes, muchas variaciones en el perfil de ácidos grasos con

respecto al control. En condiciones basales, se tiene un predominio de los ácidos grasos 18:1 w7c ($43.7 \pm 0.0\%$), 16:1 w6c ($42.1 \pm 0.0\%$), 16:1 w5c ($37.9 \pm 3.2\%$), 16:1 iso G ($14.0 \pm 0.0\%$), 18:0 anteiso ($13.1 \pm 9.8\%$) y 17:1 w7c ($13:0 \pm 0.7\%$), de los cuales solamente 18:1w7c es compartido con el perfil obtenido para la cepa tipo salvaje (Figura 11). En presencia de bacitracina, los ácidos grasos predominantes se mantienen; sin embargo, el 16:1 w6c aumenta casi al doble con respecto al control ($80 \pm 0.0\%$). Con cefalexina se tiene que los ácidos grasos que predominan son 16:0 ($27.5 \pm 0.3\%$), 16:1 w7c ($26.9 \pm 14.2\%$), 18:1 w6c ($24.5 \pm 0.0\%$) y 18:1 w7c ($19.8 \pm 0.2\%$), del cual solo el último comparte con el control. Y en el caso de cefsulodina, comparte algunos de los ácidos con el control pero aumentan considerablemente los siguientes: 11:0 iso 3OH ($39.3 \pm 0.0\%$), 16:0 ($27.5 \pm 0.1\%$) y 16:1w7c ($18.4 \pm 0.6\%$) (Figura 11).

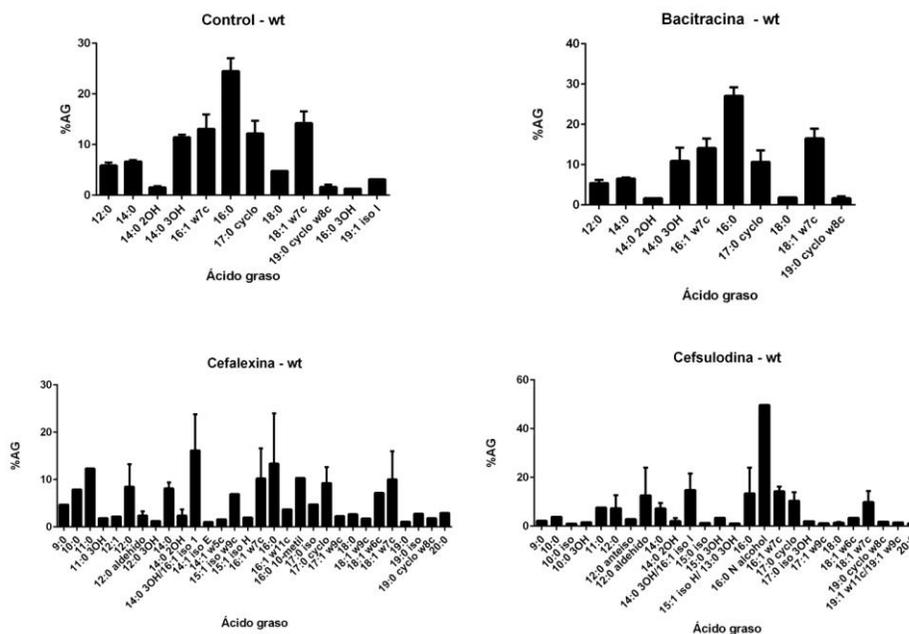


Figura 10. Perfil de ácidos grasos una cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium (wt) en un cultivo control y en presencia de bacitracina, cefalexina y cefsulodina.

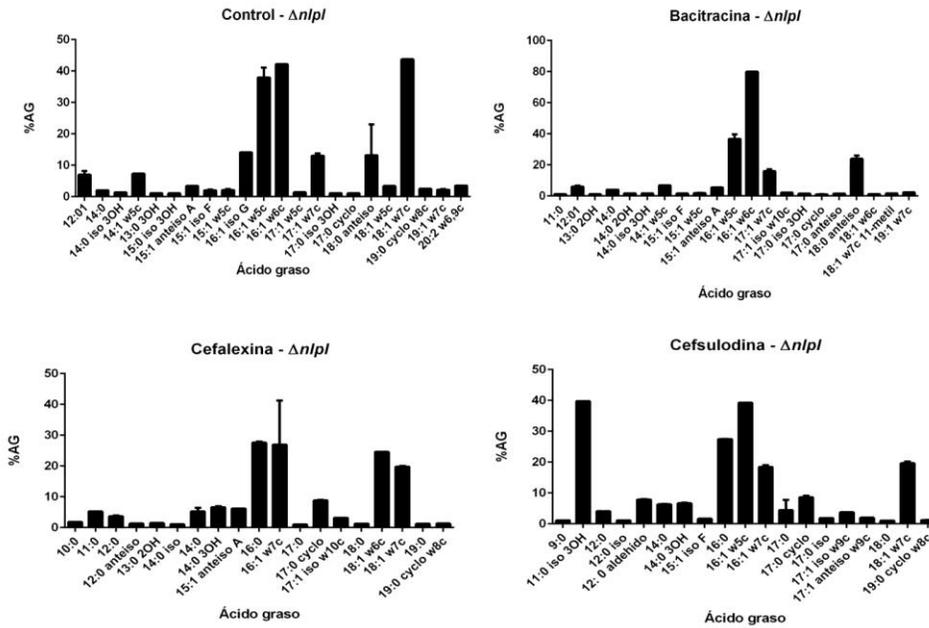


Figura 11. Perfil de ácidos grasos de una cepa mutante de *npl* de *S. enterica* Typhimurium en un cultivo control y en presencia de bacitracina, cefalexina y cefsulodina.

