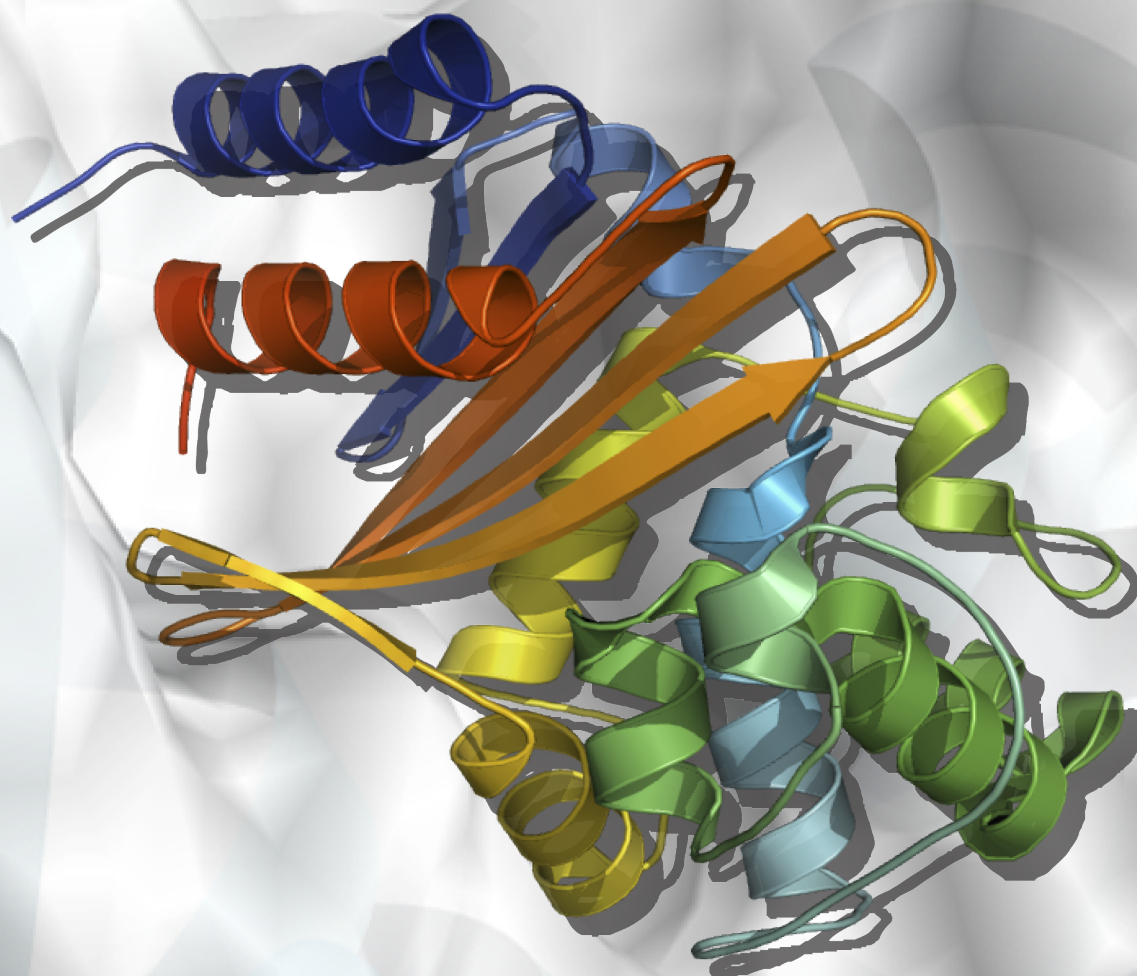


**ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA  
 $\beta$ -LACTAMASA OXA-24:**

**BASES ESTRUCTURALES QUE DETERMINAN  
SU ACTIVIDAD CARBAPENEMASA**



**Elena Santillana Heras  
Tesis Doctoral**



Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

**ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA  
 $\beta$ -LACTAMASA OXA-24:  
BASES ESTRUCTURALES QUE  
DETERMINAN SU ACTIVIDAD  
CARBAPENEMASA**

*Memoria presentada por Elena Santillana Heras para optar  
al grado de Doctora en Ciencias Biológicas  
Madrid, Enero de 2014*



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>6</b>
<b>1 SUMMARY</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>2.1 ANTIBIÓTICOS <math>\beta</math>-LACTÁMICOS.</b>	<b>14</b>
2.1.1 Carbapenémicos.	16
<b>2.2 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS MEDIADA POR <math>\beta</math>-LACTAMASAS.</b>	<b>17</b>
<b>2.3 OXACILINASAS.</b>	<b>18</b>
2.3.1 Mecanismo hidrolítico.	19
2.3.2 Oxacilinasas sin actividad carbapenemasa: caracterización estructural.	20
2.3.3 Oxacilinasas con actividad carbapenemasa: OXA-carbapenemasas.	23
<b>2.4 RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS EN <i>A. BAUMANNII</i>.</b>	<b>26</b>
<b>2.5 INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS.</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>4.1 CLONAJE DE LAS PROTEÍNAS.</b>	<b>36</b>
4.1.1 Clonaje del gen de OXA-24wt y de los mutantes OXA-24 <sub>Y112A</sub> , OXA-24 <sub>M223A</sub> y OXA-24 <sub>Y112A/M223A</sub> en el vector PAT-RA.	36
4.1.2 Clonaje del gen de OXA-24 y de los mutantes OXA-24 <sub>Y112A</sub> , OXA-24 <sub>M223A</sub> y OXA-24 <sub>Y112A/M223A</sub> en el vector pGEX-6p-1.	37
<b>4.2 ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.</b>	<b>38</b>
4.2.1 Ensayos cinéticos.	38
4.2.2 Determinación de las CMIs.	38
<b>4.3 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE OXA-24 Y LOS MUTANTES OXA-24<sub>Y112A</sub> Y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub>.</b>	<b>39</b>
4.3.1 Expresión.	39
4.3.2 Purificación.	39
<b>4.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.</b>	<b>40</b>
4.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.	40
4.4.2 Determinación de la concentración de proteína mediante espectroscopía UV-visible.	41
4.4.3 Ensayos de ultracentrifugación analítica.	41
<b>4.5 DETERMINACIÓN DE MODELOS ESTRUCTURALES MEDIANTE CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X.</b>	<b>42</b>
4.5.1 Recogida de datos	43
4.5.2 Procesamiento de datos	43
4.5.3 Determinación de las fases experimentales	45
4.5.4 Obtención y refinamiento del modelo	45
4.5.5 Validación del modelo	46
<b>4.6 ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN.</b>	<b>47</b>
4.6.1 Cristalización de OXA-24 y los mutantes OXA-24 <sub>Y112A</sub> y OXA-24 <sub>Y112A/M223A</sub>	47
4.6.2 Cristalización de los complejos OXA-24/inhibidores del tipo penema sulfónica.	48
<b>4.7 VITRIFICACIÓN DE LOS CRISTALES.</b>	<b>49</b>

<b>4.8</b>	<b>RESOLUCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS</b>	<b>50</b>
4.8.1	Recogida de datos y procesamiento de las imágenes	50
4.8.2	Cálculo de las fases.	50
4.8.3	Construcción, refinamiento y validación.	51
	<b>RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA <math>\beta</math>-LACTAMASA OXA-24</b>	<b>54</b>
5.1	<b>EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN.</b>	<b>54</b>
5.2	<b>CARACTERIZACIÓN DE OXA-24<sub>WT</sub> MEDIANTE EXPERIMENTOS DE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA.</b>	<b>60</b>
5.3	<b>RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA <math>\beta</math>-LACTAMASA OXA-24</b>	<b>61</b>
5.3.1	Cristalización. Recogida y procesamiento de los datos de difracción.	61
5.3.2	Determinación y afinamiento de la estructura de OXA-24.	64
5.4	<b>DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA <math>\beta</math>-LACTAMASA OXA-24.</b>	<b>69</b>
5.4.1	Arquitectura general de OXA-24.	69
5.4.2	Descripción del sitio activo	72
5.4.3	Bases moleculares que determinan la especificidad de OXA-24 por antibióticos carbapenémicos	75
5.5	<b>CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES OXA-24<sub>Y112A</sub> Y OXA-24<sub>DM</sub></b>	<b>76</b>
5.5.1	Ensayos bioquímicos y funcionales	77
5.5.2	Sobreexpresión y purificación de los mutantes OXA-24 <sub>Y112A</sub> y OXA-24 <sub>DM</sub> .	79
5.5.3	Caracterización de los mutantes OXA-24 <sub>Y112A</sub> y OXA-24 <sub>DM</sub> mediante experimentos de ultracentrifugación analítica.	83
5.6	<b>RESOLUCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS MUTANTES OXA-24<sub>Y112A</sub> Y OXA-24<sub>DM</sub></b>	<b>85</b>
5.6.1	Cristalización.	85
5.6.2	Recogida y procesado de los datos de difracción.	85
5.6.3	Determinación y refinamiento de la estructura de los mutantes OXA-24 <sub>Y112A</sub> y OXA-24 <sub>DM</sub> .	87
5.7	<b>DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS MUTANTES OXA-24<sub>Y112A</sub> Y OXA-24<sub>DM</sub>.</b>	<b>90</b>
5.7.1	Arquitectura general y centro activo.	90
5.8	<b>ESTUDIO DEL EFECTO DE INHIBIDORES DEL TIPO PENEMA SULFÓNICA SOBRE OXA-24.</b>	<b>93</b>
5.8.1	Ensayos funcionales para caracterizar el efecto inhibitorio sobre la actividad de OXA-24 de los compuestos del tipo penema sulfónica.	95
5.8.2	Cristalización de los complejos de OXA-24 <sub>WT</sub> con inhibidores del tipo penema sulfónica.	97
5.8.3	Determinación y refinamiento de la estructura de los complejos formados por OXA-24 con los diferentes inhibidores	99
5.9	<b>DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS COMPLEJOS FORMADOS POR OXA-24 CON LOS INHIBIDORES 2, 3 Y 5.</b>	<b>103</b>
	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>110</b>
6.1	<b>PLEGAMIENTO DE LA <math>\beta</math>-LACTAMASA OXA-24</b>	<b>110</b>
6.2	<b>CENTRO ACTIVO</b>	<b>113</b>
6.3	<b>BASES MOLECULARES QUE DETERMINAN LA ESPECIFICIDAD DE OXA-24 POR ANTIBIÓTICOS CARBAPENÉMICOS.</b>	<b>116</b>
6.4	<b>MUTANTES ESTRUCTURALES</b>	<b>123</b>
6.5	<b>INHIBIDORES</b>	<b>124</b>
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>130</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>132</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>142</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> REPRESENTACIÓN DE LOS NÚCLEOS ANTIBIÓTICOS DE CADA FAMILIA DE BETALACTÁMICOS.	16
<b>FIGURA 2.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ANTIBIÓTICOS CARBAPENÉMICOS	17
<b>FIGURA 3.</b> ACCIÓN DE LAS BETALACTAMASAS SOBRE LOS ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS	18
<b>FIGURA 4</b> CONFORMACIÓN DEL CENTRO ACTIVO DE OXA-10	19
<b>FIGURA 5.</b> PLEGAMIENTO DE OXA-10 Y SUPERPOSICIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DIMÉRICAS DE OXA-10 Y OXA-13	21
<b>FIGURA 6.</b> SUPERPOSICIÓN DE LA ESTRUCTURA DE OXA-10 CON LAS ESTRUCTURAS DE LAS BETALACTAMASAS DE CLASE A Y CLASE C	22
<b>FIGURA 7.</b> SUPERPOSICIÓN DE LOS CENTROS ACTIVOS DE LAS BETALACTAMASAS DE CLASE A, C Y D	23
<b>FIGURA 8.</b> RESUMEN DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE CARBAPENEMASAS DE CLASE D EN <i>A. BAUMANNII</i>	25
<b>FIGURA 9.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS	28
<b>FIGURA 10.</b> LAZO DE NAILON (“LOOP”) QUE SOSTIENE EL CRISTAL VITRIFICADO	49
<b>FIGURA 11.</b> REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL VECTOR RECOMBINANTE PGEX-6-P1/OXA-24	54
<b>FIGURA 12.</b> DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DEL PÉPTIDO SEÑAL DE OXA-24	55
<b>FIGURA 13.</b> PREDICCIÓN DE LOS ELEMENTOS DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DE OXA-24	56
<b>FIGURA 14.</b> ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-OXA-24 <sub>WT</sub>	57
<b>FIGURA 15.</b> PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-OXA-24 <sub>WT</sub>	57
<b>FIGURA 16.</b> DIGESTIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-OXA-24 <sub>WT</sub> CON LA PROTEASA 3C	58
<b>FIGURA 17.</b> PURIFICACIÓN DE OXA-24 <sub>WT</sub> . TRAS LA DIGESTIÓN CON LA PROTEASA 3C-GST	59
<b>FIGURA 18.</b> ANÁLISIS DE LA PUREZA DE LA PROTEÍNA OXA-24 <sub>WT</sub>	59
<b>FIGURA 19.</b> GRADIENTE DE EQUILIBRIO DE SEDIMENTACIÓN OBTENIDO PARA UNA SOLUCIÓN DE OXA-24	60
<b>FIGURA 20.</b> DISTRIBUCIÓN DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACIÓN ( <i>c</i> ( <i>s</i> )) DE OXA-24	61
<b>FIGURA 21.</b> PATRONES DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X OBTENIDOS PARA LAS FORMAS CRISTALINAS A Y B DE OXA-24	63

<b>FIGURA 22.</b> DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN DE OXA-24 <sub>WT</sub> DEL MODELO A.	66
<b>FIGURA 23.</b> DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN DE OXA-24 <sub>WT</sub> DEL MODELO B.	67
<b>FIGURA 24.</b> SUPERPOSICIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE OXA-24 A Y B	67
<b>FIGURA 25.</b> COMPARACIÓN DE LA REGIÓN DEL CENTRO ACTIVO DE LAS FORMAS CRISTALINAS A Y B	68
<b>FIGURA 26.</b> MAPAS DE DENSIDAD ELECTRÓNICA CORRESPONDIENTES A LA LISINA 84 DEL MODELO B	68
<b>FIGURA 27.</b> PLEGAMIENTO DE OXA-24	69
<b>FIGURA 28.</b> SUPERPOSICIÓN DE LA ESTRUCTURA DE OXA-24 CON LAS B-LACTAMASAS DE CLASE A Y CLASE D	70
<b>FIGURA 29.</b> SUPERPOSICIÓN DE LA ESTRUCTURA DE OXA-24 CON LAS ESTRUCTURAS DE VARIAS OXACILINASAS	72
<b>FIGURA 30. REPRESENTACIÓN DE LOS ELEMENTOS QUE COMPONEN EL CENTRO ACTIVO</b>	<b>73</b>
<b>FIGURA 31.</b> REPRESENTACIÓN DE LAS INTERACCIONES QUE ESTABILIZAN LA CONFORMACIÓN DEL SITIO ACTIVO DE OXA-24	74
<b>FIGURA 32.</b> REPRESENTACIÓN DE LA SUPERFICIE MOLECULAR DEL SITIO ACTIVO DE OXA-24	76
<b>FIGURA 33.</b> EXPRESIÓN DE LOS MUTANTES DE OXA-24 FUSIONADOS A GST	80
<b>FIGURA 34.</b> PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST-OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y GST-OXA-24 <sub>DM</sub>	81
<b>FIGURA 35.</b> ELECTROFORESIS DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN GST-OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y GST-OXA-24 <sub>DM</sub> TRATADAS CON LA PROTEASA 3C	82
<b>FIGURA 36.</b> PURIFICACIÓN DE LOS MUTANTES OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub> TRAS LA DIGESTIÓN CON LA PROTEASA GST-3C	82
<b>FIGURA 37.</b> ANÁLISIS DEL GRADO DE PUREZA DE LOS MUTANTES OXA-24 <sub>DM</sub> Y OXA-24 <sub>Y112A</sub>	83
<b>FIGURA 38.</b> DISTRIBUCIÓN DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACIÓN (C (S)) DEL MUTANTE OXA-24 <sub>Y112A</sub>	84
<b>FIGURA 39.</b> DISTRIBUCIÓN DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACIÓN (C (S)) DEL MUTANTE OXA-24 <sub>DM</sub>	84
<b>FIGURA 40.</b> CRISTALES DE LAS PROTEÍNAS MUTANTES OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub>	85
<b>FIGURA 41.</b> PATRONES DE DIFRACCIÓN CORRESPONDIENTES A LOS CRISTALES DE OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub>	86
<b>FIGURA 42</b> MAPAS DE DENSIDAD ELECTRÓNICA LOS MUTANTES OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub>	87
<b>FIGURA 43</b> DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN DE OXA-24 <sub>Y112A</sub>	89
<b>FIGURA 44.</b> DETALLE DE LA REGIÓN DEL CENTRO ACTIVO DE LOS MODELOS DE OXA-24 <sub>Y112</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub>	89
<b>FIGURA 45.</b> DENSIDAD ELECTRÓNICA DEL EXTREMO N-TERMINAL DEL MUTANTE OXA-24 <sub>DM</sub>	90

<b>FIGURA 46.</b> SUPERPOSICIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS MUTANTES OXA-24 <sub>Y112A</sub> , OXA-24 <sub>DM</sub> Y OXA-24 <sub>WT</sub>	90
<b>FIGURA 47.</b> SUPERPOSICIÓN DEL CENTRO ACTIVO DE OXA-24 <sub>WT</sub> , OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub>	91
<b>FIGURA 48.</b> INTERACCIONES QUE ESTABILIZAN EL SITIO ACTIVO DE OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub>	92
<b>FIGURA 49.</b> SUPERFICIES DE OXA-24 <sub>Y112A</sub> , OXA-24 <sub>DM</sub> Y OXA-24 <sub>WT</sub> REPRESENTADAS EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO	93
<b>FIGURA 50.</b> ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS INHIBIDORES DE OXA-24	94
<b>FIGURA 51.</b> COMPUESTOS ESTUDIADOS COMO POSIBLES INHIBIDORES DE OXA-24	94
<b>FIGURA 52.</b> DENSIDAD ELECTRÓNICA DEL INHIBIDOR 1 OXA-24	100
<b>FIGURA 53.</b> DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN DEL COMPLEJO OXA-24/2	101
<b>FIGURA 54.</b> DIAGRAMAS DE RAMACHANDRAN DE LOS COMPLEJOS OXA-24/3 Y OXA-24/5	102
<b>FIGURA 55.</b> DENSIDAD ELECTRÓNICA EXPERIMENTAL OBTENIDA PARA EL INHIBIDOR 3	103
<b>FIGURA 56.</b> ESQUEMA DEL MECANISMO DE REACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DEL TIPO PENEMA SULFÓNICA AL INTERACCIONAR CON OXA-24	104
<b>FIGURA 57.</b> CENTRO ACTIVO DE OXA-24 <sub>WT</sub> , OXA-24/2, OXA-24/3, OXA-24/5	105
<b>FIGURA 58.</b> ENLACE COVALENTE QUE SE ESTABLECE ENTRE LA S81 Y EL CARBONILO DE LOS COMPUESTOS 2, 3 Y 5	106
<b>FIGURA 59.</b> INTERACCIONES QUE ESTABILIZAN LOS COMPLEJOS FORMADOS POR OXA-24 CON LOS COMPUESTOS 2, 3 Y 5	107
<b>FIGURA 60.</b> SUPERPOSICIÓN DE LA ESTRUCTURA DE OXA-24 CON LAS B-LACTAMASAS DE CLASE A (TEM-1) Y CLASE C (CF)	111
<b>FIGURA 61.</b> SUPERPOSICIÓN DE LA ESTRUCTURA DE OXA-24 CON LAS ESTRUCTURAS DE VARIAS OXACILINASAS: OXA-1, OXA-2, OXA-10, OXA-13, OXA-48 Y OXA-46	112
<b>FIGURA 62.</b> COMPARACIÓN DE LA POSICIÓN DE LOS ELEMENTOS ESTRUCTURALES EN LA ZONA DE DIMERIZACIÓN PARA OXA-24 Y OXA-10	113
<b>FIGURA 63.</b> ENTORNO QUÍMICO QUE RODEA LA LISINA DEL CENTRO ACTIVO EN OXA-24	114
<b>FIGURA 64.</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MECANISMO HIDROLÍTICO DE OXA-24	114
<b>FIGURA 65.</b> INTERACCIONES QUE ESTABLECE EL GRUPO CARBOXILATO DE LA K84 CON LA S81	115
<b>FIGURA 66.</b> COMPARACIÓN DE LA POSICIÓN DEL SULFATO EN EL CENTRO ACTIVO DE OXA-24 CON EL COMPLEJO OXA-24/DORIPENEM	116
<b>FIGURA 67.</b> VISIÓN DESDE AMBOS EXTREMOS DE LA BARRERA HIDROFÓBICA DEFINIDA POR LA Y112 Y LA M223	117
<b>FIGURA 68.</b> DOS ORIENTACIONES DE LAS SUPERFICIES DE OXA-24 Y OXA-10 COLOREADAS SEGÚN SU POTENCIAL ELECTROSTÁTICO	118



<b>FIGURA 69.</b> COMPARACIÓN DE LA ACCESIBILIDAD AL SITIO CATALÍTICO EN OXA-10, OXA-24 Y OXA-48	119
<b>FIGURA 70.</b> CANAL QUE ALOJA EL BOLSILLO CATALÍTICO EN LAS CARBAPENEMASAS OXA-24 Y OXA-48	119
<b>FIGURA 71.</b> REPRESENTACIÓN DE LA ORIENTACIÓN QUE ADOPTA EL LAZO B4-B5 EN OXA-24	120
<b>FIGURA 72.</b> COMPARACIÓN DE LA CONFORMACIÓN QUE ADOPTA EL LAZO B4-B5 EN OXA-24 Y OXA-48	121
<b>FIGURA 73.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÁMICOS IMPENEM, MEROPENEM Y OXACILINA	121
<b>FIGURA 74.</b> MODELADO DEL IMPENEM, MEROPENEM Y OXACILINA EN EL SITIO ACTIVO DE OXA-24	122
<b>FIGURA 75.</b> COMPARACIÓN DEL ACCESO AL CENTRO ACTIVO EN OXA-24, OXA-10, OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub>	124
<b>FIGURA 76.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PENEMAS SULFÓNICAS	125
<b>FIGURA 77.</b> INTERACCIÓN DE OXA-24 CON UNA PENEMA SULFÓNICA	126

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> ELEMENTOS DEL CENTRO ACTIVO EN SERIN-BETALACTAMASAS	22
<b>TABLA 2</b> OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LAS REACCIONES DE PCR	37
<b>TABLA 3</b> PLÁSMIDOS	38
<b>TABLA 4</b> VALORES ESTADÍSTICOS CRISTALOGRAFICOS DEL PROCESADO DE LOS DATOS DE DIFRACCIÓN DE LOS CRISTALES DE OXA-24	64
<b>TABLA 5</b> VALORES ESTADÍSTICOS DEL REFINAMIENTO DE LOS MODELOS DE OXA-24	66
<b>TABLA 6</b> VALORES DE RMSD OBTENIDOS AL SUPERPONER CON EL PROGRAMA SARF LA ESTRUCTURA DE OXA-24 CON DISTINTAS FAMILIAS DE SERIN-B-LACTAMASAS.	70
<b>TABLA 7</b> VALORES DE LA DESVIACIÓN CUADRÁTICA MEDIA OBTENIDOS AL SUPERPONER LA ESTRUCTURA DE OXA-24 CON LAS ESTRUCTURAS DE OTRAS OXACILINASAS.	71
<b>TABLA 8.</b> VALORES DE CMIS DETERMINADOS PARA <i>A. BAUMANNII</i> PORTADOR DE PAT-RA/OXA-24 <sub>WT</sub>	78
<b>TABLA 9.</b> PARÁMETROS CINÉTICOS DE OXA-24, OXA-24 <sub>DM</sub> Y OXA-24 <sub>Y112A</sub> FRENTE A LOS ANTIBIÓTICOS SEÑALADOS.	79
<b>TABLA 10</b> VALORES ESTADÍSTICOS CRISTALOGRAFICOS DEL PROCESAMIENTO DE LOS DATOS DE DIFRACCIÓN DE LOS CRISTALES DE OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub>	86
<b>TABLA 11</b> VALORES ESTADÍSTICOS DEL REFINAMIENTO DE LOS MODELOS DE OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub> .	88

<b>TABLA 12</b> VALORES DE RMSD OBTENIDOS AL SUPERPONER LA ESTRUCTURA DE OXA-24 <sub>WT</sub> CON LAS ESTRUCTURAS DE LOS MUTANTES OXA-24 <sub>Y112A</sub> Y OXA-24 <sub>DM</sub> .	91
<b>TABLA 13.</b> VALORES DE CMIS DETERMINADOS PARA LA CEPA DE <i>A.BAUMANNII</i> JC7/04 TRANSFORMADA CON PAT-RA O PAT-RA/OXA-24 <sub>WT</sub>	96
<b>TABLA 14.</b> VALORES DE IC <sub>50</sub>	97
<b>TABLA 15.</b> RESUMEN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ENSAYADAS PARA LOS DIFERENTES INHIBIDORES VARIANDO EL TIEMPO Y LA CONCENTRACIÓN DE CADA INHIBIDOR.	98
<b>TABLA 16 :</b> VALORES ESTADÍSTICOS CRISTALOGRAFICOS DEL PROCESAMIENTO DE LOS DATOS DE DIFRACCIÓN DE LOS CRISTALES DE OXA-24 CON LOS DIFERENTES INHIBIDORES.	99
<b>TABLA 17</b> VALORES ESTADÍSTICOS DEL REFINAMIENTO DE LOS MODELOS DE LOS COMPLEJOS OXA-24/2, OXA-24/3 Y OXA-24/5	101
<b>TABLA 18</b> ELEMENTOS DEL CENTRO ACTIVO DE LAS SERIN-B-LACTAMASAS	113

# **SUMMARY**



## 1 SUMMARY

OXA-24 is a class D carbapenem-hydrolyzing oxacillinase extracted from a clinically epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. In contrast to other oxacillinases, most of these OXA-type carbapenemases do not present hydrolytic activity against oxacillin, cloxacillin, and methicillin, and they display activity against carbapenems. Moreover, these enzymes are widely dispersed in clinically relevant species, such as *A. baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Carbapenems are the remaining drug of choice to treat these multiresistant pathogens responsible for severe nosocomial infections. Thus, the emergence of OXA-type carbapenemases represents a particularly disturbing problem.

The native form of OXA-24 is a monomer with 275 residues. OXA-24 folds into an  $\alpha/\beta$  structure composed by two domains, one helical and one mixed  $\alpha/\beta$  containing a six stranded antiparallel  $\beta$ -sheet covered by the N- and C-terminal  $\alpha$ -helices.

The active site of OXA-24 lies in a cleft at the interface of the  $\beta$ -sheet and the helical domain and is composed of three highly conserved motifs in all Class D  $\beta$ -lactamases, which are referred to as the active site elements 1 (S81-T82-F83-K84), 2 (S128-A129-V130) and 3 (K218-S219-G220). The first element is located at the N-terminal end of the 310 helix 3 and contains the catalytic serine (S81) and the carboxylated lysine (K84), which plays a regulatory role in the acylation-deacylation process. The second motif is located at the loop connecting helices 4 and 5 and the third active site element is made up by residues from the  $\beta$ 4 strand. The interaction between Tyr-112 and Met-223 is essential for the carbapenem specificity in OXA-24. The interaction between these residues creates a hydrophobic barrier that limits the access to the catalytic site, defining a tunnel-like entrance to the active site. The substrate is anchored into the tunnel-like cavity of the binding site through the Tyr-112 that binds the 6-hydroxyethyl group of the carbapenemic antibiotics, playing an important role in the catalytic efficiency of OXA-24 for carbapenems. The key role of the Tyr-112 and the Met-223 has been confirmed by mutagenesis studies. The substitution of the residues Y112 and M223 by alanine eliminates the hydrophobic barrier essential for the carbapenem specificity and decreased significantly the hydrolytic activity of OXA-24 against carbapenems. When both amino acids are mutated, the MIC for imipenem and meropenem decreased and reached basal levels, respectively. Biochemical experiments also confirm the lower catalytic efficiency of the mutants for carbapenems.

Class D carbapenemases are usually resistant to commercial  $\beta$ -lactamase inhibitors, so new effective inhibitors are urgently needed. Three unique 6-alkylidene-2'-substituted penicillanic acid sulfones were synthesized and tested against OXA-24. The X-ray structures of OXA-24 in complex with these compounds reveal the formation of stable bicyclic aromatic intermediates with their carbonyl oxygen in the oxyanion hole.

## SUMMARY

The position of the inhibitors was clearly defined in the active site through its conjugated acyl group covalently attached to the catalytic serine (Ser81). The conformation of the active site is very similar to that of the native enzyme, but several conformational changes can be observed in some residues involved directly in the accommodation of the inhibitor. A network of interactions contributes to stabilize the intermediate state. The stable acyl-enzyme complexes from the 6-alkylidene-2'-substituted penicillin sulfone inhibitors are formed by a sequence of events in which the initial nucleophilic attack of Ser81 O $\gamma$  on the carbonyl of the penicillin ring releases the  $\beta$ -lactam nitrogen lone pair, thus enabling the opening of the neighboring sulfone ring. Another rearrangement provided by the pyridyl nitrogen bonded to the former C5 of the resultant imine leads to the formation of the crystallographically observed indolizine system.

These data provide us with the first structural evidence that 6-alkylidene-2'-substituted penicillin sulfones are effective mechanism-based inactivators of class D  $\beta$ -lactamases.

# **INTRODUCCIÓN**





## 2 INTRODUCCIÓN

*Acinetobacter baumannii* es un bacilo gram-negativo causante de infecciones y epidemias hospitalarias graves, que afectan mayoritariamente a pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI). Debido a su eficacia y rapidez para desarrollar resistencias a los antimicrobianos, y a su capacidad para persistir en el entorno hospitalario sobreviviendo en superficies inanimadas, se ha convertido en uno de los patógenos nosocomiales más problemáticos, de difícil control y tratamiento. Dado que la gran mayoría de las cepas clínicas son multirresistentes, los antibióticos carbapenémicos han constituido durante muchos años el último recurso para combatir las infecciones causadas por este organismo (Peleg, Seifert et al. 2008). Resulta por tanto alarmante la aparición de cepas clínicas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos, ya que ello reduce drásticamente las opciones terapéuticas. Responsables en gran medida de dicha resistencia son las carbapenemasas de clase D, oxacilinasas que han adquirido actividad hidrolítica frente a carbapenemas. El objeto de este trabajo de tesis, OXA-24 es, precisamente, una oxacilinasas con actividad carbapenemasa aislada de una cepa hospitalaria multirresistente de *A. baumannii* que causó un brote epidemiológico severo en el hospital Ramón y Cajal de Madrid en 1997 (Bou, Oliver et al. 2000).

Un conocimiento detallado de los mecanismos de acción de esta familia de carbapenemasas, enfocado al desarrollo de inhibidores que permitan sortear las limitaciones de tratamiento actuales, posibilitará el desarrollo de nuevas estrategias para combatir los graves problemas que este patógeno está causando dentro del ámbito hospitalario en todo el mundo.

### 2.1 ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÁMICOS.

Los antibióticos betalactámicos son (Suarez and Gudiol 2009) bactericidas de acción lenta que actúan inhibiendo la última fase de la síntesis de la pared bacteriana: la transpeptidación. Durante esta etapa, se produce la formación de los tetrapéptidos que componen el péptidoglicano a partir de la modificación de pentapéptidos, gracias a la acción de transpeptidasas periplasmáticas denominadas PBPs ("*Penicillin-Binding-Proteins*" o proteínas de unión a penicilina).

El anillo betalactámico, que define químicamente a esta familia de antibióticos, posee una estereoquímica similar a los aminoácidos finales de los tetrapéptidos del peptidoglicano: D-Ala-D-Ala. Por ello, es capaz de unirse covalentemente al centro activo de las PBPs y bloquear su actividad transpeptidasa, impidiendo la adecuada formación de la pared celular. La pared debilitada se rompe a causa de la presión osmótica, produciéndose la lisis celular.

Por otro lado, se ha comprobado que los antibióticos betalactámicos son capaces de inducir también la síntesis de las autolisinas endógenas bacterianas

## INTRODUCCIÓN

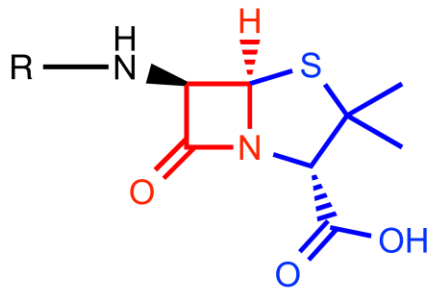
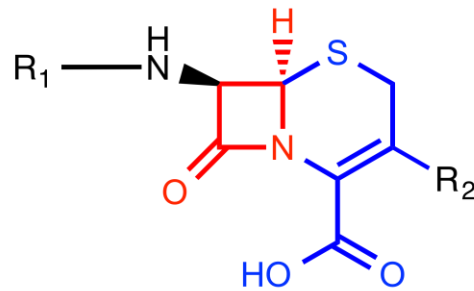
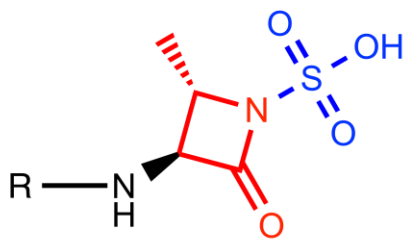
encargadas de la degradación del péptidoglicano. El aumento de la producción de la autolisina, mediada por este tipo de antibióticos, contribuye a la destrucción de la pared bacteriana y a la lisis por desequilibrio osmótico.

La asociación del anillo betalactámico con otro radical (habitualmente otro anillo) conforma el denominado núcleo antibiótico. De esta forma, existen distintas clases de antibióticos betalactámicos con propiedades específicas en función de dicho núcleo, definiendo su acción farmacológica y su espectro de actividad. Además, la sustitución del núcleo antibiótico con diferentes grupos químicos da lugar a una gran diversidad de compuestos con características funcionales propias dentro de cada clase.

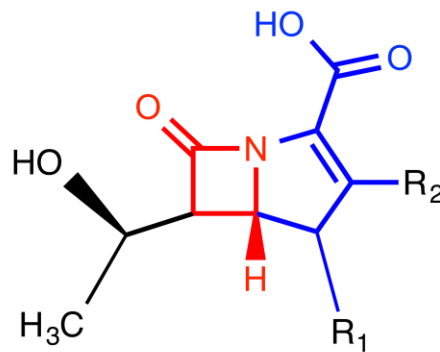
Las principales clases de antibióticos betalactámicos y sus núcleos antibióticos constituyentes son los siguientes (Fig. 1):

- Penicilinas: su núcleo antibiótico contiene un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6- $\alpha$ -aminopenicilánico.
- Cefalosporinas: son estructuralmente similares a las penicilinas y su estructura básica la forma el núcleo cefem (anillo de dihidrotiacina fusionado al anillo betalactámico).
- Monobactámicos: Son derivados del ácido 3-aminomonobactámico, con un núcleo de estructura monocíclica en la que el único anillo es el betalactámico.
- Carbapenémicos: la asociación de un anillo pirrolidínico al anillo betalactámico constituye el núcleo de este tipo de antibióticos.

## NÚCLEO DEL ANTIBIÓTICO BETALACTÁMICO / GRUPO ANTIBIÓTICO

6- $\alpha$ -penicilánico/penicilinas7- $\alpha$ -cefalosporánico/cefalosporinas

monobactámico/monobactanes



carbapenémico/carbapenemas

Figura 1. Representación de los núcleos antibióticos de cada familia de betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactanes y carbapenémicos). En rojo se representa el anillo betalactámico, común en todas las clases, y en azul el grupo químico que otorga especificidad a cada familia.

### 2.1.1 Carbapenémicos.

Los carbapenémicos son los antibióticos con mayor espectro de actividad que existen actualmente, además de los más resistentes frente a la hidrólisis mediada por betalactamasas. Son compuestos cuyo núcleo comprende la fusión de un anillo pirrolidínico al anillo betalactámico. Se diferencian de las penicilinas por la sustitución del átomo de azufre por uno de carbono, así como por la presencia de un doble enlace adicional en el pentaciclo. Su estructura química se caracteriza además por la presencia de un grupo hidroxietilo en posición 6 del carbapenem, siendo las posiciones 1 y 2 ocupadas por diferentes radicales que confieren características funcionales específicas a cada molécula carbapenémica.

Su gran facilidad para penetrar en el espacio periplásmico bacteriano, su alta afinidad por las PBPs y su estabilidad frente a las betalactamasas les otorgan su gran potencia y versatilidad, presentando una buena actividad contra la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias, Gram positivas y Gram negativas. Debido a su gran potencial, su uso está prácticamente restringido a infecciones severas causadas por organismos multirresistentes y su administración se realiza

## INTRODUCCIÓN

únicamente por vía parenteral en un entorno hospitalario (Queenan and Bush 2007).

Actualmente se comercializan cuatro antibióticos carbapenémicos: imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem (Fig. 2)

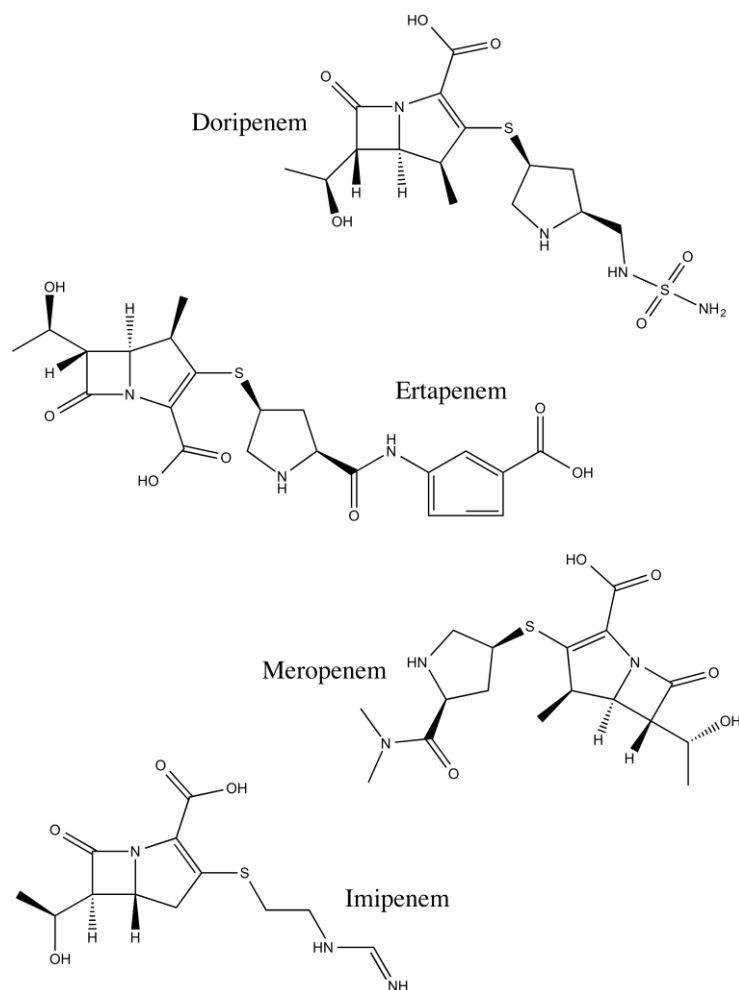
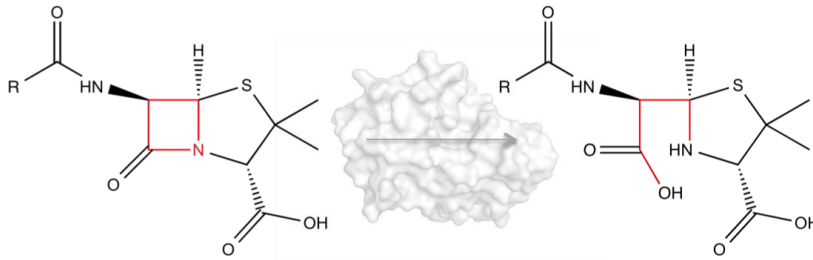


Figura 2. Estructura química de los antibióticos carbapenémicos utilizados en clínica.

## 2.2 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS MEDIADA POR $\beta$ -LACTAMASAS.

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas bacterianas capaces de hidrolizar antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Fig. 3), impidiendo que puedan inhibir la síntesis del péptidoglicano y protegiendo a la bacteria que las expresa de su acción letal (Gutkind, Di Conza et al. 2013).



**Figura 3. Representación de la acción hidrolítica de las betalactamasas sobre los antibióticos betalactámicos. La ruptura del enlace amida en el anillo betalactámico modifica el compuesto antibiótico, que no puede interactuar ya con las PBPs diana y pierde su actividad bactericida.**

Por tanto, las betalactamasas son las principales responsables de la resistencia que presentan las bacterias frente a los antibióticos betalactámicos. Dado que penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos son los tratamientos de elección frente a numerosas infecciones, la detección de betalactamasas en cepas patógenas y su caracterización funcional es sumamente importante para la elección del tratamiento antibiótico adecuado.

La clasificación de los diferentes tipos de betalactamasas se ha realizado tradicionalmente en base a su homología en secuencia primaria, definiéndose cuatro grupos: A, B, C, D (Ambler 1980). Atendiendo a su mecanismo de acción, las  $\beta$ -lactamasas de clases A, C y D son serin-hidrolasas que llevan a cabo la hidrólisis del antibiótico a través de una serina catalítica situada en el centro activo. Las  $\beta$ -lactamasas de clase B sin embargo, son metaloproteínas que requieren zinc para desempeñar su actividad catalítica.

Existe también un sistema de clasificación alternativo que agrupa las betalactamasas en función de sus características funcionales (Bush and Jacoby 2010). Considerando como criterios su espectro de actividad (sustratos sobre los que son activas) y su patrón de inhibición, se definen tres grandes grupos con múltiples subgrupos: grupo 1, constituido por cefalosporinasas de clase C no inhibibles por ácido clavulánico; grupo 2, compuesto principalmente por las serin-betalactamasas de clases A y D (penicilinasas, cefalosporinasas inhibibles por ácido clavulánico, serin-carbapenemasas y betalactamasas de amplio espectro); grupo 3, comprendido por metalobetalactamasas no inactivables con inhibidores derivados del anillo betalactámico.

### **2.3 OXACILINASAS.**

De acuerdo a su secuencia aminoacídica, las oxacilinasas son  $\beta$ -lactamasas de clase D y pertenecen a los grupos 2d, 2de y 2df (Bush and Jacoby 2010) según sus características funcionales. Están presentes en bacterias gram-negativas, principalmente en los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Naas and Nordmann 1999).

## INTRODUCCIÓN

Inicialmente, las betalactamasas de clase D fueron definidas como enzimas capaces de hidrolizar las isoxazolilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina) y meticilina con mayor eficiencia que las penicilinas clásicas, además de no ser inhibibles por ácido clavulánico, tazobactam o sulbactam (Bush, Jacoby et al. 1995). Debido a su actividad preferencial por este tipo de sustratos recibieron el nombre de oxacilinasas. Sin embargo, la caracterización posterior de nuevos miembros de esta familia permitió establecer que se trata del grupo de betalactamasas con mayor diversidad bioquímica, funcional y genética (Naas and Nordmann 1999).

### 2.3.1 Mecanismo hidrolítico.

Al igual que las betalactamasas de clase A y C, las oxacilinasas son serinohidrolasas. Los residuos que componen el centro activo se encuentran altamente conservados en todos los miembros de la familia, y se organizan en tres motivos (Poirel, Naas et al. 2010) (Fig. 4):

Elemento 1:	S-X-X-K	contiene la serina catalítica y la lisina que se encuentra carboxilada en la forma activa de la enzima
Elemento 2	S-X-V/I	
Elemento 3:	K-T/S-G	

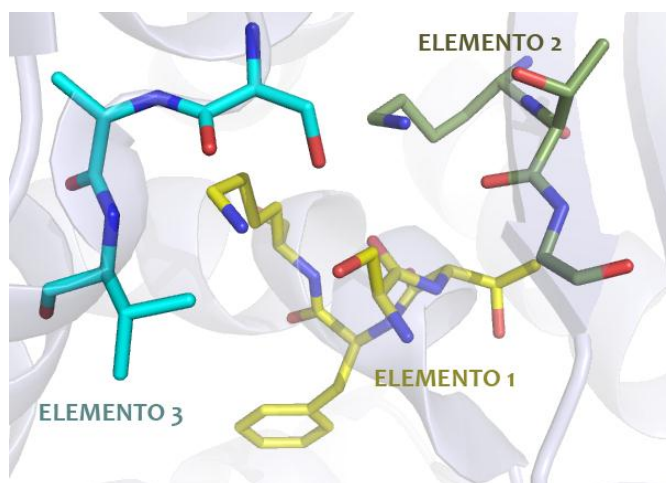


Figura 4 Conformación del centro activo de OXA-10, una oxacilinasas clásica, con sus tres elementos constituyentes: 1 (amarillo), 2 (verde) y tres (cián)

A pesar de la similitud que presenta su centro activo con otras serin-betalactamasas, las oxacilinasas poseen un mecanismo de acción particular, ya que resulta fundamental para su actividad hidrolítica que la lisina localizada en el elemento 1 del centro activo se encuentre carboxilada. La lisina carboxilada media como base en los procesos de acilación y desacilación del complejo acil-enzima. El carboxilato de la lisina establece un puente de hidrógeno con la serina catalítica aumentando su reactividad y propiciando el ataque nucleofílico sobre el anillo betalactámico para la formación de la acil-enzima. Del mismo modo, la interacción del carboxilato con una molécula de agua promueve la desacilación del intermedio acilado y la liberación del producto inactivo (Schneider, Bethel et al. 2009), (Golemi, Maveyraud et al. 2001).

