

La *nicking enzyme* de *Staphylococcus aureus*, un blanco de acción muy promisorio

Hay reglas sencillas para el uso de la penicilina: usarla solo para los microbios que sean vulnerables a ella, aplicar la dosis indicada y que el tratamiento dure lo suficiente para eliminar la infección; siguiendo estas reglas, todos quedarán satisfechos; de lo contrario, el resultado será decepcionante.

Sir Alexander Fleming (1881-1955)

Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1945

La aparición de la multiresistencia a los antimicrobianos en los diferentes microorganismos ha sido motivo de desvelos en los últimos 60 años y es un problema de salud pública mundial. Así, luego del genial descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928¹, en 1947, a los cuatro años de su producción y administración masiva, alrededor del 40% de las cepas de *Staphylococcus aureus* eran resistentes a la penicilina por su habilidad de producir penicilinasas. La respuesta efectiva, al menos por un tiempo, se logró tras la aparición en 1960 de una penicilina semisintética resistente a la penicilinasas, la meticilina². Desafortunadamente, ya en 1961 se describió la primera cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) y en 1963 se produjo el primer brote informado en el *Queen Mary's Hospital for Children* en Carshalton, Inglaterra, que comprometió a 37 pacientes. De manera muy rápida, las cepas SARM emergieron en casi todos los países del mundo³. La resistencia a la meticilina a expensas fundamentalmente de la presencia del gen *mecA*, que codifica la síntesis de una proteína ligadora de la penicilina adicional (PLP2a) de muy baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos, implica resistencia a todos ellos y a las combinaciones de estos con los inhibidores de β -lactamasas³.

Son varios los mecanismos que en los distintos microorganismos determinan resistencia a los antimicrobianos, entre ellos la presencia de bombas de eflujo que expulsan a los antibióticos, la impermeabilidad de membrana por ausencia o alteración de las porinas, la hiperproducción cromosomal o plasmídica de enzimas inactivantes, la presencia de proteínas ligadoras de la penicilina con escasa o nula afinidad por el antibiótico, alteraciones por mutaciones en el sitio blanco (deleciones, inserciones), entre otros. Una de las formas más eficientes de transferencia de la resistencia intra e interespecie es a través de los plásmidos conjugativos portadores de casetes en transposones, que codifican los múltiples factores de resistencia.

En los primeros años de la década de los ochenta, se detectó en EE.UU. un drástico incremento en la resistencia a los aminoglucósidos en diversas cepas de *S. aureus*⁴. Estudios moleculares posteriores en estas cepas determinaron la presencia de genes que codificaban las enzimas inactivantes de los aminoglucósidos; estos genes estaban ubicados en grandes plásmidos conjugativos (40-60 kb). pGO1 es el prototipo de los plásmidos clase III en *S. aureus*; codifica también resistencia a trimetoprima, bleomicina y a las sales de amonio cuaternario⁵.

En las últimas décadas, las infecciones graves causadas por SARM –cepas que suelen ser, además, multiresistentes– son tratadas con vancomicina (VAN), glucopéptido descubierto en 1952, que en 1958 fue registrado por la *US Food and Drug Administration* para el tratamiento de los aislamientos SARM. Contrariamente a lo acontecido con las penicilinas y las penicilinas semisintéticas, recién en 1988 la VAN supo seleccionar el primer aislamiento de *Enterococcus faecium* con altos niveles de resistencia [concentración inhibitoria mínima (CIM)_{VAN} > 1024 μ g/ml]. Esto se debió a la presencia del *cluster vanA*