Tanto en condiciones basales como en presencia de los tres estresantes estudiados, la cepa mutante mostró mayor hidrólisis de nitrocefina que la cepa tipo salvaje ($p \leq 0.05$, Figura 12). Esta diferencia fue máxima en el caso de cultivos con bacitracina, en donde la cepa tipo salvaje hidroliza la nitrocefina 90 veces más que el control y la cepa mutante 200 veces más (Figura 12). En cultivos con cefalexina, la cepa tipo salvaje hidroliza dos veces más nitrocefina si se compara con el cultivo control y el mutante a su vez hidroliza el doble del reactivo con respecto a la cepa tipo salvaje. Por su parte, la cepa mutante en los cultivos con cefsulodina hidroliza seis veces más que la cepa salvaje, la cual en este caso se comporta igual al control (Figura 12).

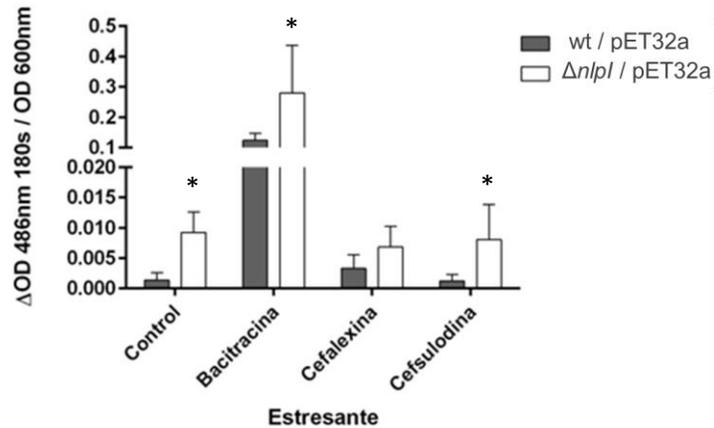


Figura 12. Hidrólisis de nitrocefina de una cepa tipo salvaje de *S. enterica* serovar Typhimurium (wt) y una cepa mutante de *npl* transformadas con una betalactamasa plasmídica en cultivos control y en presencia de bacitracina, cefalexina y cefsulodina. Se indican con asterisco (*) los estímulos donde se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Discusión.

En este trabajo se expuso por primera vez un mutante de *npl* a agentes estresantes de envoltura celular. Este mutante mostró mayor sensibilidad a compuestos que actúan sobre la pared celular tales como bacitracina (Storm, 1974), cefalexina y cefsulodina (Williamson, Collatz & Gutmann, 1986). Por tanto, es probable que Npl juegue un papel indirecto en el mantenimiento de un peptidoglicán estable, en la resistencia osmótica o en la integridad de la envoltura celular, evitando que compuestos de alto peso molecular ingresen a la célula. Lo anterior complementa reportes previos en lo que se sugiere un papel de Npl en la división celular y formación del peptidoglicán. Por ejemplo se sabe que cepas mutantes de *npl* a temperaturas de 42°C generan filamentos y además resultan menos tolerantes a la presión osmótica (Ohara *et al.*, 1999), lo que sugiere que existen problemas en los últimos pasos de la división celular y que el peptidoglicán, el cual es el encargado de la tolerancia a cambios en la osmolaridad, está viendo comprometida su formación o estabilidad.

También se ha observado que mutaciones en *nlpI* generan fenotipos similares a los de mutantes en las proteínas *fts*, del inglés “filamenting temperature-sensitive” (Addinall *et al.*, 1996). Muchas de estas proteínas *fts* forman parte del complejo multiproteico llamado divisoma o del anillo septal. La formación de este complejo inicia con la polimerización de la proteína FtsZ en una estructura similar a un anillo (anillo Z) en el sitio de división; y una vez formado el anillo, se reclutan al mismo sitio otras proteínas esenciales para la división celular entre las cuales se incluyen algunas proteínas *fts*, además de algunas PBPs. Las PBPs se encargan de las reacciones de transpeptidación y transglicosilación en la formación del peptidoglicán (Singh *et al.*, 2012), donde, específicamente, PBP1 se encarga de la elongación de la célula en el ciclo de división celular y PBP3 del proceso de formación del septo (Pehau *et al.*, 2012; Typas *et al.*, 2012). Dos de los antibióticos utilizados en el estudio, corresponden a la familia de los beta-lactámicos y actúan sobre estas proteínas, la cefsulodina que actúa sobre la PBP1 y la cefalexina sobre la PBP3 (Chung *et al.*, 2009).

Cuando los mutantes de *nlpI* crecen en presencia de cefsulodina, se lisan más rápida y claramente que la cepa tipo salvaje, mismo comportamiento que presentan los mutantes de *ftsZ* y *ftsI*, componentes del divisoma (de Pedro *et al.*, 2002). Esto podría indicar que al no encontrarse proteínas esenciales para la formación del divisoma -como FtsZ, FtsI, PBP3 y posiblemente NlpI-, éste queda incompleto y por lo tanto no puede completarse la división celular y la bacteria resulta más susceptible a este antibiótico.

Por su parte, cuando mutantes de *nlpI* crecen en presencia de cefalexina y de acuerdo con la metodología empleada, se observa un mejor crecimiento con respecto a la cepa tipo salvaje, lo que probablemente se deba a la formación de filamentos y por lo tanto a un aumento de la densidad óptica y no propiamente por división celular; porque para que ocurra la lisis con cefalexina es necesario que el proceso de formación del septo se encuentre activo y por ende que la formación y el ensamblaje del divisoma se hayan realizado correctamente; por lo que no se debe interpretar la cefalexina como un agente estimulante del crecimiento. Quizás

esta falla en la septación o en el divisoma se deba a que es necesario que Nlpl se encuentre presente (Chung *et al.*, 2009).

Los fenotipos observados son de penetrancia incompleta, lo que sugiere que Nlpl no es un efector determinante y que quizás juegue un papel indirecto de regulación. En este sentido, Nlpl tiene múltiples dominios TRP, y proteínas de este tipo suelen tener actividad chaperona (Prodromou *et al.* 1999; Edqvist *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2013). Resultados preliminares indican que la ausencia de Nlpl retarda el plegamiento periplásmico de una betalactamasa (resultados no mostrados). Las betalactamasas, además de las proteínas *fts*, son periplásmicas y en *Escherichia coli* se necesitan chaperonas para el correcto plegamiento de las proteínas del divisoma (Fujiwara & Taguchi, 2007). Sin estas proteínas, no ocurre un plegamiento adecuado de las proteínas, la división no puede completarse, y se generan filamentos (Fujiwara & Taguchi, 2007).