Aunque todas las oxacilinasas poseen un mecanismo catalítico común, su espectro de actividad y su afinidad por diferentes sustratos difiere ampliamente entre los distintos componentes de este grupo. De esta forma, podemos distinguir entre las oxacilinasas capaces de hidrolizar antibióticos carbapenémicos (OXA-carbapenemasas) y las que no poseen dicha actividad, como se describe a continuación.

### 2.3.2 Oxacilinasas sin actividad carbapenemasa: caracterización estructural.

Esta clase de oxacilinasas presentan una actividad limitada principalmente a isoxazolilpenicilinas, meticilina y amino- e ureido-penicilinas, aunque también pueden presentar actividad cefalosporinasa en mayor o menor medida. Los genes que codifican estas betalactamasas son adquiridos por las bacterias en plásmidos o integrones, siendo escasa su aparición de forma constitutiva en el genoma bacteriano (Poirel, Naas et al. 2010).

La resolución de la estructura cristalográfica de algunas oxacilinasas de este tipo, (OXA-1 (Sun, Nukaga et al. 2003), OXA-10 (Paetzel, Danel et al. 2000), OXA-13 (Pernot, Frenois et al. 2001)) ha permitido un mejor conocimiento de su funcionalidad y sus diferencias con otras serin-betalactamasas.

Desde el punto de vista estructural, todas presentan una organización tridimensional muy similar en forma de dímero, a excepción de OXA-1, de manera que cada monómero presenta un plegamiento constituido por un dominio helicoidal y otro dominio que comprende una lámina beta central formada por 6 hebras- $\beta$  antiparalelas y las hélices N- y C- terminales (Fig. 5). El centro activo se aloja en un surco definido en la interfase entre ambos dominios.

## INTRODUCCIÓN

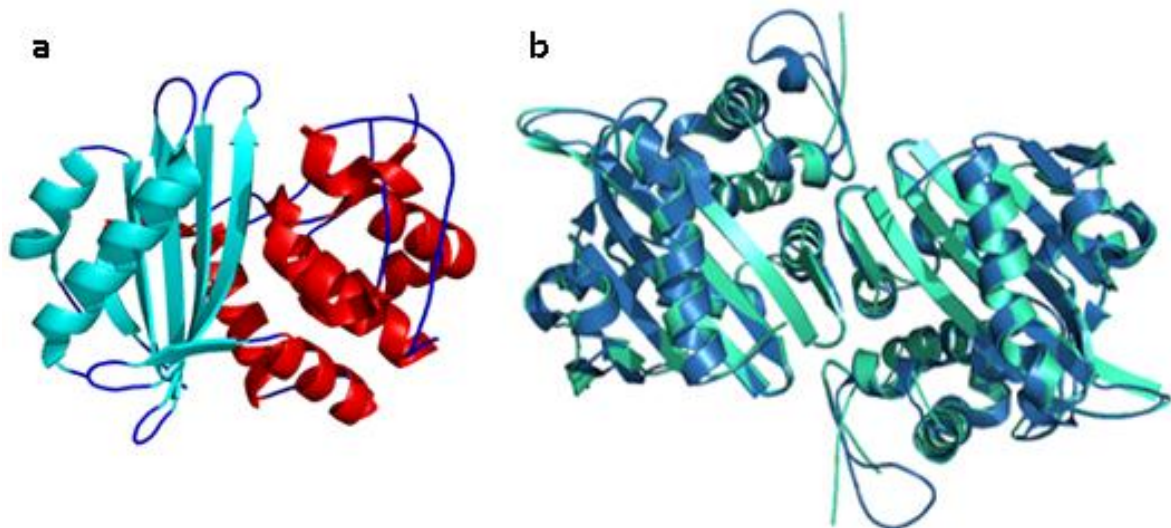


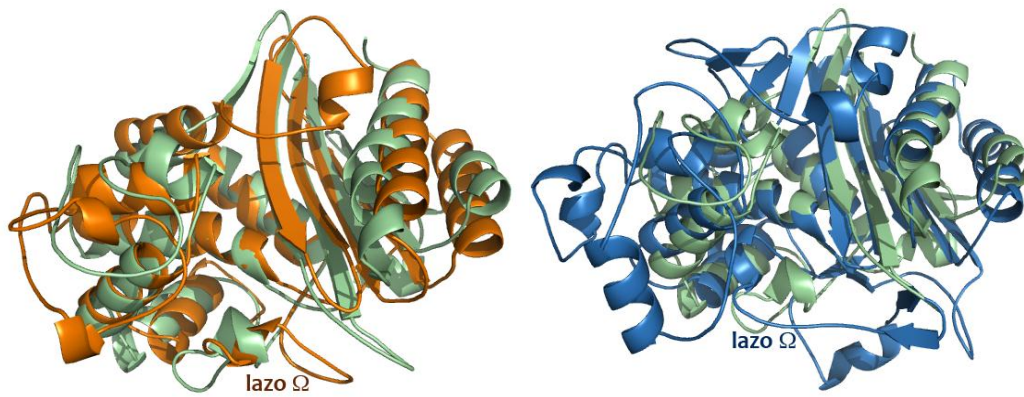
Figura 5. a) plegamiento de OXA-1, con dos dominios bien diferenciados: uno helicoidal (rojo) y otro que consta de la lámina beta central y las hélices N- y C- terminales (cián).

b) superposición de las estructuras diméricas de OXA-10 (azul) y OXA-13 (verde). Puede apreciarse el alto grado de conservación que mantiene el ordenamiento general de estas betalactamasas.

La superposición de las estructuras de este tipo de serin-oxacilinasas con las betalactamasas de clases A (Jelsch, Mourey et al. 1993) y C (Oefner, D'Arcy et al. 1990) muestra que, a pesar de la similitud que mantienen en el plegamiento, existen variaciones importantes que justifican, no sólo la diferente especificidad de sustrato que existe entre ambas familias, sino también peculiaridades del mecanismo catalítico que implica los pasos de acilación/desacilación.

Especialmente importante es la diferencia que encontramos, tanto en tamaño como en posición, en el denominado lazo  $\Omega$  adyacente al centro activo. La conformación de este lazo resulta clave en las serin-betalactamasas de clases A y C, ya que condiciona la especificidad del sustrato (Fig. 6). Además, el lazo  $\Omega$  aloja un residuo catalítico clave en las betalactamasas de clase A, una glutamina, que actúa como base general durante la hidrólisis del antibiótico. Próximo al lazo  $\Omega$  se encuentra una tirosina que realiza, en las betalactamasas de clase C, una función similar a la de la glutamina en las de clase A (Banerjee, Pieper et al. 1998) (Oefner, D'Arcy et al. 1990). El lazo  $\Omega$  de las betalactamasas de clase D es significativamente más corto en secuencia y adopta una conformación diferente, de forma que no juega un papel tan importante en el espectro de actividad enzimática como en las betalactamasas de clases A y C (Paetzel, Danel et al. 2000).



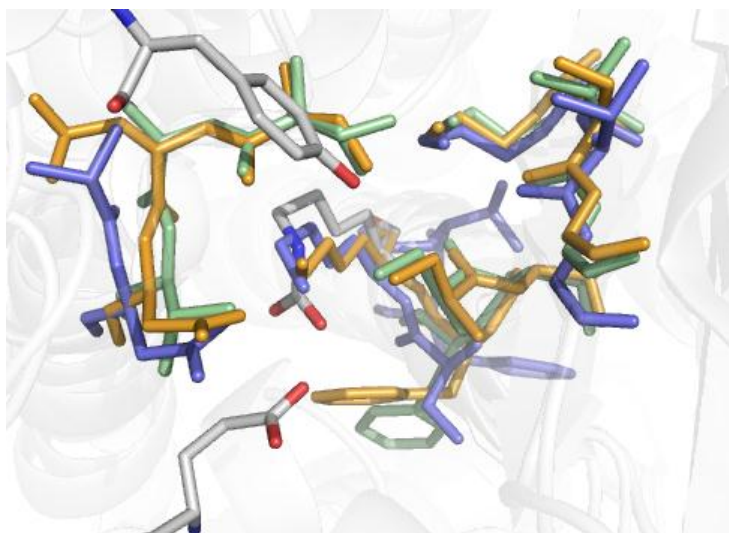


**Figura 6.** Superposición de la estructura de OXA-10 (verde; 1FOF) con las estructuras de las betalactamasas de clase A TEM-1 (naranja; 1ZG4) y clase C (azul; 1FR1). El plegamiento se encuentra conservado, aunque cabe destacar las diferencias en el lazo  $\Omega$  que presentan las oxacilinasas con respecto a las betalactamasas de clase A y C, dónde este elemento estructural desempeña un papel clave.

La conformación del centro activo, con los tres elementos que la definen, es también muy similar en las serin-betalactamasas de clases A, C y D, como se muestran en la Tabla 1 y en la Fig. 7.

**Tabla 1. Elementos del centro activo en serin-betalactamasas**

	Elemento 1	Elemento 2	Elemento 3
Clase A	S-X-X-K	S-D-N	K/R-S/T-G
Clase C (CF)	S-X-X-K	Y-A-N	K-T-G
Clase D (OXA-10)	S-X-X-K	S-X-V	K-T/S-G



**Figura 7.** Superposición de los centros activos de las betalactamasas de clase A (naranja; TEM-1), C (azul; CF) y D (verde; OXA-10). Tanto los residuos que los componen como la arquitectura general se encuentran muy conservados. Sin embargo, el mecanismo catalítico presenta importantes diferencias en las oxacilinasas, debido a la carboxilación de la lisina del elemento 1, que favorece su actuación como base en las reacciones de acilación/desacilación. Esta función la desempeñan una glutamina del lazo  $\Omega$  y una tirosina del elemento 2 en las betalactamasas de clase A y C respectivamente. Los residuos que actúan como base durante la hidrólisis en las tres clases aparecen representados en gris (lisina carboxilada, glutamina y tirosina).

### 2.3.3 Oxacilinasas con actividad carbapenemasa: OXA-carbapenemasas.

Las OXA-carbapenemasas, o carbapenemasas de clase D, son betalactamasas incluidas en la familia de las oxacilinasas por la homología secuencial (entre el 18 y el 36%) que presentan con ellas, pero que han desarrollado un perfil hidrolítico diferente a las oxacilinasas clásicas. Son capaces de hidrolizar carbapenémicos, aunque no cefalosporinas y, en algunos casos, incluso han perdido o disminuido su capacidad hidrolítica frente a isoxazolilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina). Son capaces también de conferir resistencia a carboxipenicilinas y aminopenicilinas (Queenan and Bush 2007).

Desde de que en 1993 se describiese la primera oxacilinasas con actividad carbapenemasa (OXA-23) en una cepa multirresistente de *A. baumannii* presente en un hospital escocés (Paton, Miles et al. 1993), el número de carbapenemasas de este tipo identificadas en hospitales de todo el mundo ha crecido de forma alarmante. La gran mayoría se han aislado en patógenos gram-negativos multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa* y, muy especialmente, *A. baumannii*. El hecho de que estos patógenos hayan desarrollado resistencias a antibióticos carbapenémicos está originando un serio problema terapéutico, ya que estos compuestos constituían el último recurso de tratamiento.

Las OXA-carbapenemasas se pueden dividir en diferentes grupos, de acuerdo a su secuencia aminoacídica (Fig. 8). La homología de secuencia entre los miembros de un mismo grupo suele ser superior al 90% mientras que la relación

entre las enzimas de diferentes grupos oscila entre un 40 y un 70% (Walther-Rasmussen and Hoiby 2006).

- Grupo 1: formado por OXA-23, cuyo gen es portado en un plásmido, OXA-27 (Afzal-Shah, Woodford et al. 2001) sintetizada de un gen de localización cromosómica, y OXA-49. La diferencia entre los componentes de este grupo oscila entre 2 y 5 aminoácidos.
- Grupo 2: el segundo grupo lo caracteriza OXA-24 (Bou, Oliver et al. 2000), expresadas mayoritariamente a partir de genes de localización cromosómica, aunque recientemente han aparecido plásmidos portadores del gen *bla<sub>oxa-24</sub>*. El resto de miembros del grupo lo componen OXA-25, OXA-26 (Afzal-Shah, Woodford et al. 2001), y OXA-72. Las diferencias entre estas enzimas se reducen a 5 aminoácidos en el mayor de los casos.
- Grupo 3: representado por OXA-58 (Poirel, Marque et al. 2005) y un mutante puntual de la misma, OXA-97 (Poirel, Mansour et al. 2008), ambas codificadas por genes de localización plasmídica.
- Grupo 4: incluye OXA-51 (Brown, Young et al. 2005), las oxacilinasas 64 a 66, 68 a 71 y 75 a 78 (Brown and Amyes 2005), (Heritier, Poirel et al. 2005) Es el grupo que presenta una mayor variación de secuencia, pudiendo ser de hasta 15 aminoácidos entre los miembros que lo componen. Resulta interesante destacar que los genes que codifican tanto para OXA-51 como para OXA-69 pueden formar parte intrínsecamente del genoma de *Acinetobacter baumannii*, aunque suelen encontrarse silentes.

La aparición en una cepa multirresistente de *A. baumannii* de una nueva OXA-carbapenemasa, OXA-143 (Higgins, Poirel et al. 2009), que presenta una homología del 88% con OXA-24, del 63% con OXA-23 y del 52% con OXA-58, podría dar lugar a la aparición de un nuevo grupo. Su principal característica es que su gen no es portado por ningún transposón o integrón, pero es adquirido por la bacteria mediante recombinación homóloga.

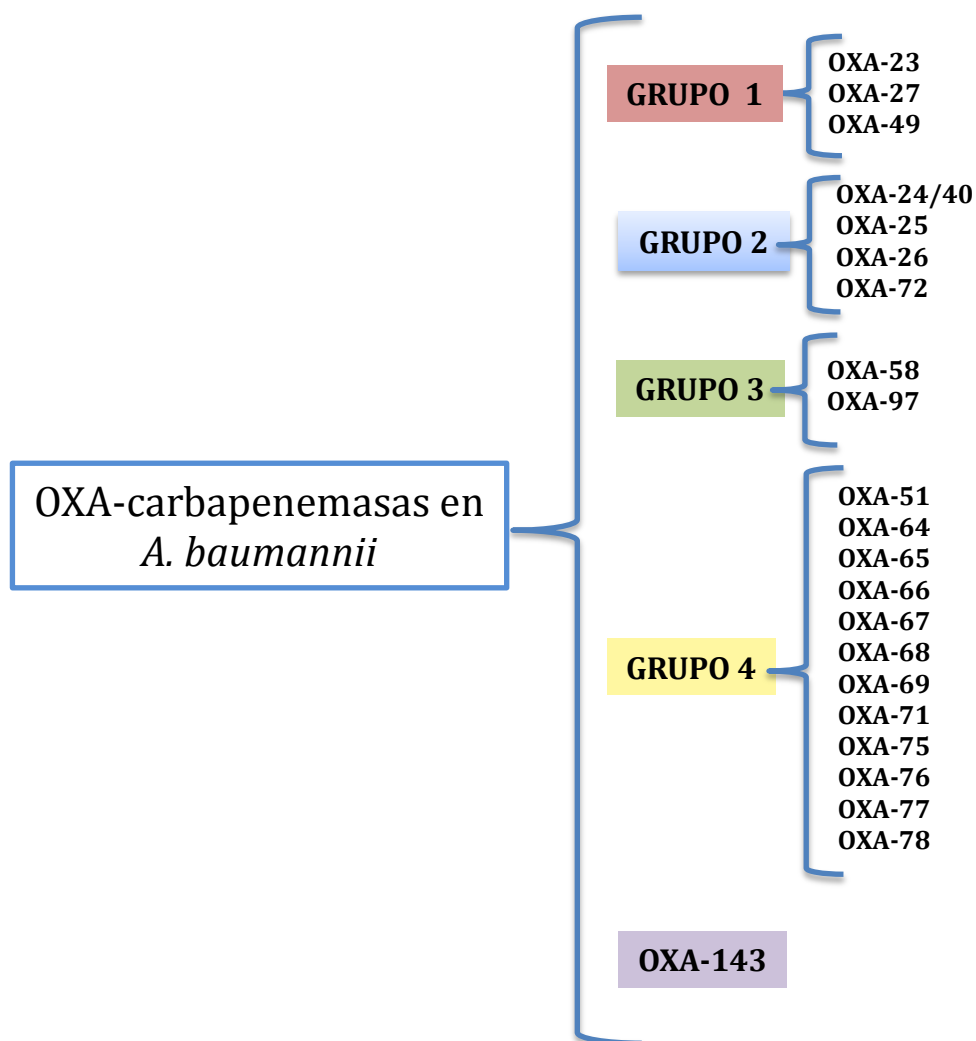


Figura 8. Resumen de las diferentes familias en las que se agrupan las carbapenemasas de clase D en *A. baumannii*.

Los grupos 1 al 4, descritos anteriormente, corresponden a OXA-carbapenemasas aisladas y descritas a partir de cepas multirresistentes de *A. baumannii*. Los grupos del 5 al 8, que se describen a continuación, corresponden a carbapenemasas de clase D presentes en otros organismos, preferentemente en los géneros *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Shewanella*.

- Grupo 5: compuesto por dos carbapenemasas del género *Shewanella*, OXA-55 (Heritier, Poirel et al. 2004) y OXA-SHE, de poca importancia clínica.
- Grupo 6: constituido por OXA-48 (Poirel, Heritier et al. 2004), aislada del patógeno oportunista *Klebsiella pneumoniae*, y OXA-54 (Poirel, Heritier et al. 2004), de *Shewanella oneidensis*, siendo la diferencia entre ambas de 20 aminoácidos.
- Grupo 7: corresponde a OXA-carbapenemasas identificadas en *Pseudomonas aeruginosa*, otro importante patógeno nosocomial. El miembro más representativo de este grupo es OXA-50 (Girlich,

Naas et al. 2004), siendo el resto de los miembros del grupo enzimas con variaciones comprendidas entre 1 y 5 aminoácidos ( OXA-50a, -50b, -50d, -50e).

- Grupo 8: en este grupo se incluyen las OXA-carbapenemasas aisladas de *Ralstonia pickettii*, un patógeno oportunista emergente. Esta familia está encabezada por OXA-60 (Girlich, Naas et al. 2004), mientras que el resto de los componentes son variantes de 1 hasta 21 residuos (- 60a, -60b, -60c, -60d).

Los alineamientos de las secuencias de las carbapenemasas de clase D con las oxacilinasas tradicionales muestran que se conservan los elementos estructurales característicos de las serin-betalactamasas en el centro activo. El motivo por el cual este grupo de oxacilinasas modificó entonces su perfil hidrolítico hasta adquirir actividad frente a antibióticos carbapenémicos fue la pregunta clave que condujo a la realización de este trabajo de Tesis. Así mismo, nos planteamos la posibilidad de que la respuesta constituyese un punto de partida para entender el mecanismo de acción de estas betalactamasas, pudiendo iniciar la búsqueda de una solución a los problemas que su aparición está causando en el tratamiento de graves infecciones hospitalarias.

#### **2.4 RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS EN *A. BAUMANNII*.**

Como ya hemos discutido anteriormente, las OXA-carbapenemasas, prácticamente exclusivas del género *Acinetobacter*, son la causa enzimática principal y más frecuente de la resistencia que presenta este patógeno a carbapenémicos (Brown and Amyes 2006). Si bien la presencia de estas enzimas resulta decisiva para la adquisición de resistencia a carbapenémicos en cepas multirresistentes de *A. baumannii* (Heritier, Poirel et al. 2005), existen otros mecanismos que contribuyen o confieren por sí mismos este fenotipo a este género (Poirel and Nordmann 2006).

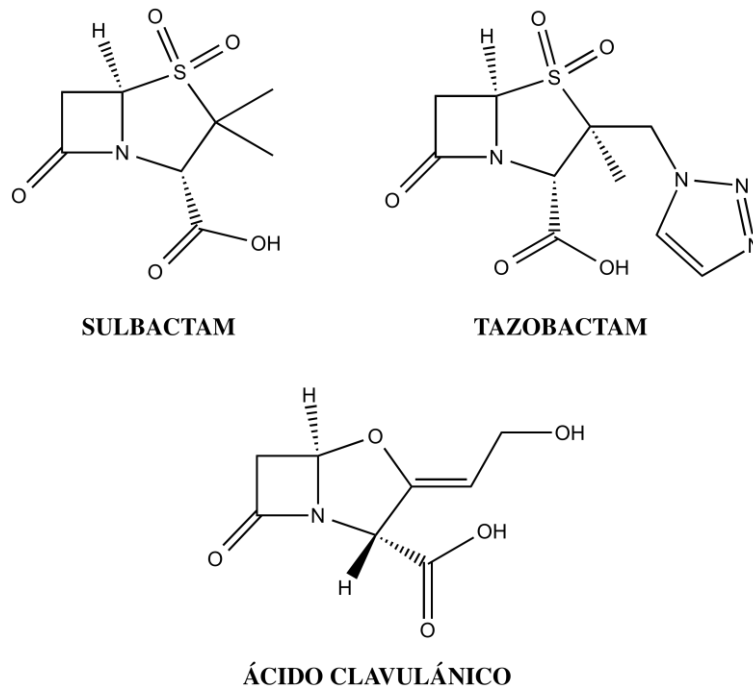
- Metallo- $\beta$ -lactamasas: Tres grupos de metalo-betalactamasas (VIM, IMP y SIM) han sido identificados en cepas multirresistentes de *A. baumannii*, aunque con una frecuencia muy baja y una escasa dispersión. Los genes que codifican dichas enzimas son adquiridos por la bacteria, embebidos en integrones de clase 1. Estas metalo-betalactamasas confieren un alto grado de resistencia frente a todos los betalactámicos, excepto el aztreonam, y no son inhibibles ni por clavulánico ni por tazobactam.
- Déficit en los canales de entrada: las porinas son las proteínas responsables de la permeabilidad de los betalactámicos a través de la membrana. La disminución de la expresión de porinas en cepas portadoras de carbapenemasas de clase D supone una

- permeabilidad reducida del antibiótico a través de la membrana y parece contribuir a la adquisición de resistencia. (Siroy, Molle et al. 2005), (Costa, Woodcock et al. 2000), (Bou, Cervero et al. 2000), (del Mar Tomas, Beceiro et al. 2005)
- Mecanismos de expulsión activa: La expresión constitutiva en algunas cepas de *A. baumannii* de la bomba de expulsión AdeABC del tipo RND (“Resistance-Nodulation-Division”), caracterizada por ser capaz de unir un gran número de moléculas químicas de distinta naturaleza, parece estar relacionada con un aumento de las CMI's frente a imipenem y meropenem, aunque su papel no está aún claramente descrito (Magnet, Courvalin et al. 2001).
  - Modificaciones en la expresión de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs): la expresión de PBPs con baja afinidad por el anillo betalactámico (24 kDa PBP), y que por tanto son difícilmente inactivables por este tipo de antibióticos, es un mecanismo que, aunque con poca frecuencia, puede encontrarse en cepas multirresistentes de *A. baumannii* (Fernandez-Cuenca, Martinez-Martinez et al. 2003). Del mismo modo, la baja expresión de la PBP 2 (73.2 KDa) puede contribuir de manera alternativa a la resistencia a carbapenémicos en presencia de carbapenemasas.

### 2.5 INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS.

Los inhibidores de betalactamasas utilizados actualmente en el ámbito clínico son moléculas de estructura química betalactámica con baja o nula actividad antibacteriana y que se unen de forma irreversible a las betalactamasas inactivándolas, de forma que no puedan interaccionar con el antibiótico. Su administración conjunta con el antibiótico lo protege frente a la hidrólisis por betalactamasas y aumenta significativamente su espectro de acción. Se comercializan tres inhibidores de betalactamasas: el ácido clavulánico, y dos sulfonas del ácido penicilánico, el sulbactam y el tazobactam (Drawz and Bonomo 2010).

El ácido clavulánico y el tazobactam presentan una actividad inhibitoria mayor frente a betalactamasas de clase A que frente a betalactamasas de clase C. El sulbactam, por el contrario, inhibe con mayor eficiencia las betalactamasas de clase C (Fig. 9). Además, el sulbactam presenta mayor actividad antibacteriana por su afinidad por la PBP 2.



**Figura 9. Estructura química de los inhibidores utilizados en la actualidad para inhibir la actividad de betalactamasas, preferentemente de clases A y C.**

El hecho de que ninguno de los inhibidores de betalactamasas comercializados actualmente sea capaz de bloquear de forma efectiva la actividad de las carbapenemasas de clase D, contribuye a agravar el déficit terapéutico que su expansión en el ámbito hospitalario está causando.

El diseño dirigido y racional de nuevos inhibidores, basado en los conocimientos aportados por el análisis de la estructura tridimensional de las enzimas es una estrategia creciente en el sector farmacéutico. Rastrear nuevos compuestos como posibles inhibidores de este tipo de betalactamasas y estudiar su mecanismo de acción en complejo con la carbapenemasa de clase D OXA-24, ha constituido otro de los objetivos planteados durante esta investigación.





# **OBJETIVOS**



### 3 OBJETIVOS

OXA-24 es una  $\beta$ -lactamasa aislada en el Hospital Ramón y Cajal de una cepa hospitalaria multirresistente de *A. baumannii* durante un brote epidemiológico. Atendiendo a su secuencia, OXA-24 pertenece a la familia de las  $\beta$ -lactamasas de clase D u oxacilinasas, caracterizadas por degradar preferentemente oxacilina, cloxacilina y meticilina a través de una serina catalítica. OXA-24, a diferencia de las oxacilinasas tradicionales, ha perdido su actividad hidrolítica frente a oxacilina mientras que ha adquirido la capacidad de hidrolizar antibióticos carbapenémicos. Dado que los alineamientos de secuencia con las oxacilinasas clásicas demuestran que los residuos catalíticos que componen el centro activo se encuentran muy conservados, la resolución de la estructura tridimensional, puede resultar clave para establecer el mecanismo de acción. De esta forma, podríamos explicar la adquisición de la especificidad por antibióticos carbapenémicos, lo que constituiría un punto de partida para el desarrollo de nuevos inhibidores.

Trabajando sobre esta hipótesis previa, los objetivos concretos de esta Tesis han sido los siguientes:

1. Establecer los mecanismos moleculares que determinan la actividad carbapenemasa de OXA-24, mediante la resolución y posterior análisis de su estructura tridimensional.
2. Llevar a cabo la búsqueda y el diseño racional de inhibidores de la actividad  $\beta$ -lactamasa de OXA-24 a partir de las conclusiones extraídas de su estructura.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 CLONAJE DE LAS PROTEÍNAS.

El clonaje del gen de la  $\beta$ -lactamasa OXA-24 en su forma nativa y el de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub>, OXA-24<sub>M223A</sub> y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub> en los vectores PAT-RA y pGEX-6p-1 se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del Hospital Juan Canalejo de La Coruña (Santillana, Beceiro et al. 2007).

#### 4.1.1 Clonaje del gen de OXA-24wt y de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub>, OXA-24<sub>M223A</sub> y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub> en el vector PAT-RA.

Para poder comprobar el efecto de la  $\beta$ -lactamasa OXA-24 y los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub>, OXA-24<sub>M223A</sub> y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub> sobre la resistencia a carbapenémicos en una cepa de *A. baumannii*, se clonaron los genes que codifican estas proteínas en el plásmido PAT-RA. Dicho vector permite expresar proteínas recombinantes en *A. baumannii* y en *E. coli* (Hunger, Schmucker et al. 1990).

El gen de la  $\beta$ -lactamasa OXA-24 se obtuvo mediante PCR a partir del genoma de la cepa RYC 52763/97 de *A. baumannii* (Bou, Oliver et al. 2000), utilizando como cebadores los oligonucleótidos OXA24Fow y OXA24Rev (Tabla 2).

Los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>M223A</sub> se generaron a partir del gen nativo en dos reacciones de PCR secuenciales (Ho, Hunt et al. 1989), utilizando como cebadores las siguientes combinaciones de oligonucleótidos: OXA24Fow/OXA24RevY112A y OXA24Rev/OXA24FowY112A para el mutante OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA24Fow/OXA24RevM223A y OXA24Rev/OXA24FowM223A para el mutante OXA-24<sub>M223A</sub> (Tabla 2).

El doble mutante OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub> se obtuvo a partir del gen mutante OXA-24<sub>Y112A</sub> en dos reacciones de PCR con los cebadores OXA24Fow/OXA24RevM223A y OXA24Fow/OXA24RevM223A (Tabla 2).

## MATERIALES Y METODOS

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR

<b>OXA24Fow</b>	5'- AAAGGATCCATGAAAAAATTTATACTTCC
<b>OXA24Rev</b>	5'- AAAGAATTCTTAAATGATTCCAAGATTTTC
<b>OXA24FowY112A</b>	5'- GGTA AAAAAGA AACTGCTCCTATGTGG
<b>OXA24RevY112A</b>	5'- CCACATAGGAGCAGTTCTTTTTTTACC
<b>OXA24FowM223A</b>	5'- GTGGATGGGGAGCGGGTGTACTCC
<b>OXA24RevM223A</b>	5'- GGAGTAACACCCGCTCCCATCCAC
<b>OXA24FowpGEX</b>	5'- AAGGATCCTCTATTAAACTAAATCTGAAG

Los productos de la amplificación se purificaron mediante electroforesis en geles de agarosa y posteriormente se clonaron en el vector pAT-RA (del Mar Tomas, Beceiro et al. 2005) entre los sitios de restricción *SmaI* y *EcoRI*.

Los plásmidos resultantes (Tabla 3) fueron introducidos por electroporación en *E. coli* TG1. Las colonias transformadas se seleccionaron en placas de LB-agar con ampicilina a una concentración de 40 mg/L. Finalmente, se comprobó la validez de los plásmidos recombinantes mediante secuenciación del ADN.

### 4.1.2 Clonaje del gen de OXA-24 y de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub>, OXA-24<sub>M223A</sub> y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub> en el vector pGEX-6p-1.

Los experimentos de cristalización requieren una gran cantidad de proteína con un elevado grado de pureza. Para lograr un método de expresión y purificación eficiente, se clonaron los genes de OXA-24 y los diferentes mutantes en el vector pGEX-6p-1 (Amersham). Dicho vector permite expresar las proteínas de interés como proteínas de fusión con GST (Glutation-Serin-Transferasa).

Se amplificaron los genes de OXA-24 y los mutantes por PCR a partir de las construcciones pAT-RA-OXA24<sub>WT</sub>, pAT-RA-OXA-24<sub>Y112A</sub>, pAT-RA-OXA-24<sub>M223A</sub> y pAT-RA-OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub>, utilizando como cebadores en todos los casos los oligonucleótidos OXA24FowpGEX / OXA24Rev. Los productos de PCR purificados y digeridos se introdujeron en el plásmido pGEX-6p-1 entre los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI*. Los plásmidos recombinantes (Tabla 3) se introdujeron en *E. coli* TG1 por electroporación y se seleccionaron las colonias que habían incorporado el plásmido mediante crecimiento sobre placas de LB-agar con ampicilina (40 mg/L). Los plásmidos resultantes se verificaron mediante secuenciación del ADN.



Tabla 3: Plásmidos

VECTOR	CARACTERÍSTICAS	CEPA EXPRESIÓN	PLÁSMIDOS RECOMBINANTES
pAT-RA	ApR, Promotor del gen de la lactamasa CTX-M-14	<i>E. coli</i> TG1, <i>A. baumannii</i> JC7/04	pAT-RA-OXA24 <sub>WT</sub> , pAT-RA-OXA-24 <sub>Y112A</sub> , pAT-RA-OXA-24 <sub>M223A</sub> , pAT-RA-OXA-24 <sub>Y112A/M223A</sub>
pGEX-6p-1	ApR, Promotor tac, sistema de represión lacIq,	<i>E. coli</i> BL21	pGEX-OXA24 <sub>WT</sub> , pGEX-OXA-24 <sub>Y112A</sub> , pGEX-OXA-24 <sub>M223A</sub> , pGEX-OXA-24 <sub>Y112A/M223A</sub>

## 4.2 ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Las cinéticas enzimáticas y las determinaciones de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) fueron llevadas a cabo en el laboratorio de Microbiología del Hospital Juan Canalejo de La Coruña (Santillana, Beceiro et al. 2007).

### 4.2.1 Ensayos cinéticos.

Se realizaron diferentes ensayos para determinar los parámetros cinéticos ( $k_{cat}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}/K_m$  y  $V_m$ ) de las reacciones de hidrólisis de OXA-24 y los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub> frente a los antibióticos oxacilina, ampicilina, meropenem e imipenem, utilizando procedimientos previamente descritos (Hujer, Hamza et al. 2005).

Los experimentos se realizaron a 25°C en un espectrofotómetro Nicolette Evolution 300 (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) utilizando cubetas de cuarzo con un paso óptico de 0.2 cm. Los experimentos se realizaron por triplicado en tampón PBS con BSA a una concentración de 20 mg/L.

Los valores de  $K_m$  fueron calculados como valores de  $K_i$  en ensayos de competición con nitrocefina. La  $V_{max}$  se calculó a partir de la ecuación de Michaelis–Menten considerando una concentración de antibiótico seis veces la  $K_m$ . Debido a que la cloxacilina presenta valores muy altos de  $K_m$ , la  $V_{max}$  se calculó asumiendo una reacción de primer orden con concentraciones de cloxacilina entre 100 y 400  $\mu$ M (Santillana, Beceiro et al. 2007).

### 4.2.2 Determinación de las CMI.

Para estudiar el efecto sobre la resistencia a antibióticos carbapenémicos de OXA-24 nativa y los distintos mutantes, utilizamos la cepa clínica JC7/04 de *A.*

## MATERIALES Y METODOS

*baumannii* sensible a carbapenemas transformada con los plásmidos recombinantes pAT-RA/OXA-24<sub>WT</sub>, pAT-RA/OXA-24<sub>Y112A</sub>, pAT-RA/OXA-24<sub>M223A</sub> y pAT-RA/OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub>.

La determinación de los perfiles de susceptibilidad y de los valores de CMI<sub>s</sub> frente a los antibióticos piperacilina, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina, aztreonam, imipenem, meropenem y ampicilina se realizó mediante tiras E test (ABBIODISK, Solna, Sweden) y ensayos de microdilución siguiendo los criterios de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards 2003).

### **4.3 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE OXA-24 Y LOS MUTANTES OXA-24<sub>Y112A</sub> Y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub>**

#### **4.3.1 Expresión.**

OXA-24 y sus mutantes se expresaron en el sistema pGEX-6p-1/*E. coli* BL21 (GST Gene Fusion System, Amersham) como proteínas de fusión con GST.

Los plásmidos recombinantes fueron transformados en la cepa de expresión *E. coli* BL21 mediante electroporación con un electroporador MicroPulser (Eppendorf) a un voltaje de 3.5 Kv durante 5 ms. Para realizar la transformación se mezclaron 100 ng de ADN con 80  $\mu$ l de células de expresión. Tras el choque eléctrico, las células se recuperaron en 1 ml de medio LB durante 1 hora a 37°C. Las células transformadas se seleccionaron en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina (40 mg/L).

Para la expresión de las proteínas en células *E. coli* BL21 se inoculó un cultivo de 500 ml de LB suplementado con 20 mg de ampicilina a una D.O.<sub>600nm</sub> inicial de 0.15 y se incubó a 37°C con agitación (250 r.p.m.) en un incubador orbital New Brunswick Scientific Company. Cuando el cultivo alcanzó una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.7 se añadió IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.8 mM para inducir la expresión.

Transcurridas 18 horas a 37°C con agitación, se centrifugó el cultivo a 8275 g y 4°C durante 5 minutos. Las células decantadas se resuspendieron en 50 ml de tampón TRIS 50 mM pH=7, 150 mM NaCl, 1mM DTT, 5mM EDTA y se lisaron por sonicación en hielo. El lisado se centrifugó a 4°C durante media hora a 142413 g en una ultracentrifuga preparativa (XL100 de Beckman) y se recogió el sobrenadante, que contenía la proteína de fusión soluble.

#### **4.3.2 Purificación.**

Las proteínas de fusión expresadas se purificaron mediante una cromatografía de afinidad con una columna de glutation-sepharosa a la que la proteína GST se une con gran afinidad. La cromatografía se realiza en un equipo para FPLC ÄKTAprime (Amersham Biosciences).

En una columna de glutation-sepharosa GSTrap FF (Amersham Biosciences) de 5ml, equilibrada con tampón TRIS 50 mM pH=7, 150 mM NaCl, 1mM DTT y 5mM EDTA, se carga el extracto que contiene la proteína de fusión soluble a un flujo de 1ml/min. Una vez que eluyen todos los contaminantes y la absorbancia recupera el nivel basal, se extrae la proteína de fusión retenida en la columna añadiendo 10 mM de glutation reducido al tampón en el que hemos cargado la muestra. La fracción en la que eluye la proteína se detecta mediante la medición de la absorbancia a 280 nm y se analiza su pureza mediante electroforesis en geles SDS-PAGE.

Para separar OXA-24 y sus mutantes de la proteína GST se realiza una digestión con la proteasa PreScission (Amersham), con una relación de concentraciones proteasa/proteína de fusión de 1/50. El corte se lleva a cabo a 4°C durante toda la noche mientras se dializa la muestra frente a TRIS 50 mM pH=7, 150 mM NaCl, 1mM DTT y 5mM EDTA para eliminar el glutation reducido. La eficiencia del corte se analiza mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE.

Para recuperar OXA-24 y los mutantes se realiza una nueva cromatografía en una columna de glutation-sepharosa siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. La proteasa, la proteína GST y la proteína de fusión no digerida quedan unidas a la resina, mientras que OXA-24 o sus mutantes eluyen en la fracción que no se retiene.

#### **4.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.**

##### **4.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.**

Para determinar la pureza de las muestras se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS (condiciones desnaturizantes), utilizando el sistema de cubetas Mini-PROTEAN (BIO-RAD) y una fuente PowerPac Basic (BIO-RAD).

Las electroforesis se llevaron a cabo con tampón Tris-HCl 25mM, glicina 192mM y SDS al 0.1% a temperatura ambiente y a una corriente constante de 50 mA. Previamente, las muestras se hirvieron 3 minutos en presencia de tampón de carga (Tris-HCl 62.5mM pH=6.8, 2% de SDS, 5% de DTT, 10% de glicerol y azul de bromofenol 0.01%). Para teñir el gel y visualizar las bandas de proteína se utilizó una solución de teñido con 10% de etanol, 5% de ácido acético y 0.005% de azul de coomassie R-250.

Se utilizó un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BIO-RAD) para determinar el tamaño de las bandas.

### 4.4.2 Determinación de la concentración de proteína mediante espectroscopía UV-visible.

La concentración de las proteínas se determinó mediante espectroscopia UV-visible utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453 (Eppendorf). Los espectros se realizaron a temperatura ambiente entre las longitudes de onda de 250 y 320 nm en cubetas UVette (Eppendorf) de 0.2-1 cm de paso óptico. Los coeficientes de extinción molar se calcularon introduciendo las secuencias primarias de las proteínas en la herramienta ProtParam del servidor ExpASY ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

### 4.4.3 Ensayos de ultracentrifugación analítica.

Las técnicas de ultracentrifugación analítica (velocidad y equilibrio de sedimentación) permiten determinar el tamaño, el estado de asociación, la forma aproximada y la homogeneidad de macromoléculas en solución.

Los experimentos se realizaron con una ultracentrífuga analítica Beckman Coulter Optima XL-I, equipada con un sistema de detección de absorbancia UV-VIS y un sistema de medida del índice de refracción. Se utilizó un rotor An-Ti50 y celdas de medida de doble sector con un paso óptico de 12 mm.

#### 4.4.3.1 Equilibrio de sedimentación.

En los experimentos de equilibrio de sedimentación las moléculas son sometidas a campos centrífugos bajos hasta que alcanzan la condición de equilibrio (se igualan las fuerzas de centrifugación y de difusión). Las especies macromoleculares se distribuyen formando un gradiente de concentración que, una vez alcanzado el equilibrio, no varía con el tiempo. Este gradiente es dependiente únicamente de la masa molecular. El equilibrio de sedimentación permite determinar la masa molecular y realizar análisis cuantitativos (estequiometría, afinidad y reversibilidad) de la formación de complejos macromoleculares en disolución.

Mediante un experimento de equilibrio de sedimentación a 20°C se determinó el estado de asociación de OXA-24. Para ello se prepararon dos muestras de 80 µl de proteína pura a 0.2 y 0.5 mg/ml en TRIS 50mM pH=7, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, y se centrifugaron a 12000, 15000 y 40000 r.p.m. Siguiendo el mismo procedimiento se determinó también el estado de asociación del doble mutante OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub>.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa HeteroAnalysis (Cole 2004).

#### 4.4.3.2 Velocidad de sedimentación

La velocidad de sedimentación es un método hidrodinámico en el que las moléculas son sometidas a un campo centrífugo elevado que genera una fuerza mucho mayor que la de difusión. De esta forma, se produce un desplazamiento (sedimentación) de las moléculas hacia el fondo de la celda en función de su tamaño y de su forma. Los experimentos de velocidad permiten determinar la homogeneidad de una muestra y separar las macromoléculas presentes en función de sus coeficientes de sedimentación (una función de la masa, la densidad y la forma). A partir del coeficiente de sedimentación se pueden estimar también la forma y la masa molecular.

Para comprobar la homogeneidad de las preparaciones de las proteínas OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub> se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación a 20°C y 50000 r.p.m, utilizando el mismo tampón descrito para los experimentos de equilibrio de sedimentación.

Para calcular el coeficiente de sedimentación se utilizó el método c(s) del programa SEDFIT (Schuck 2000; Schuck, Perugini et al. 2002).

#### 4.5 **DETERMINACIÓN DE MODELOS ESTRUCTURALES MEDIANTE CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X.**

La estructura molecular de una proteína define sus propiedades y su función. Estudiar a nivel atómico los detalles de las interacciones y la organización intramolecular de una proteína es importante para comprender su mecanismo de acción, y esencial para el diseño racional de fármacos.

La cristalografía de rayos X es una técnica basada en irradiar un cristal de la molécula de interés con un haz intenso y focalizado de rayos X. La interpretación de los patrones que se obtienen de la difracción del cristal permite reconstruir, mediante cálculos basados en la Transformada de Fourier, la densidad electrónica de la molécula. Sobre esta densidad se modela la estructura atómica en un proceso iterativo denominado refinado. La obtención de un cristal adecuado para los experimentos de difracción es, por tanto, un requisito indispensable y, a menudo, difícil de conseguir.

Un cristal es un entramado ordenado de moléculas que interactúan entre sí mediante fuerzas no covalentes según un modelo de repetición periódica en tres dimensiones. Multitud de variables afectan a la formación del cristal, aunque resultan especialmente importantes los parámetros relacionados con la estabilidad y/o solubilidad de la proteína. De este modo, la temperatura, el pH, la concentración de proteína, y los componentes químicos de la solución de cristalización son claves en el proceso. Las diferentes combinaciones de todos estos parámetros hasta encontrar la condición de cristalización específica supone un gran desafío experimental.

Durante el desarrollo de esta Tesis se utilizó como técnica de cristalización la difusión de vapor. Dicha técnica consiste en mezclar un pequeño volumen de solución de proteína (0.1-1  $\mu$ l) con el mismo volumen del agente precipitante. Estas gotas se colocan en placas de cristalización frente a un volumen mayor de la solución de cristalización (50- 200  $\mu$ L) y el sistema se cierra herméticamente. La diferencia en la concentración de precipitante entre el reservorio y la gota genera una presión de vapor mayor en la gota, lo que obliga a que vaya perdiendo agua de forma gradual hasta que se alcanza el equilibrio. De esta manera, se genera en la gota una sobresaturación que disminuye la solubilidad de la proteína y favorece su precipitación, dando lugar, idealmente, a la aparición de núcleos a partir de los cuales crece el cristal (Rhodes 1993).

### 4.5.1 Recogida de datos

El cristal expuesto a una fuente de radiación X experimenta un gran deterioro debido a los daños provocados por los radicales libres. Una manera de reducir la reactividad de los radicales libres y disminuir los daños que se producen en el cristal es llevar a cabo una protección criogénica o enfriamiento rápido del cristal hasta unos 100-110 K (Garman 2003). También se realiza la recogida de datos a dicha temperatura. Para evitar la formación de hielo, ya que la mayoría de las soluciones de cristalización son de carácter acuoso, se utiliza una solución crioprotectora formada por la solución de cristalización y un protector criogénico (por ejemplo, glicerol, etilén glicol o polietilén glicol). Al estar embebido en la solución criogénica, el cristal queda protegido en una estructura vítrea que lo mantiene estable (Garman and Owen 2007).

Dado que los átomos se disponen de forma periódica y ordenada en el cristal, parte de la radiación X dispersada se combina (interacción constructiva) en determinadas direcciones dando lugar a patrones de difracción característicos. Cada reflexión, representa la difracción de un conjunto de planos equivalentes y paralelos del cristal que son representados por tres números, hkl, denominados índices de Miller. La intensidad de cada una de estas difracciones es registrada en el detector. Durante la recogida de datos, el cristal se rota perpendicularmente al haz de radiación para recoger el mayor número de reflexiones únicas posible. El ángulo de rotación elegido depende de las características y la simetría del cristal (Doublie 2007).