que contiene al transposón Tn1546, responsable de la resistencia a la VAN por codificar las proteínas que modifican el sitio blanco del antibiótico en la pared celular bacteriana, en el cual se cambian los residuos de D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-lactato, con mucha menor afinidad por el antibiótico⁶. A partir de ese momento, la potencial transferencia de la resistencia a VAN desde los enterococos a *S. aureus* permaneció latente, hasta que en 1996 Hiramatsu et al. aislaron en Japón la primera cepa de SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina [*vancomycin-intermediate S. aureus* (VISA)], con CIM = 8 µg/ml⁷, siendo el punto de corte de sensibilidad ≤ 2 µg/ml. Sin embargo, esta cepa denominada Mu50 no poseía ninguno de los genes *van* y se observó, por microscopía electrónica, un engrosamiento de la pared celular que dificultaba la llegada de la VAN hasta su sitio blanco. Finalmente, en junio de 2002 se aisló de un paciente en diálisis en Michigan, EE.UU., una cepa SARM con altos niveles de resistencia a VAN y a teicoplanina (TEI) (CIM_{VAN} = 1024 µg/ml y CIM_{TEI} = 128 µg/ml). Esa cepa, denominada USA100, era además resistente a los aminoglucósidos, a los β-lactámicos, a las fluoroquinolonas, a los macrólidos, a la rifampicina y a la tetraciclina; y sensible al linezolid y a la trimetoprima-sulfametoxazol. En este caso la resistencia a la VAN era mediada por el operón *vanA* y residía en el transposón Tn1546, el mismo ya descrito en *E. faecium* resistente a la VAN y ahora presente en el plásmido pLW1043 en *S. aureus*⁸.

Este plásmido y otros relacionados, como el pGO1 y el pSK41, codifican una relaxasa denominada *nicking enzyme* en *S. aureus* (NES), que inicia y culmina el proceso de transferencia del ADN.

En 2013, Edwards et al.⁹ muestran la estructura cristalina y proveen información a nivel molecular de la NES y del complejo NES-ADN, determinan el sitio blanco de la enzima, logran su inhibición (y, por lo tanto, de sus funciones como relaxasa *in vitro*) a través de una poliamida a 50 µM, y determinan las regiones esenciales de la NES para la transferencia exitosa del plásmido de resistencia en *S. aureus*.

La figura de la tapa de este número, de Redinbo et al., es una composición donde se observa la estructura cristalina del extremo N-terminal de la enzima NES (color rojo) en complejo con el ADN (color amarillo) sobre un fondo de estafilococos y un átomo de níquel (esfera azul), esencial para la actividad de la enzima y, por lo tanto, para la transferencia del ADN plasmídico con los genes de resistencia a la VAN.

La NES posee 665 aminoácidos, su extremo N-terminal (~ 220 aa) es común a otras relaxasas, en cambio, su región C-terminal (residuos 221-665) es única del plásmido pLW1043 y de otros plásmidos de *S. aureus*, no comparte identidad con ninguna otra proteína bacteriana y hasta el momento se desconocía su función. Edwards et al. mostraron la estructura cristalina del dominio de la NES relaxasa determinada con una resolución de 2.9 Å; definieron que contiene el átomo de Ni rodeado de tres histidinas y una tirosina, y el oligonucleótido unido contiene, a su vez, una horquilla de 7 pb seguida de una cadena simple que se extiende hacia el sitio activo de la enzima. La estructura cristalina del dominio C-terminal de la NES plasmídica, determinada con una resolución de 3,0 Å, mostró una estructura α helicoidal única. En conjunto, estos hallazgos aportaron información a nivel atómico sobre la NES, que permite la transferencia de la resistencia en *S. aureus*.

Mediante anisotropía de fluorescencia, Edwards et al. mostraron que la NES tiene sitios específicos de contacto en las curvaturas mayor y menor de la doble hélice del ADN en las horquillas (*loops* 1 y 2), como así también interacciones base-específicas como para alinear al ADN sustrato para la catálisis. Los autores trabajaron con mutantes en el dominio de la NES relaxasa y determinaron que la integridad de este y la presencia del metal son necesarios para la unión con el ADN. Por otra parte, la eliminación del sitio de unión en el *loop* 1 o en el 2 y en la Gua-26 altera espectacularmente la actividad de la NES, en cambio, la presencia del dominio C-terminal impacta de manera significativa en la actividad de la relaxasa N-terminal regulando el delicado equilibrio clivaje-religamiento de la enzima intacta. En definitiva, ambas regiones trabajan en conjunto y coordinadamente.