Como se ha explicado, para que ocurra la división celular debe existir un alto control en el ensamblaje del divisoma, la formación de peptidoglicán septal y la separación de las células hijas. Se ha visto que dicho control se da por medio de elementos del citoesqueleto pero además se han identificado lipoproteínas de membrana externa que sirven como activadores de las PBPs para la formación del peptidoglicán. Por ejemplo, en *E. coli* las lipoproteínas LpoA y LpoB activan la PBP1a y PBP1b, respectivamente, para que realicen las reacciones de transpeptidación de los componentes proteicos del peptidoglicán, donde LpoA predomina en las paredes laterales de la célula y LpoB predomina en la síntesis de peptidoglicán septal (Typas *et al.*, 2010).

Por otra parte, se ha demostrado que la membrana externa no puede separarse genéticamente de la pared celular y se sugiere una relación entre Nlpl y las amidasas, enzimas encargadas de separar el peptidoglicán septal de las células en formación (Frandi *et al.*, 2014). La relación entre Nlpl y las amidasas se propone debido a que, mutantes de las amidasas presentes en *E. coli*, al igual que los mutantes de *nlpl*, generan filamentos al ser incapaces de separar el peptidoglicán (Peters *et al.*, 2011; Frandi *et al.*, 2014); además de que en los

mutantes de las amidasas también se afecta la estabilidad de la membrana externa y pared celular, por lo que aumenta la sensibilidad a detergentes como bilis y antibióticos como la lisozima y la bacitracina, al igual y como se observa en el crecimiento del mutante de *nlpI* en presencia de este último estresante (Frandi *et al.*, 2014).

Según Nichols *et al.*, 2011, mutantes de *nlpI* de *E. coli* presentan una elevada sensibilidad a cefsulodina y ceftazidima, lo cual correlaciona con los resultados obtenidos en este trabajo. A su vez, mutantes de *E. coli* para *envC* presentan fenotipos de sensibilidad de mayor correlación con los mutantes de *nlpI*, siendo EnvC un importante activador de amidasas y por tanto, de degradación de peptidoglicán en el sitio de división en *E. coli* (Peters *et al.*, 2013).

También, esa inestabilidad de la envoltura celular debida probablemente a la formación de un divisoma y septo incompletos, puede estar involucrada a su vez en el aumento en la lisis ante la exposición a agua destilada que muestra el mutante de *nlpI* con respecto a la cepa tipo salvaje, la cual si es capaz de adaptarse a la presión osmótica ejercida. Esto sugiere de nuevo una relación de NlpI con el peptidoglicán y su formación, indispensable para que las bacterias resistan la presión osmótica. Además, se ha visto que ante cambios en la osmolaridad del medio donde crecen las bacterias, las PBPs cambian tanto su ubicación como expresión y por lo tanto se afecta la formación del peptidoglicán (Piuri *et al.*, 2005; Hocking *et al.*, 2012). Ese cambio en la expresión de las PBPs también se observa ante la ausencia de NlpI, ya que la cepa mutante refleja una disminución leve en la tinción con bocilina con respecto a la cepa tipo salvaje, lo que indica que las PBPs, además de verse afectadas por la osmolaridad, probablemente algunas de ellas requieran de la presencia de NlpI para realizar sus funciones de transpeptidación y transglicosilación del peptidoglicán.

Debido a la relación de NlpI con las PBPs y las reacciones de transpeptidación en la formación de peptidoglicán y lo que se observa con las amidasas, se sugiere que NlpI regula negativamente la acción de las endopeptidasas e hidrolasas que se encargan de la degradación del peptidoglicán septal para la separación de las

células hijas. Apoyando esta noción se ha encontrado que mutantes de *nlpI* tienen concentraciones elevadas de los monómeros de tetrapéptidos que componen la pared celular debido a que las enzimas continúan degradando esta estructura, al estar ausente su proteína reguladora, que en este caso podría ser NlpI al menos de forma parcial (Frandi *et al.*, 2014).

Esos filamentos que se forman en los mutantes de *nlpI* y otras proteínas, tienen más implicaciones. Al inhibirse la división del septo por el ensamblaje incorrecto del divisoma, se acumula peptidoglicán incompleto en el septo y aumenta la permeabilidad de la célula, lo cual permite la entrada a la célula de moléculas de alto peso molecular. Por ejemplo se puede mencionar el cristal violeta, lo cual explica que se observe en el mutante de *nlpI* un aumento en la sensibilidad a este compuesto (Heidrich *et al.*, 2002 y este trabajo). Con la vancomicina se esperaría el mismo fenómeno por ser también un compuesto de alto peso molecular. No obstante, cuando NlpI está ausente se incrementa la tolerancia a este antibiótico; quizás porque la transpeptidación se encuentra inactiva y que por lo tanto no se encuentra el sitio blanco de este antibiótico.

Existen más evidencias que indican que NlpI se encuentra altamente relacionada con la formación del septo. Por ejemplo, si se desea purificar NlpI se ha observado que se co-purifica Tsp (datos no publicados), una proteasa periplasmática que se encarga de procesar la región C-terminal del precursor de la PBP3. También, al fusionar NlpI con la proteína verde fluorescente, se puede notar que en células en división NlpI se localiza en el centro de las células y que en células recién divididas se localiza en los polos, específicamente en el extremo que compartían con la célula de la que se separaron (datos preliminares).

El peptidoglicán que se encuentra en el proceso de formación del septo es un poco diferente al que ya contiene la célula en división. Se diferencian en que las cadenas de azúcares del peptidoglicán septal se encuentran menos unidas por medio de los puentes proteicos y por lo tanto también contiene mayor cantidad de pentapéptidos (de Pedro & Schwarz, 1981). Se cree que el peptidoglicán nuevo se debe redistribuir por el resto de la célula, para lo cual primero debe separarse por

medio de hidrolasas y seguidamente es capaz de moverse a lo largo de la pared celular gracias a que se encuentra anclado a lipoproteínas de la membrana externa (de Pedro & Schwarz, 1981).