### 4.5.2 Procesamiento de datos

Al rotar el cristal, una misma reflexión puede recogerse en varias imágenes, además de existir reflexiones equivalentes debido a la simetría del cristal. Por ello, resulta fundamental procesar los datos, de forma que la información para cada una de las reflexiones quede reducida a la intensidad de cada reflexión única y al

error experimental asignado a la medida. La reducción de los datos comprende varias etapas (Rupp 2010):

- Indexado: se asignan los índices de Miller,  $hkl$ , a cada reflexión y se determinan los valores de los ejes y ángulos de la celdilla unidad (elemento de simetría mínimo en el cristal), así como el grupo espacial.

- Integración de la intensidad de las reflexiones: se agrupan las intensidades de las reflexiones medidas más de una vez, a la vez que se descartan aquellas reflexiones cuya intensidad es débil o no puede estimarse de manera fiable.

- Escalado: Las intensidades de la reflexiones recogidas durante un experimento no se encuentran en la misma escala debido fundamentalmente al deterioro paulatino que sufre el cristal al ser irradiado. El escalado ajusta los valores a una misma escala numérica, de forma que se puedan combinar. Además, se analizan y aúnan las reflexiones equivalentes relacionadas por simetría para llevar a cabo una asignación definitiva del grupo espacial.

Para el procesamiento de los datos de difracción recogidos en esta Tesis, se utilizaron los programas Mosflm /imosflm para el indexado y el integrado (Leslie 2006), y SCALA (Evans 2006) para la fase de escalado.

Como resultado final del procesamiento de los datos, obtenemos una lista de reflexiones únicas y sus intensidades correspondientes escaladas, además de sus errores asociados. En este punto, conviene valorar la calidad de los datos, que va a estar directamente relacionada con la calidad del mapa de densidad electrónica que se calculará a partir de ellos. Para ello, se presta especial atención al parámetro de correlación  $R_{merge}$  obtenido del programa SCALA, que nos informa del grado de concordancia entre todas las reflexiones relacionadas por operaciones de simetría y de la calidad de los datos adquiridos.

$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

donde  $I_i(hkl)$  es la intensidad de la reflexión  $hkl$  y  $\langle I(hkl) \rangle$  es la intensidad media de todas las observaciones  $i$  de la reflexión  $hkl$ .

A continuación, para llevar a cabo el cálculo de los mapas de densidad electrónica, las intensidades deben transformarse a Factores de estructura, necesarios para el cálculo del mapa de densidad electrónica. El módulo del factor de estructura está relacionado directamente con la intensidad experimental, de forma que:

$$|F| \sim \sqrt{I}$$

El factor de estructura para una reflexión  $hkl$  ( $F_{hkl}$ ) representa la asociación de las ondas individuales resultantes de la difracción de todos los átomos de la celdilla unidad para dicha reflexión.

### 4.5.3 Determinación de las fases experimentales

La densidad electrónica en cada punto del espacio de la celdilla unidad  $\rho(x,y,z)$  está relacionada con los factores de estructura  $F$  a través de la Transformada de Fourier, donde  $\rho(x,y,z)$  es la densidad en cada punto del espacio,  $xyz$ ,  $|F|$  el módulo del factor de estructura correspondiente al índice de Miller  $hkl$ ,  $V$  el volumen de la celdilla unidad y  $\Phi$  la fase asociada a cada reflexión.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl}^{+\infty} |F(hkl)| \cdot e^{-2\pi i[hx+ky+lz-\phi(hkl)]}$$

Transformada de Fourier

Por lo tanto, para la construcción del mapa de densidad electrónica, es necesario conocer los factores de estructura  $F_{hkl}$ , y el ángulo de fase para cada reflexión ( $\Phi_{hkl}$ ). Los factores de estructura  $F_{hkl}$  se determinan de las medidas experimentales, ya que son proporcionales a la raíz cuadrada de las intensidades. La relación de fases entre las ondas difractadas, sin embargo, no puede calcularse a partir del patrón de difracción de la proteína. A esta particularidad se la conoce como “Problema de las Fases” en cristalografía (Rupp 2010) Dado que la fase de cada reflexión es imprescindible, resulta fundamental determinarla, para lo cual se utilizan diferentes aproximaciones:

-Cálculo experimental de fases: El procedimiento más común para el cálculo experimental de fases consiste en obtener un cristal derivado incorporando un átomo pesado y utilizar su dispersión anómala. Ello produce un cambio de intensidad medible en el patrón de difracción que puede ser utilizado como referencia.

-Reemplazamiento Molecular: Consiste en calcular las fases iniciales a partir de las fases determinadas para un modelo estructural previamente resuelto de gran semejanza (normalmente con una homología en secuencia superior al 30%). Para ello es necesario posicionar correctamente el modelo que sirve de referencia en la celdilla unidad mediante operaciones de rotación y translación, hasta que se obtenga una buena concordancia entre los datos de difracción del modelo referencia y los datos de difracción del modelo desconocido que se quiere resolver. Las estructuras presentadas en esta Tesis han sido determinadas mediante este método.

### 4.5.4 Obtención y refinamiento del modelo

Una vez calculados los mapas con la densidad electrónica experimental, se inicia la construcción y ajuste del modelo a dicha densidad. El modelado se realiza manualmente utilizando programas gráficos (Coot (Emsley and Cowtan 2004) o Turbo-Frodo (Roussel 1989)).



Sin embargo, para optimizar el ajuste del modelo, es necesario realizar varios ciclos de refinamiento, intercalándolos al proceso de modelado. Estos ciclos de refinamiento introducen restricciones sobre las distancias de los enlaces, los ángulos etc., de forma que se minimice el error entre los valores teóricos y los calculados a partir de los datos experimentales. Además, los ciclos de refinado permiten determinar el factor de vibración térmico  $B$ , una aproximación de la vibración del átomo con respecto a su posición central. Valores elevados en los factores  $B$  de los átomos de un modelo suelen indicar desorden o movilidad dentro del cristal, y por tanto una densidad electrónica poco definida para esa posición (Doublíé 2007).

En este trabajo, se utilizaron los programas CNS (Brünger, Adams et al. 1998) y *Refmac* (Collaborative Computational Project number 4 1994) para realizar el refinamiento.

#### 4.5.5 Validación del modelo

Para valorar la fiabilidad del modelo construido, se utilizan indicadores obtenidos de los programas de refinado, como el *factor R*. Este parámetro refleja la convergencia entre los datos observados y los calculados para un modelo teórico hipotético, de forma que un valor bajo indica que el modelo experimental construido se ajusta bien a los parámetros teóricos para dicho modelo. El *factor R* establece la diferencia relativa entre los factores de estructura  $F_{\text{obs}}$  (observados) y  $F_{\text{calc}}$  (calculados para un modelo teórico), y se determina según la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\sum_{hkl} [|F_{\text{obs}}(hkl)| - |F_{\text{calc}}(hkl)|]}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}(hkl)|}$$

donde " $F_{\text{obs}}(hkl)$ " es el factor de estructura observado en las difracciones y " $F_{\text{calc}}(hkl)$ " es el factor de estructura calculado de forma teórica a partir del modelo.

Aunque el *factor R* depende en gran medida de la resolución, para macromoléculas se consideran aceptables valores finales entre el 15 y el 25%.

Asociado al *factor R*, se calcula el *factor "Rfree"*, un *factor R* calculado a partir de reflexiones que no se incluyen en el refinamiento (normalmente entre un 5 y un 10%). Grandes divergencias entre los valores de  $R$  y  $R_{\text{free}}$  reflejan una discordancia entre el modelo construido y los datos experimentales e indican que el modelo final no es fiable.

Como paso final es necesario verificar que todos los parámetros geométricos, referentes a longitud, distancias y ángulos de enlaces se encuentran en rangos razonables, sin desviaciones significativas a lo establecido. Para los modelos estructurales descritos en esta Tesis, se utilizó el programa PROCHECK (Laskowski, MacArthur et al. 1993).

### 4.6 ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN.

#### 4.6.1 Cristalización de OXA-24 y los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub>

##### 4.6.1.1 *Ensayos de cristalización iniciales*

Para la búsqueda de las condiciones de cristalización se utilizaron las siguientes soluciones comerciales:

WIZARD I, II, III (Emerald Biosciences)

OZMA PEG-1K, 4K, 8K, 10K (Emerald Biosciences)

CUSTOM I, II, IV, V (Axygen Biosciences),

CLASSIC 1 - 10 (Jena Bioscience)

Crystallization Cryo Kit (SIGMA)

Crystallization Kit for DNA (SIGMA)

Crystallization Kit for Protein-Protein Complexes (SIGMA)

Crystallization Low Ionic Strength Kit (SIGMA)

Crystallization PEG Grid Screening Kit (SIGMA)

Crystal screen I, II (Hampton Research)

INDEX (Hampton Research)

Las soluciones de proteínas, en tampón Tris 50mM pH=7, 150mM NaCl, 1mM EDTA y 1mM DTT, se concentraron hasta 8 mg/ml en una centrífuga Eppendorf 5810R utilizando filtros VivaSpin 10 K (Vivascience).

La técnica de cristalización empleada fue la de difusión de vapor en gota sentada y los ensayos se realizaron manualmente y/o utilizando un robot de cristalización "Cartesian MicroSys synQUAD" (Genomic solutions).

Con el robot de cristalización se dispensaron gotas de 0.4  $\mu$ l (0.2  $\mu$ l de solución de proteína + 0.2  $\mu$ l de solución de cristalización) en placas de cristalización de 96 pocillos MRC (Swissci) con 75  $\mu$ l de solución de cristalización en el reservorio.

Manualmente se pipetearon gotas de 2  $\mu$ l (1  $\mu$ l de solución de proteína + 1  $\mu$ l de solución de cristalización) en placas Cryschem (Hampton Research) de 24 pocillos añadiendo 300  $\mu$ l de solución de cristalización al reservorio.

Las placas se mantuvieron en una cámara de cristalización a una temperatura de 22°C.

#### 4.6.1.2 Optimización de los cristales

Las condiciones iniciales de cristalización se pueden optimizar para conseguir cristales de mayor calidad y tamaño. Para ello se siguieron diferentes estrategias.

a) Ajustar los parámetros de las soluciones de cristalización iniciales. Tomando como base las condiciones iniciales en las que se ha obtenido material cristalino, se variaron algunos factores (la concentración de precipitante o el pH) y se probaron distintas proporciones entre la solución de proteína y la solución de cristalización en la composición de las gotas.

Estos ensayos para la optimización de cristales se pusieron manualmente con las técnicas de difusión de vapor tanto en gota colgante como en gota sentada utilizando placas de 24 pocillos Linbro y Cryschem (Hampton Research) respectivamente. Las gotas estaban compuestas por 1 µl de solución de proteína + 1 µl de solución de cristalización y se equilibraron frente a 500 µl (gota colgante) o 300 µl (gota sentada) de solución de cristalización situada en el reservorio.

b) Utilización de aditivos. Se añadieron a las gotas de cristalización soluciones comerciales de diferentes compuestos químicos (“Additive Screen 1, 2 y 3” y “Detergent Screen 1, 2 y 3”, de Hampton Research) que modifican sus propiedades físico-químicas, pudiendo favorecer el crecimiento de los cristales. El aditivo se incorporó a la gota siguiendo los protocolos indicados por la casa comercial. Estos experimentos se realizaron en placas de 24 pocillos Cryschem (Hampton Research).

c) Sembrado de micro- /macro- cristales (micro-/macro- “seeding”). Para el sembrado de microcristales se tocaron con un pelo de gato cristales muy pequeños obtenidos en los ensayos de cristalización iniciales. De esta forma, los núcleos cristalinos se depositan en una nueva gota que contiene la solución de proteína y la solución de cristalización, previamente equilibradas. Para el sembrado de macrocristales se cogieron los cristales pequeños enteros con un lazo de nylon y, tras lavarlos introduciéndolos en una gota limpia de solución de cristalización, se depositaron en otra gota formada por solución de proteína y solución de cristalización.

En ambos casos las gotas se equilibraron a 22°C mediante difusión de vapor en gota sentada empleando placas Cryschem (Hampton Research) de 24 pocillos con 300 µl de solución de cristalización en el reservorio.

#### 4.6.2 Cristalización de los complejos OXA-24 / inhibidores del tipo penema sulfónica.

Para la obtención de cristales de los complejos de OXA-24 con los distintos inhibidores se utilizaron dos métodos:

## MATERIALES Y METODOS

Co-cristalización: se realizaron ensayos de cristalización con una mezcla de solución de proteína a 6 mg/ml y de solución de inhibidor. Se ensayaron diferentes relaciones proteína/inhibidor (1:1, 1:2).

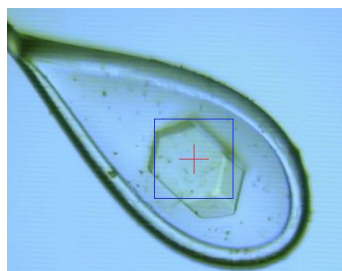
Los ensayos se realizaron manualmente en placas de 24 pocillos Cryschem (Hampton Research).

Difusión del inhibidor (*soaking*): se equilibró durante toda la noche una gota formada por una mezcla de la solución en la que cristaliza OXA-24 con una solución del inhibidor. En la gota ya equilibrada se depositó un cristal de OXA-24 y se dejó incubando. Se combinaron distintos tiempos de incubación y diferentes concentraciones de inhibidor en la gota hasta encontrar unas condiciones en las que el cristal incorporaba el inhibidor sin sufrir daños (Bou, Santillana et al.).

### 4.7 VITRIFICACIÓN DE LOS CRISTALES.

Para minimizar los daños que la radiación produce sobre el cristal durante la recogida de datos se llevó a cabo una protección criogénica o enfriamiento rápido del cristal a 100-110 K (Garman 2003). Para evitar la formación de cristales de hielo se utilizó una solución crioprotectora, en la que se añade a la solución de cristalización un porcentaje determinado de un protector criogénico (glicerol, etilenglicol o polietilenglicol). Al ser congelado, embebido en la solución criogénica, el cristal queda envuelto en una estructura vítrea que lo mantiene estable (Garman and Owen 2007).

Para su vitrificación, los cristales fueron transferidos a la solución crioprotectora y montados en lazos de nailon (Hampton Research) que se sumergieron en nitrógeno líquido donde se conservaron hasta la realización de los experimentos de difracción (Fig. 10). Durante la recogida de datos, los cristales se mantuvieron a 100 K bajo un flujo de nitrógeno.



**Figura 10. Lazo de nailon (“loop”) que sostiene el cristal vitrificado durante los experimentos de difracción.**

## 4.8 RESOLUCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS

### 4.8.1 Recogida de datos y procesamiento de las imágenes

La calidad de los cristales se testó en un ánodo rotatorio Enraf-Nonius FR 591 (Bruker) equipado con un detector de área "Image Plate" Mar Research 345 (MarResearch, RFA).

La recogida de los datos de difracción empleados para la resolución de las estructuras se llevó a cabo utilizando una fuente de radiación de sincrotrón en las líneas ID14-1, ID14-4 y BM16 del ESRF ("European Synchrotron Radiation Facility", Grenoble, Francia).

Los datos se recogieron mediante el método de rotación, en el que el cristal se gira alrededor de un eje perpendicular al haz de rayos X. Con dos imágenes se determinó la simetría del cristal y los parámetros reticulares para proceder a la recogida de datos midiendo el mayor número de reflexiones únicas posibles. El ángulo de rotación se selecciona en función de las dimensiones de la celdilla unidad, de la mosaicidad del cristal y de la resolución.

Para la reducción de los datos se empleó el paquete informático CCP4 suite (Collaborative Computational Project number 4 1994) como se detalla a continuación:

- Para el cálculo de los parámetros de la celdilla unidad y el grupo espacial (indexado) y para el integrado de las imágenes se utilizó el programa informático MOSFLM (Leslie 2006).

- El escalado de las intensidades y el promediado de las reflexiones se realizó con el programa SCALA (Evans 2006). Este programa efectúa un análisis estadístico de todos los datos y proporciona un diferentes parámetros, que nos permiten estimar el grado de concordancia entre todas las reflexiones relacionadas por operaciones de simetría y la calidad de los datos adquiridos.

- La transformación de las intensidades (I) de cada reflexión en factores de estructura (F) se llevó a cabo utilizando el programa TRUNCATE.

### 4.8.2 Cálculo de las fases.

Para calcular las fases que permitiesen determinar la estructura de la  $\beta$ -lactamasa OXA-24 se utilizó la técnica de reemplazamiento molecular, usando como modelo la estructura de la  $\beta$ -lactamasa OXA-10 (identificador PDB 1FOF)(Paetzel, Danel et al. 2000), que presenta un 33% de homología de secuencia con OXA-24.

Los cálculos para llevar a cabo el reemplazamiento molecular se realizaron con el conjunto de programas AMoRe (Navaza 1994).

La resolución de las estructuras de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub> se realizó mediante un reemplazamiento molecular en el que se

tomaron como modelo las coordenadas de la OXA-24 nativa y se utilizó el programa Molrep del paquete CCP4 (Collaborative Computational Project number 4 1994) para realizar los cálculos.

Para la resolución de las estructuras de OXA-24 acomplejada con distintos inhibidores se utilizó la técnica denominada "Difference Fourier" a partir de las coordenadas de la proteína nativa OXA-24.

### 4.8.3 Construcción, refinamiento y validación.

Para la construcción del modelo a partir de los mapas de densidad electrónica de las estructuras de OXA-24 nativa y unida a diferentes inhibidores se utilizó la herramienta gráfica Turbo-Frodo (Roussel 1989) en estaciones Silicon Graphics. En el caso de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>Y112A/M223A</sub> se utilizó el programa Coot (Emsley and Cowtan 2004). Estos programas permiten modificar y acoplar la cadena polipeptídica a la densidad electrónica. Para ajustar el modelo a los datos experimentales se realizaron varios ciclos de refinamiento utilizando el programa Refmac5 (Murshudov, Vagin et al. 1997) y el paquete de programas CNS (Brünger, Adams et al. 1998). Las diferentes fases de refinamiento se intercalaron con ajustes sobre el mapa de densidad electrónica realizados con Coot y Turbo-Frodo.

Para verificar la calidad final de la estructura construida se comprobó la validez de diferentes parámetros estereoquímicos (ángulos y longitud de enlace, ángulos de torsión, contactos interatómicos, etc) utilizando el programa PROCHECK (Laskowski, MacArthur et al. 1993). Mediante el diagrama de Ramachandran (Ramachandran and Sasisekharan 1968) (Kleywegt and Jones 1996) se localizaron y corrigieron aquellos residuos que presentaban ángulos de torsión  $\phi$  y  $\psi$  desviados de las conformaciones permitidas entre los ángulos diédricos de la cadena principal. Otros parámetros como las conformaciones de las cadenas laterales de los residuos (rotámeros), el análisis de las aguas modeladas en la estructura o las distancias y contactos entre átomos se revisaron con diferentes herramientas incluidas en el programa Coot y el programa WHAT\_IF (Hoofstede, Vriend et al. 1996) (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>).

# **RESULTADOS**

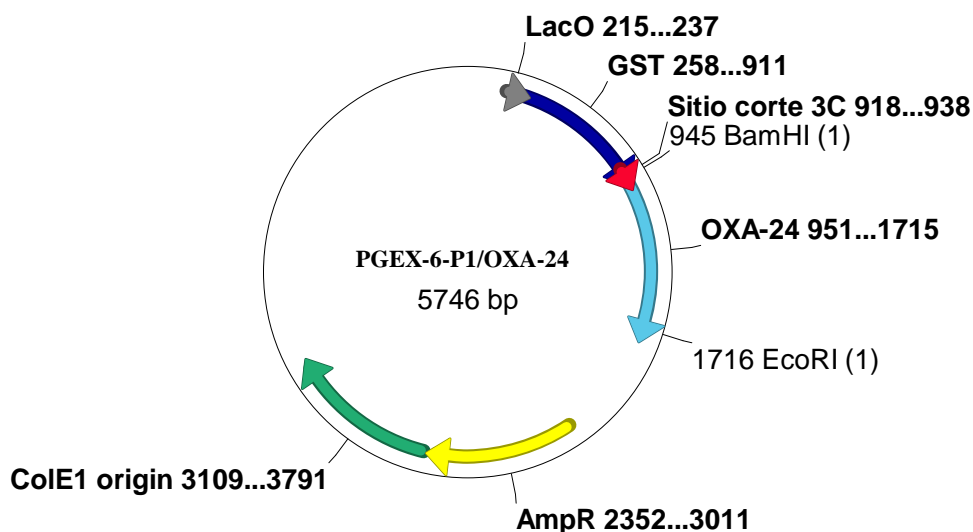




## 5 EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA $\beta$ -LACTAMASA OXA-24

### 5.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN.

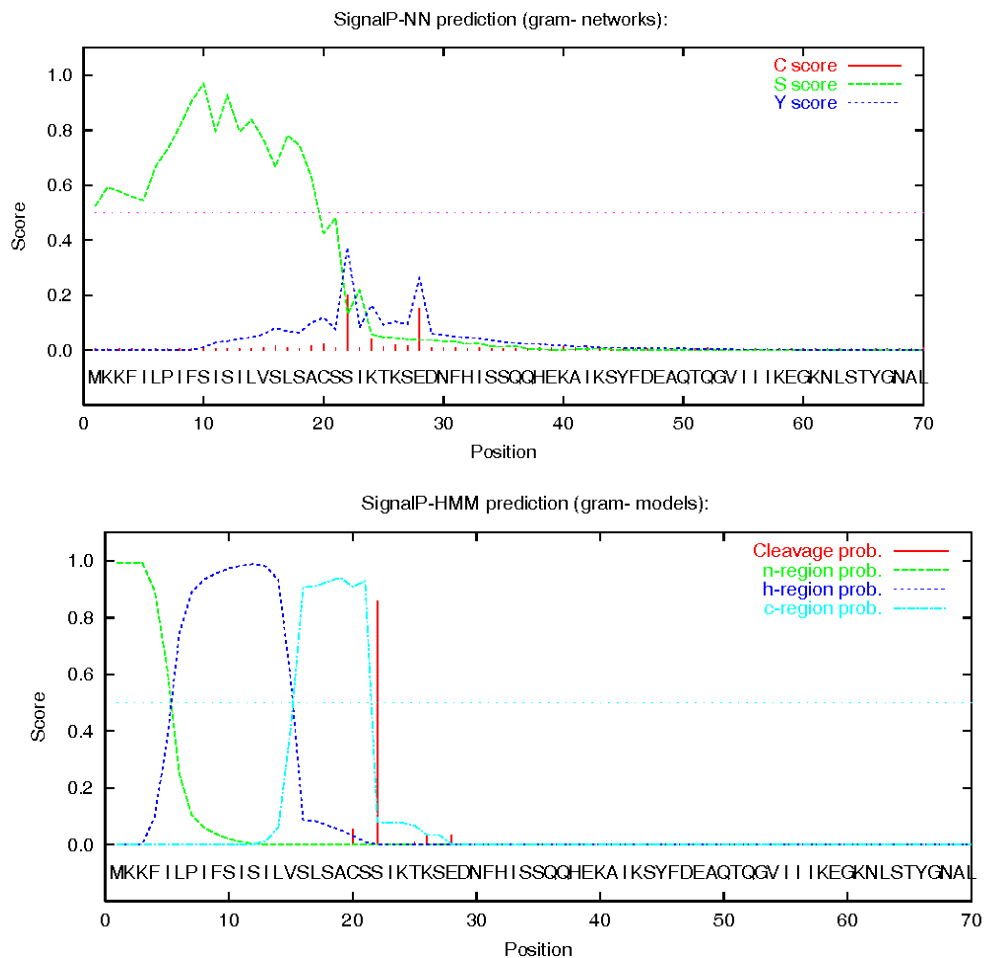
Para abordar los ensayos de cristalización se necesita una gran cantidad de proteína con un elevado nivel de pureza y una alta homogeneidad conformacional. Para ello es importante mejorar los métodos de expresión y purificación, de forma que podamos optimizar estos parámetros. Además, la proteína no debe sufrir a lo largo del proceso alteraciones que modifiquen su plegamiento nativo y su funcionalidad. Con estas premisas, el gen *bla*<sub>OXA-24</sub> se clonó en el vector PGEX-6-P1 (Amersham Biosciences) entre los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI (Fig. 11), de forma que tras la expresión se obtenía OXA-24 fusionada a GST. La proteína de fusión OXA-24/GST se purificaba mediante una cromatografía de afinidad. Utilizando la proteasa 3C se separaban GST de OXA24, recuperándose en cantidades suficientes y en un estado de pureza óptimo para llevar a cabo los ensayos cristalográficos y biofísicos.



**Figura 11.** Representación gráfica del vector recombinante que se utilizó para producir la  $\beta$ -lactamasa OXA-24, construido a partir del vector comercial PGEX-6-P1. El plásmido posee un promotor tac reprimido por el represor *lacI* e inducible por IPTG, un gen que confiere resistencia a ampicilina y permite la selección de colonias recombinantes y el gen que codifica para la proteína GST y que permite que OXA-24 se exprese como proteína de fusión con GST.

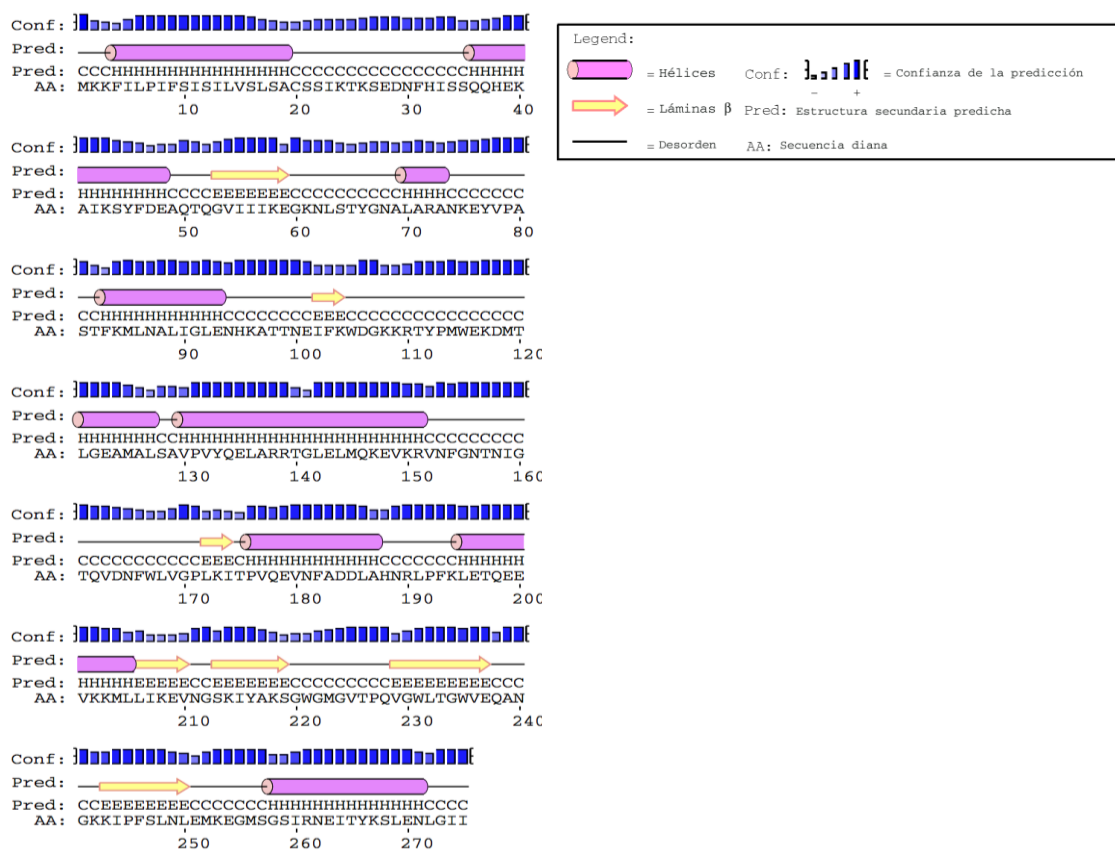
Un análisis de la secuencia aminoacídica de OXA-24 con el servidor SignalP 3.0 (Bendtsen, Nielsen et al. 2004) (Fig. 12) permitió identificar la presencia de un péptido señal comprendido entre los residuos M1 y S21 (Bou, Oliver et al. 2000), de forma que las bases que codificaban dichos residuos se excluyeron del clonaje en PGEX-6-P1.

## RESULTADOS



**Figura 12. Resultados de la determinación de la secuencia correspondiente al péptido señal de OXA-24 con el servidor SignalP 3.0 mediante los métodos “neural networks (NN)” y “Hidden Markov models (HMM)” optimizados para bacterias Gram-negativas.**

Con el fin de localizar posibles regiones desordenadas que pudiesen dificultar la cristalización se realizó también una predicción de estructura secundaria utilizando la herramienta PSIPRED (McGuffin, Bryson et al. 2000). Dado que no se predecían grandes regiones desordenadas, se decidió eliminar únicamente el péptido señal para modificar lo menos posible la proteína y evitar una alteración de su funcionalidad que distorsionase los resultados de los ensayos bioquímicos (Fig. 13).



**Figura 13. Predicción de los elementos de estructura secundaria de OXA-24 con PSIPRED.**

De los ensayos de expresión realizados a 37°C en células *E.coli* BL21 durante 18 h se obtuvieron elevados niveles de expresión de la proteína de fusión GST-OXA-24 (Fig. 14).

## RESULTADOS

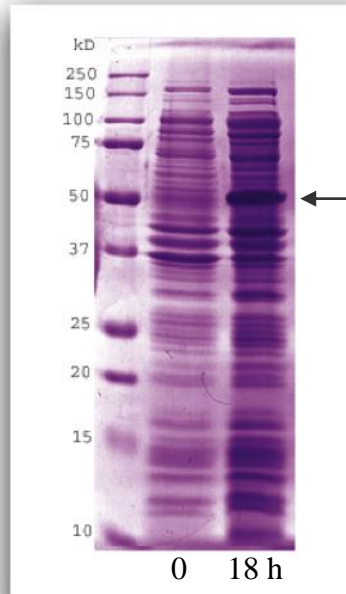


Figura 14. Análisis de la expresión de la proteína de fusión GST-OXA-24<sub>WT</sub> en la cepa de *E.coli* BL21. Las proteínas se analizaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. Línea 1, extracto crudo del cultivo a tiempo 0; línea 2, tras inducir la expresión con IPTG e incubar el cultivo 18 h a 37°C se obtienen niveles altos de expresión de la proteína de fusión. Como marcador de peso molecular se utilizó la mezcla comercial “Precision Plus Protein Standard Dual Color” (Bio-Rad)

El extracto soluble de la proteína de fusión se purificó mediante una cromatografía de afinidad utilizando una columna de Glutathion sepharosa GSTrap™ FF (Amersham Biosciences). OXA-24 fusionada se retuvo en la resina y después de un extenso lavado para eliminar los contaminantes (Fig. 15, pico 1) se recuperó mediante elución con una solución de glutathion reducido 10 mM. (Fig. 15, pico 2).

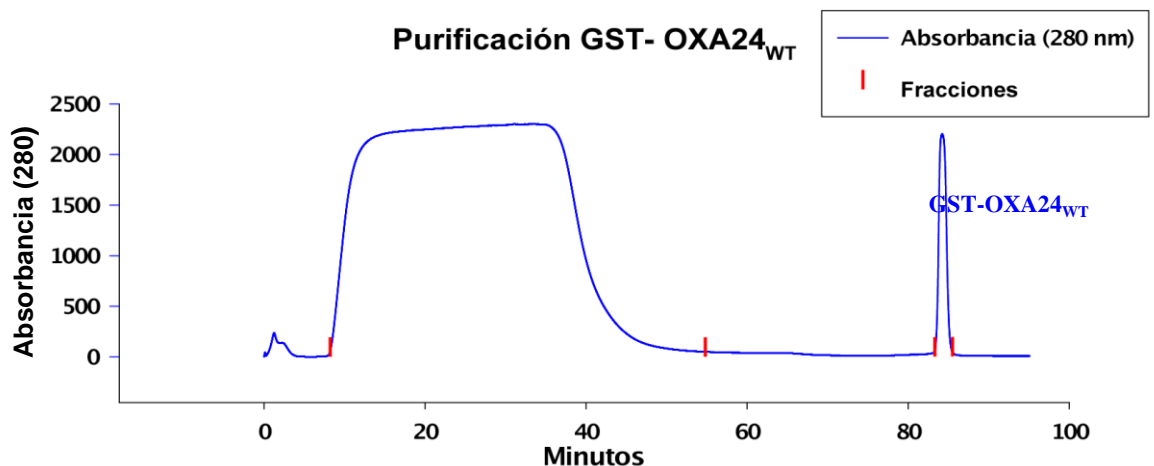
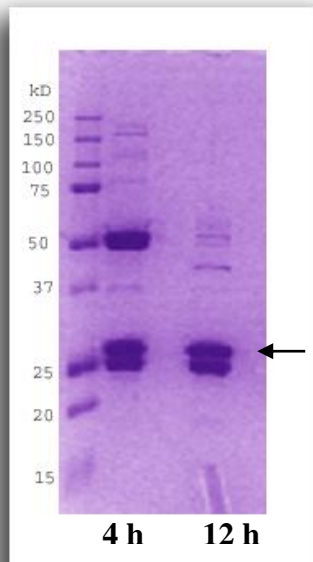


Figura 15. Purificación de la proteína de fusión GST-OXA-24wt. El extracto celular soluble que contenía la proteína se cargó en una columna de Glutathion sepharosa a un flujo de 1ml/min. Una vez que eluyeron las proteínas contaminantes (primer pico en el cromatograma), se lavó la columna con tampón 50 mM TRIS pH=7, 150 mM NaCl, 1mM DTT, 5mM EDTA y 10 mM de glutathion reducido para recuperar la proteína de fusión unida a la resina.

De esta primera cromatografía de afinidad, se obtuvieron aproximadamente 25 mg de la proteína de fusión. Con el fin de eliminar la proteína GST, la proteína de fusión se digirió con la proteasa 3C asociada a GST. El corte se realizó a 4°C durante 16 h utilizando una relación de concentraciones proteasa/proteína de 1/50, a la vez que se dializaba la muestra para eliminar el glutatión reducido (Fig. 16).



**Figura 16. Digestión de la proteína de fusión GST-OXA-24<sub>WT</sub> con la proteasa 3C, tras 4h y 12 h de incubación, en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. Como marcador de peso molecular se utilizó la mezcla comercial "Precision Plus Protein Standard Dual Color" (Bio-Rad).**

Tras 12h de digestión se realizó una nueva cromatografía de afinidad, a 1ml/min, en una columna de Glutation sepharosa GSTrap™ FF (Amersham Biosciences) para separar OXA24<sub>WT</sub> (Fig. 17, pico 1) de la proteína de fusión no digerida, de la proteína GST y de la proteasa 3C (Fig. 17, pico 2).

## RESULTADOS

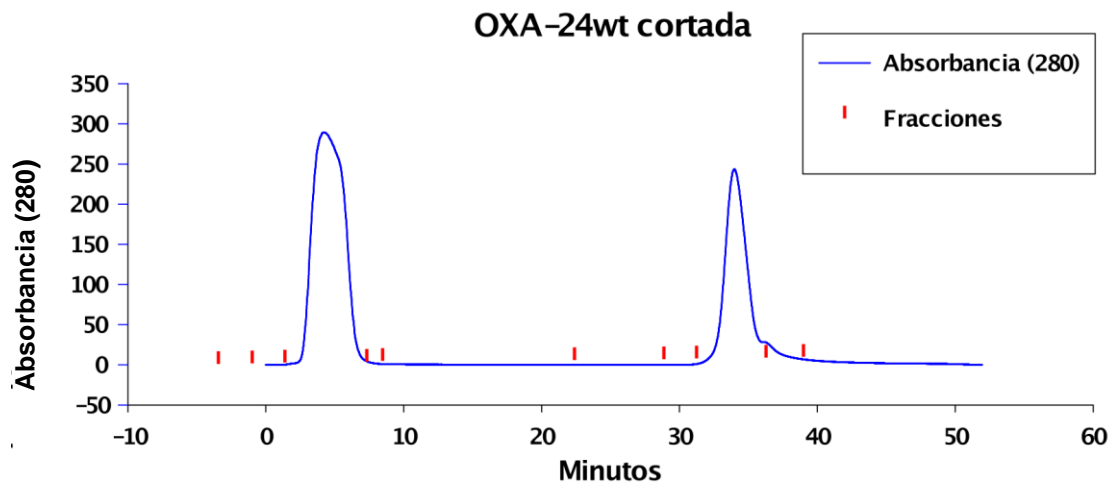


Figura 17. Purificación de OXA-24<sub>WT</sub>. Tras la digestión con la proteasa 3C-GST, la mezcla de proteínas se cargó en una columna de Glutation sepharosa. Tanto GST como la proteína de fusión no digerida y la proteasa 3C, quedan retenidas en la columna, mientras que OXA24<sub>WT</sub> no se une a la resina (pico 1).

La fracción eluída de la columna que contenía la proteína OXA-24<sub>WT</sub> se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE para comprobar la pureza de la preparación (Fig. 18).

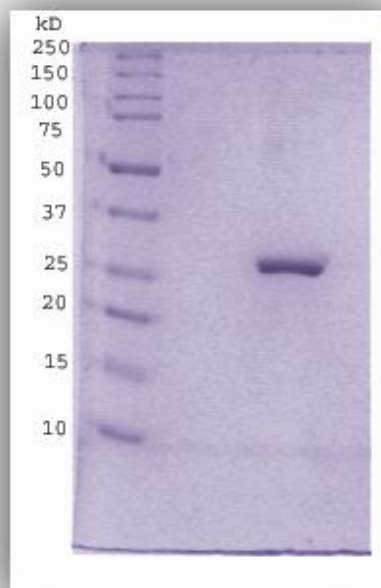
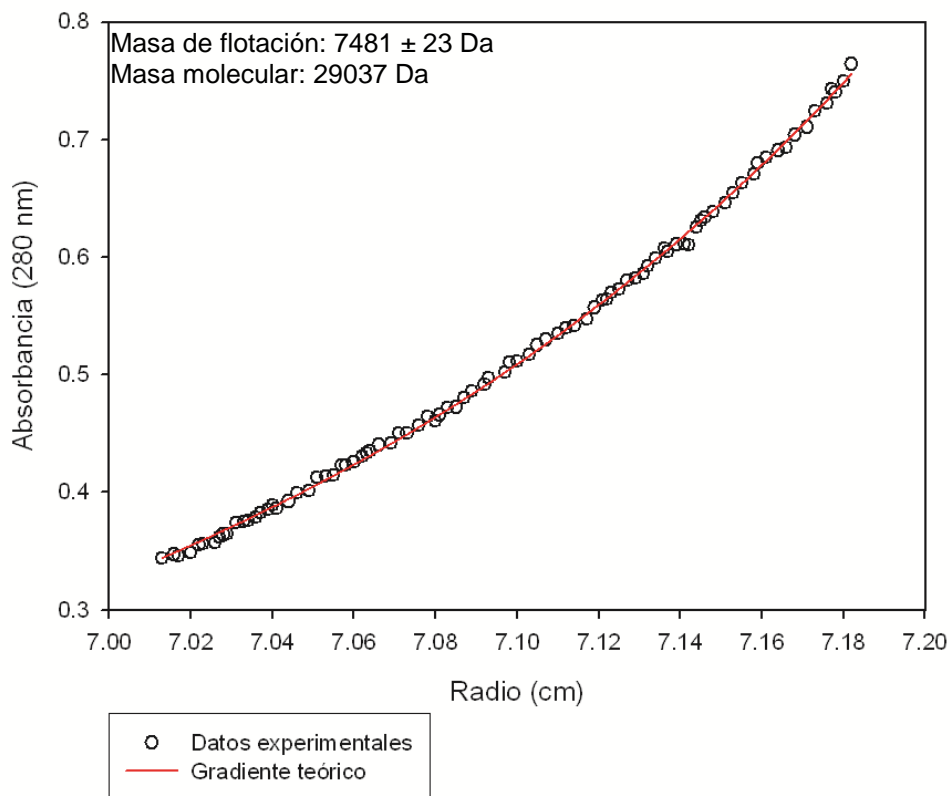


Figura 18. Análisis de la pureza de la proteína OXA-24<sub>WT</sub> en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%.

## 5.2 CARACTERIZACIÓN DE OXA-24<sub>WT</sub> MEDIANTE EXPERIMENTOS DE ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA.

Para determinar el estado de asociación de OXA-24 en solución se realizó un experimento de equilibrio de sedimentación. El gradiente obtenido se ajusta al de una proteína con una masa de flotación de  $7481 \pm 23$  Da, que corresponde con una masa molecular de aproximadamente 29037 Da, equivalente a la de un monómero. (Fig. 19).

Equilibrio de sedimentación: OXA-24



**Figura 19. Gradiente de equilibrio de sedimentación obtenido para una solución de 0.5 mg/ml de OXA-24. Los círculos representan los datos experimentales del equilibrio de sedimentación adquiridos a 15000 rpm y a 20°C. La curva roja representa el mejor ajuste a la masa molecular promedio que se corresponde con un monómero de OXA-24. Los datos se analizaron con el programa HeteroAnaKis (Cole 2004)**

Para analizar las propiedades hidrodinámicas y la homogeneidad de la muestra y descartar la presencia de agregados que pudieran dificultar la obtención de cristales se llevó a cabo un experimento de velocidad de sedimentación (Fig. 20). Del análisis de los datos del ensayo, obtenemos una distribución del coeficiente de sedimentación que nos indica que la muestra contiene una única especie en solución con un coeficiente de sedimentación de 2.4 S, compatible con un monómero de OXA-24.

## RESULTADOS

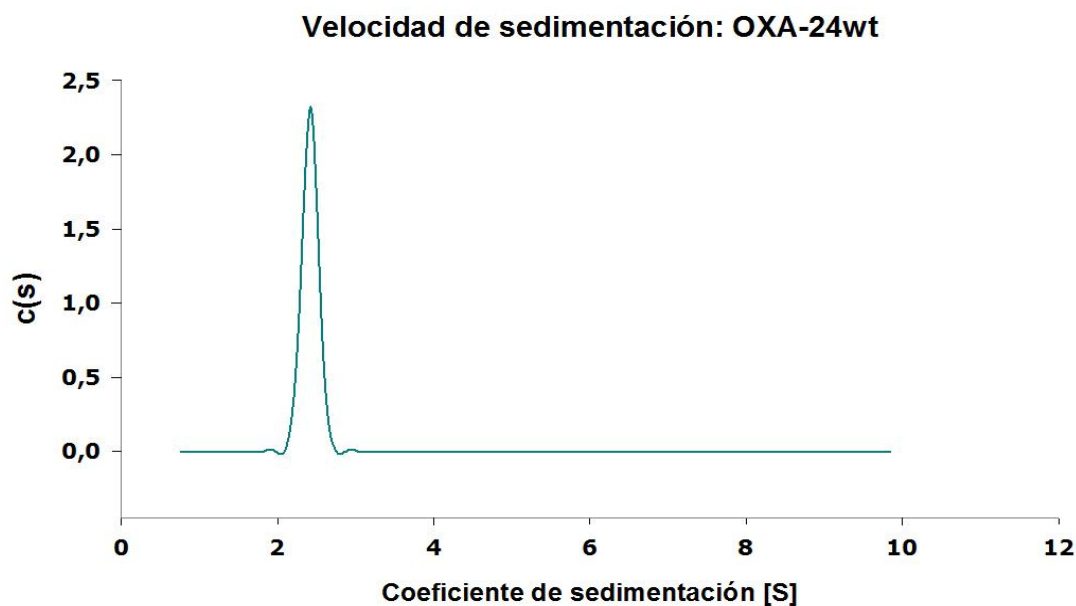


Figura 20. Distribución de la probabilidad del coeficiente de sedimentación ( $c$  (s)) de OXA-24 en tampón Tris 50 mM pH=7, 150 mM NaCl, 1mM DTT, 5 mM EDTA. A una concentración de 0.5 mg/ml (17  $\mu$ M), OXA-24 sedimenta como una única especie con un coeficiente de sedimentación [S] de 2.4 S, compatible con el de un monómero de OXA-24.

### 5.3 RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA $\beta$ -LACTAMASA OXA-24

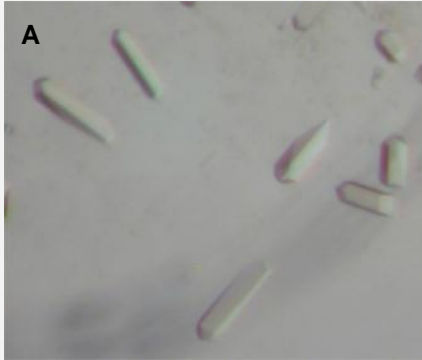
#### 5.3.1 Cristalización. Recolecta y procesamiento de los datos de difracción.