En *S. aureus* y con el plásmido pSK41 –muy similar al pLW1043, pero sin los genes de resistencia a la vancomicina– demostraron mediante la determinación del número de transconjugantes que la alteración de los genes *nes* truncaba la transferencia del plásmido, con lo cual confirmaron el rol esencial de la NES en la transmisión del plásmido pSK41 y de todos los plásmidos relacionados. Asimismo, deleciones en los *loops* 1, 2 o en ambos también reducían la transferencia del ADN entre células de *S. aureus*. Por último, los autores investigaron las posibilidades de inhibición de la NES mediante una sustancia sintética, la poliamida 1, que se unió selectivamente a la secuencia 5'-GCGAA-3' del *loop*1. El clivaje del ADN por parte de la región NES relaxasa (1-220) fue totalmente inhibido por la poliamida 1 a una concentración de 50 µM. Con la NES intacta (1-665) se requirió no más de 25 µM. Los autores proponen que este modelo puede ser muy interesante para el desarrollo de pequeñas moléculas que

puedan inhibir las interacciones NES-ADN, alterar la actividad de la NES y evitar la transferencia de los plásmidos de resistencia.

De todos modos, no se debe olvidar que el uso masivo y a veces abusivo de los agentes antimicrobianos ha determinado siempre, y a veces muy rápidamente, la aparición de cepas resistentes. Esto ha puesto en evidencia la notable e infinita capacidad de los microorganismos de generar los más envidiables mecanismos de supervivencia a través de la selección y expresión de los múltiples genes de resistencia, algunos de ellos referidos en este editorial.

Silvia C. Predari

Departamento de Microbiología,
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari,
Universidad de Buenos Aires
e-mail: predari.silvia@lanari.fmed.uba.ar

1. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 1929; X: 226-36.
2. Rolinson GN, Batchelor FR, Stevens S, Cameron Wood J, Chain EB. Bacteriological studies on a new penicillin-BRL. 1241. *Lancet* 1960; 2: 564-7.
3. Gardella N, Picasso R, Predari SC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Buenos Aires teaching hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible to rifampin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 156-60.
4. Archer GL, Johnston JL. Self-transmissible plasmids in staphylococci that encode resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24: 70-7.
5. Caryl JA, O'Neill AJ. Complete nucleotide sequence of pGO1, the prototype conjugative plasmid from staphylococci. *Plasmid* 2009; 62: 35-8.
6. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988; 319: 157.
7. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 135-6.
8. Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003; 302: 1569-71.
9. Edwards JS, Betts L, Frazier ML et al. Molecular basis of antibiotic multiresistance transfer in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 2804-9.

Man will never succeed in eradicating all pathogens from his external and internal environments. Despite sanitation, vaccination, and chemotherapy, he will continue to harbour in his tissues a host of latent viruses, bacterial persisters, and other parasites potentially capable of causing disease. Certain types of pathogens may become less common, but others soon emerge to take their place. As stated by the English epidemiologist William Farr in his annual letter to the Registrar General almost a century ago: "The infectious diseases replace each other, and when one is rooted out it is apt to be replaced by others which ravage the human race indifferently whenever the condition of healthy life are wanting. They have this property in common with weeds and other forms of life, as one species recedes another advances." (Italics mine.)

El hombre nunca tendrá éxito en erradicar todos los patógenos de su ambiente interno y externo. A pesar de las obras de salubridad, vacunación y quimioterapia, continuará alojando como huéspedes en los tejidos de su cuerpo a virus latentes, bacterias persistentes y otros parásitos potencialmente capaces de causar enfermedad. Ciertos tipos de patógenos pueden hacerse menos comunes, pero otros emergerán para tomar su lugar. Como sostuvo el epidemiólogo inglés William Farr en su informe anual al Registrar General hace casi una centuria: "Las enfermedades infecciosas se reemplazan unas a otras, y cuando una es erradicada es propensa a ser reemplazada por otras que indiferentes causaran estragos siempre que las condiciones de una vida sana dejen que desear. Ellas tienen una propiedad común con las malezas y otras formas de vida, cuando una especie retrocede otra avanza." (La bastardilla es mía).

René J. Dubos (1901-1982)

Infection into disease. En: Life and Disease. New Perspectives in Biology and Medicine. Edited by Dwight J. Ingle. New York: Basic Books, 1963