Además de su relación con la septación, este trabajo planteaba que Nlpl podría funcionar como un sensor en la membrana externa ante exposición a agentes estresantes. Con el fin de estudiarlo, se midió la expresión del gen codificante a través del tiempo mediante PCR en tiempo real en condiciones basales y en presencia de agentes estresantes. La expresión de *nlpl* en un cultivo en condiciones basales aumentó a través del tiempo en las primeras 24 horas de un cultivo.

Por su parte, en presencia de bacitracina, a pesar de que la cepa salvaje de *S. enterica* ve afectado su crecimiento, aumenta levemente la expresión del gen de *nlpl* en las primeras 6 horas de cultivo con respecto al control y a las 24 horas más bien hay una represión del gen. En cultivos con cefalexina y cefsulodina, la cepa puede crecer pero de igual manera la expresión del gen aumenta levemente a través del tiempo en el caso de cefalexina y a las 6 horas en el caso de cefsulodina. Lo anterior refuerza la hipótesis de que Nlpl responde a la exposición ante agentes estresantes de envoltura celular aumentando, al menos un poco su expresión (el incremento en el RQ es muy sutil), cuando se compara con las condiciones basales; lo que sugiere que Nlpl podría funcionar como un sensor a nivel de la membrana externa, trasladar información hacia el interior de la célula y así poder generar una respuesta ante el estrés. La posible comunicación hacia el interior de la célula, debido al contexto genómico de *nlpl*, probablemente sea con el degradosoma, un complejo multiproteico citoplasmático que se encarga de regular la expresión genética. Los componentes del degradosoma se organizan como estructuras helicoidales a lo largo de toda la célula, y se ha postulado que el degradosoma, tal y como ocurre con el divisoma, se asocia al citoesqueleto. Específicamente, RNasaE se encuentra asociada con la proteína MinD, proteína del citoesqueleto bacteriano que se encarga de situar el sitio de división en el centro de la célula correctamente. Si Nlpl funciona como un sensor de estrés de

envoltura, tendría la oportunidad de interactuar con el degradosoma en el sitio de división durante la septación, cuando la membrana externa se acerca más a componentes internos de la célula (Taghbalout & Rothfield, 2007). Si se muta el dominio de RNasaE que posibilita su localización subcelular helicoidal, se observa formación de filamentos al igual que en mutantes de *nlpI*, al igual que se observa la formación de protuberancias por la debilidad del peptidoglicán en el sitio de división (Taghbalout & Rothfield, 2007). Además, esa relación entre NlpI y el degradosoma se ha consolidado aún más al estudiar los fenotipos que resultan en mutantes de componentes del degradosoma y de *nlpI*. Por ejemplo, tanto mutantes de *nlpI* como mutantes de *pnp* expresan una habilidad disminuida de aclimatación al frío (Rouf *et al.*, 2011).

Los resultados son compatibles con la hipótesis de que el mutante de *nlpI* es más sensible a estresantes de la envoltura externa, por lo que se llega a las siguientes conclusiones:

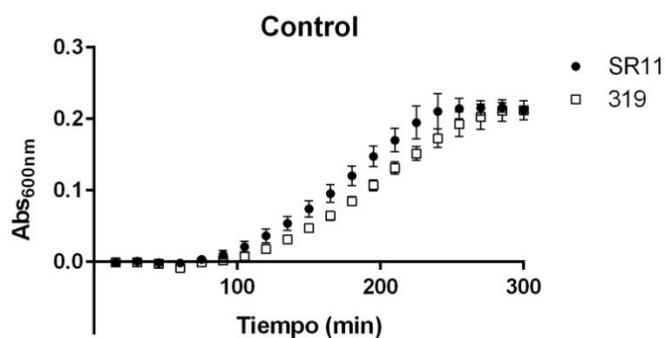
NlpI se requiere para mantener la integridad de la pared celular y de la membrana externa.

El mutante de *nlpI* resulta más sensible a estresantes de membrana externa, pero más aún a estresantes de pared celular.

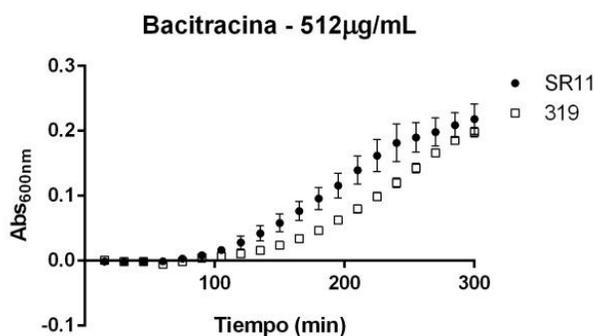
Los resultados sugieren que NlpI juega un papel fundamental en la división celular, posiblemente en lo que es la formación de septo y el ensamblaje del divisoma de forma indirecta, por lo que se le puede atribuir un papel regulatorio del crecimiento bacteriano, posiblemente por una actividad chaperona.

Anexos

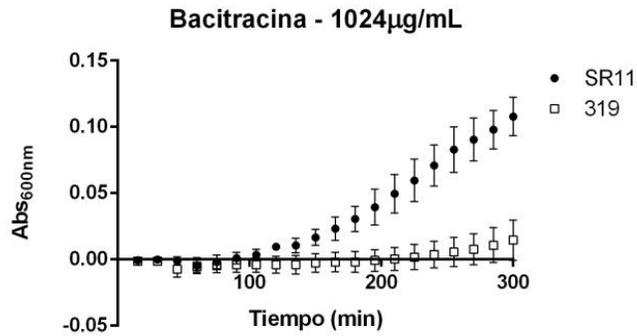
Anexo I. Curvas de crecimiento de la cepa tipo salvaje de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (SR11) y la cepa mutante de *nlpI* (319), en presencia de agentes estresantes de pared celular y membrana externa, a diferentes concentraciones con el fin de seleccionar la concentración en la que se observa la mayor diferencia en el crecimiento entre las cepas.