La solución de proteína de OXA-24 en tampón TRIS 50 mM pH=7, 150 mM NaCl, 1mM DTT y 5mM EDTA se concentró hasta  $\sim$ 8 mg/ml ( $\sim$ 344  $\mu$ M). Tras ensayar una amplia gama de diferentes soluciones de cristalización se obtuvieron los primeros cristales, mediante difusión en gota sentada, en las siguientes condiciones:

- ✓ 1.8M Sulfato amónico, 0.1M BIS-TRIS pH 5.5, a 22°C.
- ✓ 30% PEG 2000 MME, 0.1M Acetato sódico, 0.1M MES pH 6.5, a 22°C

Con el fin de mejorar el tamaño y la calidad de los cristales se optimizaron las condiciones de cristalización iniciales variando el pH y las concentraciones de proteína y precipitante. Finalmente, se consiguieron cristales adecuados para la recolección de datos de difracción en las condiciones detalladas a continuación:

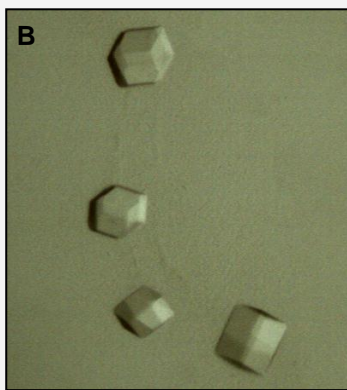




Cristales con un tamaño aproximado de 0.1 x 0.1 x 0.05 mm

Forma cristalina A

- 2M Sulfato amónico, 0.1M Acetato sódico pH 4.6, a 22°C y mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada.
- Gotas de 2 µl con una proporción 1:1 (proteína: condición de cristalización).
- Concentración de proteína : 8 mg/ml
- Solución crioprotectora: solución de cristalización más 30 % de glicerol como agente crioprotector



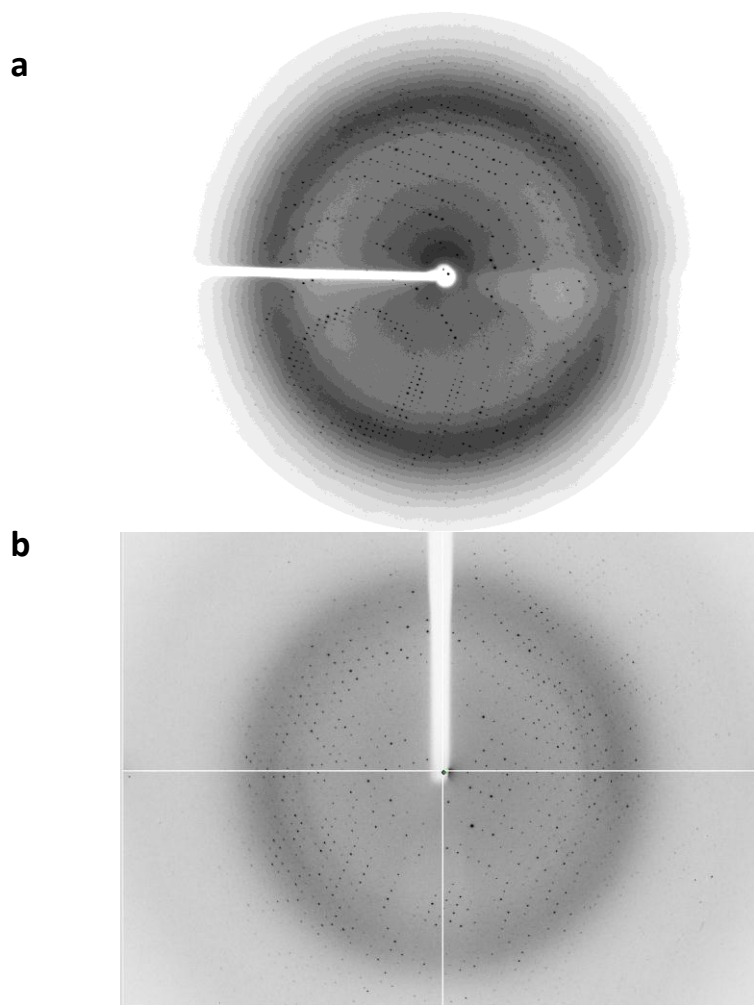
Cristales con un tamaño aproximado de 0.5 x 0.15 x 0.1 mm

Forma cristalina B

- 28% PEG 2000 MME, 0.1M HEPES pH 7.5, a 22°C y utilizando el método de difusión de vapor en gota colgante.
- Gotas de 2 µl con una proporción 1:1 (proteína: solución de cristalización).
- Solución de proteína concentrada a 6 mg/ml
- Solución crioprotectora: solución de cristalización más 15 % de PEG400 como agente crioprotector

Para la recogida de los datos de difracción, los cristales fueron congelados a temperaturas criogénicas por inmersión en nitrógeno líquido en la misma solución de cristalización a la que habíamos añadido un agente crioprotector: 30% de glicerol para la forma cristalina A y 15% de PEG400 para la forma cristalina B.

Una vez criogenizados, los cristales se expusieron a una fuente de radiación sincrotrón en las líneas BM16 (forma cristalina A) e ID14.1 (forma cristalina B) de la estación de radiación sincrotrón del ESRF (Grenoble, Francia) (Fig. 21).



**Figura 21. Patrones de difracción de rayos x obtenidos para las formas cristalinas A (a) y B (b). Para recoger cada imagen, el cristal se rotó un grado con una exposición de 10 s (BM16) y 3 s (ID14.1) hasta recoger 180 imágenes en ambos casos.**

Los datos de difracción se procesaron y escalaron utilizando los programas *Mosflm* (Leslie 2006) y *Scala* del CCP4 (*Collaborative Computational Project number 4 1994*), tal y como se describe en el apartado de “*Materiales y Métodos*”. Las estadísticas del procesamiento de los datos para cada una de las formas cristalinas se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4: Valores estadísticos cristalográficos del procesado de los datos de difracción de los cristales de OXA-24

	OXA-24 (Forma cristalina A)	OXA-24 (Forma cristalina B)
Grupo espacial	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Dimensiones de la celda a, b, c (Å)	102.2, 102.2, 86.1	102.3, 102.3, 84.0
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Rango de resolución (Å)	35-2.5 (2.65-2.5)*	31.6-2.1 (2.19-2.1)*
Completitud (%)	99.9 (100.0)	99.9 (99.7)
Reflexiones medidas	233051	322863
Reflexiones únicas	16361	27373
R <sub>merge</sub> (%)	8.7 (22.0)	7.7 (32.9)
Multiplicidad	14.2 (14.4)	11.8 (11.3)
I/σ(I)	5.0 (3.1)	7.9 (2.4)

Los datos de la capa de alta resolución aparecen entre paréntesis

### 5.3.2 Determinación y afinamiento de la estructura de OXA-24.

La estructura tridimensional de OXA-24<sub>WT</sub> se determinó mediante reemplazo molecular utilizando el programa AMoRe (Navaza 1994) con reflexiones comprendidas entre 15 y 3.5 Å y con los datos de difracción correspondientes a la forma cristalina A. Como modelo de búsqueda se empleó la estructura cristalográfica de la β-lactamasa OXA-10 (Paetzel, Danel et al. 2000) (código PDB: 1FOF), que presenta una homología de secuencia del 33% con OXA-24.

De la búsqueda de las diferentes funciones de rotación y translación se obtuvieron varias soluciones, de las cuales se seleccionó la que presentaba un valor del coeficiente de correlación (Factor-C) más alto entre el modelo y los datos experimentales y un valor bajo para el factor de acuerdo (Factor-R).

Solución del reemplazamiento molecular							
Función de rotación			Función de Translación			Factor-C	Factor-R
71.22	36.74	86.59	-0.0663	0.2385	0.3754	36.9	53.0

Para mejorar el ajuste del modelo a la densidad electrónica experimental se realizaron afinados de cuerpo rígido y afinado de templado simulado (“*simulated annealing*”) y posteriormente se calcularon los mapas 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> y F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>. Con la ayuda de estos mapas de densidad electrónica y mediante un proceso iterativo de modelado y refinamiento se terminó de construir la cadena polipeptídica. Para

## RESULTADOS

algunas regiones de la molécula, especialmente el extremo N-terminal y determinados lazos de conexión (“*loops*”) desordenados, el mapa no era de la suficiente calidad. Para trazar estas zonas, hubo que desactivar los residuos implicados y con las nuevas fases realizar el trazado de la cadena polipeptídica manualmente. Finalmente, se procedió a incorporar las moléculas de agua visibles en la densidad electrónica implicadas en la red de puentes de hidrógeno con átomos del esqueleto polipeptídico. Se observó también una densidad electrónica adicional, no atribuible a moléculas de agua en la región del centro activo, que se asignó a una molécula de sulfato.

Los cristales de OXA-24 contienen una sola molécula de proteína por unidad asimétrica y no se observa densidad electrónica definida para los primeros 11 residuos de la proteína expresada.

La forma cristalina B pertenece al mismo grupo espacial que la forma cristalina A con prácticamente los mismos ejes de celdilla, por lo que no fue necesario realizar un reemplazo molecular para resolver la estructura. Con los datos de difracción procesados con MOSFLM (Leslie 2006) y escalados con SCALA (Collaborative Computational Project number 4 1994) y el modelo refinado obtenido de la forma cristalina A se realizó un refinamiento de cuerpo rígido y se calculó un mapa de densidad electrónica  $F_o - F_c$  utilizando el programa *Refmac* (Murshudov, Skubak et al.). La visualización de dicho mapa permitió identificar las principales variaciones entre ambos modelos. Intercalando sesiones de modelado gráfico con ciclos de refinamiento se corrigieron estas diferencias hasta obtener el modelo final (modelo B). En los últimos ciclos se añadieron las moléculas de agua.

Las estadísticas finales del refinamiento y las características de cada uno de los modelos se muestran en la Tabla 5, siendo especialmente importantes los valores de los factores de acuerdo  $R$ , ya que reflejan las diferencias relativas entre los factores de estructura observados ( $F_{obs}$ ) y los factores de estructura calculados ( $F_{calc}$ ), dando una medida de en que grado el modelo cristalográfico se ajusta a los datos experimentales de difracción.

Para el modelo final resuelto a partir de la forma cristalina A se obtuvieron unos valores de  $R$  y  $R_{free}$  del 19.2% y el 23.4%, respectivamente. En el caso del modelo obtenido a partir de la forma cristalina B los valores de  $R$  y  $R_{free}$  fueron del 19.25% y 23.1%.

Tabla 5: Valores estadísticos del refinamiento de los modelos de OXA-24

	OXA-24 (modelo A) (PDB ID 2jc7)	OXA-24 (modelo B) (PDB ID 3G4P)
Número de átomos no hidrógenos	<b>2058</b> Proteína: 1932 Moléculas de agua: 121 Heteroátomos (SO <sub>4</sub> ): 5	<b>2106</b> Proteína: 1939 Moléculas de agua: 167
R / Rfree	0.192 (0.234)/0.234 (0.296)*	0.192 (0.268)/0.231 (0.31)*
Factor B (Å <sup>2</sup> )	32.1	30.24
r.m.s.d. distancias de enlace (Å)	0.006	0.022
r.m.s.d. ángulos de enlace (°)	1.20	1.95

\* Los datos de la capa de alta resolución aparecen entre paréntesis

Finalmente, se revisaron los parámetros estereoquímicos (los ángulos de enlace, los ángulos de torsión  $\psi$  y  $\phi$ , los contactos interatómicos, etc) utilizando el programa PROCHECK (Laskowski, MacArthur et al. 1993). En las figuras 22 y 23 se representan los diagramas de Ramachandran que nos permite localizar los residuos cuya estereoquímica se desvía de la posición ideal (ángulos de torsión  $\phi$  y  $\psi$ ). Como se puede apreciar en los diagramas, el 90% de los residuos se encuentran en las zonas más favorables, el 10% en zonas permitidas y ningún residuo de la Forma A en zonas energéticamente desfavorables. Sólo la alanina 80 (A80) de la Forma B se encuentra en una región energéticamente desfavorable.

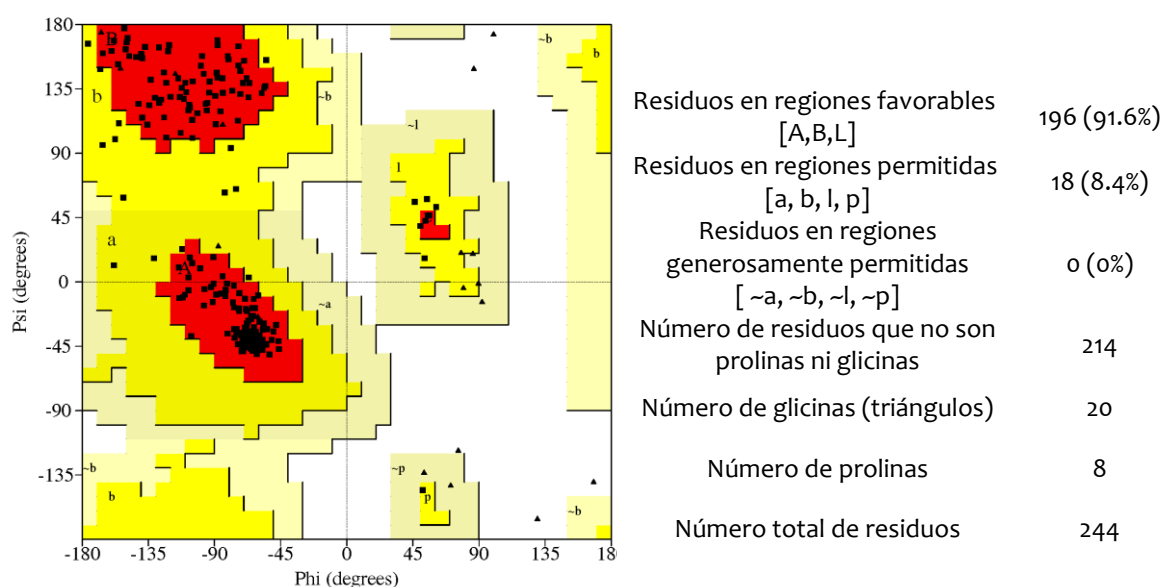


Figura 22. Diagrama de Ramachandran de OXA-24<sub>WT</sub> del modelo A.

## RESULTADOS

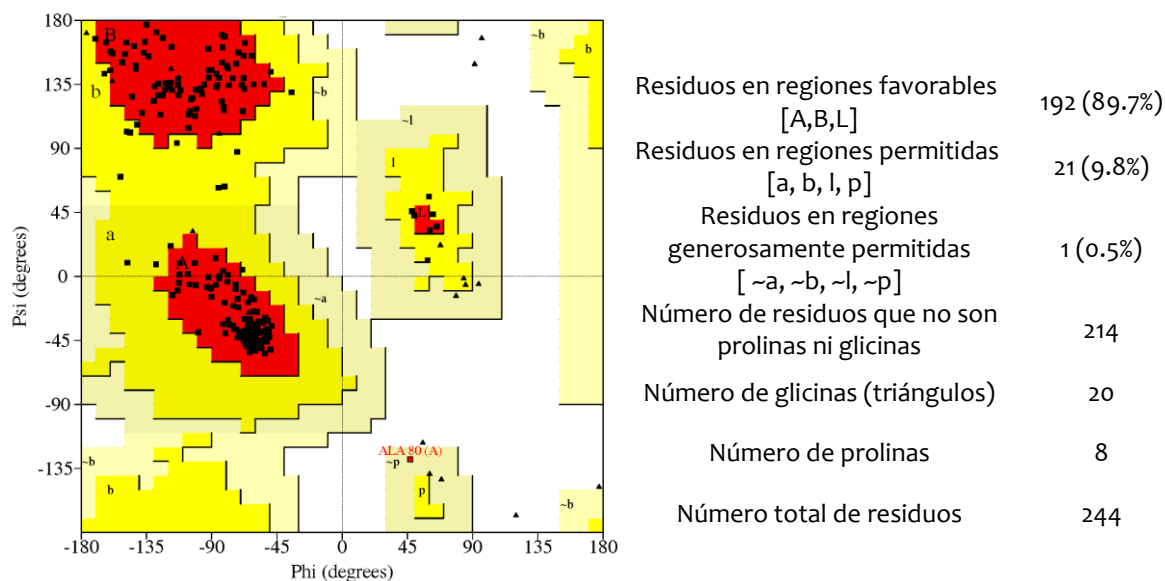


Figura 23. Diagrama de Ramachandran de OXA-24<sub>WT</sub> del modelo B.

La comparación de ambos modelos (r.m.s.d. 0.16 Å) permitió visualizar que la mayoría de las diferencias correspondían a modificaciones en las posiciones de las cadenas laterales de los residuos más expuestos al solvente (Fig. 24). Por otro lado, la molécula de sulfato que encontramos en el centro activo del modelo A es reemplazada en el modelo B por una red de moléculas de agua (Fig. 25).

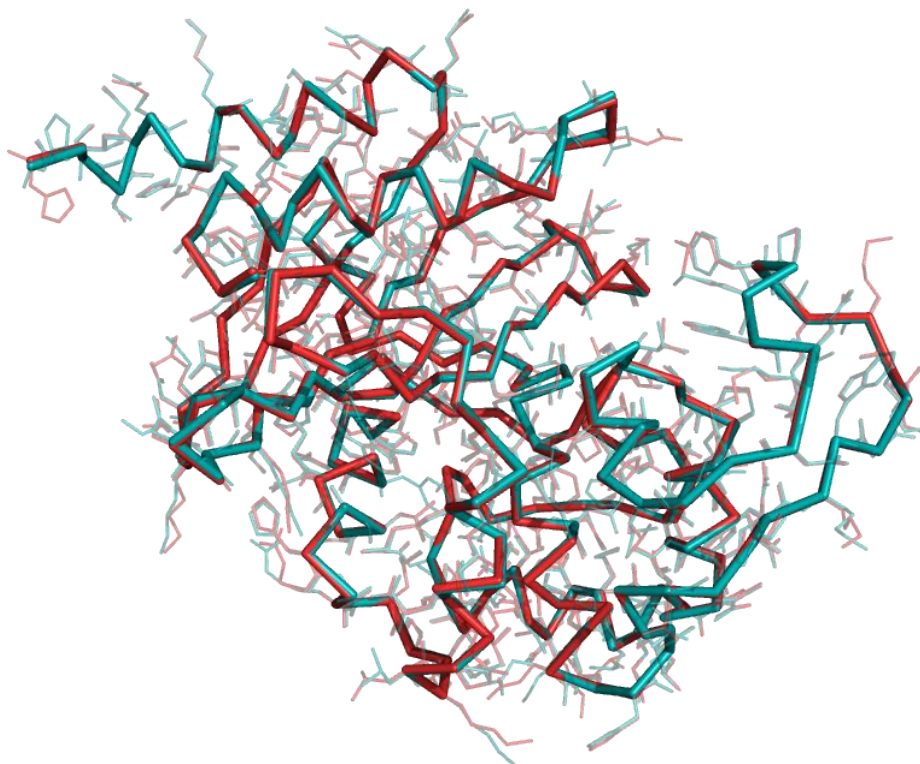


Figura 24. Superposición de las estructuras de OXA-24 de las dos formas cristalinas: A (cian) y B (rojo). No se observan diferencias significativas en el esqueleto principal de los dos modelos, aunque sí en la orientación de las cadenas laterales de algunos residuos. El r.m.s.d., calculado sobre el C $\alpha$  con SARF (Alexandrov and Fischer 1996) es de 0.16Å.

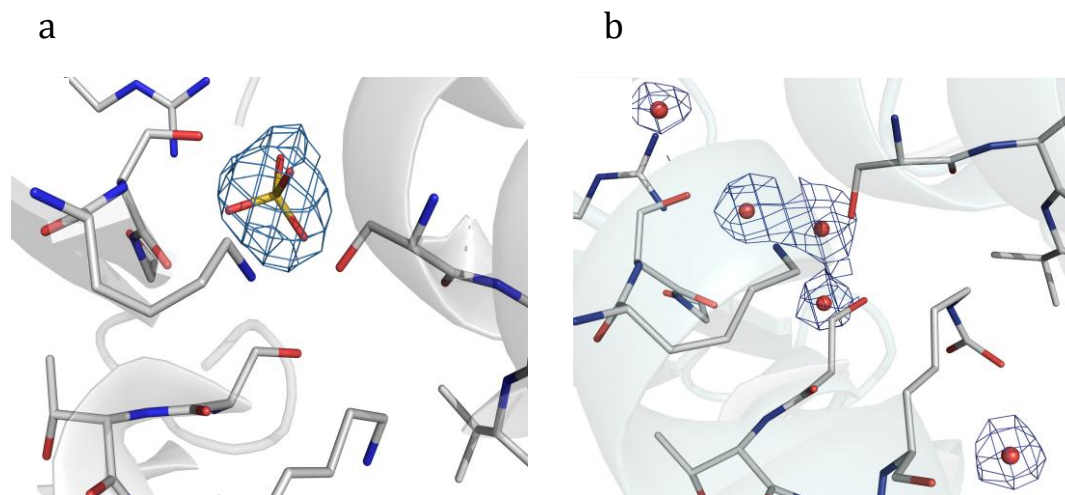


Figura 25. Comparación de la región del centro activo de las formas cristalinas A (a) y B (b). La molécula de sulfato presente en la forma cristalina A (2) está ausente en la forma B, ocupando su lugar una red de moléculas de agua. Las densidades electrónicas 2Fo-Fc (1 $\sigma$ ) correspondientes a la molécula de sulfato (2) y a las moléculas de agua (3) aparecen representadas como una malla azul.

La diferencia más importante se localizó en el sitio activo, ya que la lisina 84 (K84), un residuo clave durante la catálisis, aparece carboxilada en el modelo B (Fig. 26). La carboxilación de la lisina 84 en el modelo B y no en el modelo A puede ser atribuible a las diferentes condiciones de cristalización, siendo especialmente importante la gran variación que encontramos en los valores de pH (4.6 para la forma A y 7.5 para la forma B).

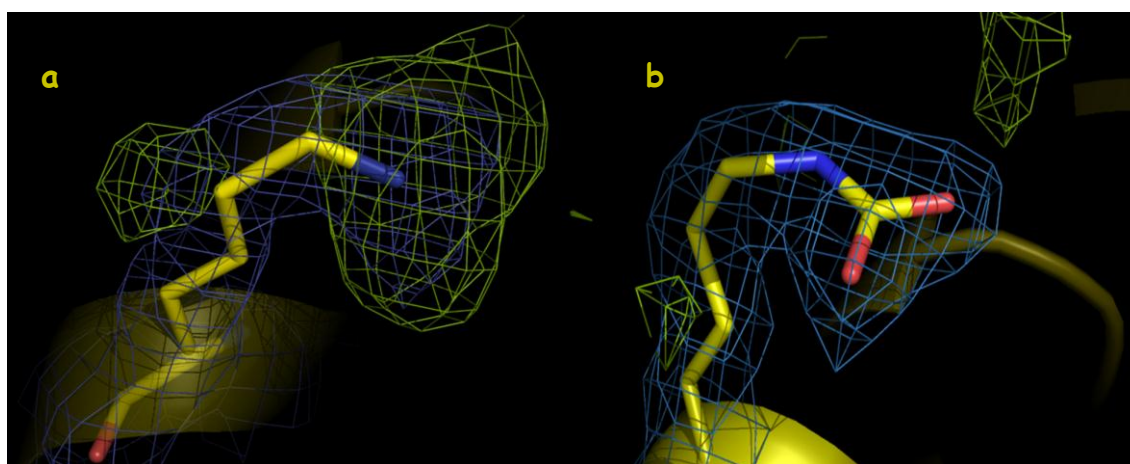


Figura 26. Mapas de densidad electrónica 2Fo-Fc a 1.5  $\sigma$  (azul) y Fo-Fc a 2.5  $\sigma$  (verde) correspondientes a la lisina 84 (K84) del modelo B. La densidad electrónica positiva (verde, panel a) sugiere la presencia de átomos adicionales a los que aporta la lisina en el modelo inicial. Con la introducción del grupo carboxilato (panel b) regularizamos la densidad electrónica para una lisina carboxilada en esta región.

## 5.4 DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA $\beta$ -LACTAMASA OXA-24.

### 5.4.1 *Arquitectura general de OXA-24.*

La  $\beta$ -lactamasa de clase D OXA-24 (PDB ID 2jc7 y PDB ID 3G4P) es un monómero de 275 residuos con unas dimensiones aproximadas de 58 x 46 x 38 Å. La molécula está compuesta por dos dominios: un dominio helicoidal ( $\alpha$ 2- $\alpha$ 8) y un dominio mixto compuesto por una  $\beta$ -lámina formada por seis cadenas  $\beta$  antiparalelas ( $\beta$ 1- $\beta$ 6) y las hélices N- y C- terminales ( $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 9) (Santillana, Beceiro et al. 2007) (Fig. 27).

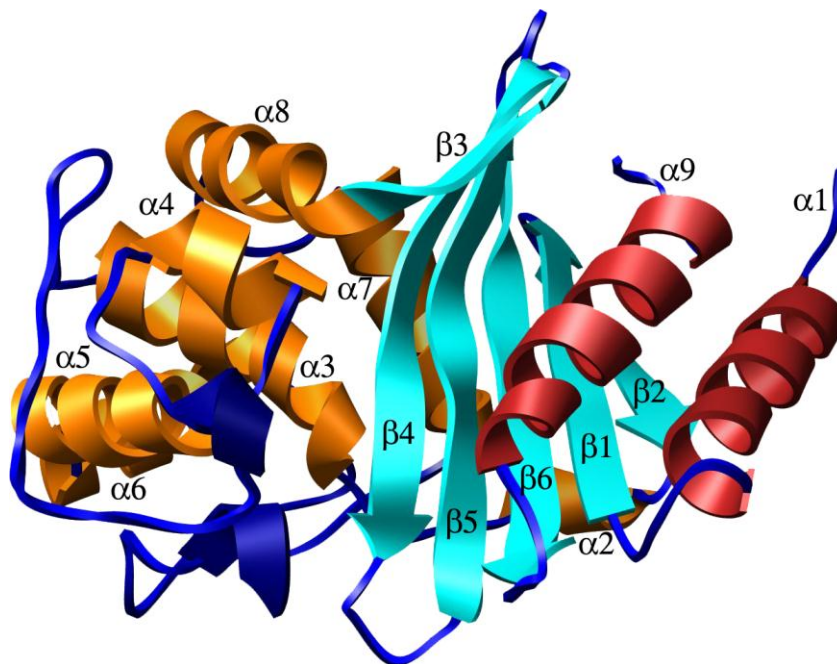


Figura 27. Plegamiento de OXA-24. OXA-24 presenta un plegamiento  $\alpha/\beta$  con las hélices expuestas al solvente rodeando un núcleo central formado por una lámina  $\beta$  compuesta por seis hebras antiparalelas (cian). El dominio helicoidal ( $\alpha$ 2- $\alpha$ 8) aparece representado en amarillo, mientras que las hélices N- y C-terminal ( $\alpha$ 1/ $\alpha$ 9) se muestran en rojo.

Si comparamos la estructura de OXA-24 con la estructura de los miembros más representativos de cada una de las familias de serin- $\beta$ -lactamasas de clase A, clase C y clase D comprobamos que la arquitectura global, definida por una  $\beta$ -lámina central rodeada de  $\alpha$ -hélices, se encuentra bastante conservada en las estructuras de todas ellas (Tabla 6 y Fig. 28). A pesar de estas semejanzas, las diferencias existentes en su ordenamiento y disposición espacial, especialmente en las zonas adyacentes al centro activo, son suficientes para definir las distintas especificidades por los diferentes tipos de antibióticos que presenta cada miembro de la familia.



Serin- $\beta$ -lactamasa	Familia	r.m.s.d.
TEM-1(Stec, Holtz et al. 2005)	Clase A	2.45Å (169 átomos C $^{\alpha}$ , 69%)
$\beta$ -lactamasa de clase C (Oefner, D'Arcy et al. 1990)	Clase C	2.37Å (161 átomos C $^{\alpha}$ , 66%)
OXA-10(Paetzl, Danel et al. 2000)	Clase D	1.38Å (224 átomos C $^{\alpha}$ , 92%)

Tabla 6 Valores de RMSD obtenidos al superponer con el programa SARF (Alexandrov and Fischer 1996) la estructura de OXA-24 con las estructuras de un miembro representativo de las distintas familias de serin- $\beta$ -lactamasas.

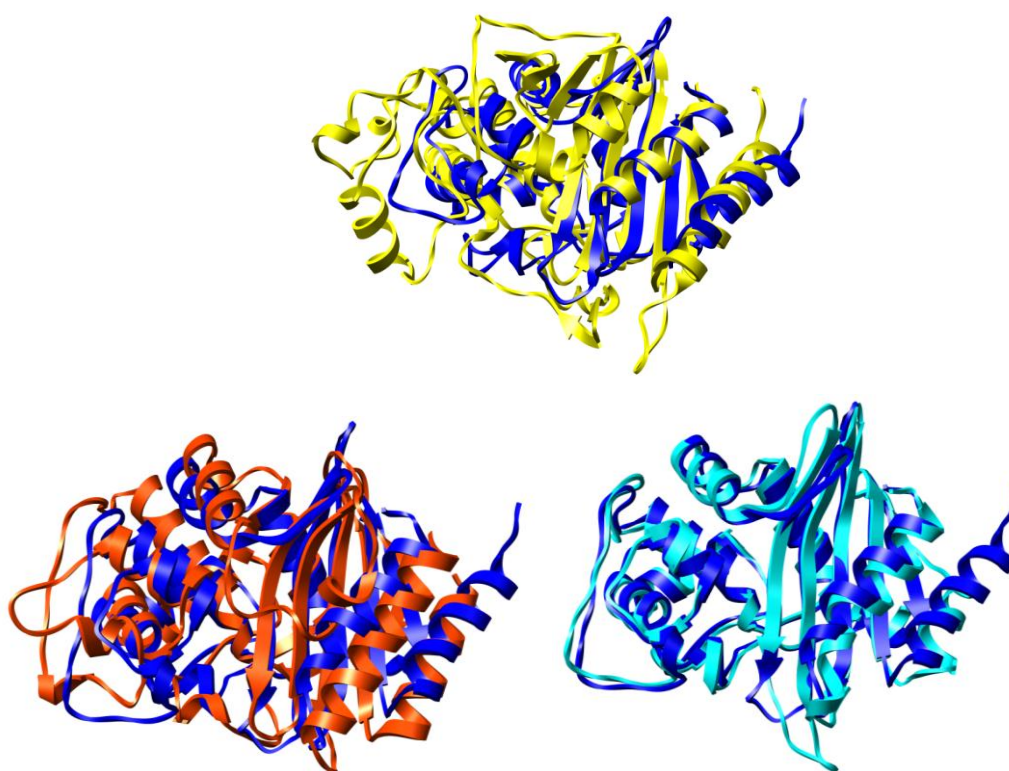


Figura 28. Superposición de la estructura de OXA-24 (azul marino) con las  $\beta$ -lactamasas de clase A (TEM-1, naranja) (PDB ID 1ZG4), clase C (amarillo) (PDB ID 1FR1) y clase D (OXA-10, cian) (PDB ID 1FOF). OXA-24 mantiene una organización muy parecida a la de la mayoría de las serin- $\beta$ -lactamasas descritas.

Cómo podemos observar, es especialmente significativa la similitud que existe entre el plegamiento de OXA-24 y el de las  $\beta$ -lactamasas de clase D (oxacilinasas). Además, a pesar de que la homología de secuencia entre OXA-24 y estas oxacilinasas se encuentra sólo entre el 23% (OXA-1) y el 33% (OXA-10), los elementos de estructura secundaria y su disposición espacial están muy conservados en todos los miembros de esta familia (Tabla 7).

## RESULTADOS

Oxacilinasas	Organismo	r.m.s.d.
OXA-1 (Sun, Nukaga et al. 2003)	<i>E. coli</i>	1.47Å (218 átomos C <sup>α</sup> , 89%)
OXA-2 (PDB ID code IK38)	<i>Salmonella typhimurium</i>	1.34Å (220 átomos C <sup>α</sup> , 92%)
OXA-10 (Paetzel, Danel et al. 2000)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.38Å (224 átomos C <sup>α</sup> , 92%)
OXA-13 (Pernot, Frenois et al. 2001)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.40Å (225 átomos C <sup>α</sup> , 92%)
OXA-46 (Docquier, Benvenuti et al.)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.59Å (215 átomos C <sup>α</sup> , 89%)
OXA-48 (Docquier, Calderone et al. 2009)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.60Å (231 átomos C <sup>α</sup> , 96%)

Tabla 7 Valores de la desviación cuadrática media (r.m.s.d.) obtenidos con el programa SARF (Alexandrov and Fischer 1996) al superponer la estructura de OXA-24 con las estructuras descritas de otras oxacilinasas.

Las mayores diferencias encontradas entre la estructura de OXA-24 y las estructuras de otras oxacilinasas (OXA-1, -2, -10, -13, -46 y -48) se localizan fundamentalmente en las siguientes regiones (Fig. 29):

- El extremo N-terminal, donde la hélice  $\alpha 1$  sustituye al motivo común  $\beta 1/\alpha 1$  que aparece en el resto de la familia de oxacilinasas.
- En la lámina  $\beta 3$ , que se encuentra inclinada unos 30° hacia la hélice C-terminal (sólo OXA-1 muestra una cadena homóloga con una inclinación similar).
- En el lazo  $\Omega$  (residuos 159-169), situado entre las hélices  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$ .
- En el lazo que conecta las cadenas  $\beta 4$  y  $\beta 5$  (residuos 223-227).

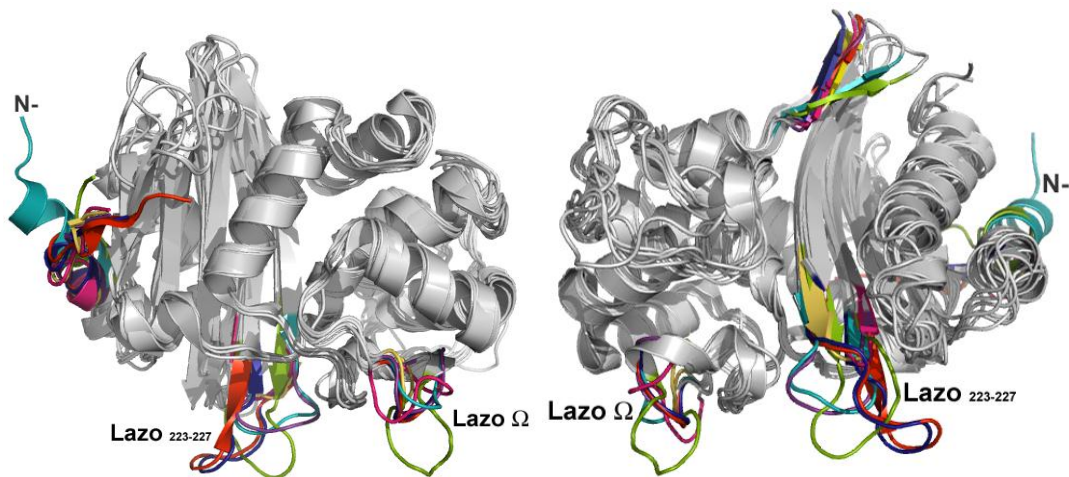


Figura 29. Superposición de la estructura de OXA-24 (cian) con las estructuras de varias oxacilinasas: OXA-1 (verde), OXA-2 (amarillo), OXA-10 (azul marino), OXA-13 (rojo), OXA-46 (rosa) y OXA-48 (morado). Las principales diferencias aparecen coloreadas, mientras que el plegamiento global, muy similar en todas ellas, se muestra en gris.

#### 5.4.2 Descripción del sitio activo

El centro activo se encuentra alojado en la interfase entre la  $\beta$ -lámina central y el dominio helicoidal, adoptando la forma de una hendidura alargada con carga positiva. Los residuos que conforman el centro activo se localizan fundamentalmente en la lámina  $\beta_4$ , en la hélice  $\alpha_3$  y en el lazo que conecta las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ . Estos residuos se agrupan en tres regiones diferentes del sitio activo (elementos) generando una arquitectura característica para las  $\beta$ -lactamasas de clase D (Fig. 30):

Elemento 1: está formado por los residuos S81-T82-F83-K84, situados en el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha_3$ . Este elemento contiene la serina catalítica, S81, que lleva a cabo el ataque nucleofílico sobre el anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico. En este elemento encontramos también la K84, que cuando se encuentra carboxilada desempeña un papel regulador fundamental en el proceso de acilación/desacilación mediante el cual se produce la hidrólisis del sustrato.

Elemento 2: está compuesto por los residuos S128-A129-V130 que se localizan en el lazo situado entre las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ . El hidroxilo de la cadena lateral de la S128 se orienta hacia la serina catalítica, con la que interacciona. La presencia de la V130, un residuo no polar, contribuye a crear un entorno mayoritariamente hidrofóbico en el centro activo.

Elemento 3: constituido por los residuos K218-S219-G220 de la cadena  $\beta_4$ . Este elemento desempeña un papel importante en el anclaje del antibiótico al centro activo.

Además de los tres elementos anteriormente descritos, la R261 tiene una importancia especial en el reconocimiento y el anclaje del antibiótico. La R261 tiene una localización similar a la R250 de las oxacilinasas OXA-10 (Paetzel, Danel

## RESULTADOS

et al. 2000) y OXA 13 (Pernot, Frenois et al. 2001). El análisis de la estructura de OXA-13 unida a diferentes antibióticos ha permitido comprobar que esta arginina, conservada en todas las  $\beta$ -lactamasas de clase D, establece contactos importantes con el grupo carboxilato del antibiótico (Pernot, Frenois et al. 2001).

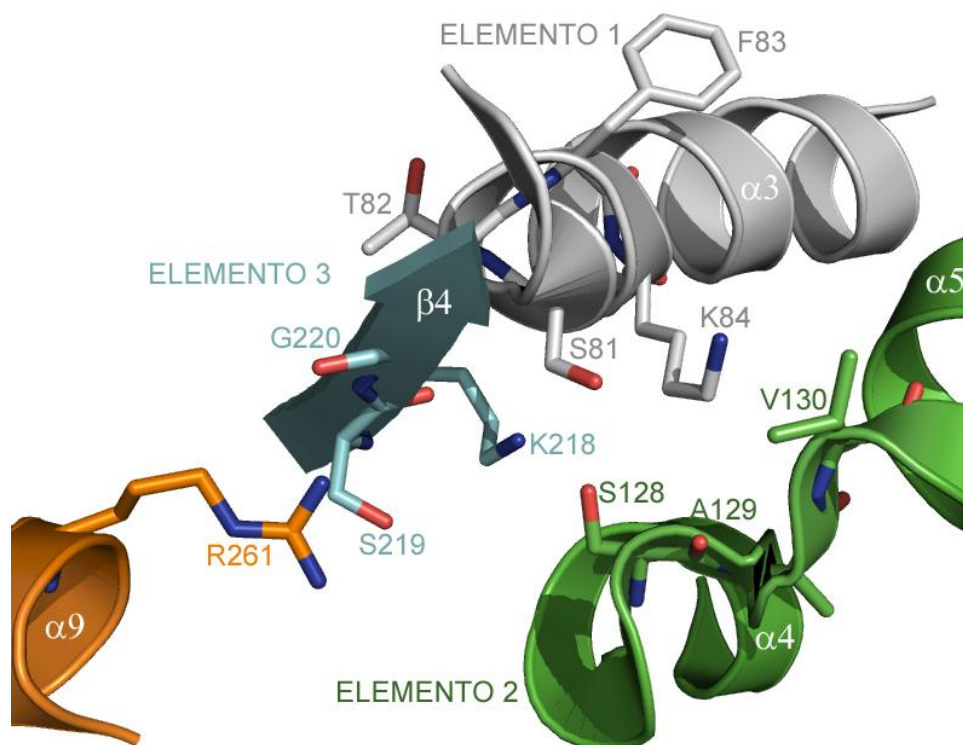


Figura 30. Representación de los elementos que componen el centro activo. El elemento 1 (coloreado en gris) lo componen los residuos S81-T82-F83-K84 y está localizado en la hélice  $\alpha_3$ . Los residuos S128-A129-V130 constituyen el elemento 2 (verde) que se sitúa entre las hélices  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$ . El elemento 3 (representado en cian) está formado por los residuos K218-S219-G220 localizados en la lámina  $\beta_4$ .

Las interacciones que se establecen entre los residuos de los tres elementos anteriormente descritos, así como la presencia de moléculas de agua, mantienen una estructura preformada del centro activo.

Existen pequeñas diferencias en la conformación del sitio activo entre el modelo A y el modelo B, motivadas principalmente por la presencia de una molécula de sulfato en el modelo A y la carboxilación de la K84 en el modelo B.

En el modelo A (Fig. 31a) la serina catalítica (S81) establece enlaces de puente de hidrógeno con la S128 del elemento 2 ( $O^Y S128 - O^Y S81$  2.9 Å), con la molécula de sulfato ( $O1 SO_4 - O^Y S81$  3.3 Å) y con la molécula de agua 41 ( $O HOH 41 - O^Y S81$  2.6 Å). El grupo guanidinio de la R261 interacciona con el sulfato ( $NH1 R261 - O4 SO_4$  2.9 Å y  $NH2 R261 - O2 SO_4$  3.1 Å). El sulfato, que parece ocupar una posición similar a la que adopta el carboxilato del antibiótico durante la catálisis enzimática, establece también puentes de hidrógeno con las moléculas de

agua 41 (O1 SO<sub>4</sub> — O HOH 41 2.8 Å) y 121 (O1 SO<sub>4</sub> — O HOH 121 2.8 Å). La K84 se encuentra desplazada hacia el lazo Ω, interactuando con el W167 (3.5 Å).

En el modelo B (Fig. 31b) la ausencia de una molécula de sulfato es compensada por la presencia de diversas moléculas de agua que establecen puentes de hidrógeno con la R261 (NH<sub>2</sub> R261 — O HOH 173 2.9 Å), la S219 (O<sup>Y</sup> S219 — O HOH 74 2.5 Å), y la S81 (O<sup>Y</sup> S81 — O HOH 174 2.7 Å, O<sup>Y</sup> S81 — O HOH 77 2.6 Å). El puente de hidrógeno que se forma entre la S81 y la S218 se mantiene en el modelo B (O<sup>Y</sup> S128 — O<sup>Y</sup> S81 2.9 Å). La K84 carboxilada se aproxima a la serina catalítica (S81), estableciéndose un puente de hidrógeno entre el O1 del carboxilato y el grupo hidroxilo de la S81 (2.9 Å). Además, el carboxilato de la K84 se estabiliza mediante puentes de hidrógeno que forma con el nitrógeno presente en la cadena lateral del W167 (O1 K84 — N<sup>E</sup> W167 2.79 Å y O2 K84 — N<sup>E</sup> W167 3.1 Å). El O2 del carboxilato interactúa también con la molécula de agua 24, (O2 K84 — O HOH24 2.7 Å) que puede desempeñar un papel importante durante la reacción de desacilación.

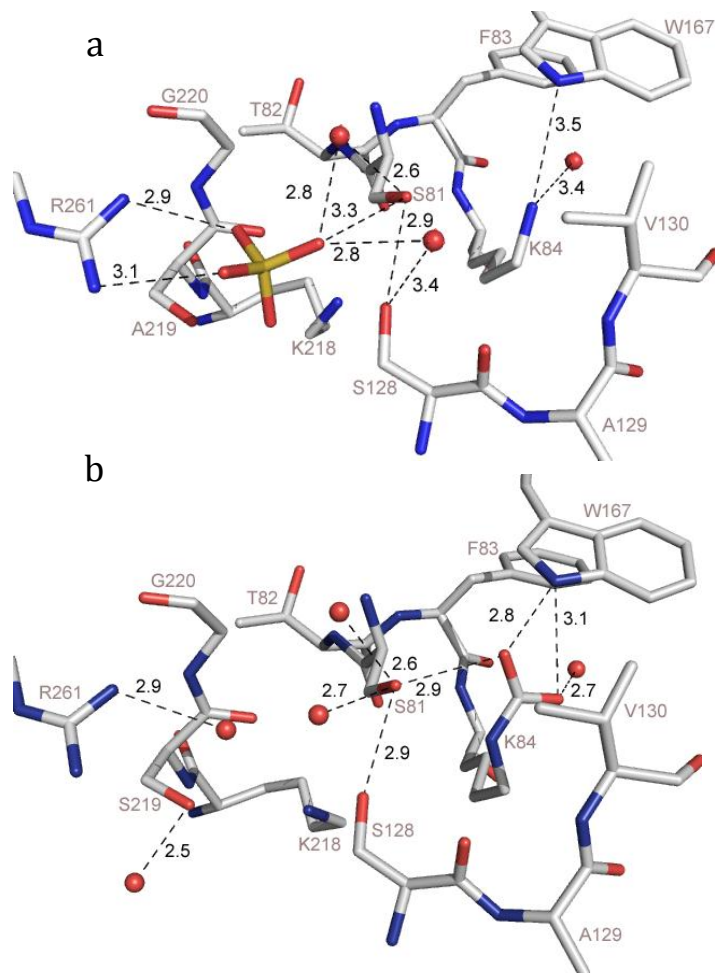


Figura 31. Representación de las interacciones (distancias en Å) más importantes que estabilizan la conformación del sitio activo de OXA-24 para las dos formas cristalinas A (a) y B (b). Los residuos de la proteína se representan utilizando un modelo de varillas coloreadas según su composición atómica (gris, carbono; amarillo, azufre; azul, nitrógeno; rojo, oxígeno). Las moléculas de agua se representan como pequeñas esferas en rojo.