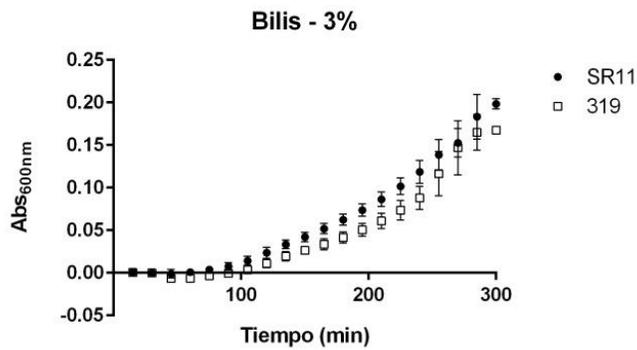
Curva de crecimiento de SR11 y 319 en 5 horas sin presencia de agentes estresantes.



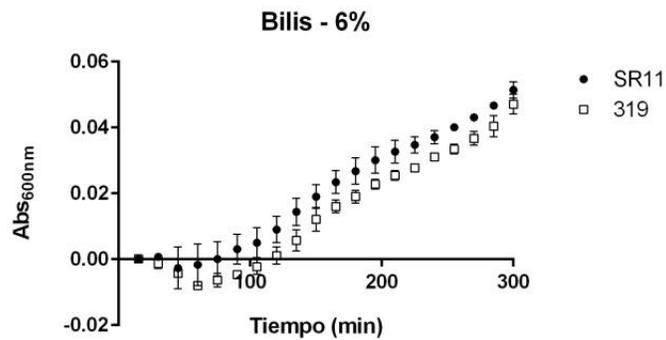
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de bacitracina en una concentración de 512µg/mL.



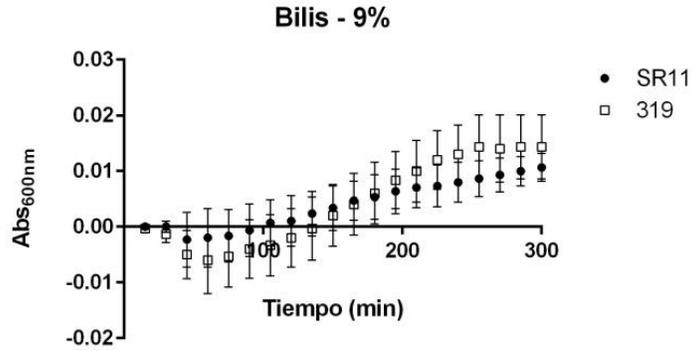
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de bacitracina en una concentración de 1024 µg/mL.



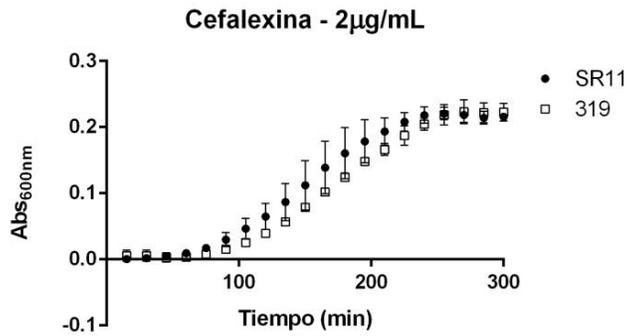
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de bilis en una concentración de 3%.



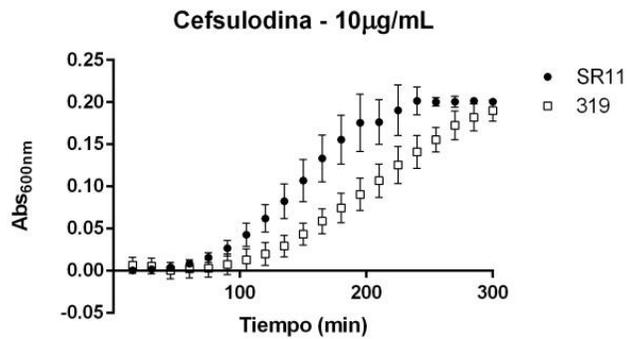
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de bilis en una concentración de 6%.



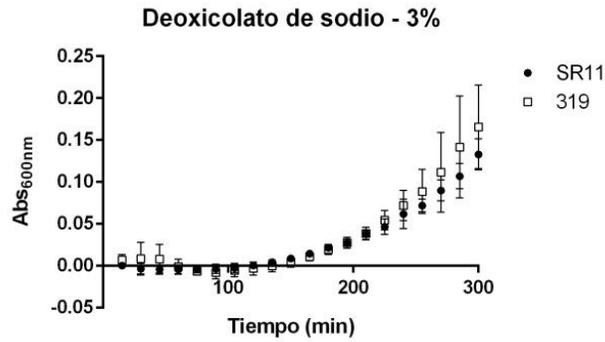
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de bilis en una concentración de 9%.



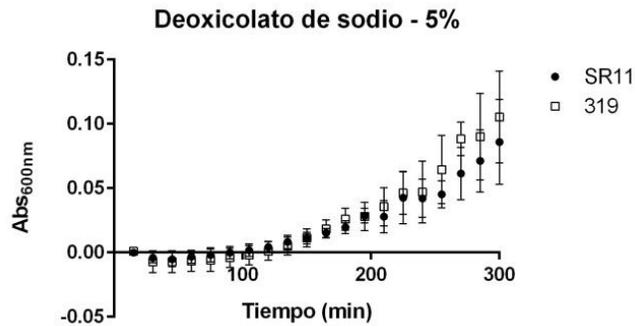
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de cefalexina en una concentración de 2µg/mL.