### 5.4.3 Bases moleculares que determinan la especificidad de OXA-24 por antibióticos carbapenémicos

Los tres motivos que conforman la estructura general del centro activo de OXA-24 aparecen muy conservados en otras oxacilinasas y  $\beta$ -lactamasas de clase A y C. No existe, por tanto, ninguna diferencia significativa en la composición y en la organización del centro activo de OXA-24 que a nivel estructural nos permita entender el mecanismo mediante el cual OXA-24, a diferencia del resto de las oxacilinasas, es capaz de hidrolizar antibióticos carbapenémicos. Sin embargo, un análisis más detallado de la superficie molecular de esta enzima ha permitido identificar dos residuos: Y112 y M223, situados en regiones adyacentes al centro activo, que podrían jugar un papel clave en la especificidad por el antibiótico (Fig. 32a).

Las interacciones que se producen entre las cadenas laterales de estos dos residuos crean una barrera hidrofóbica que restringe el acceso al centro activo. De esta forma, el sitio activo de OXA-24 queda delimitado por un túnel de carácter hidrofóbico de  $\sim 6.3$  Å de diámetro que determinaría la forma y la composición química de los antibióticos que pueden acceder a la serina catalítica.

Además, la presencia de la V130, un residuo no polar, refuerza el carácter hidrofóbico del centro activo de OXA-24, así como los contactos hidrofóbicos que se producen entre residuos localizados en el entorno del sitio catalítico como el W115, el W221 y la T111.

Otro grupo de residuos no polares (V78, V225, V229 y W231), situados en el lazo  $\beta 4$ - $\beta 5$ , crean también un núcleo hidrofóbico que bloquea parcialmente la parte inferior de la cavidad que aloja el centro activo, contribuyendo a determinar la especificidad de OXA-24 por determinados tipos de antibióticos (Fig. 32b, 32c).

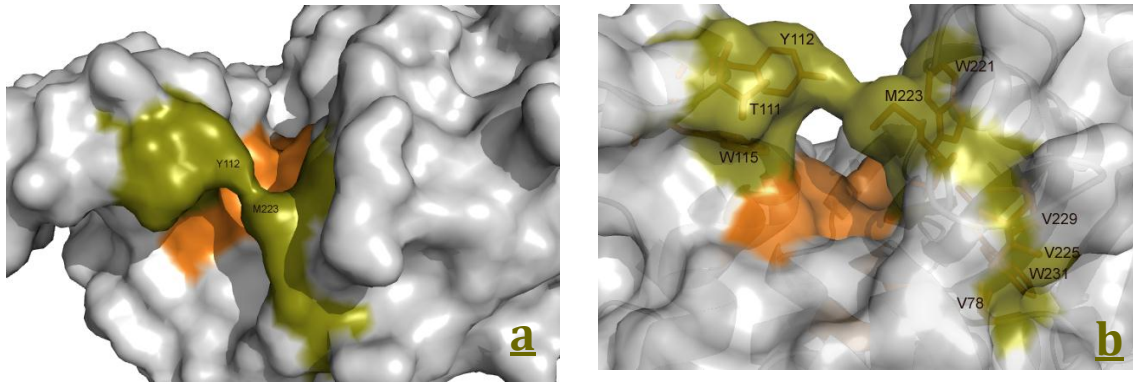
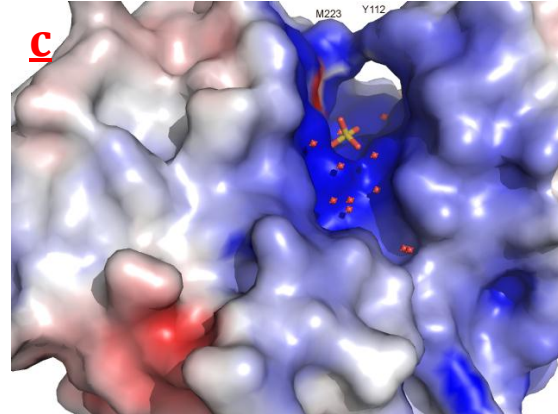


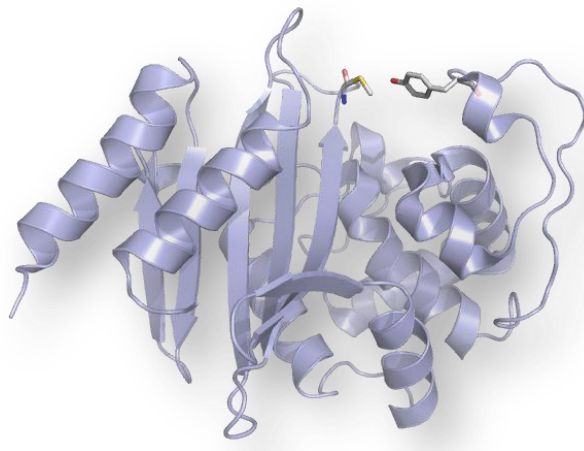
Figura 32. Representación de la superficie molecular del sitio activo de OXA-24. a) Detalle de la superficie de interacción entre los residuos Y112 y M223, que define una barrera hidrofóbica (verde) que condiciona el acceso al centro activo (naranja). b) Núcleo hidrofóbico (resaltado en verde) formado por aminoácidos adyacentes al centro activo (señalado en naranja). c) "Túnel" que delimita la entrada a la cavidad que aloja el centro activo. La superficie de la proteína se colorea de acuerdo con su potencial electrostático (azul carga positiva, rojo carga negativa), calculado con el programa APBS (Baker, Sept et al. 2001).



### 5.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES OXA-24<sub>Y112A</sub> Y OXA-24<sub>DM</sub>

El análisis de la estructura cristalográfica de OXA-24 demuestra que la tirosina 112 y la metionina 223 podrían ser dos residuos claves en la adquisición de la capacidad de hidrolizar antibióticos carbapenémicos. Para corroborar el papel que desempeñan ambos aminoácidos se crearon diferentes mutantes mediante mutagénesis dirigida sobre el gen *bla*<sub>OXA24</sub> (Santillana, Beceiro et al. 2007) en colaboración con el laboratorio del Dr. Germán Bou (Hospital Juan Canalejo, La Coruña):

MUTANTES



- Tyr112 → Ala112

**OXA-24<sub>Y112A</sub>**

- Met223 → Ala223

**OXA-24<sub>M223A</sub>**

- Tyr112 → Ala112  
Met223 → Ala223

**OXA-24<sub>DM</sub>**

5.5.1 Ensayos bioquímicos y funcionales

Las enzimas mutantes obtenidas fueron caracterizadas mediante ensayos bioquímicos para establecer sus parámetros cinéticos y mediante ensayos funcionales a través de la determinación de las CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) en presencia de carbapenémicos.

5.5.1.1 Determinación de las CMIs

Para valorar la funcionalidad de los mutantes de OXA-24 anteriormente descritos, se procedió al cálculo de la CMI frente a carbapenemas de una cepa de *A. baumannii* capaz de expresar las proteínas mutantes

Para la determinación de las CMIs frente a imipenem y meropenem, tanto OXA-24 nativa como las proteínas mutantes fueron expresadas en células de *A. baumannii* JC7/04 previamente transformadas con los plásmidos recombinantes PAT-RA/OXA-24<sub>WT</sub>, PAT-RA/OXA-24<sub>Y112A</sub>, PAT-RA/OXA-24<sub>M223A</sub> y PAT-RA/OXA-24<sub>DM</sub> (cepas *AB<sub>JC7/04</sub>OXA-24wt*, *AB<sub>JC7/04</sub>OXA-24<sub>Y112A</sub>*, *AB<sub>JC7/04</sub>OXA-24<sub>M223A</sub>* y *AB<sub>JC7/04</sub>OXA-24<sub>DM</sub>*). Las células crecieron frente a diferentes concentraciones de imipenem y meropenem para valorar el efecto inhibitorio que dichos antibióticos tienen sobre el crecimiento de *A. baumannii* cuando porta OXA-24 o alguno de sus mutantes. Los valores de CMI obtenidos se detallan en la Tabla 8 (Santillana, Beceiro et al. 2007).



**Tabla 8. Valores de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )\* determinados para *A. baumannii* portador de OXA-24<sub>WT</sub> y los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub>, OXA-24<sub>M223A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub>.**

Antibiótico	OXA-24 <sub>WT</sub>	OXA-24 <sub>Y112A</sub>	OXA-24 <sub>M223A</sub>	OXA-24 <sub>DM</sub>	pAT-RA <sup>†</sup>
Ampicilina	>256	>256	>256	>256	>256
Imipenem	32	4	16	4	0.5
Meropenem	64	1	16	0.5	0.25

<sup>†</sup>*A. baumannii* transformado con pAT-RA como control negativo.

\*Los puntos de corte marcados por la NCCLS establecen que las cepas de *A. baumannii* con valores iguales o menores a 4  $\mu\text{g/ml}$  ( $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ ) son sensibles a  $\beta$ -lactámicos carbapenémicos.

Los valores de CMI (32/64  $\mu\text{g/ml}$ ) frente a imipenem y meropenem obtenidos para la cepa *AB<sub>JC7/04</sub>OXA-24<sub>WT</sub>* indican que se trata de una cepa resistente a carbapenémicos, según los criterios marcados por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards 2003).

Las cepas *AB<sub>JC7/04</sub>OXA-24<sub>Y112A</sub>* y *AB<sub>JC7/04</sub>OXA-24<sub>DM</sub>* presentan un descenso significativo en sus valores de CMIs (4/1 y 4/0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) frente a carbapenemas, alcanzando valores que las convierten en sensibles a este tipo de antibióticos.

En el caso de la cepa *AB<sub>JC7/04</sub>OXA-24<sub>M223A</sub>* se aprecia un descenso moderado de las CMIs (16/16  $\mu\text{g/ml}$ ), de forma que, aunque presentan valores más bajos que las células que expresan la proteína nativa, mantienen la resistencia frente a imipenem y meropenem.

#### 5.5.1.2 Ensayos cinéticos.

Se realizaron experimentos cinéticos para estudiar la actividad catalítica de OXA-24<sub>WT</sub> y los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub> frente a imipenem y meropenem. La mutación de la M223 a alanina parece tener un efecto menos importante sobre la actividad carbapenemasa de OXA-24, por lo que se descartó realizar estos ensayos con el mutante OXA-24<sub>M223A</sub>.

Los parámetros cinéticos ( $k_{\text{cat}}$ ,  $K_m$ ) calculados en estos experimentos (Tabla 9) (Santillana, Beceiro et al. 2007) proporcionan información acerca de la afinidad de OXA-24<sub>WT</sub>, OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub> por oxacilina, imipenem y meropenem y de la eficacia con la que los hidrolizan (eficiencia catalítica,  $k_{\text{cat}}/K_m$ ).

OXA-24 presenta una eficiencia catalítica ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) con respecto a la ampicilina entre tres y seis veces mayor que los mutantes. Aunque con las tres enzimas se obtiene una velocidad de reacción similar (valores de  $k_{\text{cat}}$  similares), los mutantes presentan valores de  $K_m$  más elevados que OXA-24<sub>WT</sub>, lo que indica que las mutaciones afectan principalmente a la afinidad de OXA-24<sub>WT</sub> por la ampicilina.

Los resultados descritos en la Tabla 9 nos muestran también que OXA-24<sub>WT</sub> posee una eficiencia catalítica frente a la oxacilina ( $k_{\text{cat}}/K_m = 202$ ) muy inferior a la

## RESULTADOS

de otras oxacilinasas, con valores de  $K_m$  muy elevados, que indican la baja afinidad que OXA-24<sub>WT</sub> tiene por la oxacilina, a pesar de tratarse de una oxacilinasas. La eliminación en OXA-24<sub>DM</sub> de la barrera hidrofóbica creada por la Y112 y la M223 triplica la eficiencia catalítica de OXA-24 hacia la oxacilina.

Por otro lado, podemos observar que OXA-24<sub>WT</sub> presenta una considerable actividad catalítica frente a imipenem y meropenem ( $k_{cat}/K_m$  de 2786 y 37869 respectivamente), con los que interacciona con gran afinidad (valores de  $K_m$  muy pequeños). Los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub> sin embargo, muestran una eficiencia catalítica muy baja frente a carbapenémicos, con valores de  $k_{cat}/K_m$  muy inferiores los que presenta OXA-24<sub>WT</sub>. Especialmente drástica es la pérdida de actividad frente a meropenem, con un descenso de la eficiencia catalítica de entre 456 (OXA-24<sub>DM</sub>) y 155 veces (OXA-24<sub>Y112A</sub>).

Es interesante destacar que los valores de  $K_m$  para imipenem y meropenem son mucho más elevadas en los mutantes que en OXA-24<sub>WT</sub>, mientras que los valores de  $k_{cat}$  son similares en las tres enzimas. Esto indica que los mutantes pierden la capacidad de interaccionar con imipenem y meropenem y concuerda con las conclusiones extraídas del análisis de la estructura cristalográfica de OXA-24, en las que se destaca la importancia de la Y112 y la M223, dos residuos adyacentes al centro activo implicados en la especificidad por el sustrato pero que no participan directamente en la catálisis.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de OXA-24, OXA-24<sub>DM</sub> Y OXA-24<sub>Y112A</sub> frente a los antibióticos señalados.

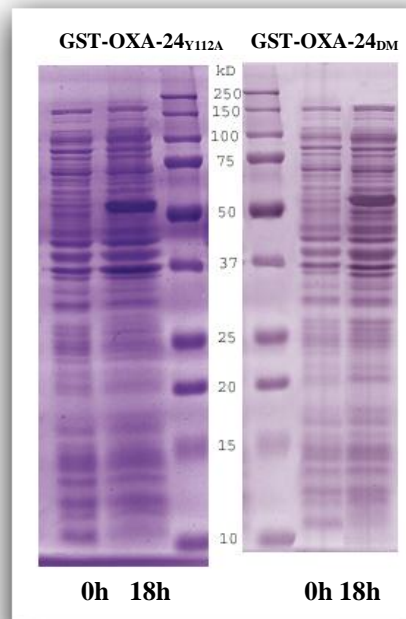
	Ampicilina			Oxacilina			Imipenem			Meropenem		
	$K_m$ , $\mu\text{M}$	$k_{cat}$ , $\text{s}^{-1}$	$k_{cat}/K_m$ , $\text{mM}^{-1} \text{S}^{-1}$	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$
OXA-24	80 ( $\pm 15$ )	223 ( $\pm 92.9$ )	2758	1272 ( $\pm 222$ )	0.18 ( $\pm 0.086$ )	202	0.58 ( $\pm 0.084$ )	1 ( $\pm 0.47$ )	2.786	0.0099 ( $\pm 0.0014$ )	0.37 ( $\pm 0.1$ )	37869
OXA-24 DM	410 ( $\pm 11$ )	401 ( $\pm 84$ )	980	1951 ( $\pm 461$ )	0.35 ( $\pm 0.12$ )	645	9 ( $\pm 0.71$ )	3 ( $\pm 0.26$ )	342	3 ( $\pm 0.45$ )	0.25 ( $\pm 0.1$ )	83
OXA-24 Y112A	594 ( $\pm 60$ )	274 ( $\pm 14$ )	461	3757 ( $\pm 816$ )	0.055 ( $\pm 0.019$ )	197	15 ( $\pm 2.20$ )	5 ( $\pm 1.21$ )	355	1 ( $\pm 15$ )	0.22 ( $\pm 0.05$ )	243

Los datos representados en esta tabla son los valores promedio de los resultados obtenidos después de realizar cada experimento por triplicado.

### 5.5.2 Sobreexpresión y purificación de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub>.

Para obtener preparaciones adecuadas para los experimentos de cristalización, se utilizaron los protocolos de expresión y purificación anteriormente descritos para OXA-24 nativa. Los genes que codifican para los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub> (sin péptido señal) se clonaron en el vector pGEX-6-P1 (Fig. 11) entre los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, de forma que

ambos mutantes se expresaron como proteínas de fusión con GST. La expresión se llevó a cabo en medio LB con células *E.coli* BL21 a 37°C durante 18 horas (Fig. 33).



**Figura 33. Expresión de los mutantes de OXA-24 fusionadas a GST: GST-OXA-24<sub>Y112A</sub> y GST-OXA-24<sub>DM</sub>. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% y se utilizó el marcador de peso molecular "Precision Plus Protein Standard Dual Color" de la casa comercial Bio-Rad**

Las proteínas de fusión solubles se purificaron realizando cromatografías de afinidad en columnas de Glutation sepharosa GSTrap™ FF (Amersham Biosciences), que retienen únicamente las proteínas fusionadas a GST. Para recuperar GST-OXA-24<sub>Y112A</sub> y GST-OXA-24<sub>DM</sub> se lavó la columna con 10 mM de glutation reducido (Fig. 34).

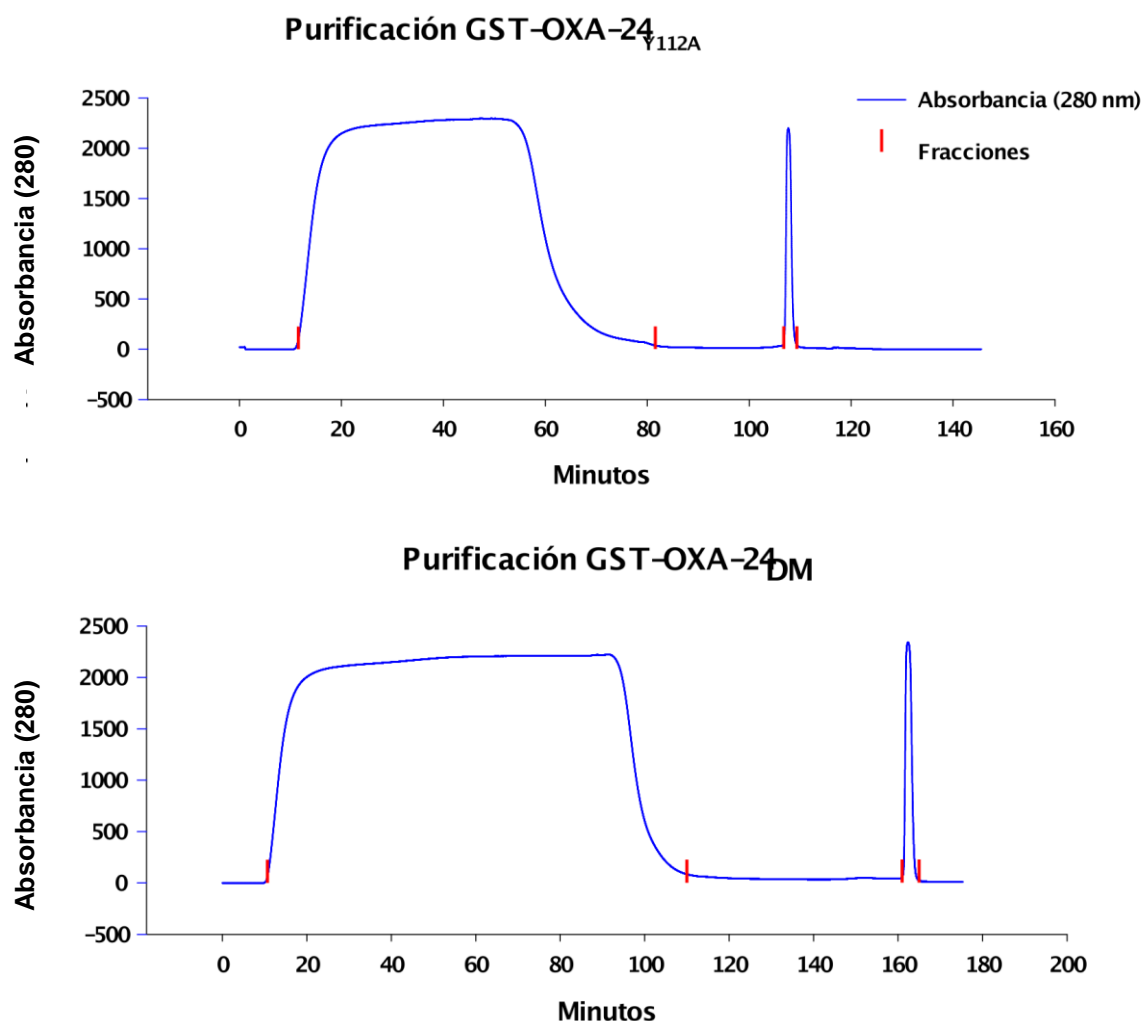


Figura 34. Purificación de las proteínas de fusión GST-OXA-24<sub>Y112A</sub> y GST-OXA-24<sub>DM</sub>. De la columna de Glutation sepharosa eluye un primer pico correspondiente a proteínas no retenidas en la resina. Tras un lavado posterior con TRIS 50 mM pH=7, 150 mM NaCl, 1mM DTT , 5mM EDTA y 10 mM de glutation se obtiene un segundo pico que corresponde a la elución de las proteínas de fusión.

Para escindir la proteína de fusión, GST-OXA-24<sub>Y112A</sub> y GST-OXA-24<sub>DM</sub> fueron proteolizadas a 4°C durante ~12h con una variante recombinante de la proteasa 3C (GST-3C) empleando una relación de concentraciones de 1/50 (proteasa/proteína). Los resultados se comprobaron mediante electroforesis en geles de acrilamida (Fig. 35).

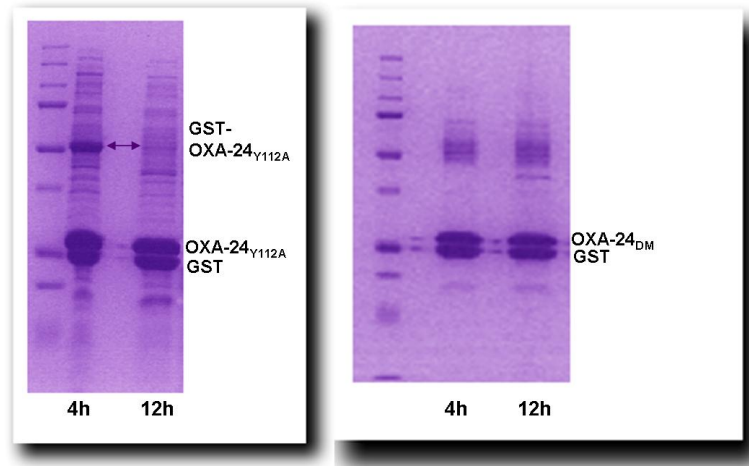


Figura 35. Electroforesis de las proteínas de fusión tratadas con la proteasa 3C tras 4h y 12 h de digestión: a) GST-OXA-24<sub>Y112A</sub> y b) GST-OXA-24<sub>DM</sub>. El marcador de peso molecular Dual color, (Bio-Rad) se incluye a la izquierda.

Los mutantes de OXA24 se recuperaron en un último paso cromatográfico con una columna de Glutathion sepharosa GSTrap™ FF (Amersham Biosciences) (Fig.36).

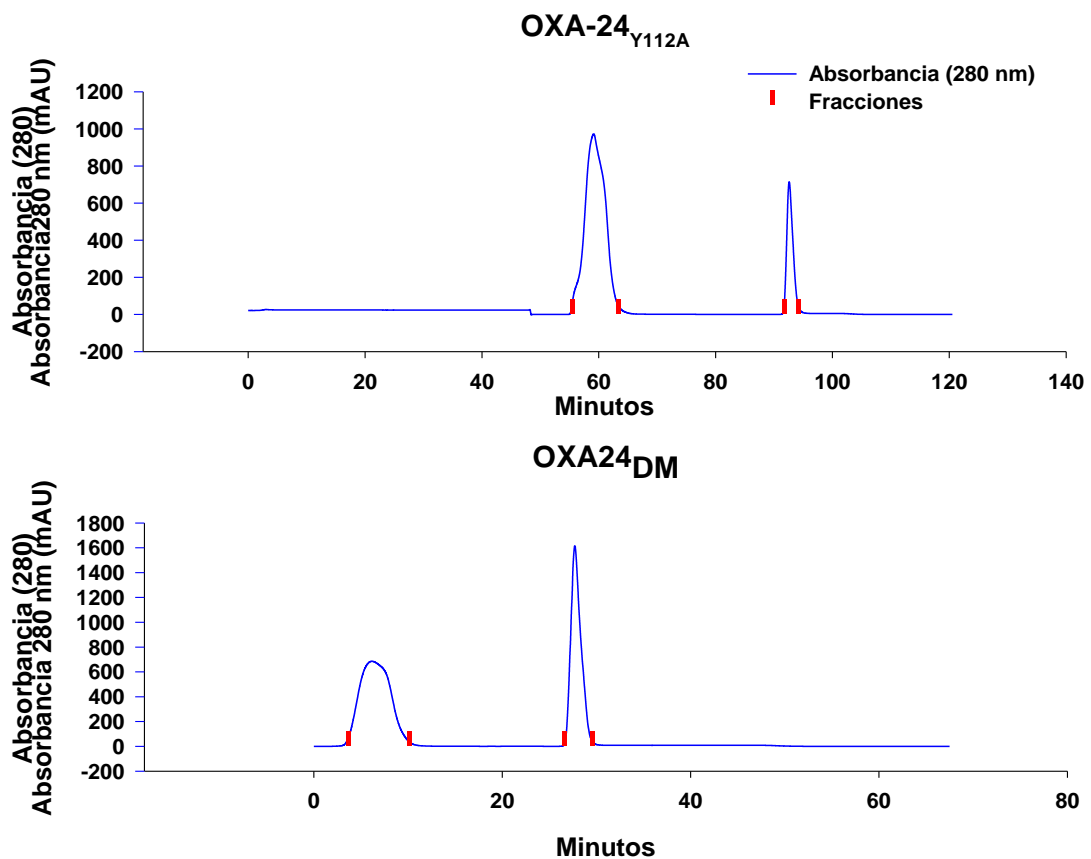


Figura 36. Purificación de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub> tras la digestión con la proteasa GST-3C. Ambos mutantes eluyen de la columna de Glutathion sepharosa en un primer pico, mientras que las proteínas de fusión no digeridas, la proteasa 3C y la proteína GST aparecen en un segundo pico tras lavar la columna con 10 mM de glutathion reducido.

## RESULTADOS

Mediante electroforesis SDS-PAGE se comprobó el estado de las soluciones de ambos mutantes (Fig. 37).

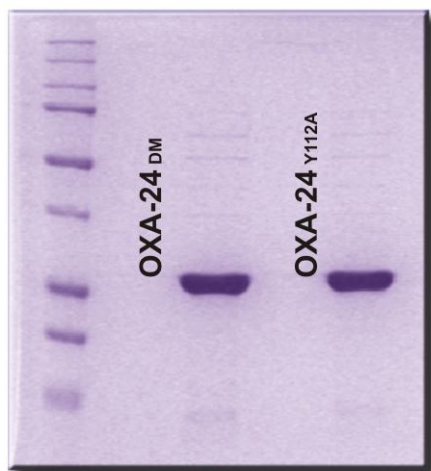


Figura 37. Análisis del grado de pureza de los mutantes OXA-24<sub>DM</sub> (28918.1 Da) y OXA-24<sub>Y112A</sub> (28978.3 Da) en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) del 15%, empleando como marcador de peso molecular la preparación comercial “Precision Plus Protein Standard Dual Color” (Bio-Rad).

### 5.5.3 Caracterización de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub> mediante experimentos de ultracentrifugación analítica.

Las soluciones de las proteínas mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub> se analizaron mediante experimentos de ultracentrifugación analítica para confirmar que ambos mutantes conservaban en solución el carácter monomérico de OXA-24<sub>WT</sub>.

Los ensayos de velocidad de sedimentación realizados con soluciones de las proteínas mutantes a 0.5 mg/ml, en ambos casos, mostraron la presencia mayoritaria de una especie compatible con un monómero (Figs. 38, 39).

Para el mutante OXA-24<sub>Y112A</sub> se obtuvo una distribución del coeficiente de sedimentación en la que se observaba un pico principal (75% de la muestra) con un coeficiente de sedimentación de 2.47 S, concordante con el coeficiente de sedimentación de OXA-24<sub>WT</sub> en solución (2.4 S). El 25% restante de la distribución corresponde a diferentes picos con coeficientes de sedimentación más elevados que reflejarían la presencia de proteína agregada en la muestra o de diferentes impurezas.

En el caso del mutante OXA-24<sub>DM</sub>, se identificó una especie con un coeficiente de sedimentación de 2.38 S, similar al del monómero de OXA-24<sub>WT</sub>.

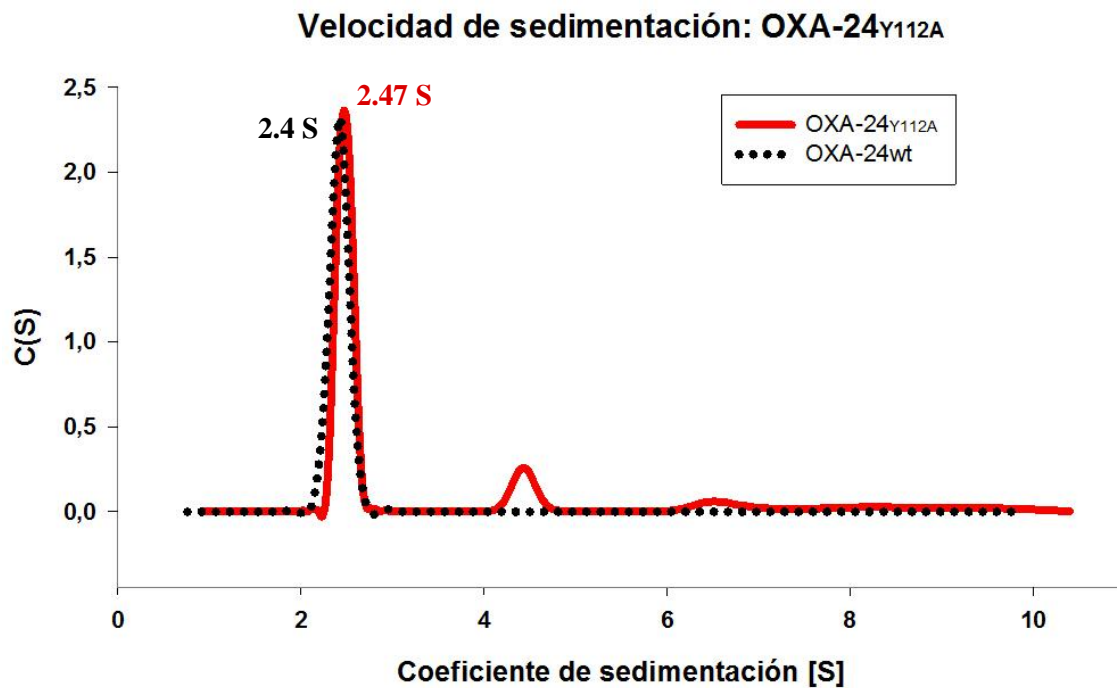


Figura 38. Distribución del coeficiente de sedimentación ( $c$  (s)) del mutante OXA-24<sub>Y112A</sub> en tampón Tris 50 mM pH=7, 150 mM NaCl, 1mM DTT, 5 mM EDTA a una concentración de 0.5 mg/ml. La comparación del perfil de sedimentación con el de OXA-24<sub>WT</sub> muestra que presenta un coeficiente de sedimentación semejante al del monómero de OXA-24<sub>WT</sub>, lo que indica que se encuentra también como monómero en solución

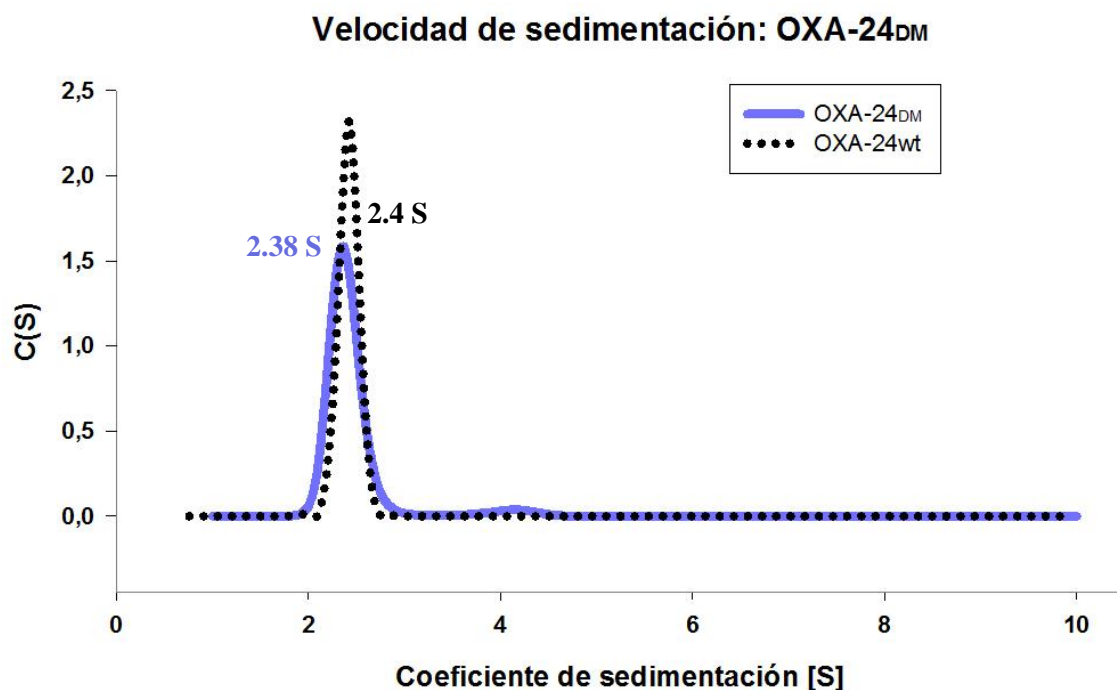


Figura 39. Distribución del coeficiente de sedimentación ( $c$  (s)) del mutante OXA-24<sub>DM</sub> en tampón Tris 50 mM pH=7, 150 mM NaCl, 1mM DTT, 5 mM EDTA a una concentración de 0.5 mg/ml. Su coeficiente de sedimentación, similar al del monómero de OXA-24<sub>WT</sub>, indica que se encuentra como monómero en solución.

## RESULTADOS

### 5.6 RESOLUCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS MUTANTES OXA-24<sub>Y112A</sub> Y OXA-24<sub>DM</sub>

#### 5.6.1 Cristalización.

Para realizar los experimentos de cristalización se concentraron las soluciones de ambos mutantes hasta ~10 mg/ml. Mediante difusión de vapor en gota sentada se probaron 768 condiciones comerciales, además de las condiciones de cristalización con las que se obtuvieron cristales de la proteína nativa. Los ensayos se llevaron a cabo mezclando 0.5  $\mu$ l de la solución de cristalización con 0.5  $\mu$ l de la solución de proteína, y las gotas se incubaron a 22°C.

De estos ensayos de cristalización, los mejores cristales de las dos proteínas mutantes se obtuvieron en la condición comercial 30%(w/v) PEG 5000 MME, 0.1M Tris pH 8.0, 0.2M sulfato de litio (Fig. 40). Para evitar que crecieran adheridos a la base de la placa y para mejorar su tamaño, los cristales se optimizaron en gota colgante aumentando el volumen final de la gota a 2  $\mu$ l (1  $\mu$ l de solución de cristalización más 1  $\mu$ l de solución de proteína).

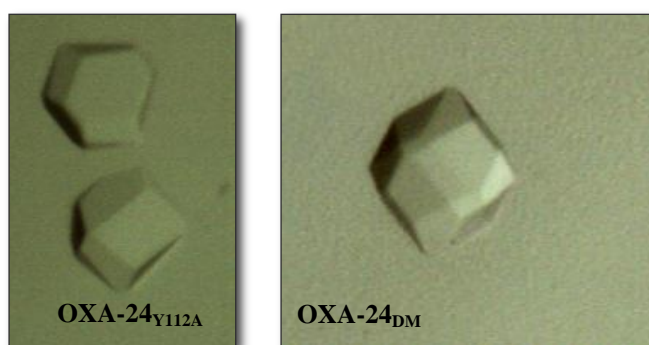


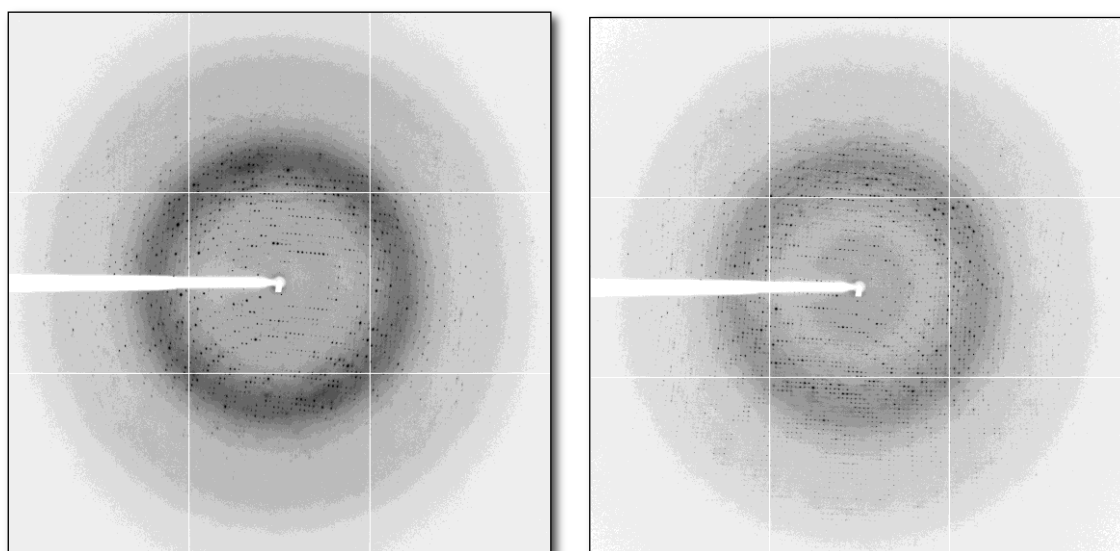
Figura 40. Cristales de las proteínas mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub> optimizados para la recogida de datos de difracción.

#### 5.6.2 Recogida y procesado de los datos de difracción.

Para llevar a cabo la recogida de datos a 110 K, los cristales se sumergieron en nitrógeno líquido embebidos en una solución crioprotectora compuesta por la solución de cristalización suplementada con un 15 % de glicerol.

Finalmente, los cristales se irradiaron en las líneas de luz sincrotrón ID14.1 (OXA-24<sub>DM</sub>) e ID14.4 (OXA-24<sub>Y112A</sub>) del ESRF (Grenoble, Francia) (Fig. 41).





**Figura 41.** Patrones de difracción correspondientes a los cristales de OXA-24<sub>Y112A</sub> (A) y OXA-24<sub>DM</sub> (B). Cada imagen de difracción se obtuvo girando cada cristal un grado durante 2 s (ID14.4) y 3 s (ID14.1) hasta recoger 110 imágenes en ambos casos.

El procesamiento de los datos de difracción se realizó con el programa *Mosflm* (Leslie 2006), mientras que el escalado se llevó a cabo utilizando el programa *Scala* del CCP4 (Collaborative Computational Project number 4 1994) Los valores obtenidos tras procesar los datos de difracción de los cristales de cada mutante se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10 :** Valores estadísticos cristalográficos del procesamiento de los datos de difracción de los cristales de OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub>

	OXA-24 <sub>Y112A</sub>	OXA-24 <sub>DM</sub>
<b>Grupo espacial</b>	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
<b>Dimensiones de la celda</b> a, b, c (Å) α, β, γ (°)	102.2, 102.2, 86.1 90, 90, 90	102.2, 102.2, 84.5 90, 90, 90
<b>Rango de resolución (Å)</b>	45.6-1.85 (1.95-1.85)*	40.19-2.1 (2.21-2.1)*
<b>Completitud (%)</b>	99.9 (99.9)	100 (100)
<b>Reflexiones medidas</b>	318431 (45980)	231185 (33523)
<b>Reflexiones únicas</b>	38584 (5561)	26741 (3836)
<b>R<sub>merge</sub> (%)</b>	8.1 (41.3)	7.9 (39.2)
<b>Multiplicidad</b>	8.3 (8.3)	8.6 (8.7)
<b>I/σ(I)</b>	5.7 (1.8)	7.5 (1.9)

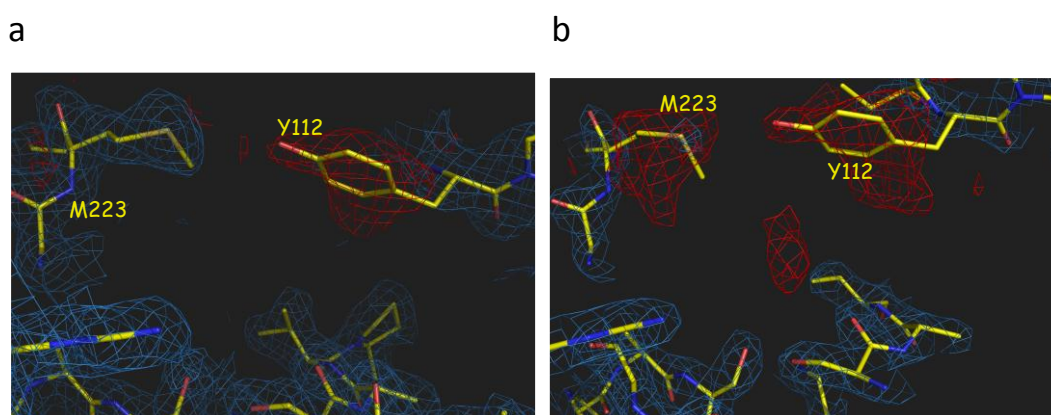
\* Los datos de la capa de alta resolución aparecen entre paréntesis

## RESULTADOS

### 5.6.3 Determinación y refinamiento de la estructura de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub>.

Tanto OXA-24<sub>Y112A</sub> como OXA-24<sub>DM</sub> cristalizaron en el mismo grupo espacial y con aproximadamente la misma celdilla que ambas formas de la proteína nativa, por lo que la obtención del modelo estructural de ambos mutantes se inició con un primer refinamiento de cuerpo rígido y el cálculo de un mapa de diferencia Fourier ( $F_o - F_c$ ) con el programa *Refmac* (Murshudov, Skubak et al.), utilizando los datos experimentales escalados de los mutantes y el modelo de la proteína nativa OXA-24.

A partir del análisis detallado del mapa de densidad electrónica con el programa gráfico COOT (Emsley and Cowtan 2004) se trabajó en la construcción de los modelos, alternando el modelado con ciclos de refinado realizados con el programa *Refmac* (Murshudov, Skubak et al.). El mapa diferencia nos indicó que átomos del modelo nativo (pdb ID 3G4P) utilizado no coincidían con la densidad electrónica calculada a partir los datos experimentales recogidos de los cristales de OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub>, bien reflejando la presencia de un número mayor de átomos o de átomos con mayor densidad electrónica (densidad positiva) o la ausencia en la densidad experimental de algunos de los átomos presentes en el modelo (densidad negativa). De esta forma, los residuos mutados se identificaron claramente en el mapa diferencia, al aparecer en contornos con densidad negativa (Fig. 42).



**Figura 42** Mapas de densidad electrónica  $2F_o - F_c$  a  $1.5 \sigma$  (azul) y  $F_o - F_c$  (mapa diferencia) a  $2.5 \sigma$  (rojo) correspondientes a los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> (a) y OXA-24<sub>DM</sub> (b). La densidad electrónica negativa (representada en rojo) revela que los residuos M223 y Y112 (1) o Y112(2) presentes en la estructura de la proteína nativa utilizada inicialmente como modelo no están presentes en los mutantes.

En los pasos finales del refinamiento se incorporaron moléculas de agua y otras moléculas presentes en la condición de cristalización (glicerol, PEG y sulfato) para las cuales se apreciaba una densidad electrónica considerable.

Las estadísticas obtenidas del refinado final de los modelos se muestran en la Tabla 11.

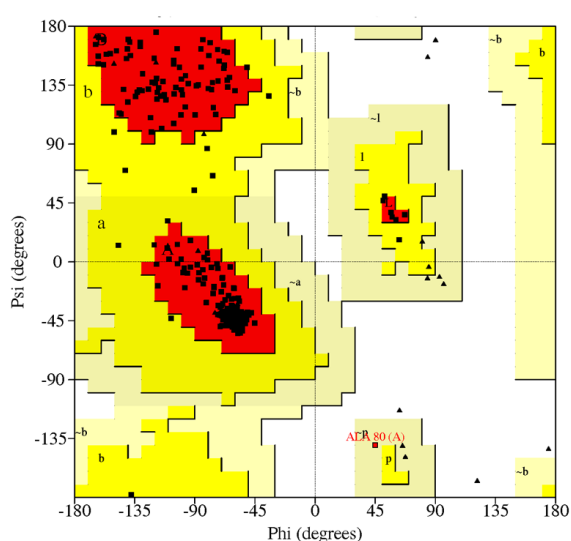
Tabla 11: Valores estadísticos del refinamiento de los modelos de OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub>.