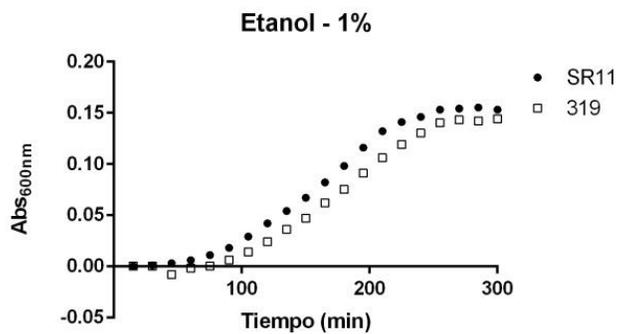
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de cefsulodina en una concentración de 10µg/mL.



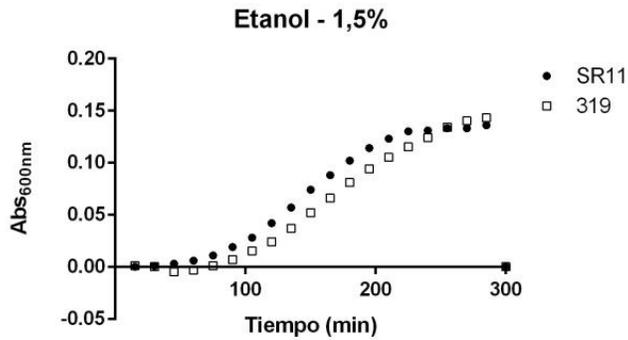
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de deoxicolato de sodio en una concentración de 3%.



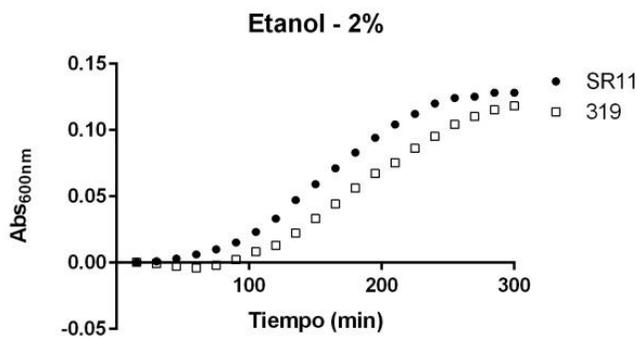
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de deoxicolato de sodio en una concentración de 5%.



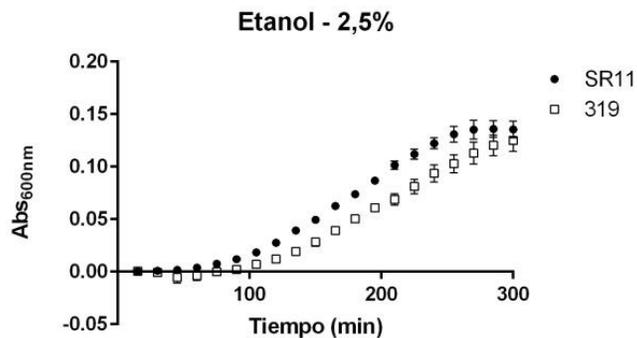
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de etanol en una concentración de 1%.



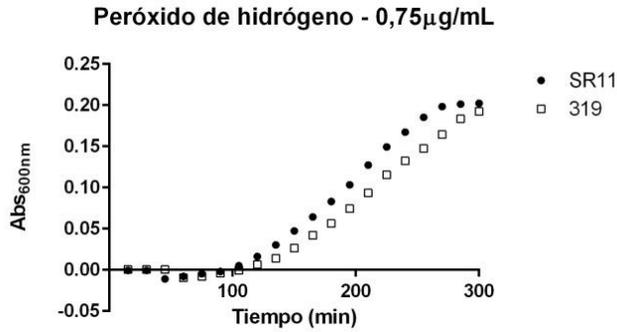
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de etanol en una concentración de 1,5%.



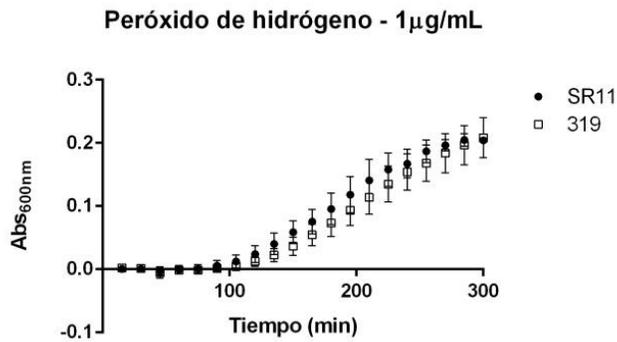
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de etanol en una concentración de 2%.



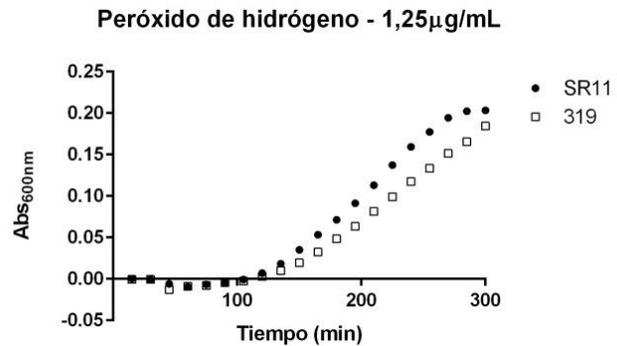
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de etanol en una concentración de 2,5%.



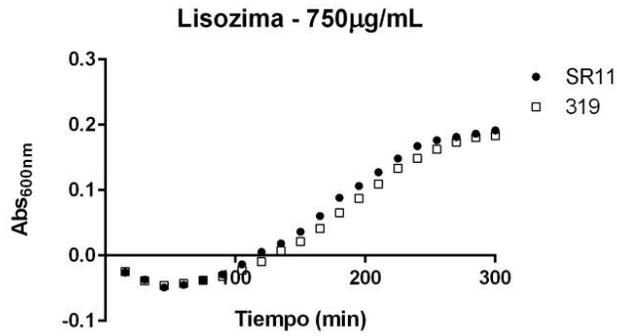
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de peróxido de hidrógeno en una concentración de 0,75µg/mL.



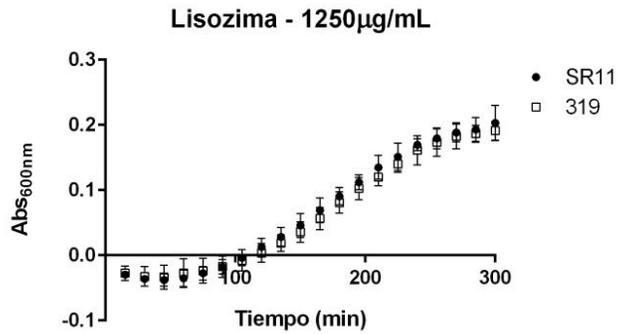
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de peróxido de hidrógeno en una concentración de 1,0µg/mL.



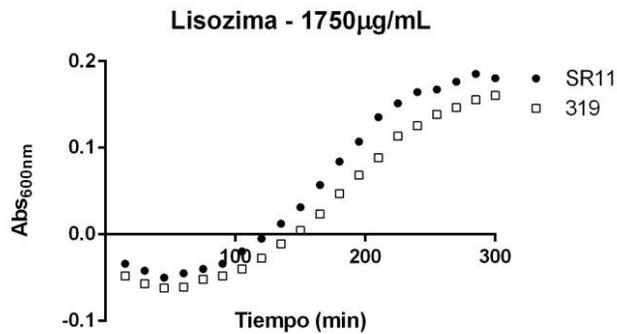
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de peróxido de hidrógeno en una concentración de 1,25µg/mL.



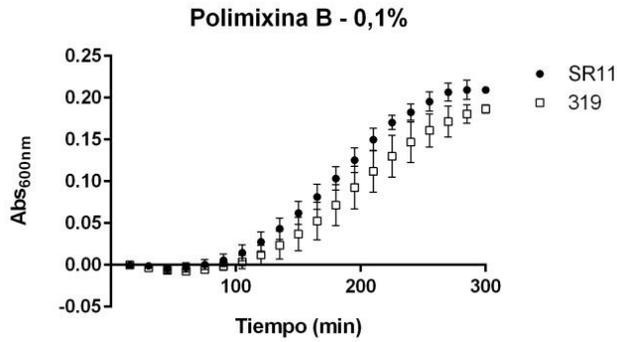
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de lisozima en una concentración de 750µg/mL.



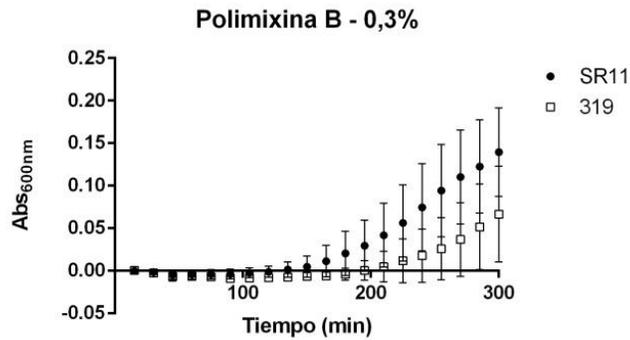
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de lisozima en una concentración de 1250µg/mL.



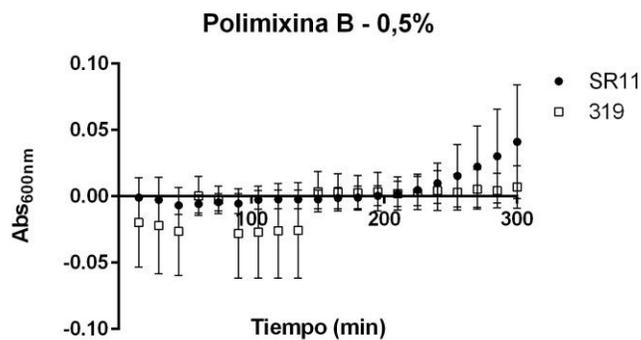
Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de lisozima en una concentración de 1750µg/mL.



Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de polimixina B en una concentración de 0,1%.



Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de polimixina B en una concentración de 0,3%.



Curva de crecimiento de SR11 y 319 de 5 horas en presencia de polimixina B en una concentración de 0,5%.

Referencias

1. Addinall S, Bi E, Lutkenhaus J. 1996. FtsZ ring formation in *fts* mutants. *Journal of Bacteriology*. 178: 3877-3884.
2. Babu M, Priya M, Selvan A, Madera M, Gough J, Aravind L, Sankaran K. 2006. A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *Journal of Bacteriology*. 188: 2761-2773.
3. Barnich N, Bringer MA, Claret L, Michaud A. 2004. Involvement of lipoprotein Nlpl in the virulence of adherent invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's Disease. *Infection and Immunity*. 72 (5): 2484-2493.
4. Blatch G, Lässle M. 1999. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays*. 21: 932-939.
5. Bush K, Jacoby G. 2010. Updated Functional Classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54: 969-976.
6. Carpousis A.J. 2007. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annual Review of Microbiology*. 61: 71-87.
7. Cascales E, Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni J, Lloubes R. 2002. Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *Journal of Bacteriology*. 184: 754-759.
8. Castanie M, Cam K, Jacq A. 2006. RcsF in an outer membrane lipoprotein involved in RcsCDB phosphorelay signaling pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 188: 4264-4270.
9. Chung H, Yao Z, Goehring N, Kishony R, Beckwith J, Kahne D. 2009. Rapid beta-lactam-induced lysis requires successful assembly of the cell division machinery. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*. 106: 21872-21877.
10. Clements M, Eriksson S, Thompson A, Lucchini S, Hinton J, Normark S, Rhen M. 2002. Polynucleotide phosphorylase is a global regulator of