	OXA-24 <sub>Y112A</sub>	OXA-24 <sub>DM</sub>
Número de átomos no hidrógenos	<p><u>2189</u></p> <p>Proteína: 1943</p> <p>Moléculas de agua: 241</p> <p>Heteroátomos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SO<sub>4</sub>: 5</li> <li>• Glicerol: 6</li> <li>• PEG: 18</li> </ul>	<p><u>2111</u></p> <p>Proteína: 1940</p> <p>Moléculas de agua: 151</p> <p>Heteroátomos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SO<sub>4</sub>: 5</li> <li>• Glicerol: 6</li> <li>• PEG: 7</li> </ul>
R / Rfree	0.172 (0.241)/0.205 (0.311)*	0.177 (0.262)/0.215 (0.332)*
Factor B (Å <sup>2</sup> )	27.65	33.25
r.m.s.d. enlaces (Å)	0.022	0.022
r.m.s.d. ángulos (°)	1.96	1.96

- Los datos de la capa de alta resolución aparecen entre paréntesis

Por último, se procedió a la validación de los parámetros estereoquímicos con el programa PROCHECK (Laskowski, MacArthur et al. 1993) y la herramienta Validate incluida en el programa de modelado COOT. (Emsley and Cowtan 2004) El análisis de los diagramas de Ramachandran obtenidos nos permitió comprobar si existían residuos en conformaciones desfavorables por presentar ángulos diedros alejados de las posiciones permitidas (Fig. 43).

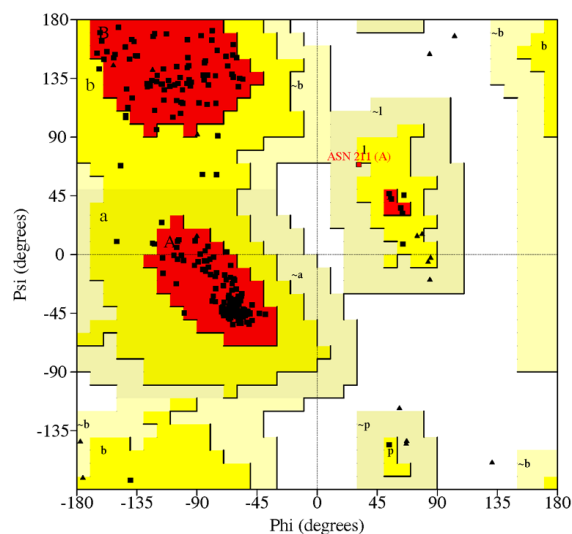
### 1. Diagrama de Ramachandran de OXA-24<sub>Y112A</sub>.



Residuos en regiones favorables [A,B,L]	202 (94%)
Residuos en regiones permitidas [a, b, l, p]	12 (5.6%)
Residuos en regiones generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	1 (0.5%)
Número de residuos que no son prolinas ni glicinas	215
Número de glicinas (triángulos)	20
Número de prolinas	8
Número total de residuos	245

## RESULTADOS

### 2. Diagrama de Ramachandran de OXA-24<sub>DM</sub>



Residuos en regiones favorables [A,B,L]	199 (92.6%)
Residuos en regiones permitidas [a, b, l, p]	15 (7%)
Residuos en regiones generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	1 (0.5%)
Número de residuos que no son prolinas ni glicinas	215
Número de glicinas (triángulos)	20
Número de prolinas	8
Número total de residuos	245

Figura 43 (1) Diagrama de Ramachandran de OXA-24<sub>Y112A</sub>. El 94% de los residuos se encuentran en regiones favorables (representadas en rojo), 12 aminoácidos (5.6 %) en regiones permitidas (amarillo) y sólo 1 residuo, la A80 aparece en una región energéticamente desfavorable (amarillo pálido). (2) Diagrama de Ramachandran de OXA-24<sub>DM</sub>. Sólo el aminoácido N211 se encuentra en una conformación menos favorable mientras que el 92.6% y el 7% de los residuos están en conformaciones favorables y permitidas, respectivamente.

Hay que destacar que los datos de ambos mutantes reflejan la presencia de densidad electrónica atribuible a una molécula de sulfato que interacciona con los residuos del centro activo estabilizando dicha región. La densidad electrónica experimental muestra también que la lisina 84 (K84) del centro activo se encuentra carboxilada en las estructuras de los mutantes (Fig. 44).

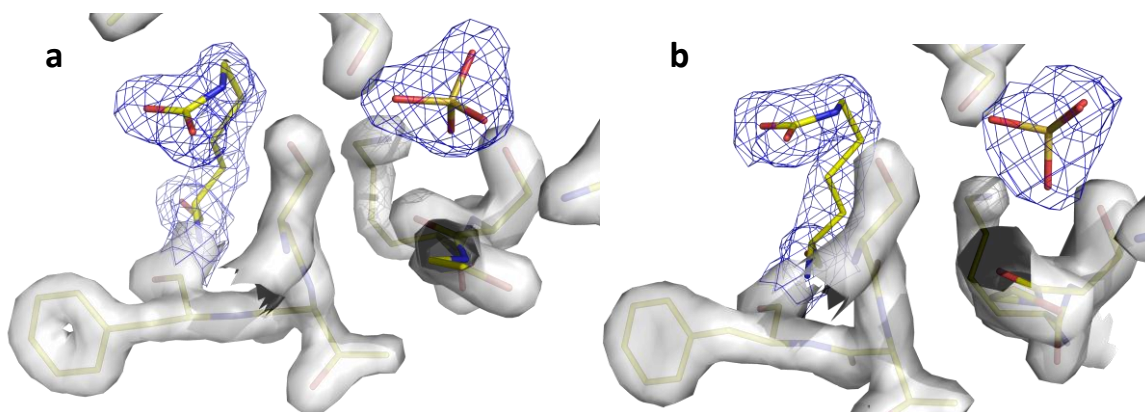


Figura 44. Detalle de la región del centro activo de los modelos de OXA-24<sub>Y112A</sub> (a) y OXA-24<sub>DM</sub> (b). La densidad electrónica  $2F_o - F_c$ , representada como una malla azul, muestra la presencia de una molécula de sulfato estabilizando el centro activo, así como la carboxilación de la K84 en los modelos de ambos mutantes.

Los mapas de densidad electrónica de ambos mutantes presentaban una densidad extra en el extremo N-terminal que nos permitió modelar un nuevo

residuo, fenilalanina 31 (F31), un residuo que no se apreciaba en el modelo de la proteína nativa (Fig. 45).

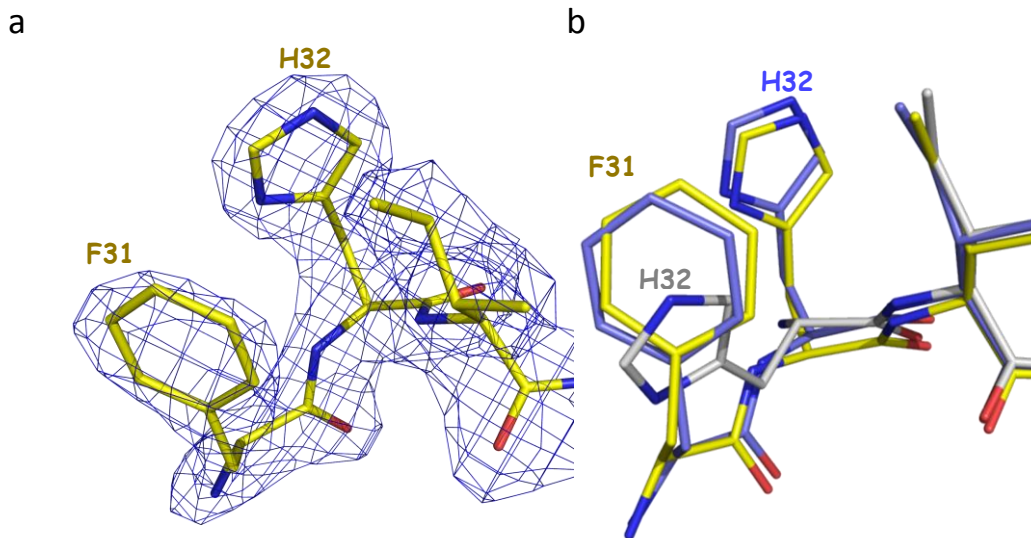


Figura 45. (a) Densidad electrónica  $2F_o-F_c$  a  $1.5 \sigma$  (representada en azul) que muestra la presencia de una fenilalanina (F31) en el extremo N-terminal del mutante OXA-24<sub>DM</sub>. (b) Superposición de los residuos del extremo N-terminal de los mutantes OXA-24<sub>DM</sub> (amarillo), OXA-24<sub>Y112A</sub> (azul) y OXA-24<sub>WT</sub> (gris).

## 5.7 DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS MUTANTES OXA-24<sub>Y112A</sub> Y OXA-24<sub>DM</sub>.

### 5.7.1 *Arquitectura general y centro activo.*

Los mutantes de OXA-24 conservan el plegamiento de la proteína nativa (Tabla 12), constituido por una  $\beta$ -lámina central, situada entre las hélices N- ( $\alpha$ 1) y C- ( $\alpha$ 9) terminales y un dominio helicoidal que forman las hélices  $\alpha$ 2- $\alpha$ 8 (Fig. 46).

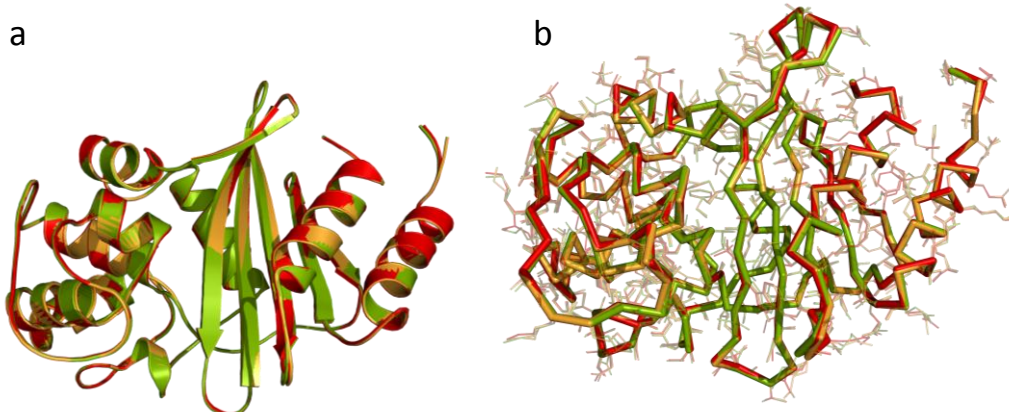


Figura 46. Superposición de las estructuras de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> (representada en verde), OXA-24<sub>DM</sub> (rojo) y OXA-24<sub>WT</sub> (mostrada en naranja). El plegamiento  $\alpha/\beta$  en el que las hélices flanquean un núcleo central en forma de lámina  $\beta$ , se encuentra totalmente conservado en los mutantes (a). Sólo se aprecian algunas pequeñas diferencias en la orientación de algunas cadenas laterales (b).

## RESULTADOS

	r.m.s.d.
OXA-24 <sub>Y112A</sub>	0.23Å (244 átomos C <sup>α</sup> , 100%)
OXA-24 <sub>DM</sub>	0.14Å (244 átomos C <sup>α</sup> , 100%).

Tabla 12 Valores de RMSD obtenidos al superponer con el programa SARF (Alexandrov and Fischer 1996) la estructura de OXA-24<sub>WT</sub> con las estructuras de los mutantes OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub>.

Los modelos para ambos mutantes muestran también que dichas mutaciones no afectan ni a la arquitectura general del centro activo, que mantiene sus tres elementos constituyentes intactos, ni a la posición de ninguno de los residuos que lo componen de forma significativa (Fig. 47).

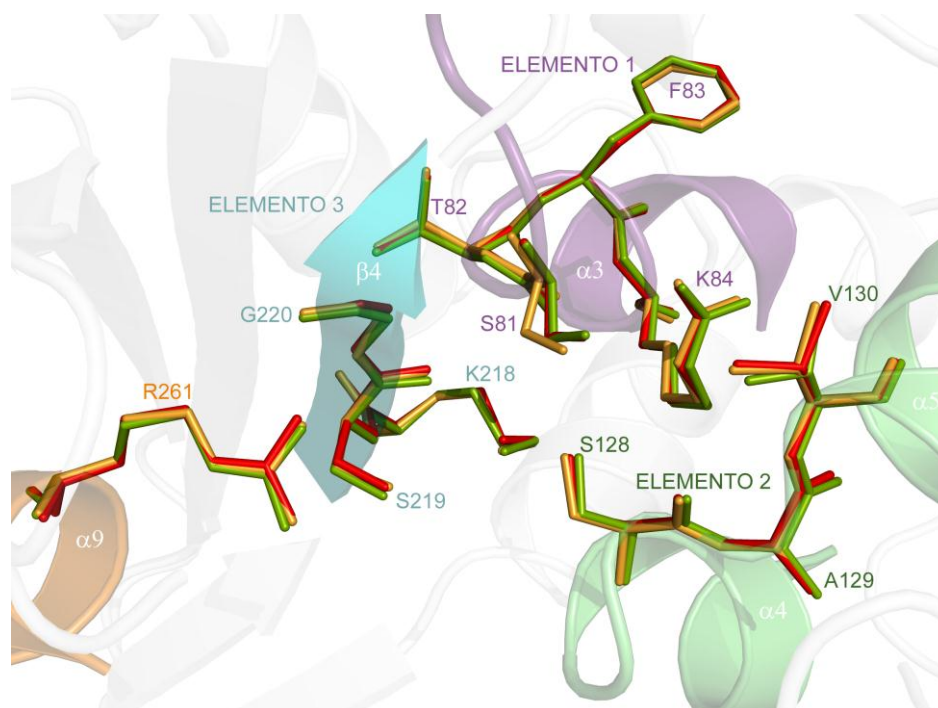
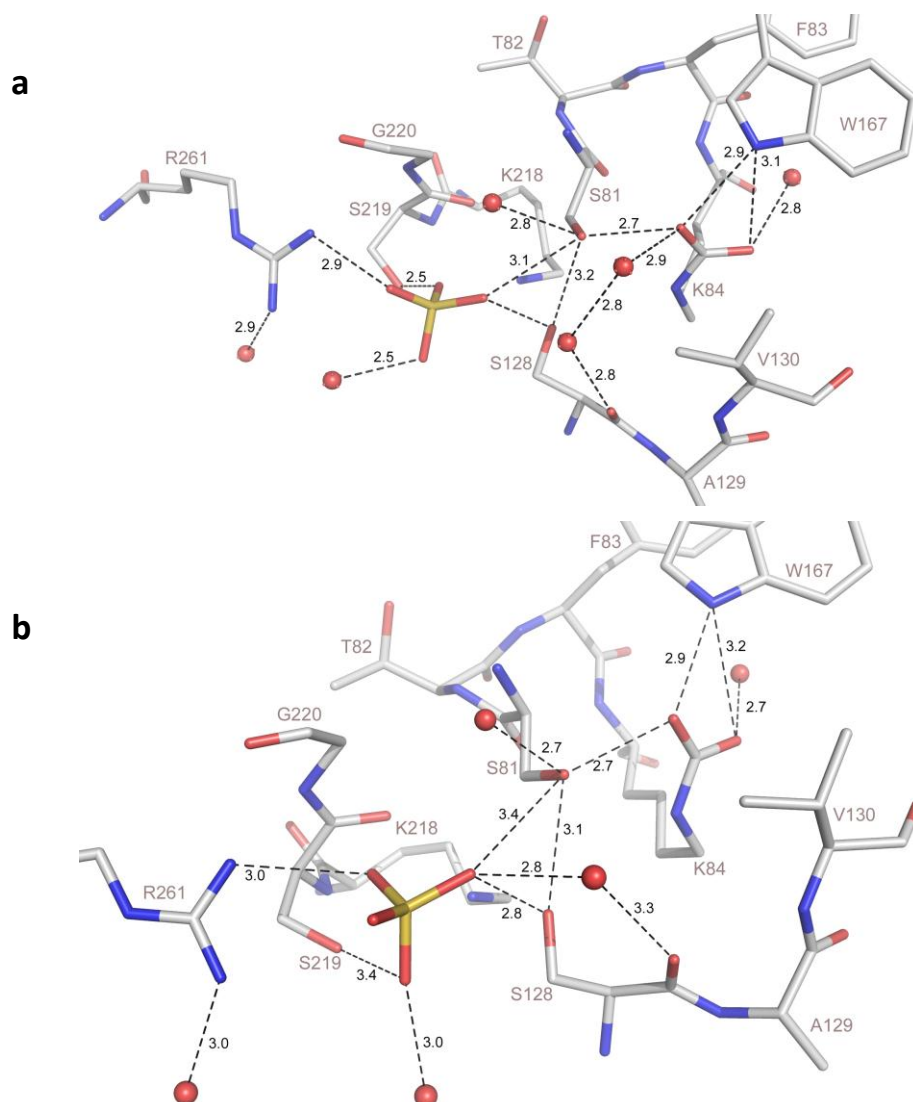


Figura 47. Superposición de los aminoácidos que componen el centro activo de las estructuras de OXA-24<sub>WT</sub> (residuos coloreados en naranja), OXA-24<sub>Y112A</sub> (verde) y OXA-24<sub>DM</sub> (rojo). Los tres elementos que engloban el centro activo de OXA-24<sub>WT</sub> (1 señalado en violeta, 2 en verde y 3 en cian) se conservan sin variación en las proteínas mutadas.

Los aminoácidos que componen los tres elementos del centro activo establecen una red de puentes de hidrógeno con moléculas del solvente (agua y sulfato) que estabiliza la cavidad en ausencia del sustrato (Fig. 48). En las estructuras de los dos mutantes, el O<sup>γ</sup> de la serina catalítica, S81, interacciona con moléculas de agua y de sulfato, con el O<sup>γ</sup> de la S128 y con el carboxilato de la lisina carboxilada K84, que enlaza a su vez con el nitrógeno del W167. Especialmente destacable es la presencia de una molécula de agua muy conservada en todos los modelos de OXA-24 (nativo y mutantes), que establece un puente de hidrógeno

con el O1 del carboxilato de la K84, que podría actuar probablemente como nucleófilo durante la desacilación del complejo acil-enzima.

El resto de contactos se establecen fundamentalmente entre el sulfato y diferentes moléculas de agua con el grupo guanidinio de la R261 y los O<sup>γ</sup> de las serinas: S128 y S219, de forma que se produce un entramado de puentes de hidrógeno que conservan la conformación del canal que aloja el centro activo.



**Figura 48. Conjunto de interacciones que estabilizan la conformación del sitio activo de OXA-24<sub>Y112A</sub> (a) y OXA-24<sub>DM</sub> (b). Los aminoácidos del centro activo se representan en función de su composición atómica (gris carbono, amarillo azufre, azul nitrógeno, rojo oxígeno), mientras que las moléculas de agua se representan como pequeñas esferas. Las distancias inferiores a 3.5 Å se representan como líneas discontinuas.**

La comparación de las superficies moleculares de ambos mutantes con la de OXA-24<sub>WT</sub> muestra que las mutaciones de los residuos Y112 y M223 provoca la desaparición en mayor o menor medida de la barrera hidrofóbica creada por la interacción de estos dos residuos (Fig. 49), que definían un túnel de entrada característico al sitio catalítico en OXA-24<sub>WT</sub>.

## RESULTADOS

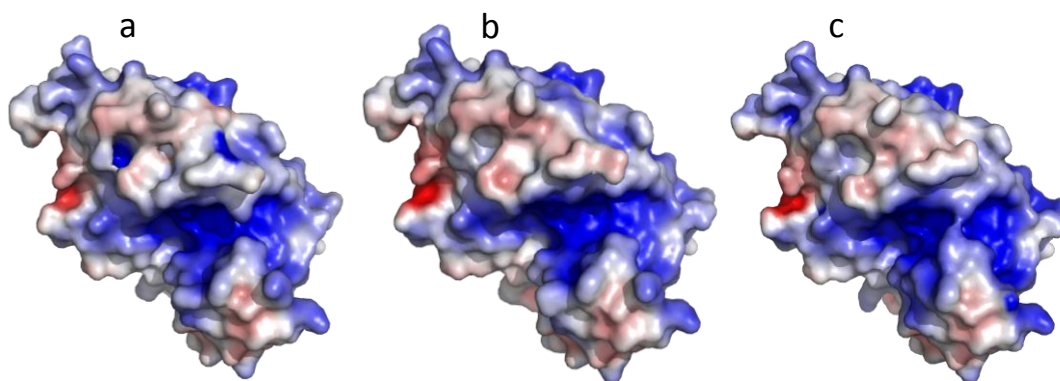


Figura 49. Superficies de OXA-24<sub>Y112A</sub> (a) OXA-24<sub>DM</sub> (b), OXA-24<sub>WT</sub> (c) representadas en función del potencial electrostático calculado con APBS (Baker, Sept et al. 2001), con las regiones cargadas positivamente en color azul y las zonas con carga negativa en color rojo. La desaparición de la barrera hidrofóbica creada por la Y112 y la M223 modifica visiblemente la accesibilidad al sitio catalítico.

### 5.8 ESTUDIO DEL EFECTO DE INHIBIDORES DEL TIPO PENEMA SULFÓNICA SOBRE OXA-24.

No existen actualmente inhibidores comerciales eficaces contra las  $\beta$ -lactamasas de clase D, incluyendo a las carbapenemasas de clase D. Por ello, nos propusimos caracterizar mediante ensayos bioquímicos, funcionales y estructurales, el efecto de un grupo de inhibidores del tipo penemas sulfónicas diseñados y sintetizados por el Dr. John Buynak en el Departamento de Química de la Universidad Metodista del Sur situada en Dallas (*Southern Methodist University, Dallas*).

Los compuestos utilizados poseen un esqueleto común (Fig. 50a) formado por una sulfona del ácido penicilánico, con un sustituyente metilenopiridínico en posición 6. Sobre esta plataforma, se realizaron diferentes modificaciones en la posición 2 de la penema sulfónica y sobre la posición 4 de la piridina, para dar lugar a cada uno de los inhibidores sintetizados (Fig. 50b).



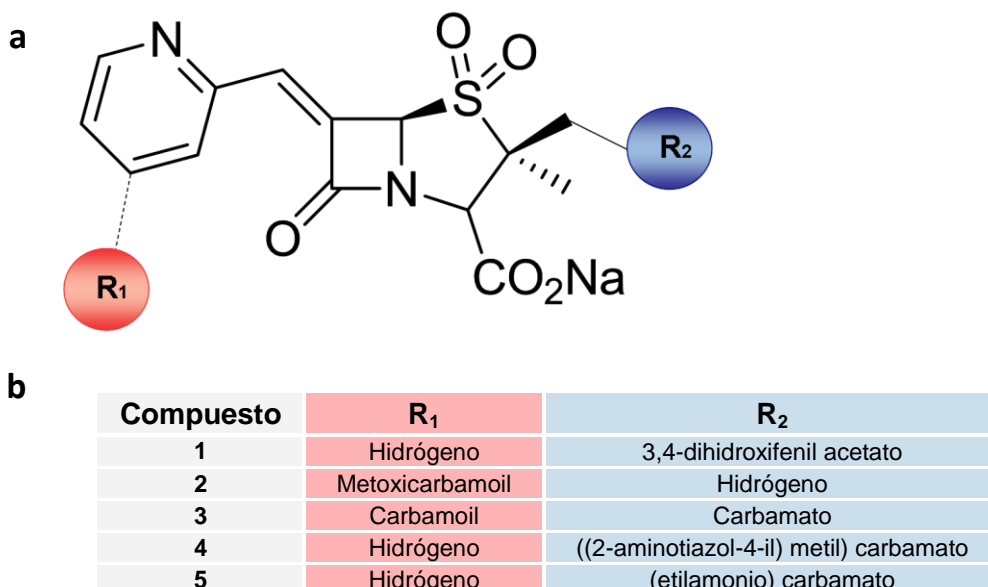


Figura 50. a) Estructura básica de los inhibidores de OXA-24. Las posiciones sobre las que se introducen diferentes modificaciones para obtener los distintos compuestos aparecen señaladas como esferas coloreadas y señaladas como R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>. b) Resumen de los sustituyentes utilizados para construir, a partir de la base 6-(metilpirid-2-yl) sulfona del ácido penicilánico, los 5 inhibidores estudiados en este trabajo.

Para ello se sintetizaron 5 penemas sulfónicas modificadas (nombradas 1, 2, 3, 4 y 5) como potenciales inhibidores de OXA-24 (Fig. 51).

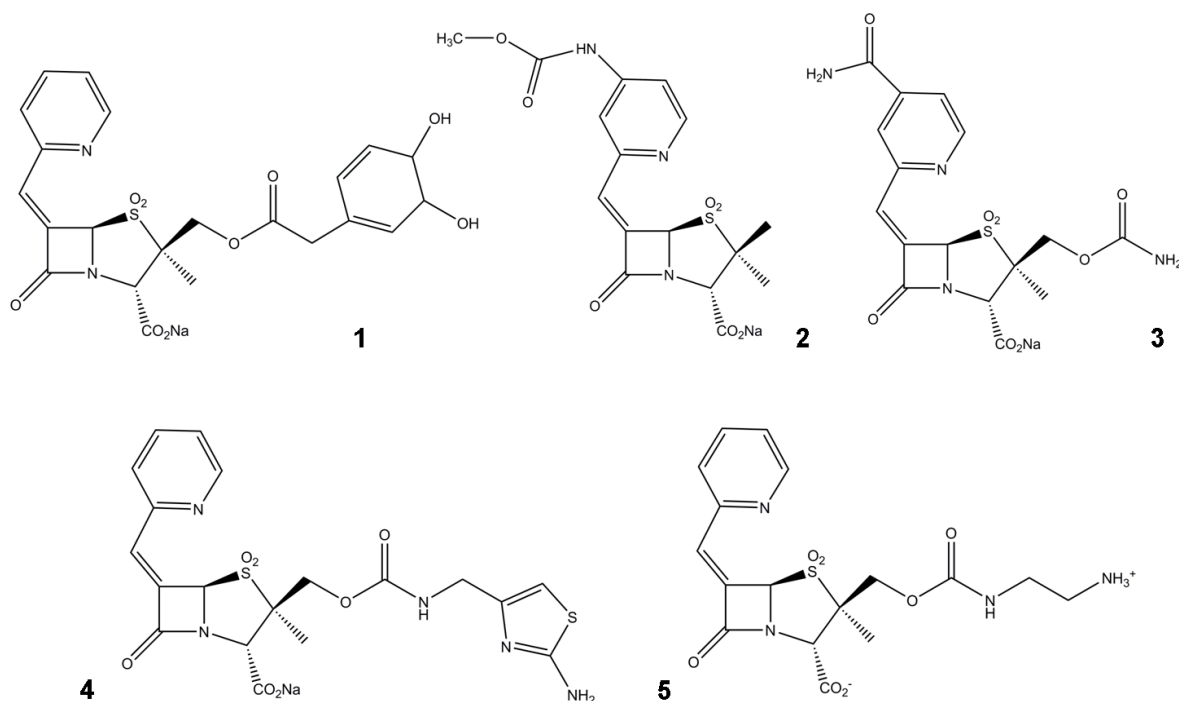


Figura 51. Compuestos estudiados como posibles inhibidores de OXA-24.

## RESULTADOS

### 5.8.1 Ensayos funcionales para caracterizar el efecto inhibitorio sobre la actividad de OXA-24 de los compuestos del tipo penema sulfónica.

#### 5.8.1.1 Ensayos microbiológicos: determinación de los valores de CMI en presencia de inhibidores.

Para valorar el efecto inhibitorio de los compuestos sobre la resistencia a carbapenemas mediada por OXA-24, se determinaron las CMIs (Tabla 13) frente a imipenem y meropenem de la cepa de *A. baumannii* JC7/04 transformada con el vector PAT-RA/OXA-24<sub>WT</sub> (*AB*<sub>JC7/04</sub>OXA-24<sub>WT</sub>) en presencia de cada uno de los inhibidores a dos concentraciones: 4 y 16 µg/ml (Bou, Santillana et al.). Además, para establecer el efecto inhibitorio con mayor fiabilidad, se realizaron controles en paralelo con el inhibidor comercial tazobactam a las mismas concentraciones así como también con la cepa de *A. baumannii* JC7/04 sin transformar (sensible a carbapenemas).

Debido a que los compuestos inhibidores tienen un anillo β-lactámico como parte de su estructura, también fue necesario testarlos en ausencia de antibióticos, de forma que se pudiera comprobar que no poseían actividad antibiótica intrínseca frente a *A. baumannii* JC7/04 transformada o no con PAT-RA/OXA-24<sub>WT</sub>. Los resultados obtenidos (CMI ≥ 64 µg/ml) confirman que no actúan como antibióticos de la cepa *A. baumannii* JC7/04.

Tabla 13. Valores de CMI's determinados para la cepa de *A. baumannii* JC7/04 transformada con pAT-RA o pAT-RA/OXA-24<sub>WT</sub>

	CMI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
	pAT-RA <sup>a</sup>	pAT-RA/OXA-24 <sub>WT</sub>
Tazobactam e inhibidores 1-5 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$		
meropenem	1	64
meropenem/tazobactam	0.5	32
meropenem/ 1	1	4
meropenem/ 2	1	16
meropenem/ 3	0.5	16
meropenem/ 4	0.5	16
meropenem/ 5	0.5	4
imipenem	1	32
imipenem/tazobactam	0.5	16
imipenem/ 1	0.5	4
imipenem/ 2	0.5	32
imipenem/ 3	0.5	8
imipenem/ 4	0.25	8
imipenem/ 5	0.5	8
Tazobactam e inhibidores 1-5 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$		
meropenem	1	32
meropenem/tazobactam	0.5	32
meropenem/ 1	1	1
meropenem/ 2	1	16
meropenem/ 3	0.5	4
meropenem/ 4	0.5	8
meropenem/ 5	0.5	4
imipenem	1	32
imipenem/tazobactam	0.25	16
imipenem/ 1	0.25	1
imipenem/ 2	0.25	16
imipenem/ 3	0.25	2
imipenem/ 4	0.25	4
imipenem/ 5	0.5	8

<sup>a</sup> Plásmido pAT-RA sin contener el gen *bla*<sub>OXA-24</sub>. Las CMI's del tazobactam y los compuestos 1-5 sin la presencia de meropenem o imipenem fueron >64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Los valores de CMI obtenidos para la cepa de *A. baumannii* JC7/04 transformada con el plásmido pAT-RA sin el gen de OXA-24 confirman que se trata de una cepa sensible a imipenem/meropenem (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), mientras que la cepa *AB*<sub>JC7/04</sub>OXA-24<sub>WT</sub> presenta claramente resistencia frente a ambas carbapenemas, tal y como ya he descrito anteriormente (64  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para meropenem y 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$  para imipenem). La presencia del tazobactam no modifica los valores de CMI de la cepa *AB*<sub>JC7/04</sub>OXA-24<sub>WT</sub> frente a imipenem y meropenem hasta rangos de susceptibilidad, corroborando su ineficacia como inhibidor de la actividad OXA-24.

Con respecto a la actividad inhibitoria de las cinco penemas sulfónicas ensayadas, la presencia de los compuestos 1 y 5 reduce significativamente hasta niveles de sensibilidad las CMI's frente a meropenem e imipenem, siendo más acusado el efecto a la concentración más alta probada (16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Estos datos

## RESULTADOS

reflejan la eficacia “*in vivo*” de ambos compuestos como inhibidores de OXA-24, destacando el compuesto 1 como el más efectivo.

Aunque en menor medida, los resultados muestran también una clara actividad inhibitoria “*in vivo*” (disminución significativa de las CMI) de los compuestos 3 y 4, muy especialmente a alta concentración (16 µg/ml), siendo más eficaces cuando se combinan con el imipenem, ya que en este caso la disminución de los valores de CMI es más marcada incluso a baja concentración (4 µg/ml).

De los experimentos realizados en presencia del compuesto 2 se obtienen valores de CMI inferiores a los obtenidos en su ausencia, si bien no son tan significativos como para reflejar una actividad inhibitoria importante “*in vivo*”.

### 5.8.1.2 Ensayos bioquímicos: determinación de las cinéticas de inhibición.

Para obtener información adicional de la eficiencia relativa de los compuestos 1-5 como inhibidores, se calcularon las IC<sub>50</sub>, utilizando Nitrocefina como sustrato indicador (Tabla 14)

	1 (nM)	2 (nM)	3 (nM)	4 (nM)	5 (nM)
OXA-24 <sub>WT</sub>	17 ± 1	27 ± 1	22 ± 1	10 ± 1	55 ± 5

### 5.8.2 Cristalización de los complejos de OXA-24<sub>WT</sub> con inhibidores del tipo penema sulfónica.

Para estudiar con detalle la interacción de OXA-24<sub>WT</sub> con los inhibidores descritos anteriormente, se obtuvo la estructura cristalográfica de los complejos.

Dado que la co-cristalización de OXA-24 con los inhibidores no funcionó, la obtención de los distintos complejos se llevó a cabo sumergiendo los cristales de OXA-24<sub>WT</sub> obtenidos en 28% PEG 2000 MME, 0.1M HEPES pH 7.5 en soluciones de los inhibidores equilibradas en la solución de cristalización. Por tanto, fue necesario optimizar tanto la concentración de la solución de los inhibidores como el tiempo en que los cristales permanecían sumergidos en dicha solución, de forma que se lograra difundir el inhibidor sin que los cristales sufriesen daños. Se siguieron dos estrategias para encontrar la condición adecuada:

- ✓ Utilizar soluciones muy concentradas del inhibidor (12.5mM, 10mM, 5mM, 3mM) de forma que se consiguiera la difusión de los inhibidores dentro del cristal en tiempos de incubación cortos (30 min., 15 min., 10 min., 5 min., 1min.).

- ✓ Utilizar soluciones menos concentradas (3mM, 1mM, 750µM, 500µM) de los inhibidores con tiempos de incubación del cristal en dichas soluciones más largos (12h, 6h, 3h, 1h).

Las condiciones que incluían las concentraciones más altas de inhibidor (12.5mM y 10mM) se descartaron por ocasionar un daño visible a los cristales incluso a tiempos muy cortos. Las condiciones que incluían tiempos de incubación largos (de 1h en adelante) se descartaron también porque producían daños en el cristal no apreciables visualmente, pero que daban lugar a una peor difracción. Para el resto de las condiciones se llevaron a cabo medidas en las líneas de luz sincrotrón, comprobando tanto la calidad de la difracción como los mapas de densidad electrónica resultantes. Finalmente, se estableció que la inmersión de los cristales en soluciones del inhibidor a 3mM durante 5 min. era suficiente para que se produjese la difusión del inhibidor sin deteriorar significativamente la calidad los cristales. Un resumen de los resultados de todas las condiciones ensayadas se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Resumen de las condiciones experimentales ensayadas para los diferentes inhibidores variando el tiempo y la concentración de cada inhibidor.

	12h	6h	3h	1h	30min.	15min.	10min.	5min.	1min.		
12.5mM	Daño visible en el cristal				Daño visible en el cristal				Cristal dañado: difracción no interpretable		
10mM											
5mM	Cristal dañado: difracción no interpretable				Daño visible	Difracción de baja calidad.		Difracción	Complejo no apreciable en la densidad		
3mM					Cristal dañado						
1mM	Cristal dañado: difracción no interpretable		Cristal dañado: difracción no interpretable		Complejo no apreciable en la densidad.		apreciable en la densidad				
750µM							Complejo no apreciable en la densidad.		apreciable en la densidad		
500µM											

La recogida de los datos de difracción se llevó a cabo en las líneas de luz sincrotrón ID14.1, ID14.2 e ID14.4 del ESRF (Grenoble, Francia) a 110K con los cristales inmersos en una solución crioprotectora compuesta por la solución de cristalización más un 15 % de PEG 400 adicional.

Los valores obtenidos tras procesar los datos de difracción de los cristales con los programas Mosflm (Leslie 2006), y Scala del CCP4 (Collaborative Computational Project number 4 1994) se recogen en la Tabla 16.

## RESULTADOS

Tabla 16 : Valores estadísticos cristalográficos del procesamiento de los datos de difracción de los cristales de OXA-24 con los diferentes inhibidores.

	OXA-24/1	OXA-24/2	OXA-24/3	OXA-24/4	OXA-24/5
<b>Grupo espacial</b>	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
<b>Dimensiones de la celda a, b, c (Å)</b>	102.3 102.3 84.4	102.4 102.4 84.2	102.8 102.8 83.1	102.2 102.2 86.1	102.5 102.5 84.5
<b>Rango de resolución (Å)</b>	33.24-2.1 (2.21-2.1)	45.8-2.0 (2.11-2.0)	72.7-2.1 (2.21-2.1)	31.59-2.0 (2.11-2.0)	45.8-2.0 (2.11-2.0)
<b>Complejidad (%)</b>	100.0 (100.0)	99.9 (99.8)	99.0 (99.0)	99.9 (99.6)	99.9 (99.1)
<b>Reflexiones medidas</b>	253069	297521	275304	361773	289326
<b>Reflexiones únicas</b>	26758	30828	26265	30698	30940
<b>R<sub>merge</sub> (%)</b>	8.4 (43.0)	7.6 (54)	10.1 (62.1)	8.3 (45.4)	7.8 (56.4)
<b>Multiplicidad</b>	9.5 (9.6)	9.6 (9.8)	7.3 (4.4)	11.8 (11.3)	9.5 (9.5)
<b>I/σ(I)</b>	6.9 (1.1)	9.0 (1.4)	6.8 (1.1)	7.3 (1.1)	9.2 (1.4)

\* Los datos de la capa de alta resolución aparecen entre paréntesis

### 5.8.3 Determinación y refinamiento de la estructura de los complejos formados por OXA-24 con los diferentes inhibidores

Mediante un refinamiento de cuerpo rígido realizado con *Refmac* (Murshudov, Skubak et al.), el modelo cristalográfico de OXA-24<sub>WT</sub> (pdb ID 3G4P) se ajustó a los datos experimentales de los complejos de OXA-24 con los distintos inhibidores. Un análisis de los mapas de densidad electrónica ( $F_o - F_c$ ) permitió identificar visualmente la presencia o no del inhibidor en los nuevos modelos estructurales. La presencia de una densidad positiva localizada en el centro activo nos indicó que los inhibidores se habían unido a la enzima. Tras esta primera inspección, se descartaron los datos de los complejos OXA-24/1 y OXA-24/4.

En la densidad electrónica obtenida para el complejo OXA-24/1 se observaba claramente la presencia del inhibidor, aunque la densidad electrónica de una gran parte de la molécula no estaba bien definida (Fig. 52a), por lo que los resultados no pueden ser concluyentes. En el caso del complejo OXA-24/4 no se apreciaba una densidad electrónica definida para el compuesto 4, por lo que no fue posible modelar dicho complejo (Fig. 52b). La gran movilidad de los grandes sustituyentes con anillos aromáticos que presentan ambos compuestos en

posición 2 o la baja población en el cristal, parecen ser la causa de la pobre densidad experimental obtenida en estos dos casos.

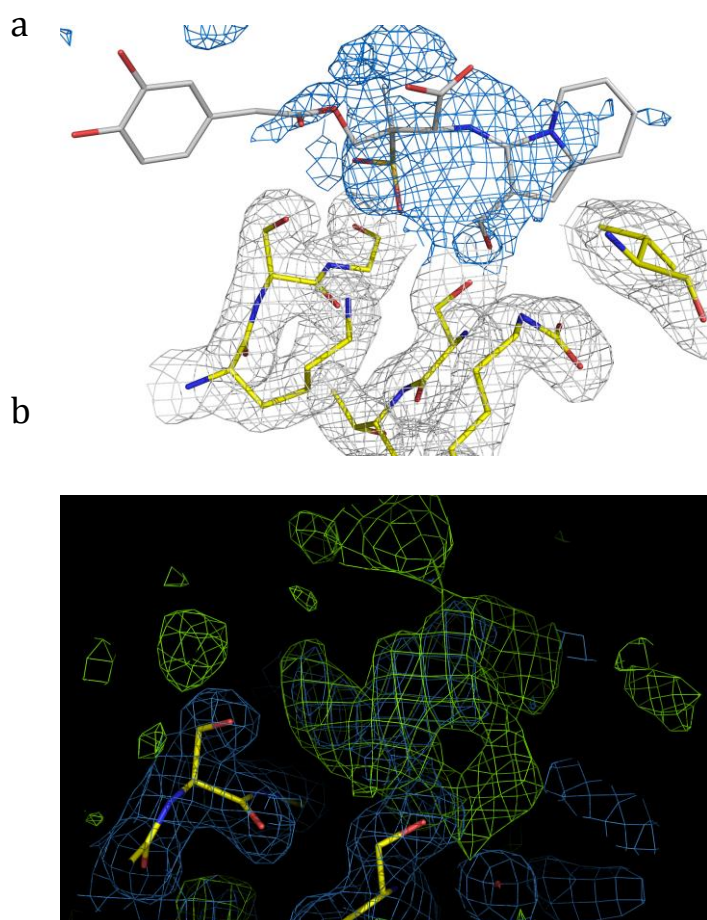


Figura 52. (a) Densidad electrónica  $2F_o-F_c$  a  $1.0 \sigma$  (representada en azul) que muestra la presencia del compuesto 1 interaccionando con la S81 de OXA-24. Puede apreciarse, sin embargo, que la densidad experimental no está lo suficientemente definida para poder modelar correctamente el inhibidor. (b) Densidad electrónica experimental obtenida a partir del cristal del complejo OXA-24/4. Si bien la densidad residual ( $F_o-F_c$  a  $2.0 \sigma$ , coloreada de verde) rodeando la serina catalítica podría indicar la presencia del compuesto 4, no se aprecia con la claridad suficiente como para modelar dicho compuesto en la estructura.

La formación de los complejos de OXA-24 con los inhibidores -2, -3, y -5 en los cristales era visible en los mapas de densidad electrónica experimental, por lo que se procedió a construir los modelos sobre los mapas de densidad con el programa gráfico COOT (Emsley and Cowtan 2004), validando simultáneamente el trazado del modelo con ciclos de afinado, utilizando los programas *Refmac* (Murshudov, Skubak et al.) y *CNS* (Brünger, Adams et al. 1998).

Los valores finales obtenidos del refinamiento de los modelos en base a la densidad experimental se reflejan en la Tabla 17.

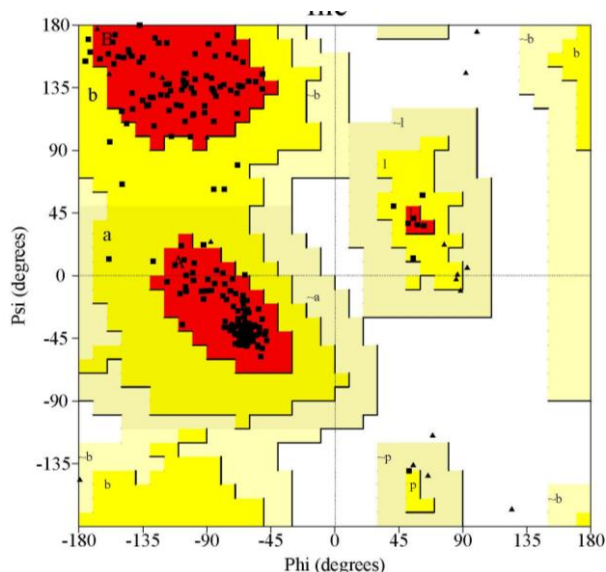
## RESULTADOS

Tabla 17: Valores estadísticos del refinamiento de los modelos de los complejos OXA-24/2, OXA-24/3 y OXA-24/5

	OXA-24/2	OXA-24/3	OXA-24/5
Número de átomos no hidrógenos	Proteína: 1939 Moléculas de agua: 112 Heteroátomos: • Ligando: 27	Proteína: 1939 Moléculas de agua: 79 Heteroátomos: • PEG: 13 • Ligando: 29	Proteína: 1939 Moléculas de agua: 116 Heteroátomos: • PEG: 13 • Ligando: 29
R / R <sub>free</sub>	0.22 / 0.26	0.23 / 0.25	0.22 / 0.25
Factor B (Å <sup>2</sup> )	Proteína: 34.9 Ligando: 67.5	Proteína: 33.5 Ligando: 49.6	Proteína: 33.3 Ligando: 65.9
R.m.s.d. enlaces (Å)	0.008	0.007	0.009
R.m.s.d. ángulos (°)	1.3	1.2	1.5

De la revisión de los parámetros estereoquímicos de los modelos finales con el programa PROCHECK (Laskowski, MacArthur et al. 1993) se obtuvieron los diagramas de Ramachandran con los que pudimos verificar que los modelos se ajustaban a los parámetros convencionales con los ángulos diédricos de todos los aminoácidos en conformaciones permitidas (Figs. 53, 54).

### Diagrama de Ramachandran de OXA-24/2

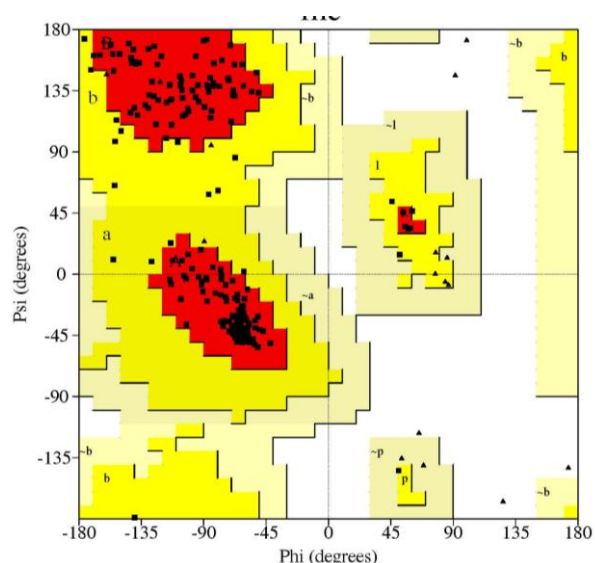


Residuos en regiones favorables [A,B,L]	196 (91.6%)
Residuos en regiones permitidas [a, b, l, p]	18 (8.4%)
Residuos en regiones generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	0 (0%)
Número de residuos que no son prolinas ni glicinas	214
Número de glicinas (triángulos)	20
Número de prolinas	8
Número total de residuos	244

Figura 53. Diagrama de Ramachandran del complejo OXA-24/2. El 91.6% de los residuos se encuentran en regiones preferidas (representadas en rojo) y el (8.4 %) en regiones permitidas (amarillo).