- virulence and persistency in *Salmonella enterica*. Proceedings of the National Academy of Science (USA). 99 (13): 8784-8789.
11. Edqvist P, Bröms J, Betts H, Forsberg A, Pallen M, Francis M. 2006. Tetratricopeptide repeats in the type III secretion chaperone LcrH: their role in substrate binding and secretion. *Molecular Microbiology*. 59: 31-44.
 12. Eriksson S, Clements M, Rytönen A, Thompson A, Holden D, Hinton J, Rhen M. 2006. Polynucleotide phosphorylase negatively controls *spv* virulence gene expression in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*. 74 (2): 1243-1254.
 13. Frandi A, Jacquier N, Théraulaz L, Greub G, Viollier P. 2014. FtsZ-independent septal recruitment and function of cell wall remodeling enzymes in chlamydial pathogens. *Nature*. 10:1038.
 14. Fujiwara K, Taguchi H. 2007. Filamentous morphology in GroE-depleted *Escherichia coli* induced by impaired folding of FtsE. *Journal of Bacteriology*. 189: 5860-5866.
 15. Heidrich C, Ursinus A, Berger J, Schwarz H, Höltje J. 2002. Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 184: 6093-6099.
 16. Hocking J, Priyadarshini R, Takacs C, Costa T, Dye N, Shapiro L, Vollmer W, Wagner C. 2012. Osmolality-dependent relocation of penicillin-binding protein PBP2 to the division site in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*. 194: 3116-3127.
 17. Koebnik R, Locher K, Van Gelder P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins. *Molecular Microbiology*. 37: 239-253.
 18. Lutkenhaus J, Pichoff S, Du S. 2012. Bacterial cytokinesis: from Z ring to divisome. *Cytoskeleton*. 69: 778-790.
 19. Nichols R, Sen S, Choo Y, Beltrao P, Zietek M, Chaba R, Lee S, Kazmierczak K, Lee K, Wong A, Shales M, Lovett S, Winkler M, Krogan N, Typas A, Gross C. 2011. Phenotypic landscape of bacterial cell. *Cell*. 144: 143-156.

20. Ohara M, Wu H, Sankaran K, Rick P. 1999. Identification and characterization of a new lipoprotein, Nlpl, in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 181 (14): 4318-4325.
21. de Pedro M, Schwarz U. 1981. Heterogeneity of newly inserted and preexisting murein in the sacculus of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*. 78: 5856-5860.
22. de Pedro MA, Höltje JV, Schwarz H. 2002. Fast lysis of *Escherichia coli* filament cells requires differentiation of potential division sites. *Microbiology*. 148: 79-86.
23. Pehau G, Joseleau D, Arluison V. 2012. New insights into the final stage of bacterial cell division. *American Journal of Molecular and Cell Biology*. 1: 17-24.
24. Peters N, Dinh T, Bernhardt T. 2011. A fail-safe mechanism in the septal ring assembly pathway generated by the sequential recruitment of cell separation amidases and their activators. *Journal of Bacteriology*. 193: 4973-4983.
25. Peters N, Morlot C, Yang D, Uehara T, Vernet T, Bernhardt T. 2013. Structure-function analysis of the LytM domain of EnvC, an activator of cell wall remodeling at the *Escherichia coli* division site.
26. Pfaffl M. 2006. Relative Quantification. En *Real-time PCR*. Publicado por International University Line (Editor: T. Dorak): 63-82.
27. Piuri M, Sanchez C, Ruzal S. 2005. Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 84-95.
28. Pouch F, Ito K. 2001. *Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Organization. Fourth edition. p.635.
29. Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson D, Regan L, Panaretou B, Ladbury J, Piper P, Pearl L. 1999. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TRP)-domain co-chaperones. *European Molecular Biology Organization Journal*. 18: 754-762.

30. Rouf S, Ahmad I, Anwar N, Vodnala S, Kader A, Römling U, Rhen M. 2011. Opposing contributions of Polynucleotide Phosphorylase and the membrane protein Nlpl to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. 193 (2): 580-582.
31. Rouf S, Anwar N, Clements M, Rhen M. 2011. Genetic analysis of the *pnp-deaD* genetic region reveals membrane lipoprotein Nlpl as an independent participant in cold acclimatization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters*. 325: 56-63.
32. Schweiger R, Soll J, Jung K, Heermann R, Schwenkert S. 2013. Quantification of interaction strengths between chaperones and tetratricopeptide repeat domain-containing membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 288: 30614-30625.
33. Singh S, SaiSree L, Amrutha R, Reddy M. 2012. Three redundant murein endopeptidases catalyse an essential cleavage step in peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* K12. *Molecular Microbiology*. 86: 1036-1051.
34. Storm D. 1974. Mechanism of bacitracin action: a specific lipid-peptide interaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 235: 387-398.
35. Taghbalout A, Rothfield L. 2007. RNase E and the other constituents of the RNA degradosome are components of the bacterial cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*. 104: 1667-1672.
36. Teng C, Tseng Y, Maruvada R, Pearce D, Xie Y, Satyaseela M, Kim K. 2010. Nlpl contributes to *Escherichia coli* K1 strain RS218 interaction with human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*. 78 (7): 3090-3096.
37. Typas A, Banzhaf M, van der Berg van Saparoea B, Verheul J, Biboy J, Nichols R, Zietek M, Beilharz K, Kannenberg K, von Rechenberg M, Breukink E, den Blaauwen T, Gross C, Vollmer W. 2010. Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins. *Cell*. 143: 1097-1109.

38. Typas A, Banzhaf M, Gross C, Vollmer W. 2012. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews*. 10: 123-136.
39. Williamson R, Collatz E, Gutmann L. 1986. Mechanisms of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of non-enzymatic resistance. *Presse Medicale*. 15: 2282-2289.
40. Wilson C, Kajander T, Regan L. 2005. The crystal structure of Nlpl: a prokaryotic tetratricopeptide repeat protein with a globular fold. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 272: 166-179.
41. Zhao G, Meier T, Kahl S, Gee K, Blaszczyk L. 1999. Bocillin FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43: 1124-1128.
42. Zeytuni N, Zarivach R. 2012. Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Cell Structure*. 20(3): 397-405.