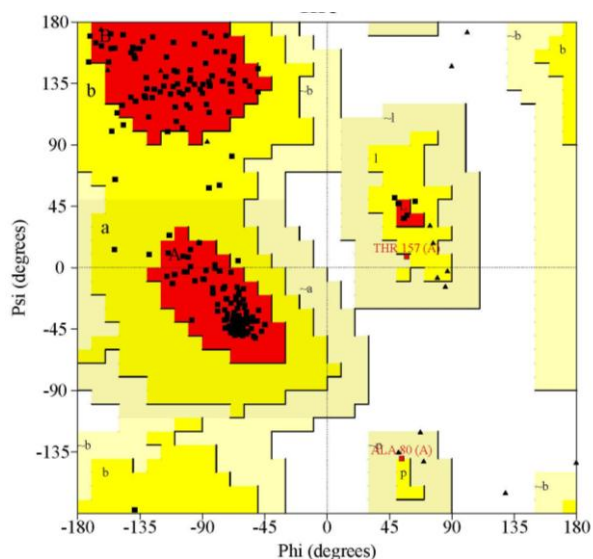


**1. Diagrama de Ramachandran de OXA-24/3**



Residuos en regiones favorables [A,B,L]	196 (91.6%)
Residuos en regiones permitidas [a, b, l, p]	18 (8.4%)
Residuos en regiones generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	0 (0.0%)
Número de residuos que no son prolinas ni glicinas	214
Número de glicinas (triángulos)	20
Número de prolinas	8
Número total de residuos	244

**2. Diagrama de Ramachandran de OXA-24/5**



Residuos en regiones favorables [A,B,L]	194 (90.7%)
Residuos en regiones permitidas [a, b, l, p]	18 (8.4%)
Residuos en regiones generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	2 (0.9%)
Número de residuos que no son prolinas ni glicinas	214
Número de glicinas (triángulos)	20
Número de prolinas	8
Número total de residuos	244

**Figura 54. Diagramas de Ramachandran de los complejos OXA-24/3 y OXA-24/5. El 91.6% de los residuos se encuentran en regiones preferidas (representadas en rojo) y el (8.4 %) en regiones permitidas (amarillo) para el modelo OXA-24/3. En el modelo OXA-24/5 el 99.1% de los aminoácidos están en regiones preferidas o permitidas y sólo los residuos A80 y T157 tienen conformaciones energéticamente menos favorecidas.**

### 5.9 DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS COMPLEJOS FORMADOS POR OXA-24 CON LOS INHIBIDORES 2, 3 Y 5.

La presencia de un anillo  $\beta$ -lactámico en la estructura de los inhibidores estudiados, imitando a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que constituyen el sustrato natural de la enzima. De esta forma, interaccionan con el centro activo de OXA-24, sin que el plegamiento general se modifique.

El residuo activo, la S81 lleva a cabo un ataque nucleófilo sobre el carbonilo del anillo  $\beta$ -lactámico, formándose la correspondiente acil-enzima. Sin embargo, la densidad electrónica observada en el centro activo mostraba un contorno diferente al de un posible intermedio acil-enzima (Fig. 55).

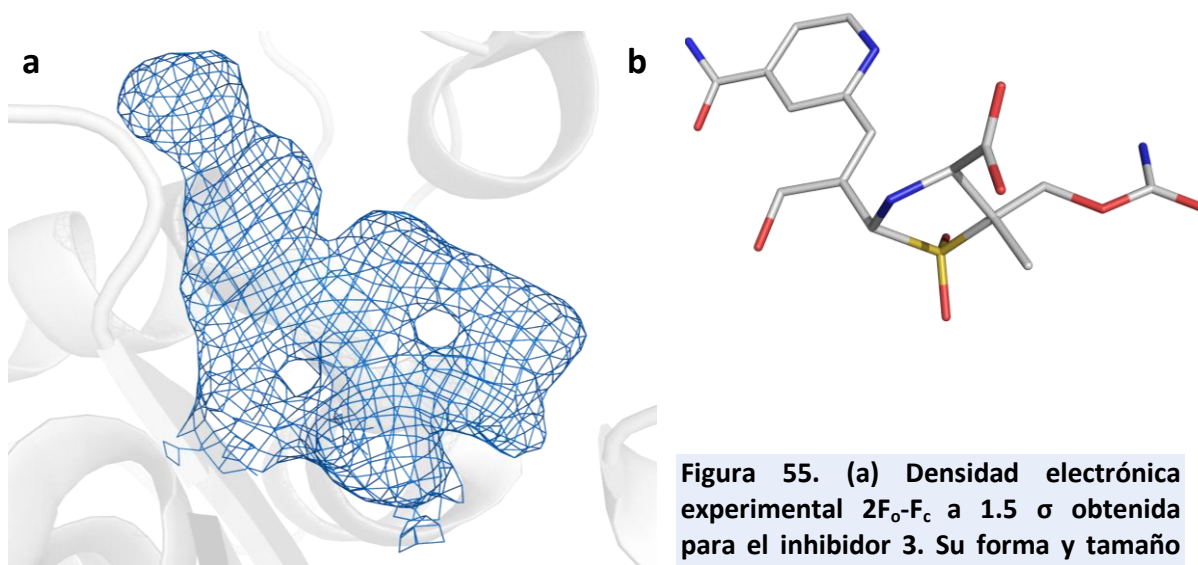


Figura 55. (a) Densidad electrónica experimental  $2F_o-F_c$  a  $1.5 \sigma$  obtenida para el inhibidor 3. Su forma y tamaño no concuerdan con la del inhibidor 3 con el anillo  $\beta$ -lactámico abierto (b). Esto parece indicar que los inhibidores experimentan reacciones adicionales después de producirse el ataque nucleofílico mediado por la S81 sobre el anillo penicilánico.

La forma de la densidad electrónica sugería la presencia de un anillo aromático bicíclico, la indolizina, formado por un anillo de cinco miembros fusionado a un anillo de piridina. Así, el ataque nucleofílico inicial del O $\gamma$  de la serina 81 sobre el carbonilo del anillo  $\beta$ -lactámico del inhibidor provoca que el par electrónico sobre el nitrógeno  $\beta$ -lactámico quede desapareado, favoreciendo la apertura del anillo sulfónico y la formación de una imina intermedia. A su vez, el nitrógeno piridínico interacciona con el carbono deficiente en electrones de la imina, formándose un anillo de indolizina (Fig. 56a) que podemos apreciar en los mapas de densidad electrónica para los diferentes inhibidores (Fig. 56b).

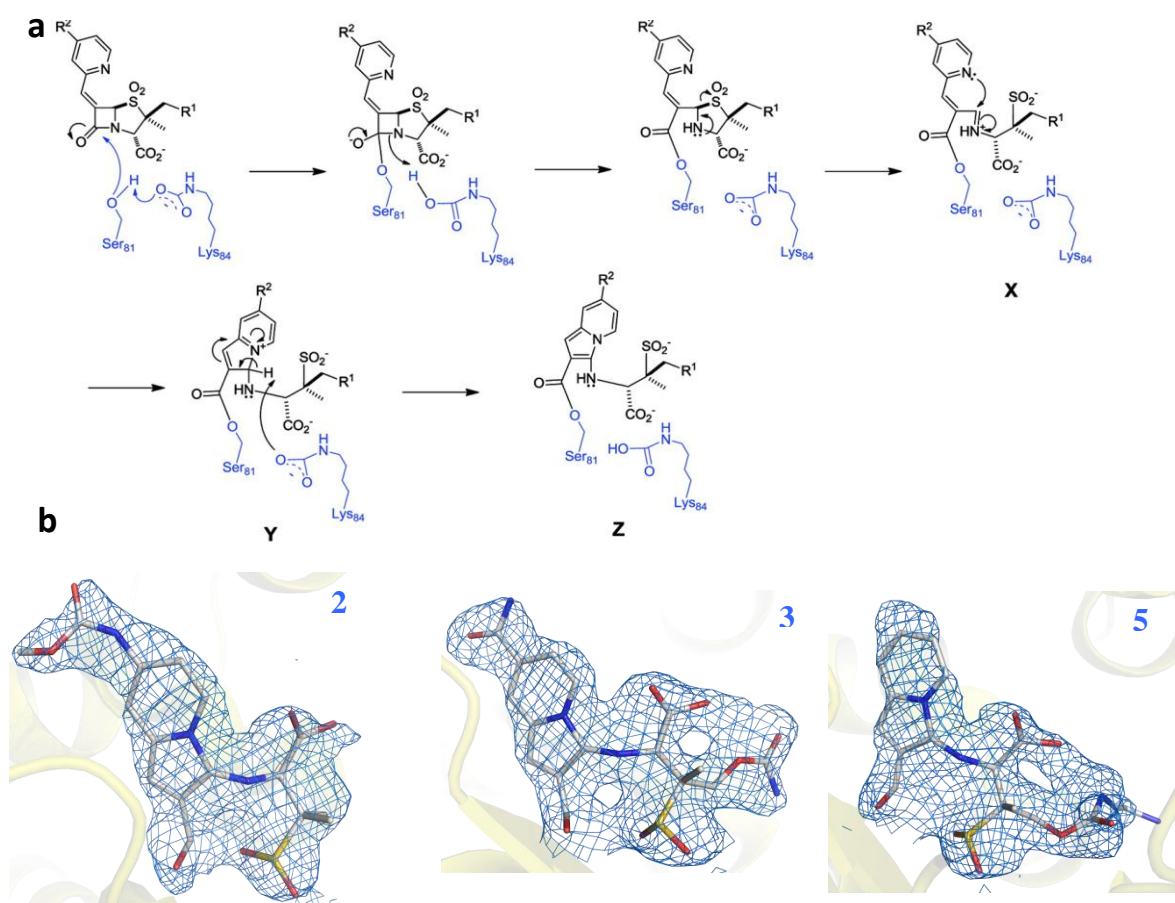
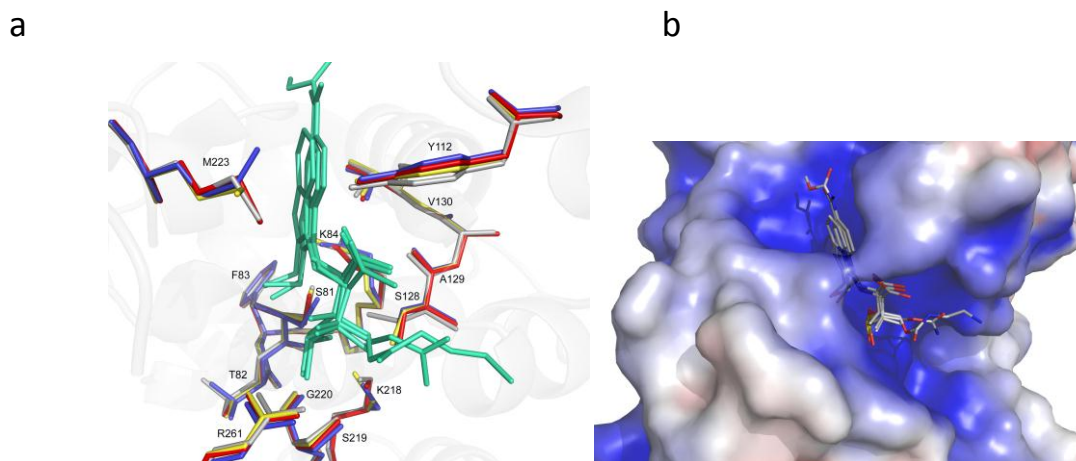


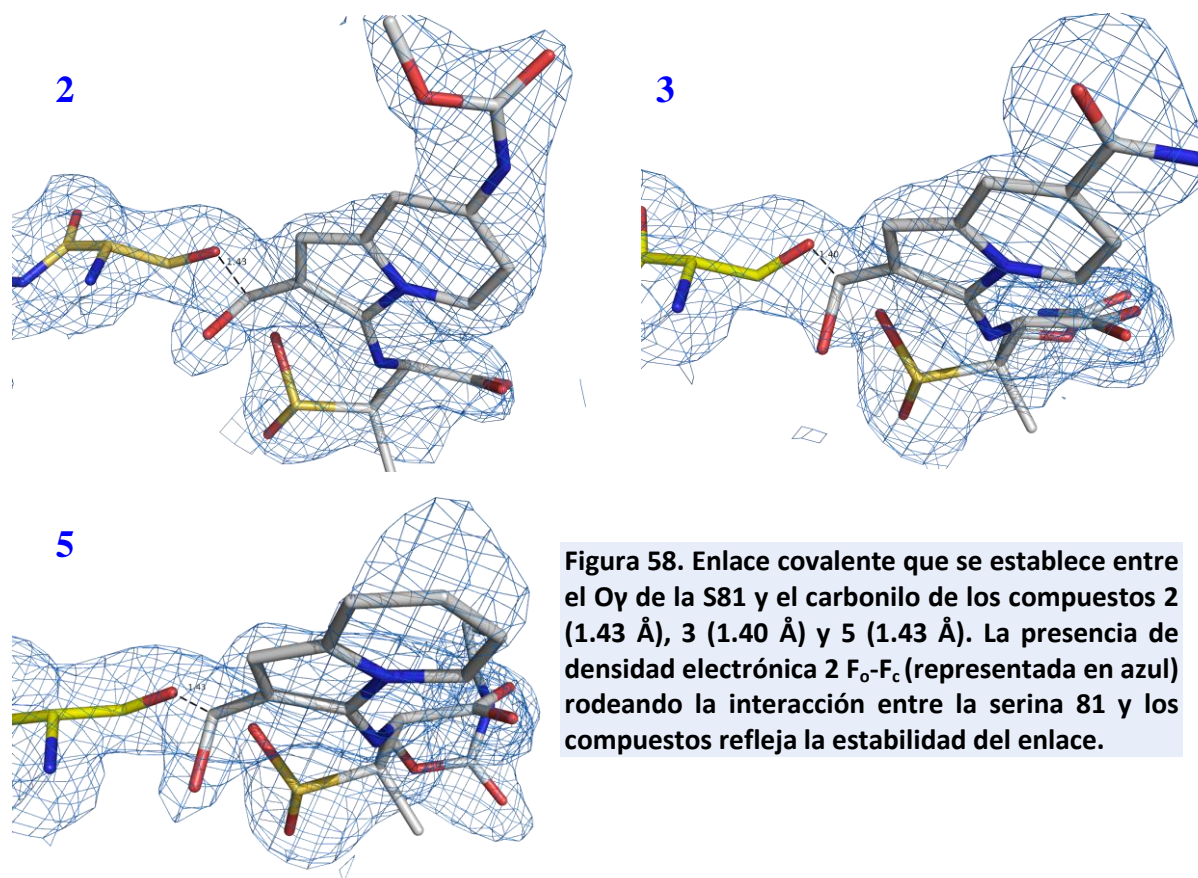
Figura 56. (a) Esquema del mecanismo de reacción de los inhibidores del tipo penema sulfónica al interactuar con OXA-24. (b) Inhibidores 2, 3 y 5 modelados en la densidad electrónica  $2F_o-F_c$  (azul) a  $1 \sigma$ . La formación del anillo de indolizina se refleja claramente en la densidad electrónica experimental.

La estructura general del centro activo de OXA-24 no se modifica sustancialmente cuando se encuentra unida a los inhibidores, aunque se aprecian pequeños desplazamientos de la cadenas laterales de los residuos que lo componen y algunos adyacentes, que se reorientan para acomodar a los productos de reacción de los inhibidores (Fig. 57a).



**Figura 57. (a) Centro activo de OXA-24<sub>WT</sub> (gris), OXA-24/2 (amarillo), OXA-24/3 (azul), OXA-24/5 (rojo). La presencia de los inhibidores (verde) no altera la conformación del centro activo. (b) Orientación de los inhibidores dentro de la cavidad catalítica. La indolizina se dirige hacia el solvente, mientras que las cadenas sustituidas en posición 2 del anillo sulfónico se localizan a lo largo del canal hidrofóbico. La superficie de OXA-24 se muestra coloreada en función del potencial electrostático, con las zonas electronegativas representadas en azul y las electropositivas en rojo.**

Los inhibidores se alojan en la cavidad catalítica de forma que la indolizina apunta hacia el solvente (Fig. 57b). Para formar el complejo acil-enzima, los compuestos se unen covalentemente a la S81 (Fig. 58), de forma que el oxígeno del carbonilo resultante, tras la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico, queda en el agujero oxaniónico y establece un puente de hidrógeno con la amida de la cadena principal del W221. Además, el sulfinato interacciona mediante puentes salinos con el grupo guanidino de la R261 y establece puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de las serinas 128 y 219 del centro activo. Como consecuencia de la orientación que adopta el sulfinato, el grupo carboxilo cambia su posición y se sitúa sobre la cavidad catalítica interaccionando mediante un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la Y112 (Fig. 59).



Aparte de las interacciones que establecen los elementos del esqueleto común de los inhibidores, hay que tener en cuenta la contribución en la estabilización de los complejos que soportan los radicales que cada inhibidor posee en la posición 6 del grupo metil-pirid-2-yl y en la posición 2 de la penema sulfónica, y que depende fundamentalmente de la naturaleza química de cada radical. Las estructuras indican que los sustituyentes en posición 2 de la penema sulfónica que presentan los inhibidores 2 y 5 no aportan interacciones que ayuden de manera significativa a estabilizar los complejos. Los sustituyentes que encontramos en el metil-pirid-2-yl en los compuestos 2 y 3 no muestran una mayor influencia, ya que sólo el carbamoilo del compuesto 3 interacciona con la T111 de la enzima, mientras que el metoxicarbamoil del compuesto 2 no interacciona de forma reseñable.

## RESULTADOS

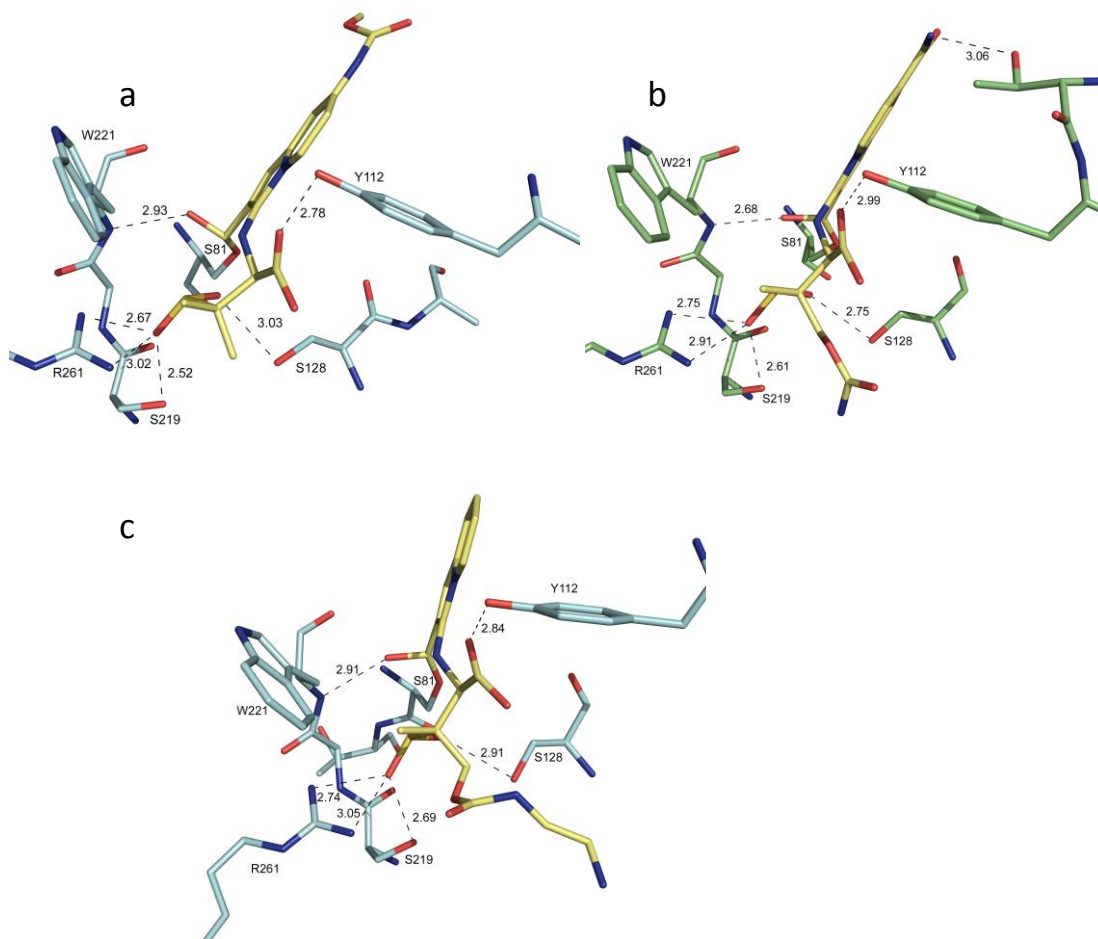


Figura 59. Conjunto de interacciones (representadas como líneas discontinuas) que estabilizan los complejos formados por OXA-24 con los compuestos 2 (a), 3(b) y 5 (c).

# **DISCUSIÓN**





## 6 DISCUSIÓN

OXA-24 es una  $\beta$ -lactamasa de clase D aislada de una cepa clínica multirresistente de *Acinetobacter baumannii* y representa a una familia de oxacilinasas que, a diferencia de las oxacilinasas tradicionales, han adquirido la capacidad de degradar antibióticos carbapenémicos. Este grupo de oxacilinasas con actividad carbapenemasa aparece cada vez con más frecuencia en patógenos multirresistentes (*Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*) responsables de graves infecciones hospitalarias. Dado que los antibióticos carbapenémicos constituyen uno de los últimos recursos para combatir estas infecciones, y que los inhibidores  $\beta$ -lactámicos comerciales resultan ineficaces frente a este tipo de  $\beta$ -lactamasas, resulta cada vez más necesario desarrollar inhibidores frente a esta familia de oxacilinasas. La determinación de la estructura tridimensional de OXA-24, la primera de este tipo de carbapenemasas, no sólo ha permitido establecer las bases moleculares que explican la adquisición de la especificidad por antibióticos carbapenémicos sino que, además, ha constituido un punto de partida clave para el desarrollo de potenciales inhibidores.

### 6.1 PLEGAMIENTO DE LA $\beta$ -LACTAMASA OXA-24

Atendiendo a su secuencia aminoacídica, OXA-24 fue clasificada como una serin- $\beta$ -lactamasa de clase D, también denominada oxacilinasas por su capacidad para hidrolizar isoxazolilopenicilina y meticilina. Sin embargo, y como se muestra en este trabajo, OXA-24, a diferencia de las oxacilinasas clásicas, ha perdido la capacidad hidrolítica frente a este tipo de penicilinas, mientras que ha adquirido actividad catalítica frente a antibióticos carbapenémicos (Bou, Oliver et al. 2000).

La organización estructural que presenta OXA-24 es muy similar a la que encontramos en otras serin- $\beta$ -lactamasas de clase A y C, (Jelsch, Mourey et al. 1993) (Oefner, D'Arcy et al. 1990) definida por una lámina  $\beta$  central rodeada por un conjunto de hélices  $\alpha$  expuestas al solvente (Fig. 60). Sin embargo, existen algunas diferencias estructurales con importantes implicaciones en el mecanismo de hidrólisis y en el reconocimiento del sustrato.

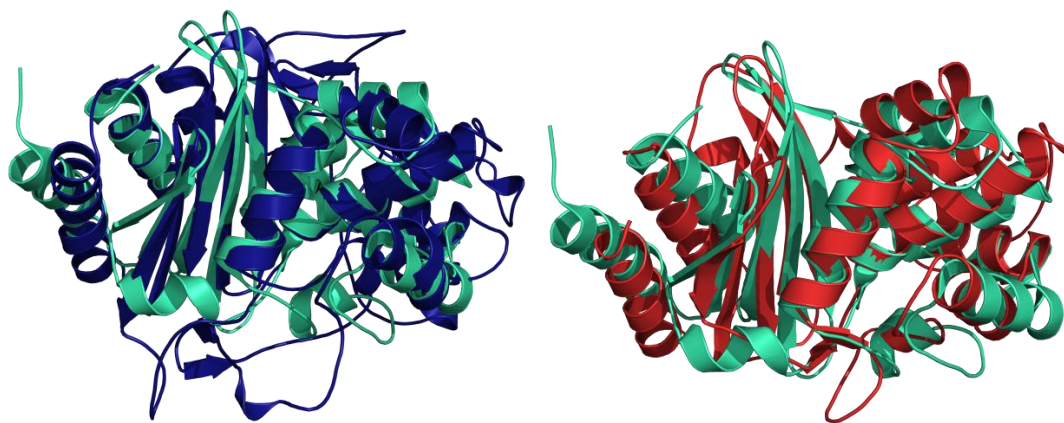
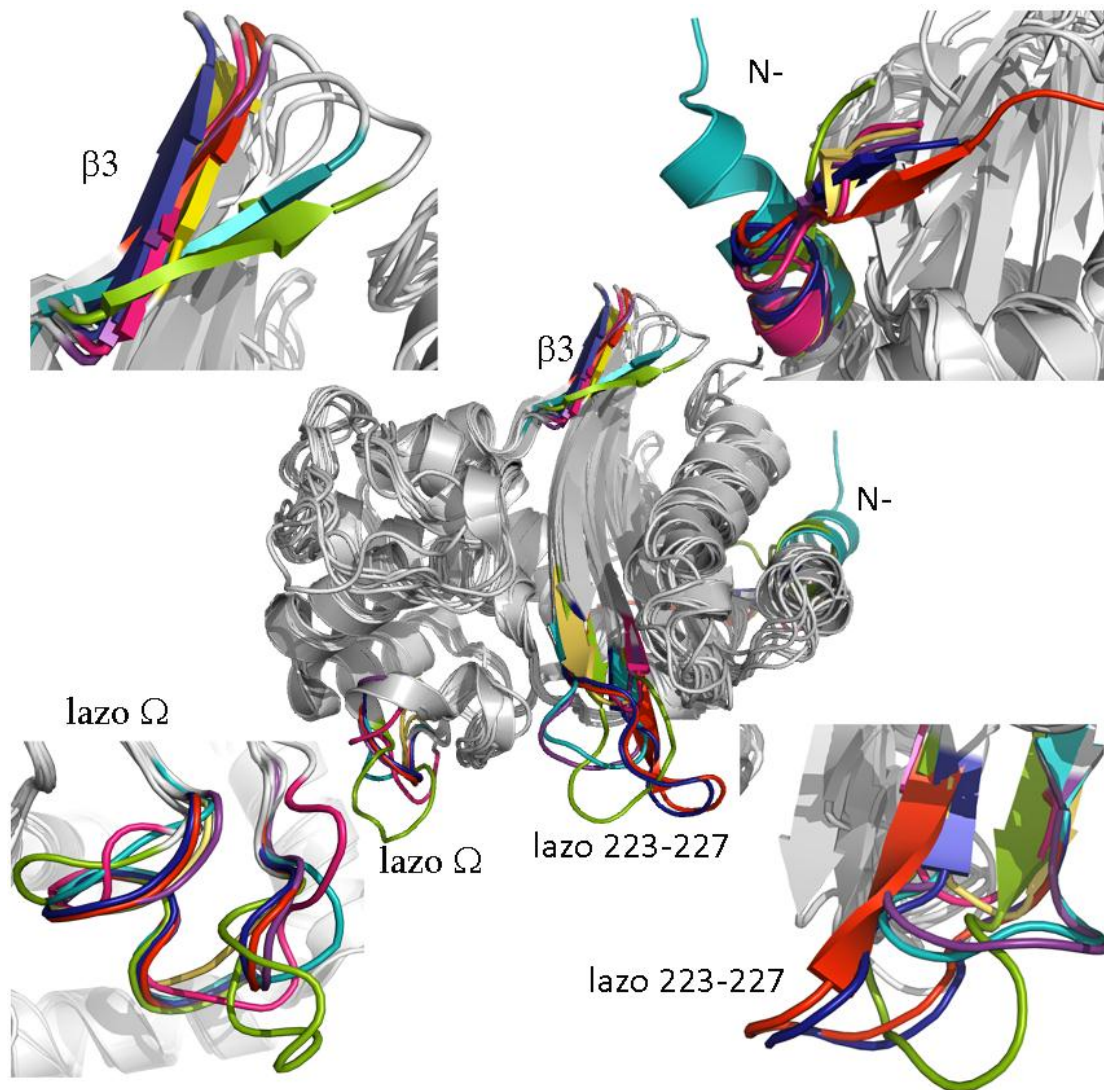


Figura 60. Superposición de la estructura de OXA-24 (verde) con las  $\beta$ -lactamasas de clase A (TEM-1, rojo) (PDB ID 1ZG4) y clase C (CF, azul marino) (PDB ID 1FR1). OXA-24 conserva un plegamiento general muy similar al del resto de las serin- $\beta$ -lactamasas descritas, con una lámina  $\beta$  central rodeada de hélices  $\alpha$ .

Si nos centramos en particular en las  $\beta$ -lactamasas de clase D, comprobamos que el plegamiento de OXA-24 se mantiene, con los elementos de estructura secundaria muy conservados, y organizados de forma similar (Fig. 61). A pesar de esta similitud, existen diferencias destacables entre la estructura de OXA-24 y las estructuras de otras oxacilinasas. Una de las más evidentes se localiza en el extremo N-terminal, que en OXA-24 está formado por una hélice  $\alpha$  más larga, que se asemeja más a la que encontramos en las  $\beta$ -lactamasas de clase A que al motivo  $\beta 1/\alpha 1$  presente en el resto de las oxacilinasas.

Hay que destacar también la diferencia que encontramos en el lazo que conecta las cadenas  $\beta 4$  y  $\beta 5$  (residuos 223-227). El desplazamiento de este lazo hacia el centro del surco que aloja el centro activo en OXA-24 bloquea parcialmente el acceso inferior a la cavidad catalítica, lo que puede resultar relevante en la actividad carbapenemasa que presentan.



**Figura 61.** Superposición de la estructura de OXA-24 (cian) con las estructuras de varias oxacilinasas: OXA-1 (verde), OXA-2 (amarillo), OXA-10 (azul marino), OXA-13 (rojo), OXA-48 (morado) y OXA-46 (rosa). Las principales diferencias aparecen coloreadas, mientras que el plegamiento global, muy similar en todas ellas, se muestra en gris.

Muy significativos son los cambios que encontramos en la región de dimerización. Los resultados obtenidos de los experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación realizados confirman que OXA-24 en solución se encuentra como una especie única y monomérica. La comparación de la estructura de OXA-24 con la de otras oxacilinasas dimericas, por ejemplo OXA-10 (Paetzel, Danel et al. 2000) muestra que la disposición de la lámina  $\beta 3$ , implicada en la dimerización, presenta una orientación relativa distinta en OXA-24 y OXA-1 (Sun, Nukaga et al. 2003), las dos únicas oxacilinasas monoméricas descritas hasta la fecha.

La lámina  $\beta 3$  de OXA-24 y OXA-1 se encuentra inclinada aproximadamente  $30^\circ$  hacia la hélice C-terminal, lo que provoca que las interacciones

## DISCUSIÓN

intermoleculares que propician la formación del dímero no puedan establecerse (Fig. 62).



Figura 62. Comparación de la posición de los elementos estructurales en la zona de dimerización para OXA-24 (cián) y OXA-10 (rojo). La disposición de la lámina  $\beta 3$  en OXA-24 imposibilita los contactos favorables para la formación del dímero.

### 6.2 CENTRO ACTIVO

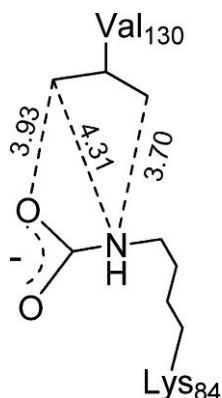
Además de un plegamiento muy conservado, OXA-24 presenta también un centro activo muy similar al del resto de serin- $\beta$ -lactamasas, tanto en conformación como en composición, manteniendo los tres elementos característicos que definen la región catalítica de este tipo de enzimas, como se aprecia en la Tabla 18.

Tabla 18_Elementos del centro activo de las serin- $\beta$ -lactamasas			
	Elemento 1	Elemento 2	Elemento 3
Clase A (TEM-1)	<sup>70</sup> S-X-X-K	<sup>130</sup> S-D-N	<sup>234</sup> K/R-S/T-G
Clase C ( <i>Citrobacter freundii</i> )	<sup>64</sup> S-X-X-K	<sup>150</sup> Y-A-N	<sup>314</sup> K-T-G
Clase D (OXA-24)	<sup>81</sup> S-X-X-K	<sup>128</sup> S-X-V	<sup>218</sup> K-T/S-G

La serina catalítica del elemento 1, S81, actúa como nucleófilo sobre el carbono carbonílico del anillo  $\beta$ -lactámico, en la reacción de acilación, con la consiguiente formación de un intermedio tetraédrico seguida de la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico y la formación del complejo acilado.

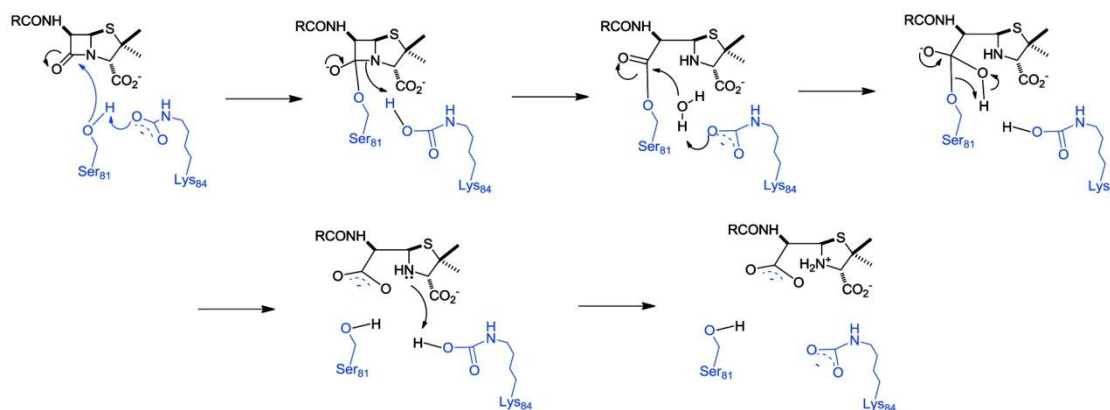
A diferencia de los sitios catalíticos de las  $\beta$ -lactamasas de clase A y C, el centro activo de OXA-24 y otras  $\beta$ -lactamasas de clase D se encuentra en una cavidad más hidrofóbica. La presencia de un residuo no polar, la V130, en el

elemento 2, (Fig. 63) y otros residuos apolares adyacentes, como Y112, W115, W221 o M223, contribuye a crear y estabilizar el entorno hidrofóbico. Es precisamente este entorno hidrofóbico que envuelve al sitio catalítico el que favorece la carboxilación en condiciones fisiológicas de la lisina K84 del elemento 1, tal y como se observa en nuestra estructura.



**Figura 63.** Entorno químico que rodea la región dónde se ubica la lisina del centro activo en OXA-24. La K84 de OXA-24 se encuentra en un núcleo hidrofóbico, estabilizado por la presencia de la V130 en el elemento 2, que favorece su carboxilación, definiendo un proceso de acilación/desacilación característico.

La carboxilación convierte a la lisina K84 en un residuo clave en OXA-24, ya que actúa como base en los pasos de acilación/desacilación, definiendo un mecanismo hidrolítico característico de las  $\beta$ -lactamasas de clase D (Bou, Santillana et al.) (Fig. 64).



**Figura 64.** Representación esquemática del mecanismo hidrolítico de OXA-24, en el que la K84 carboxilada actúa como base general en los pasos de acilación/desacilación, aumentando la reactividad tanto de la S81 como del agua hidrolítica.

El carboxilo de la lisina K84 establece un enlace de hidrógeno con el hidroxilo de la serina catalítica S81 (Fig. 65), favoreciendo la desprotonación del hidroxilo y aumentando la reactividad del oxígeno de la serina. De esta forma se aumenta la nucleofilicidad del residuo catalítico lo que favorece el ataque sobre el

## DISCUSIÓN

carbonilo del anillo penicilánico. Del mismo modo, activa el agua hidrolítica que actúa como nucleófilo en la desacilación del complejo acil-enzima.

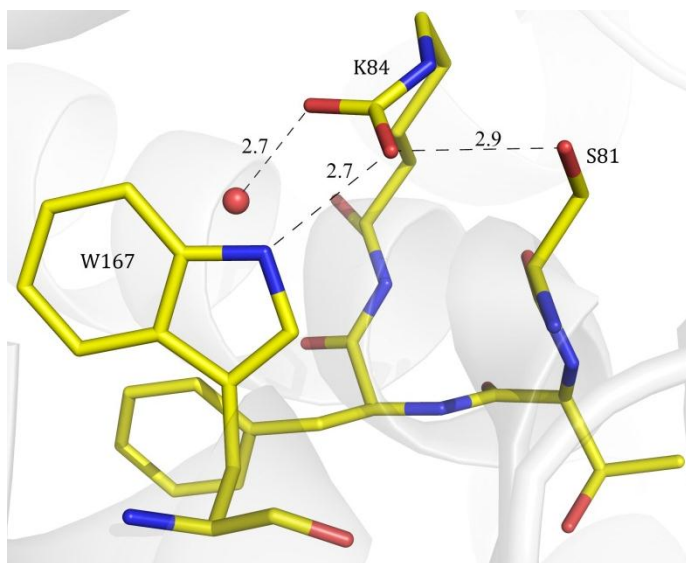


Figura 65. Interacciones (medidas en Å) que establece el grupo carboxilato de la K84 con la S81 durante la acilación y el agua hidrolítica presente en el centro activo en la desacilación. Además, el carboxilo se estabiliza por las interacciones que establece con el nitrógeno del W167 ubicado en lazo  $\Omega$ .

Las interacciones que establece el ión sulfato presente en el centro activo de OXA-24 con la S219 del elemento 3 y el grupo guanidinio de la R261, localizada en la hélice  $\alpha 9$  adyacente al sitio catalítico, sugiere que dichos residuos podrían desempeñar un papel relevante en la unión del sustrato a OXA-24, interaccionando con el carboxilato del antibiótico entrante. La comparación de la estructura de OXA-24 con el complejo acil-enzima de la serin  $\beta$ -lactamasa de clase A TEM-1 (Strynadka, Adachi et al. 1992), revela que el sulfato se localiza de forma similar al carboxilato del antibiótico reforzando esta posibilidad. La estructura posteriormente resuelta de un mutante funcional de la carbapenemasa OXA-24 con doripenem (Schneider, Ortega et al. 2011) ha confirmado que el carboxilato del sustrato establece interacciones con los aminoácidos que componen el elemento 3 del centro activo y con la R261, validando así nuestras conclusiones (Santillana et al., 2007) (Fig. 66).

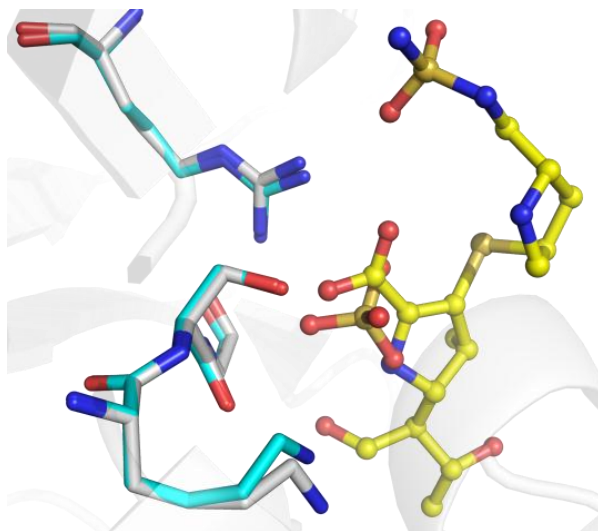


Figura 66. Comparación de la posición del sulfato en el centro activo del modelo cristalográfico de la forma libre de OXA-24 (cián) con el complejo OXA-24/doripenem (gris) descrita posteriormente. La molécula de sulfato emula al carboxilato del antibiótico, estabilizando la conformación del centro activo.

### 6.3 BASES MOLECULARES QUE DETERMINAN LA ESPECIFICIDAD DE OXA-24 POR ANTIBIÓTICOS CARBAPENÉMICOS.

A pesar de que OXA-24 mantiene un plegamiento general muy conservado con el resto de oxacilinasas y una estructura y composición idéntica del centro activo, el análisis de la estructura cristalográfica ha permitido identificar dos aminoácidos claves que podrían ser los responsables en la adquisición de la actividad carbapenemasa de OXA-24, Y112 y M223.

La orientación relativa de ambos residuos y la interacción entre sus cadenas laterales crea una barrera hidrofóbica que delimita el acceso al centro activo, definiendo una entrada tipo túnel con unas dimensiones específicas que determinará las características físico-químicas de los antibióticos que puedan alcanzar dicho sitio (Fig. 67).

## DISCUSIÓN

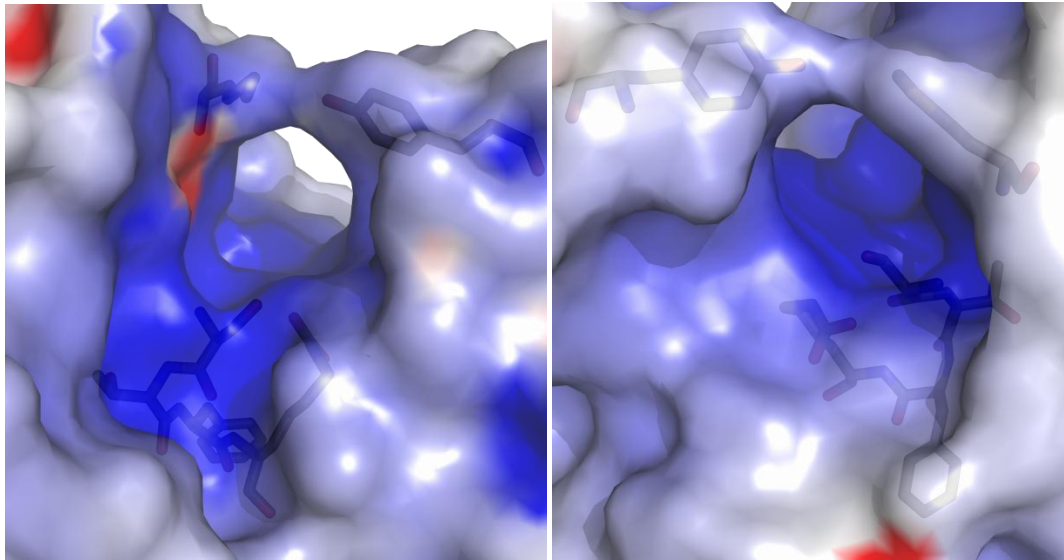
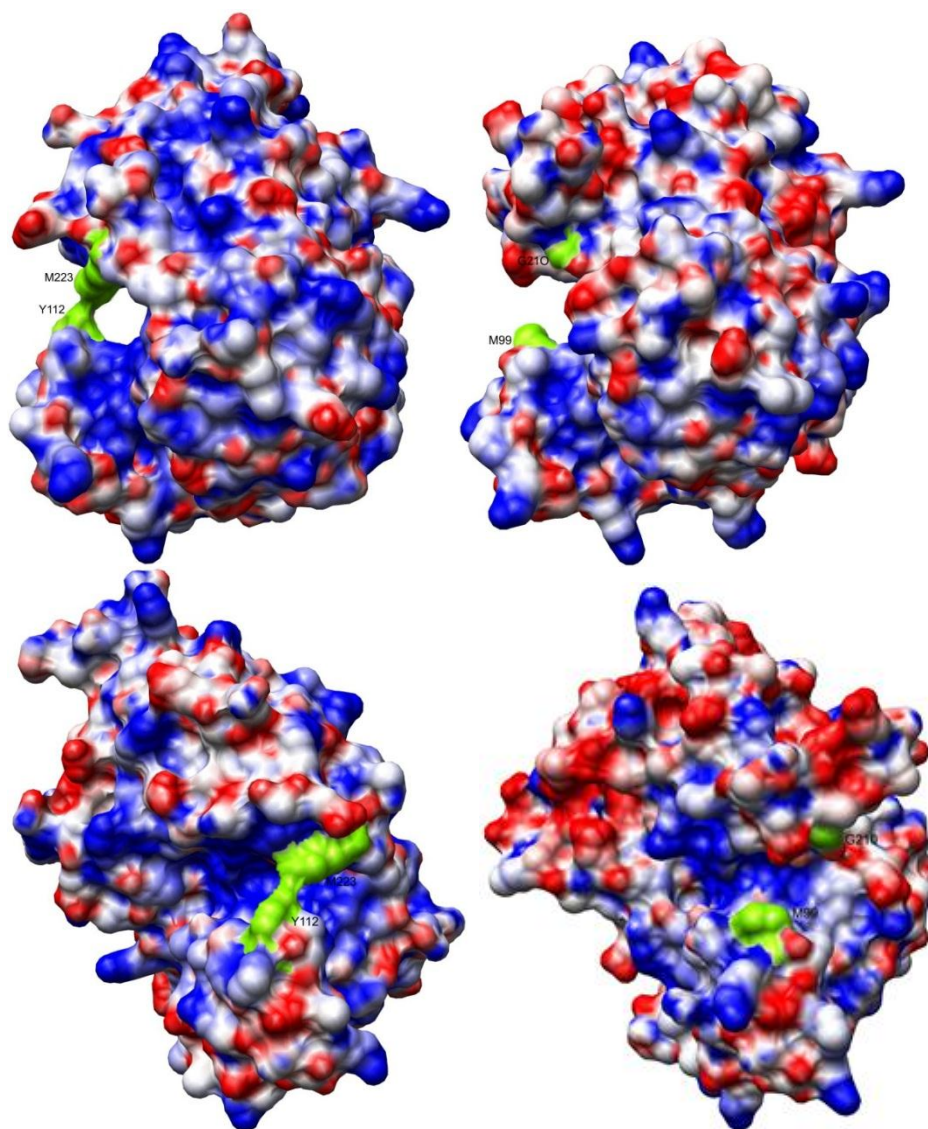


Figura 67. Visión desde ambos extremos de la barrera hidrofóbica definida por los contactos que se establecen entre la Y112 y la M223. El acceso al surco que aloja el centro activo, coloreado de acuerdo a su potencial electrostático (regiones cargadas negativamente en rojo y regiones cargadas positivamente en azul), restringe las características de los sustratos que pueden alcanzar la serina catalítica.

Si se compara la superficie molecular de OXA-24 con la de OXA-10 (Paetzel, Danel et al. 2000), una oxacilinasas tradicional que no posee actividad carbapenemasa, se puede apreciar que, en OXA-10, el surco donde se ubica el centro activo está completamente accesible. Los residuos Y112 y M223 que definen la barrera hidrofóbica en OXA-24 son reemplazados por una Metionina (M99) y una Glicina (G210), respectivamente. Esta diferencia en la geometría del canal de acceso al centro activo condiciona la naturaleza de los antibióticos que podrán alcanzar la serina catalítica, lo que podría explicar el motivo por el cual OXA-24 presenta una especificidad de sustrato distinta a la de las oxacilinasas clásicas (Fig. 68).

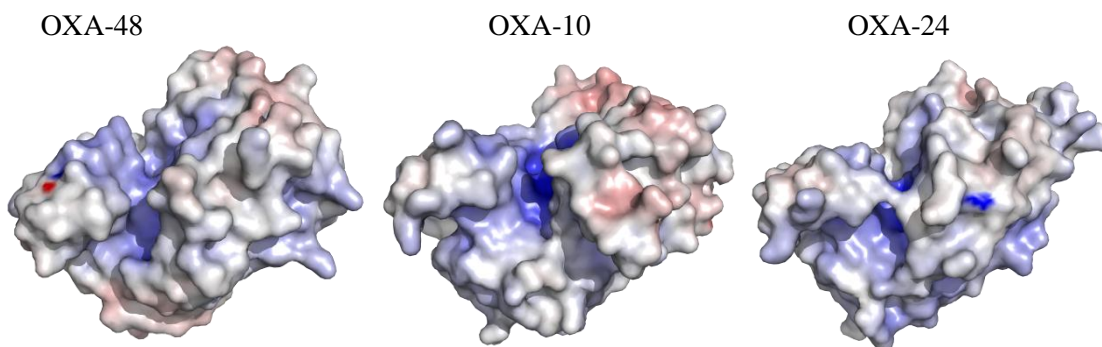




**Figura 68.** Representación en dos orientaciones diferentes de las superficies de OXA-24 (izquierda) y OXA-10 (derecha) coloreadas según su potencial electrostático (regiones cargadas negativamente en rojo y regiones cargadas positivamente en azul) determinado con APBS (Baker, Sept et al. 2001). Los aminoácidos Y112 y M223 de OXA-24 y sus equivalentes en la estructura de OXA-10 (M99 y G210) se muestran en verde. La interacción entre la Y112 y la M223 bloquea la entrada al centro activo de OXA-24, que queda definida como un túnel. Sin embargo, el acceso al sitio catalítico de OXA-10 se encuentra completamente abierto.

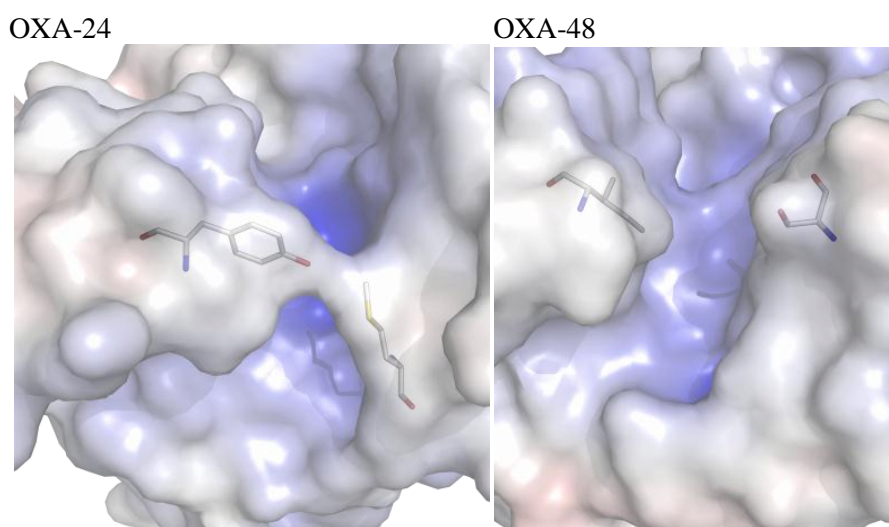
El análisis de la estructura de OXA-48, (Docquier, Calderone et al. 2009) otra carbapenemasa resuelta posteriormente, ha permitido observar que, si bien la barrera hidrofóbica que describimos en OXA-24 no se conserva en esta enzima, el centro activo se aloja en un canal que adopta también una conformación más cerrada que las oxacilinasas tradicionales (Fig. 69).

## DISCUSIÓN



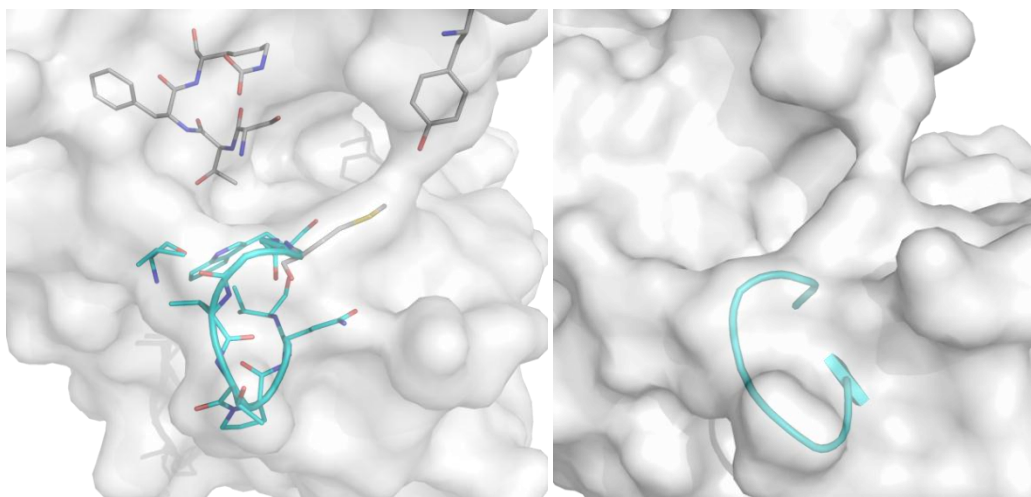
**Figura 69.** Comparación de la accesibilidad al sitio catalítico en OXA-10, una oxacilinas clásica y las carbapenemasas OXA-24 y OXA-48. La cavidad catalítica se encuentra más abierta en OXA-10, mientras que OXA-24 y OXA-48 presentan una entrada parcialmente cerrada.

Así pues, en OXA-48, la conformación que adoptan la S244 (lazo  $\beta 7$ - $\alpha 10$ ), enfrentada a la I102 (lazo  $\alpha 3$ - $\alpha 4$ ), y la R214 (lazo  $\beta 5$ - $\beta 6$ ) enfrentada a la Q124 ( $\alpha 5$ ), produce un estrechamiento del canal que restringe la entrada al centro activo, condicionando tanto la forma en que el sustrato puede alcanzar la serina catalítica como las características de los antibióticos que pueden acceder al centro activo, de manera semejante a lo que hemos descrito para la selectividad de sustrato que muestra OXA-24 (Fig. 70).



**Figura 70.** Representación del canal que aloja el bolsillo catalítico en las carbapenemasas OXA-24 y -48. La conformación que adoptan los residuos S44 e I102 en OXA-48, si bien no crean una barrera hidrofóbica equivalente a la formada por la Y112 y la M223 en OXA-24, contribuyen a estrechar el canal. De esta forma, el acceso queda también parcialmente restringido y limita el tipo de compuestos que pueden alcanzar el centro activo.

Además de la barrera hidrofóbica creada por los aminoácidos Y112 y M223, la conformación que adopta el lazo  $\beta 4$ - $\beta 5$ , inclinado hacia el surco de unión del sustrato, bloquea parcialmente el acceso del antibiótico al centro activo por el límite inferior del canal (Fig.71).



**Figura 71. Representación de la orientación que adopta el lazo  $\beta 4$ - $\beta 5$  en OXA-24. Su inclinación hacia el bolsillo catalítico limita la entrada del sustrato por la zona inferior del surco hidrofóbico, aumentando la especificidad de sustrato de OXA-24 por los carbapenémicos.**

Este lazo se estabiliza gracias al núcleo hidrofóbico creado por la interacción entre las cadenas laterales de los residuos no polares que lo componen (V78, V225, V229 y W231) así como de otros aminoácidos adyacentes, que contribuyen a reforzar el carácter hidrofóbico del canal que aloja al centro activo.

Cabe destacar también que la orientación y el tamaño del lazo  $\beta 4$ - $\beta 5$  es muy similar en OXA-48 y OXA-24 (Fig. 72), lo que refuerza su posible implicación en la especificidad por carbapenemas. Siguiendo la línea de lo descrito anteriormente para la estructura de OXA-24, el lazo  $\beta 4$ - $\beta 5$  de OXA-48 se orienta hacia el interior del surco catalítico, confiriéndole una conformación más cerrada que la que observamos en las oxacilinasas tradicionales.

## DISCUSIÓN



Figura 72. Comparación de la conformación específica que adopta el lazo  $\beta$ 4- $\beta$ 5 en las carbapenemasas OXA-24 (cián) y OXA-48 (naranja) con la que presenta el mismo lazo en OXA-10 (amarillo), donde se orienta hacia el exterior del canal de unión del sustrato.

La comparación de las estructuras químicas de la oxacilina, el sustrato clásico de las oxacilinasas, y los carbapenémicos imipenem y meropenem podría ayudar a comprender la selectividad por el sustrato específica de OXA-24 (Fig.73)

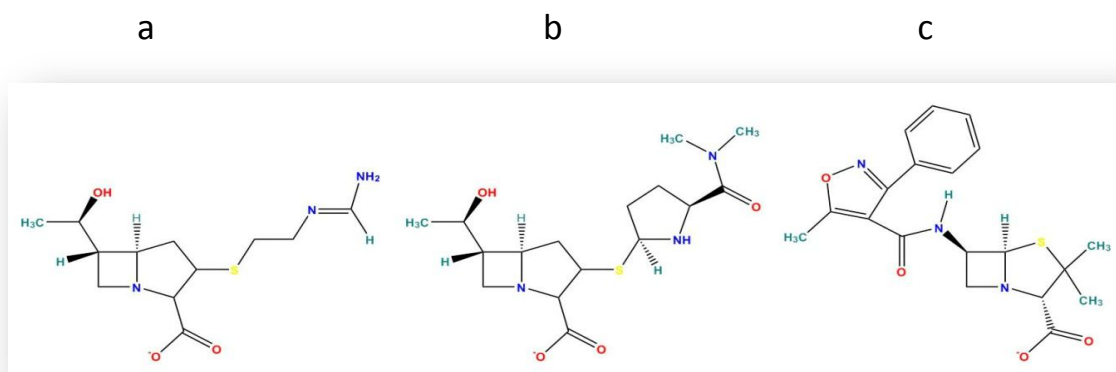


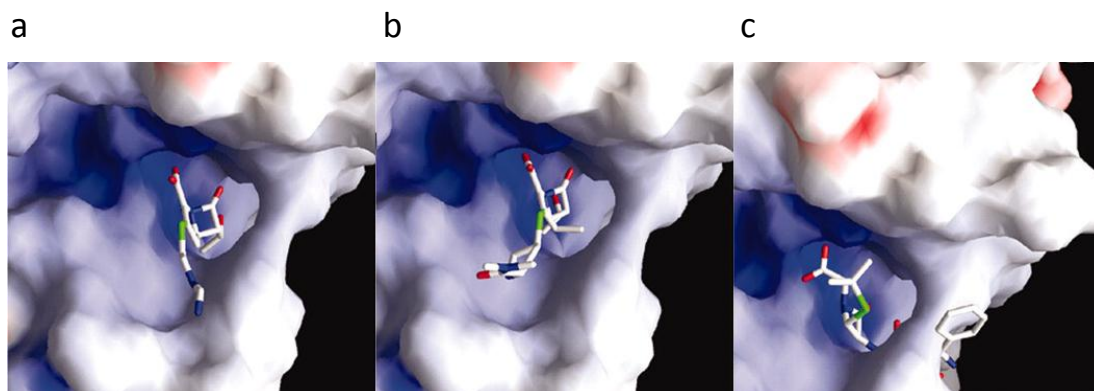
Figura 73. Estructura química de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos imipenem (a), meropenem (b) y oxacilina (c).

El voluminoso grupo metilfenilisoxazolil de la oxacilina, localizado en la posición 6 del anillo  $\beta$ -lactámico, dificulta el acceso de este antibiótico al centro activo de OXA-24. La barrera hidrofóbica, creada por la interacción de la Y112 y la M223, que delimita la entrada al bolsillo catalítico de esta  $\beta$ -lactamasa, colisionaría con este grupo lateral tal y como se aprecia en los modelos obtenidos al modelar el antibiótico en el centro activo (Fig. 74c). De esta forma, OXA-24 perdería la

capacidad de unir oxacilina y sus derivados, reduciendo por tanto su actividad oxacilinasas, como demuestran los datos funcionales y cinéticos descritos en este trabajo.

Los antibióticos carbapenémicos, por el contrario, presentan en la misma posición del anillo lactámico un grupo hidroxietilo, mucho menos voluminoso. Esta característica, unida al carácter hidrofóbico del surco catalítico, los convierte en sustratos idóneos por los que OXA-24 presenta una gran afinidad.

Además de la formación del intermedio acil-enzima que se produce por el ataque nucleofílico de la serina sobre el anillo  $\beta$ -lactámico, el modelado de imipenem y meropenem sobre el centro activo de OXA-24 muestra que estas carbapenemas interaccionan fundamentalmente a través del grupo carboxilato y del grupo 6-hidroxietilo (Fig. 74a y 74b). Mientras que el carboxilato establece un puente de hidrógeno con la S219 y un puente salino con el grupo guanidinio de la R261, el metilo del grupo hidroxietilo interacciona mediante fuerzas de van der Waals con la V130. Además, el hidroxilo del antibiótico establece un puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo del W221. Por su parte, la cadena lateral situada en posición 3 del anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico, y que contiene la molécula de sulfato, se sitúa a lo largo del canal hidrofóbico, casi paralela al centro activo, interaccionando con diferentes residuos, tales como la Y112, M114, W115, L127.



**Figura 74. Modelado del imipenem (a), meropenem (b) y oxacilina (c) en el sitio activo de OXA-24. El sustituyente metilfenilisoxazolil que presenta la oxacilina en la posición 6 del anillo  $\beta$ -lactámico chocaría con la barrera hidrofóbica creada por la interacción Y112-M223. El grupo hidroxietilo que poseen los carbapenémicos en esa posición, permite su acceso al túnel sin que exista impedimento estérico. Además, la tirosina parece desempeñar un papel esencial, anclando el 6-hidroxietilo de los carbapenémicos y orientándolos adecuadamente para interaccionar con la serina catalítica.**

La publicación posterior de las estructuras de dos mutantes funcionales de OXA-24, OXA-24<sub>K84D</sub> y OXA-24<sub>V130D</sub>, en complejo con doripenem (Schneider, Ortega et al. 2011), muestran la interacción de éste antibiótico con los residuos antes descritos, validando los modelos sobre la formación del complejo de OXA-24-imipenem/meropenem realizados durante el transcurso de este estudio. Dichas

estructuras muestran que el antibiótico se une covalentemente a la serina catalítica, formándose el complejo acil-enzima. Interacciones adicionales refuerzan el anclaje del complejo. La posición del grupo hidroxietilo se estabiliza en gran medida mediante interacciones hidrofóbicas de su grupo metilo con las cadenas laterales de la L168 y la V130. Por su parte, el grupo carboxilo del doripenem establece un puente salino con el grupo guanidinio de la R261 y un puente de hidrógeno con el hidroxilo de la S219. Las conformaciones que adoptan tanto el carboxilato como el grupo hidroxietilo fuerzan que el átomo de azufre, que actúa de puente entre el anillo de pirrolina y el de pirrolidina, adquiera una orientación estable. La pirrolidina queda entonces inmersa en un bolsillo hidrofóbico formado por los residuos M114, Y112, M223 o W221. De esta manera, la cadena larga del doripenem, anclada a la posición 3 del anillo  $\beta$ -lactámico, se posiciona en el surco catalítico, de forma que no colisiona con la barrera creada por la Y112 y la M223.

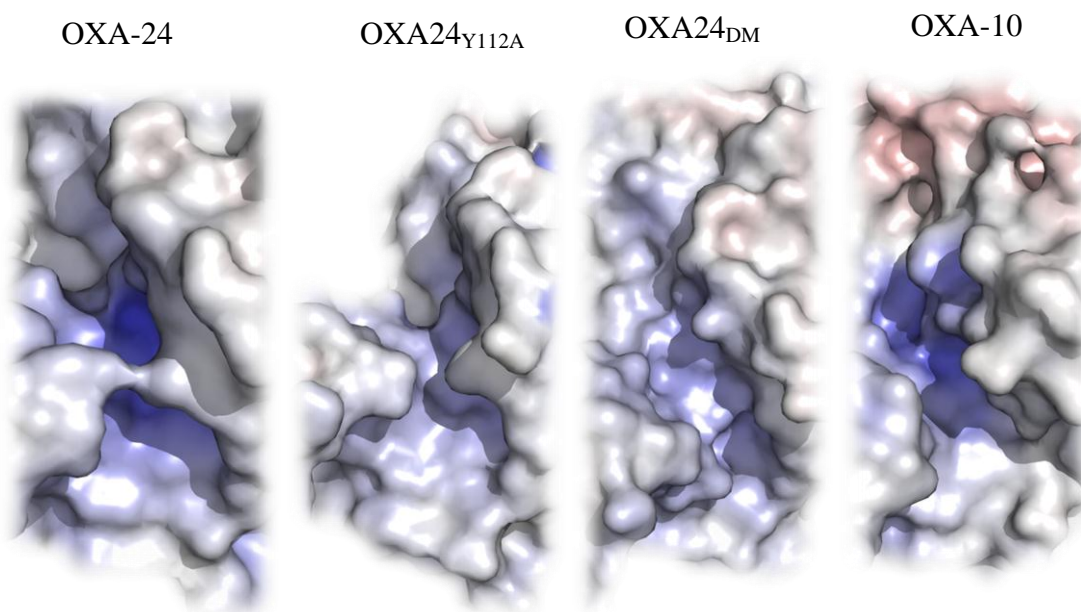
### 6.4 MUTANTES ESTRUCTURALES

Para validar y clarificar el papel que desempeña la Y112 y la M223 en la especificidad de OXA-24 por antibióticos carbapenémicos, se diseñaron varios mutantes: OXA24<sub>Y112A</sub>, OXA24<sub>M223A</sub> y OXA24<sub>DM</sub>. Los experimentos microbiológicos realizados con una cepa de *A. baumannii* intrínsecamente sensible a carbapenemas, y modificada para que expresase OXA-24<sub>WT</sub> o cada uno de los diferentes mutantes estructurales, muestran que las células portadoras de OXA-24<sub>WT</sub> presentan una clara resistencia a imipenem y meropenem. Sin embargo, las células que expresan los mutantes OXA24<sub>Y112A</sub> y OXA24<sub>DM</sub> manifiestan un acusado descenso en sus valores de CMIs, lo que indica que son sensibles a este tipo de antibióticos. En las células que expresan el mutante OXA24<sub>M223A</sub>, la disminución de las CMIs frente a imipenem y meropenem es sólo moderado, de manera que conservan la resistencia frente a carbapenémicos

Resulta interesante comprobar que, en los ensayos bioquímicos, los valores de  $K_m$  para imipenem y meropenem de los mutantes OXA24<sub>Y112A</sub> y OXA24<sub>DM</sub> aumentan significativamente en comparación con los que presenta OXA-24<sub>WT</sub>, mientras que los valores de  $k_{cat}$  se conservan semejantes en las tres enzimas. Estos resultados destacan la importancia de los residuos Y112 y M223 que, si bien no participan directamente en el proceso catalítico de la enzima (valores de  $k_{cat}$  similares entre los mutantes estructurales y la proteína nativa), están directamente implicados en la especificidad por el sustrato y en la determinación de las propiedades bioquímicas de OXA-24. La drástica reducción de la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) frente a imipenem y, especialmente meropenem, de los mutantes OXA24<sub>Y112A</sub> y OXA24<sub>DM</sub> en relación a OXA-24<sub>WT</sub> demuestra que, debido a la ausencia de la barrera hidrofóbica formada por los residuos Y112 y M223, los mutantes pierden la capacidad de interactuar con imipenem y meropenem.

Por otra parte, la desaparición total de la barrera hidrofóbica en el doble mutante OXA24<sub>DM</sub> provoca la aparición de la actividad catalítica frente a oxacilina, ausente en la proteína nativa. Cómo se puede observar en la figura 75 el sitio de

unión del doble mutante se asemeja más al descrito para las oxacilinasas típicas, donde el acceso al bolsillo catalítico está completamente accesible.



**Figura 75. Comparación del acceso al centro activo en OXA-24, OXA-10, OXA-24<sub>Y112A</sub> y OXA-24<sub>DM</sub>. La mutación de los residuos Y112A y M223 que conforman la barrera hidrofóbica provoca la apertura del canal, de forma que los mutantes presentan un acceso al centro activo similar al de las oxacilinasas clásicas (OXA-10), perdiendo su especificidad por carbapenémicos.**

Las conclusiones anteriores reflejan la función determinante que desempeñan los residuos Y112 y M223 en la actividad catalítica de OXA-24 hacia carbapenemas, determinando la manera que tiene esta  $\beta$ -lactamasa de reconocer y anclar el antibiótico al centro activo. La mutación de la M223 por alanina disminuye la actividad carbapenemasa de OXA-24, aunque sin llegar a revertir la resistencia a imipenem y meropenem. Especialmente importante parece el papel de la Y112, ya que su mutación a alanina provoca la pérdida de la resistencia a imipenem y meropenem, sugiriendo que los mutantes en este aminoácido reducen drásticamente su capacidad de hidrolizar  $\beta$ -lactámicos carbapenémicos. De esta forma, la Y112 podría actuar atrayendo el grupo 6-hidroxietilo de los carbapenémicos favoreciendo su correcta orientación para acceder al canal y alcanzar la serina catalítica.

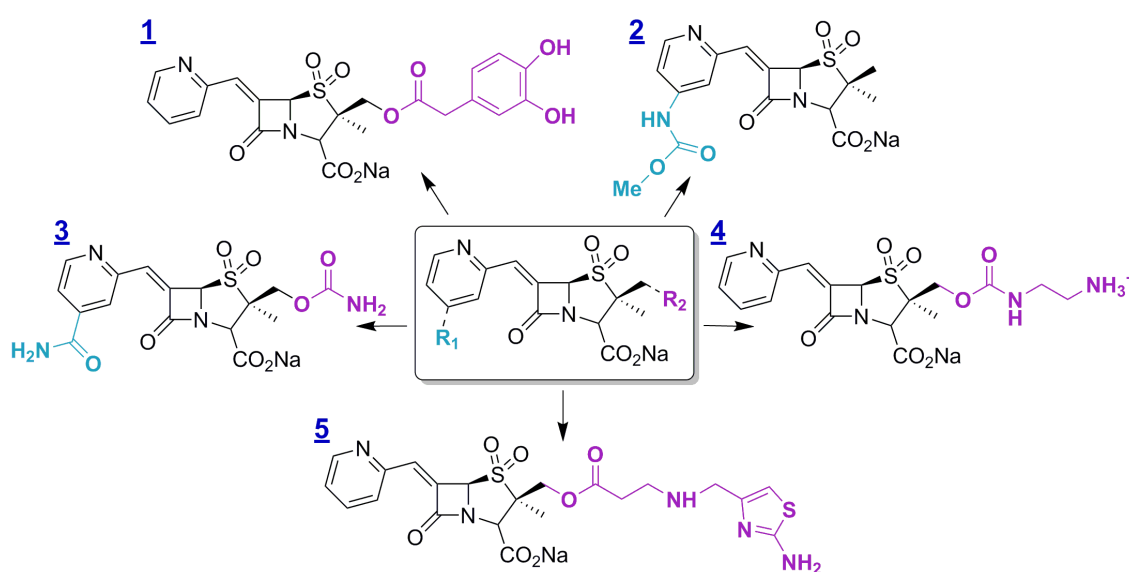
## 6.5 INHIBIDORES

Las oxacilinasas con actividad carbapenemasa se han convertido en uno de los mecanismos de resistencia más preocupantes en patógenos nosocomiales multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Dado que los antibióticos carbapenémicos constituyen uno de los últimos recursos para combatir los brotes infecciosos causados por estos patógenos y que los inhibidores  $\beta$ -lactámicos comerciales (ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam)

## DISCUSIÓN

resultan ineficaces frente a este tipo de  $\beta$ -lactamasas, resulta necesario desarrollar nuevos inhibidores.

Basándonos en la estructura cristalográfica de OXA-24, que ha permitido identificar uno de los mecanismos mediante el cual las carbapenemasas de clase D adquieren especificidad por antibióticos carbapenémicos, se probó un nuevo tipo de inhibidores, las penemas sulfónicas, con el objetivo de inhibir el mecanismo hidrolítico de OXA-24 (Bou, Santillana et al.). La formación de un intermedio acil-enzima de larga duración dificultaría la actividad catalítica de la enzima mientras el antibiótico lleva a cabo su función. La estructura de estos compuestos está basada en una sulfona del ácido penicilánico sustituida con diferentes grupos en posición 2 y con una 6-metilpirid-2-yl sobre la que se realizan, a su vez, diferentes modificaciones (Fig.76).



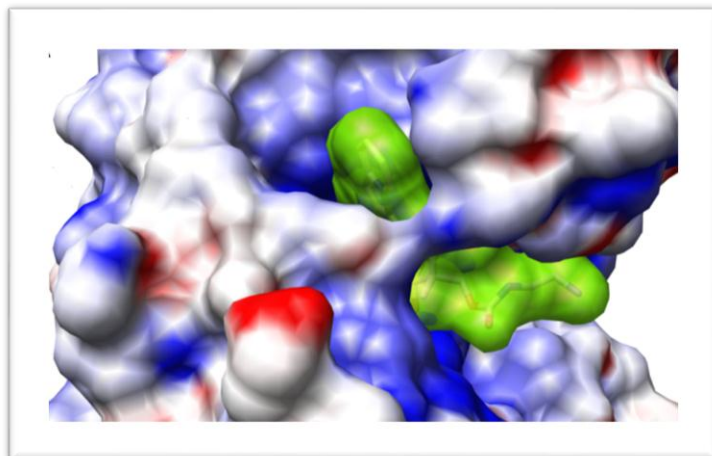
**Figura 76. Estructura química de las penemas sulfónicas. Sobre un esqueleto común, sulfona del ácido penicilánico, se realizan distintas sustituciones en diferentes posiciones para obtener los diferentes inhibidores.**

Una ventaja potencial que aporta esta familia de inhibidores son los cambios que experimentan en su conformación química una vez que se unen covalentemente a la serina catalítica, lo que los transforma en menos susceptibles a la desacilación y los convierte en “inhibidores suicidas”. El ataque nucleofílico de la S81 sobre el carbonilo del anillo penicilánico provoca un reordenamiento del compuesto que conlleva la formación de una indolizina como intermedio bicíclico estable.

La estructura de los complejos de OXA-24 con tres penemas sulfónicas modificadas, permite comprender diversos aspectos de la capacidad inhibitoria de este tipo de compuestos. En primer lugar hay que destacar la formación de un complejo acil-enzima muy estable con el oxígeno del carbonilo ocupando el agujero oxaniónico. Las interacciones que establece el sulfinato con la R261 (puente salino) y las serinas S128 y S219 (puentes de hidrógeno) contribuyen a



reforzar la estabilidad del complejo, de igual forma que el puente de hidrógeno que se establece entre el carboxilato y la Y112. Además, otros dos factores dificultan la desacilación, contribuyendo a la estabilidad de la acil-enzima. Por un lado, la presencia de la indolizina ocupando el centro activo, impide la entrada del agua catalítica que actúa como nucleófilo durante la desacilación (Fig. 77). Por otro lado, el inhibidor proporciona al centro activo un protón extra, que pierde el C5 para mantener la aromaticidad, lo que estabiliza a la K84 carboxilada en su forma de ácido conjugado e imposibilita que pudiese activar una molécula de agua que mediase en la hidrólisis de la acil-enzima.



**Figura 77. Interacción de OXA-24 (coloreada en función de su potencial electrostático) con una penema sulfónica (verde). La representación de la superficie de ambas moléculas muestra que la formación del la indolizina tras la interacción con la enzima ocupa la totalidad del agujero oxianiónico, impidiendo la entrada del agua catalítica y bloqueando el proceso de desacilación.**



# **CONCLUSIONES**



## 7 CONCLUSIONES

1. OXA-24 es una oxacilinasas con actividad carbapenemasa aislada de una cepa hospitalaria multirresistente de *Acinetobacter baumannii*. La resolución de su estructura cristalográfica, la primera de este tipo de  $\beta$ -lactamasas que se ha resuelto, ha permitido establecer las bases moleculares que explican la adquisición de especificidad por antibióticos carbapenémicos y constituye un punto de partida clave para el desarrollo de inhibidores.
2. OXA-24 presenta un plegamiento general muy similar al de otras  $\beta$ -lactamasas de clase A, C y D. Este plegamiento comprende un núcleo central formado por una  $\beta$ -lámina rodeada de  $\alpha$ -hélices, de forma que se pueden distinguir dos dominios bien definidos: un dominio formado por  $\alpha$ -hélices y otro mixto compuesto por las  $\alpha$ -hélices de las regiones N- y C-terminal y las seis hebras- $\beta$  antiparalelas que forman el núcleo de la lámina  $\beta$ .
3. El centro activo comprende también los tres elementos clásicos de las serin-betalactamasas, con una serina catalítica (S81) que actúa como nucleófilo.
4. A pesar de las analogías con las oxacilinasas clásicas en el plegamiento global y la composición del centro activo, la estructura de OXA-24 ha revelado que la interacción y posición relativa de dos residuos adyacentes al centro activo, Y112 y M223, genera una barrera hidrofóbica que bloquea parcialmente la entrada al centro activo, formándose un túnel cuyo tamaño y carácter hidrofóbico determina la especificidad que presenta OXA-24 por los carbapenémicos.
5. La cristalización y los ensayos funcionales realizados con mutantes, en los que ambos residuos han sido sustituidos por alanina, demuestran que la ausencia de la barrera que forman la Y112 y la M223 hace que OXA-24 pierda su selectividad por antibióticos carbapenémicos.
6. La carboxilación de la lisina 84 del elemento 1 del centro activo, confirma que las carbapenemasas de clase D conservan el mecanismo de acción descrito para las oxacilinasas clásicas, en las que dicho residuo actúa como base general en los procesos de acilación/desacilación que promueven la hidrólisis del antibiótico.
7. El estudio mediante cristalografía de rayos X de los complejos formados por OXA-24 con cinco compuestos del tipo penema sulfónica (penemas sulfónicas 6-alkiliden-2'-sustituidas) revela la formación de un enlace

## CONCLUSIONES

covalente entre la serina catalítica de la enzima y el compuesto, dando lugar a un acil-intermedio estable que bloquea el centro activo, actuando como inhibidor.

8. La interacción con la enzima provoca una reorganización química de estos compuestos, dando lugar a la formación de un anillo de indolizina que estabiliza la unión entre la proteína y el inhibidor.
9. Los ensayos de determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) en *A. baumannii* frente a los carbapenémicos imipenem y meropenem en presencia de las penemas sulfónicas, valida el carácter inhibitorio de estos compuestos frente a OXA-24.

# **BIBLIOGRAFÍA**





- ❖ Afzal-Shah, M., N. Woodford, et al. (2001). "Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(2): 583-588.
- ❖ Alexandrov, N. N. and D. Fischer (1996). "Analysis of topological and nontopological structural similarities in the PDB: new examples with old structures." *Proteins* **25**(3): 354-365.
- ❖ Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**(1036): 321-331.
- ❖ Baker, N. A., D. Sept, et al. (2001). "Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10037-10041.
- ❖ Banerjee, S., U. Pieper, et al. (1998). "Role of the omega-loop in the activity, substrate specificity, and structure of class A beta-lactamase." *Biochemistry* **37**(10): 3286-3296.
- ❖ Bendtsen, J. D., H. Nielsen, et al. (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." *J Mol Biol* **340**(4): 783-795.
- ❖ Bou, G., G. Cervero, et al. (2000). "Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases." *J Clin Microbiol* **38**(9): 3299-3305.
- ❖ Bou, G., A. Oliver, et al. (2000). "OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(6): 1556-1561.
- ❖ Bou, G., E. Santillana, et al. "Design, synthesis, and crystal structures of 6-alkylidene-2'-substituted penicillanic acid sulfones as potent inhibitors of *Acinetobacter baumannii* OXA-24 carbapenemase." *J Am Chem Soc* **132**(38): 13320-13331.
- ❖ Brown, S. and S. Amyes (2006). "OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far." *J Antimicrob Chemother* **57**(1): 1-3.
- ❖ Brown, S. and S. G. Amyes (2005). "The sequences of seven class D beta-lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents." *Clin Microbiol Infect* **11**(4): 326-329.

## BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Brown, S., H. K. Young, et al. (2005). "Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina." *Clin Microbiol Infect* **11**(1): 15-23.
- ❖ Brünger, A. T., P. D. Adams, et al. (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**(Pt 5): 905-921.
- ❖ Bush, K. and G. A. Jacoby (2010). "Updated functional classification of beta-lactamases." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(3): 969-976.
- ❖ Bush, K., G. A. Jacoby, et al. (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(6): 1211-1233.
- ❖ Cole, J. L. (2004). "Analysis of heterogeneous interactions." *Methods Enzymol* **384**: 212-232.
- ❖ Collaborative Computational Project number 4, C. (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**(Pt 5): 760-763.
- ❖ Costa, S. F., J. Woodcock, et al. (2000). "Outer-membrane proteins pattern and detection of beta-lactamases in clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil." *Int J Antimicrob Agents* **13**(3): 175-182.
- ❖ del Mar Tomas, M., A. Beceiro, et al. (2005). "Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(12): 5172-5175.
- ❖ Docquier, J. D., M. Benvenuti, et al. "Crystal structure of the narrow-spectrum OXA-46 class D beta-lactamase: relationship between active-site lysine carbamylation and inhibition by polycarboxylates." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(5): 2167-2174.
- ❖ Docquier, J. D., V. Calderone, et al. (2009). "Crystal structure of the OXA-48 beta-lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases." *Chem Biol* **16**(5): 540-547.
- ❖ Doublíé, S. (2007). *Macromolecular Crystallography Protocol*. Totowa, NJ., Humana Press.

- ❖ Drawz, S. M. and R. A. Bonomo (2010). "Three decades of beta-lactamase inhibitors." Clin Microbiol Rev **23**(1): 160-201.
- ❖ Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-2132.
- ❖ Evans, P. (2006). "Scaling and assessment of data quality." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **62**(Pt 1): 72-82.
- ❖ Fernandez-Cuenca, F., L. Martinez-Martinez, et al. (2003). "Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*." J Antimicrob Chemother **51**(3): 565-574.
- ❖ Garman, E. (2003). "'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage." Curr Opin Struct Biol **13**(5): 545-551.
- ❖ Garman, E. and R. L. Owen (2007). "Cryocrystallography of macromolecules: practice and optimization." Methods Mol Biol **364**: 1-18.
- ❖ Girlich, D., T. Naas, et al. (2004). "Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **48**(6): 2043-2048.
- ❖ Girlich, D., T. Naas, et al. (2004). "OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Ralstonia pickettii*." Antimicrob Agents Chemother **48**(11): 4217-4225.
- ❖ Golemi, D., L. Maveyraud, et al. (2001). "Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of class D beta-lactamases." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14280-14285.
- ❖ Gutkind, G. O., J. Di Conza, et al. (2013). "beta-lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview." Curr Pharm Des **19**(2): 164-208.
- ❖ Heritier, C., L. Poirel, et al. (2005). "Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*." Antimicrob Agents Chemother **49**(10): 4174-4179.
- ❖ Heritier, C., L. Poirel, et al. (2005). "Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3198-3202.

## BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Heritier, C., L. Poirel, et al. (2004). "Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing ambler class D beta-lactamase from *Shewanella algae*." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5): 1670-1675.
- ❖ Higgins, P. G., L. Poirel, et al. (2009). "OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(12): 5035-5038.
- ❖ Ho, S. N., H. D. Hunt, et al. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." *Gene* **77**(1): 51-59.
- ❖ Hooft, R. W., G. Vriend, et al. (1996). "Errors in protein structures." *Nature* **381**(6580): 272.
- ❖ Hujer, K. M., N. S. Hamza, et al. (2005). "Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(7): 2941-2948.
- ❖ Hunger, M., R. Schmucker, et al. (1990). "Analysis and nucleotide sequence of an origin of DNA replication in *Acinetobacter calcoaceticus* and its use for *Escherichia coli* shuttle plasmids." *Gene* **87**(1): 45-51.
- ❖ Jelsch, C., L. Mourey, et al. (1993). "Crystal structure of *Escherichia coli* TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution." *Proteins* **16**(4): 364-383.
- ❖ Kleywegt, G. J. and T. A. Jones (1996). "Phi/psi-chology: Ramachandran revisited." *Structure* **4**(12): 1395-1400.
- ❖ Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, et al. (1993). "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." *Journal of Applied Crystallography* **26**(2): 283-291.
- ❖ Leslie, A. G. (2006). "The integration of macromolecular diffraction data." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 1): 48-57.
- ❖ Magnet, S., P. Courvalin, et al. (2001). "Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(12): 3375-3380.
- ❖ McGuffin, L. J., K. Bryson, et al. (2000). "The PSIPRED protein structure prediction server." *Bioinformatics* **16**(4): 404-405.

- ❖ Murshudov, G. N., P. Skubak, et al. "REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **67**(Pt 4): 355-367.
- ❖ Murshudov, G. N., A. A. Vagin, et al. (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **53**(Pt 3): 240-255.
- ❖ Naas, T. and P. Nordmann (1999). "OXA-type beta-lactamases." Curr Pharm Des **5**(11): 865-879.
- ❖ National Committee for Clinical Laboratory Standards, W., Pa (2003). "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A6." National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- ❖ Navaza, J. (1994). "AMoRe: an automated package for molecular replacement." Acta Crystallogr A **50**: 157-163.
- ❖ Oefner, C., A. D'Arcy, et al. (1990). "Refined crystal structure of beta-lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for beta-lactam hydrolysis." Nature **343**(6255): 284-288.
- ❖ Paetzel, M., F. Danel, et al. (2000). "Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10." Nat Struct Biol **7**(10): 918-925.
- ❖ Paton, R., R. S. Miles, et al. (1993). "ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*." Int J Antimicrob Agents **2**(2): 81-87.
- ❖ Peleg, A. Y., H. Seifert, et al. (2008). "*Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen." Clin Microbiol Rev **21**(3): 538-582.
- ❖ Pernot, L., F. Frenois, et al. (2001). "Crystal structures of the class D beta-lactamase OXA-13 in the native form and in complex with meropenem." J Mol Biol **310**(4): 859-874.
- ❖ Poirel, L., C. Heritier, et al. (2004). "Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 348-351.
- ❖ Poirel, L., C. Heritier, et al. (2004). "Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 15-22.

## BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Poirel, L., W. Mansour, et al. (2008). "Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(5): 1613-1617.
- ❖ Poirel, L., S. Marque, et al. (2005). "OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(1): 202-208.
- ❖ Poirel, L., T. Naas, et al. (2010). "Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(1): 24-38.
- ❖ Poirel, L. and P. Nordmann (2006). "Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology." *Clin Microbiol Infect* **12**(9): 826-836.
- ❖ Queenan, A. M. and K. Bush (2007). "Carbapenemases: the versatile beta-lactamases." *Clin Microbiol Rev* **20**(3): 440-458, table of contents.
- ❖ Ramachandran, G. N. and V. Sasisekharan (1968). "Conformation of polypeptides and proteins." *Adv Protein Chem* **23**: 283-438.
- ❖ Rhodes, G. (1993). *Crystallography. Made Crystal Clear*, Academic Press, San Diego, CA. London, UK.
- ❖ Roussel, A., Cambilleau, C. (1989). "Turbo-Frodo. In Silicon Graphics geometry partners directory." *Silicon Graphics, Mountain View, USA*: 77-79.
- ❖ Rupp, B. (2010). *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. Abingdon, New York, Science, Taylor & Francis Group.
- ❖ Santillana, E., A. Beceiro, et al. (2007). "Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(13): 5354-5359.
- ❖ Schneider, K. D., C. R. Bethel, et al. (2009). "Mutation of the active site carboxylysine (K70) of OXA-1 beta-lactamase results in a deacylation-deficient enzyme." *Biochemistry* **48**(26): 6136-6145.
- ❖ Schneider, K. D., C. J. Ortega, et al. (2011). "Structures of the class D carbapenemase OXA-24 from *Acinetobacter baumannii* in complex with doripenem." *J Mol Biol* **406**(4): 583-594.

- ❖ Schuck, P. (2000). "Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling." Biophys J **78**(3): 1606-1619.
- ❖ Schuck, P., M. A. Perugini, et al. (2002). "Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems." Biophys J **82**(2): 1096-1111.
  
- ❖ Siroy, A., V. Molle, et al. (2005). "Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*." Antimicrob Agents Chemother **49**(12): 4876-4883.
  
- ❖ Stec, B., K. M. Holtz, et al. (2005). "Structure of the wild-type TEM-1 beta-lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **61**(Pt 8): 1072-1079.
  
- ❖ Strynadka, N. C., H. Adachi, et al. (1992). "Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution." Nature **359**(6397): 700-705.
  
- ❖ Suarez, C. and F. Gudiol (2009). "[Beta-lactam antibiotics]." Enferm Infecc Microbiol Clin **27**(2): 116-129.
  
- ❖ Sun, T., M. Nukaga, et al. (2003). "Comparison of beta-lactamases of classes A and D: 1.5-Å crystallographic structure of the class D OXA-1 oxacillinase." Protein Sci **12**(1): 82-91.
  
- ❖ Walther-Rasmussen, J. and N. Hoiby (2006). "OXA-type carbapenemases." J Antimicrob Chemother **57**(3): 373-383.





# **ABREVIATURAS**



<b><i>A. baumannii</i></b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<b>ADN</b>	Ácido dexosirribonucleico
<b>ADSC</b>	“Area Detector Systems Corporation”
<b>AMoRe</b>	“Art of Molecular Replacement”
<b>APBS</b>	“Adaptive Poisson-Boltzmann Solver”
<b>c(s)</b>	Coeficiente de sedimentación
<b>CCP4</b>	“Collaborative Computational Project No. 4”
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CNS</b>	Crystallography and NMR System
<b>C-terminal</b>	Extremo Carboxilo-terminal
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>Da</b>	Dalton
<b>DTT</b>	Ditiotriol
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Acido etilendiaminotetraacético
<b>ESRF</b>	“European Synchrotron Radiation Facility”

## ABREVIATURAS

<b>F</b>	Factor de estructura
<b>F<sub>calc</sub>/F<sub>c</sub></b>	Factor de estructura calculado
<b>F<sub>obs</sub>/F<sub>o</sub></b>	Factor de estructura observado
<b>GST</b>	Glutathione S-Transferase
<b>I</b>	Intensidad
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración Inhibitoria 50%
<b>IPTG</b>	Isopropil-b-D-tiogalactopiranosido
<b>k<sub>cat</sub></b>	Constante catalitica
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de Inhibición
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>LB</b>	Medio de cultivo "Luria Bertani"
<b>MW</b>	Peso molecular
<b>N-terminal</b>	Extremo Amino-terminal
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBPs</b>	"Penicillin Binding Proteins"
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa

<b>PDB ID</b>	Código de identificación “Protein Data Bank “
<b>PEG</b>	Polietilén glicol
<b>PSIPRED</b>	“Protein Structure Prediction Serve”
<b>r.m.s.d.</b>	Desviación cuadrática media
<b>r.p.m</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima