



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**“Estudio del mecanismo de reacción y reconocimiento
de sustrato de la metalo- β -lactamasa NDM-1”**

Presentada por Antonela Rocío Palacios

Rosario, Argentina

2018

“Estudio del mecanismo de reacción y reconocimiento de sustrato de la metalo- β -lactamasa NDM-1”

Antonela Rocío Palacios

Licenciada en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET) y en la Cátedra de Biofísica del Departamento de Química Biológica dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1° de abril de 2013 y el 19 de febrero de 2018, bajo la dirección del Prof. Alejandro José Vila y co-dirección de la Dra. Leticia Irene Llarrull.

A mi familia.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por el otorgamiento de la beca y los fondos que hicieron posible este trabajo. Deseo que nunca falten oportunidades para todos los que deseen realizar ciencia en nuestro país.

Al Prof. Alejandro Vila, por dirigirme durante la realización de este trabajo, por depositar su confianza en mí desde el primer día y permitirme formar parte de su grupo, por preocuparse por mi bienestar, por enseñarme a defender mi trabajo y por alentarme a seguir adelante.

A la Dra. Leticia Llarrull, por aceptar la co-dirección de este trabajo, por enseñarme a prestar atención a los detalles, por su gran dedicación, por las horas de intercambio de ideas que ayudaron a formar mi pensamiento crítico y por escuchar, también, mis cuestiones personales.

A Natalia Lisa, por el trabajo en equipo. A María, por compartir conmigo su proyecto, su amistad y sus dichos. A Mariano y a Ro, por acompañarme en mis primeros pasos en el laboratorio.

A Estefí, por convertirse en mi hermanita científica y amiga, por confiar en mí y por esos chistes que a nadie más causaron gracia. A Maru, la mejor *roomate* que podría haber pedido, por compartir conmigo su segunda casa (aunque yo tome mate dulce) y por no pedirme que limpie en estos meses. A Andrés, por escucharme y por ser mi primer amigo en el laboratorio. A Marcos, por su amistad de estos años y por las apuestas perdidas sin querer queriendo. A Guille, por el acceso libre a la *Guishypedia* y por su interminable paciencia, no hay chocolate que esté a la altura de su buena voluntad. A Bruno y a Nina, los mejores agregados que el laboratorio 1 podría haber tenido. A Lis, por estar siempre bien predispuesto a discutir resultados. A Alcho, por su paciencia zen. A todos ellos y a Alchito, Belén, Caro, Flor, Irina, Juli, Luli, Marco y Pau, por los buenos recuerdos, por tener sus escudos listos para enfrentar los ataques de arena y por compartir el mismo tipo de locura. A Agus, Fito, Florcita, Gina, Jim, Meli, Pablo, Robi, y a todo el personal del IBR con el que compartí espacio de trabajo y almuerzos, por su buena energía que ayudó a alivianar los días.

A Agos, Nela, Piki, Sabri, y Vir, por su amistad que me acompaña desde los días de facultad y por esas ataques de risa que dan contracciones. A Lucas y Marcel, por los buenos momentos de pastas.

A Ane, Aye, Maia, Marie, Nai, Pao, Pau y Sofí, por estar siempre presentes desde hace más de 17 años y porque su compañía hace que los retos sean más fáciles.

A mis papás, mis hermanos, mis abuelos y toda mi familia de sangre y del corazón, por darme su apoyo, aunque no entiendan mis decisiones, por darme fuerzas, y por compartir mis logros con alegría.

Siempre me gustó la frase que dice “*Yo soy una parte de todo aquello que he encontrado en mi camino*”, este trabajo también es parte de ustedes. Gracias a todos.

Índice General

Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas.....	vi
Abreviaturas, Símbolos y Anglicismos.....	vii
Capítulo 1. Introducción General.....	1
1.1. Antibióticos-β-lactámicos.....	1
1.1.1. La era antibiótica.....	1
1.1.2. Clases de antibióticos β -lactámicos.....	3
1.1.3. Mecanismo de acción de antibióticos β -lactámicos.....	5
1.1.4. Resistencia bacteriana a antibióticos β -lactámicos.....	6
1.2. Las metalo-β-lactamasas.....	7
1.2.1. Relevancia clínica de las M β Ls.....	7
1.2.2. Biogénesis, procesamiento y contenido metálico de M β Ls <i>in bacteria</i>	8
1.2.3. Clasificación de las M β Ls.....	9
1.2.4. Estructura de las M β Ls.....	9
1.2.4.i. Estructura secundaria de M β Ls.....	9
1.2.4.ii. Organización del sitio Activo de M β Ls.....	11
1.2.4.iii. Segunda esfera de coordinación de M β Ls.....	12
1.2.5. Inhibición de M β Ls.....	13
1.3. La MβL NDM-1.....	16
1.3.1. Diseminación de NDM-1.....	16
1.3.2. Estructura y variantes alélicas de NDM.....	17
1.3.3. Localización celular de NDM-1.....	18
1.3.4. Interacciones con sustratos en NDM-1.....	18
1.3.5. Estudios del mecanismo de reacción de M β Ls.....	20
1.4. Objetivos de esta Tesis.....	22
Capítulo 2. Materiales y Métodos.....	23
2.1. Cepas, plásmidos, medios de cultivo y soluciones amortiguadoras.....	23
2.1.1. Cepas utilizadas.....	23
2.1.2. Medios de cultivo.....	23
2.1.3. Plásmidos.....	24
2.1.4. Soluciones amortiguadoras.....	26
2.2. Técnicas concernientes a la manipulación de ácidos nucleicos.....	26
2.2.1. Purificación de ADN plasmídico.....	26
2.2.2. Electroforesis en geles de agarosa.....	27
2.2.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	27
2.2.4. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	28

2.2.5. Reacciones de ligación	28
2.2.6. Reacciones en cadena de la polimerasa	28
2.3. Técnicas de Microbiología	29
2.3.1. Preparación y transformación de células de <i>E. coli</i> utilizando CaCl_2	29
2.3.2. Preparación de extractos de periplasma, esferoplastos y células totales	29
2.3.3. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas	30
2.4. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	31
2.4.1. Inducción en células de <i>E. coli</i> y ruptura celular	31
2.4.2. Separaciones Cromatográficas	32
2.4.3. Cuantificación de las muestras de proteínas	33
2.4.4. Concentración de muestras de proteínas	33
2.5. Detección de proteínas	33
2.5.1. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)	33
2.5.2. <i>Western Blots</i>	34
2.6. Técnicas para la caracterización bioquímica de las proteínas	35
2.6.1. Determinación del contenido de Zn(II) utilizando el quelante colorimétrico PAR	35
2.6.2. Medida de la afinidad por Zn(II)	35
2.6.3. Medida de actividad en estado estacionario y cuantificación de antibióticos β -lactámicos	36
2.6.4. Medidas de estabilidad térmica	37
2.7. Técnicas vinculadas al estudio de las variantes metálicas	38
2.7.1. Preparación de apo-enzimas	38
2.7.2. Preparación y estudio de las variantes con Co(II)	38
2.7.3. Preparación y estudio de las variantes con Cd(II)	39
2.8. Técnicas aplicadas al estudio del mecanismo de reacción.....	40
2.8.1. Medidas de cinética transiente	40
2.8.2. Ajuste de los datos a diferentes modelos de reacción	41
2.8.3. Titulación de bi- Co(II) -NDM-1 con imipenem hidrolizado.....	41
2.8.4. RMN de ^1H de los productos de hidrólisis de imipenem.....	41
Capítulo 3. Caracterización Bioquímica y Biofísica de NDM-1	43
3.1. Introducción: uso de la sustitución de metal para generar sondas espectroscópicas en $\text{M}\beta\text{Ls}$.....	43
3.2. Resultados: caracterización de NDM-1 soluble.....	45
3.2.1. Expresión y purificación.....	45
3.2.2. Medidas de actividad en estado estacionario	47
3.2.3. Estimación de las constantes de afinidad por Zn(II)	48
3.2.4. Empleo de Co(II) como sonda espectroscópica en NDM-1.....	50
3.2.5. Empleo de Cd(II) como sonda espectroscópica en NDM-1.....	53
3.3. Discusión: estudio de la coordinación de los iones metálicos en NDM-1	55

Capítulo 4. Estudio del Mecanismo de Hidrólisis de Carbapenemes por NDM-1	58
4.1. Introducción: hidrólisis de antibióticos β-lactámicos.....	58
4.1.1. Reactividad química de los antibióticos β -lactámicos	58
4.1.2. Hidrólisis mediada por S β Ls.....	59
4.1.3. Hidrólisis mediada por M β Ls bimetálicas	60
4.1.3.i. Formación del complejo ES y ruptura del anillo β -lactama	60
4.1.3.ii. Formación de intermediarios de reacción.....	61
4.1.3.iii. Generación de producto	64
4.1.4. Hidrólisis mediada por M β Ls B2.....	66
4.1.5. Importancia del estudio de la hidrólisis de carbapenemes por M β Ls	67
4.2. Resultados: estudio de la hidrólisis de carbapenemes por NDM-1.....	68
4.2.1. Hidrólisis de carbapenemes por bi-Zn(II)-NDM-1.....	68
4.2.1.i. Hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1	68
4.2.1.ii. Hidrólisis de meropenem por bi-Zn(II)-NDM-1.....	72
4.2.2. Hidrólisis de Imipenem por bi-Co(II)-NDM-1.....	74
4.2.2.i. Análisis de los cambios observados durante la reacción de hidrólisis	74
4.2.2.ii. Análisis de la formación de un complejo enzima:producto.....	76
4.2.2.iii. Propuesta de un mecanismo de reacción mínimo.....	77
4.2.2.iv. Simulación de especies producidas durante la reacción	79
4.2.3. Estudio de la identidad de los intermediarios de reacción	80
4.2.3.i. Análisis de los productos formados por RMN	80
4.2.3.ii. Aplicación QM-MM al estudio de intermediarios de reacción	81
4.3. Discusión: mecanismo de acción común para MβLs.....	86
Capítulo 5. Interacción entre la Estructura y la Función del Bucle L3 de NDM-1	91
5.1. Introducción: estudio del L3 en MβLs.....	91
5.2. Resultados: estudio de las variantes en el L3 de NDM-1	94
5.2.1. Análisis de los niveles de expresión y estabilidad.....	94
5.2.2. Estudio del perfil de sustrato.....	96
5.2.3. Análisis de la afinidad por Zn(II) y la coordinación de los iones metálicos.....	99
5.2.4. Estudio del mecanismo de acción de las variantes en el L3 de NDM-1.....	102
5.2.4.i. Hidrólisis de nitrocefina por variantes en el L3.....	102
5.2.4.ii. Hidrólisis de carbapenemes por variantes en el L3.....	104
5.2.5. Estructuras cristalográficas de las variantes en el L3 de NDM-1.....	106
5.3. Discusión: impacto del bucle L3 en el mecanismo de reacción de NDM-1.....	109
Conclusiones Generales	114
Resumen.....	116
Bibliografía.....	119

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura de los núcleos de las distintas clases de antibióticos β -lactámicos.....	3
Figura 2: Estructuras de los carbapenemes imipenem y meropenem.	5
Figura 3: Esquema simple de la reacción catalizada por β -lactamasas.	7
Figura 4: Estructuras de las tres subclases de M β LS.....	10
Figura 5: Segunda esfera de coordinación de NDM-1.....	12
Figura 6: Unión del inhibidor L-CS319 a NDM-1.	15
Figura 7: Unión de sustratos hidrolizados de diversas familias en NDM-1.....	19
Figura 8: Purificación de NDM-1 Δ 38.....	46
Figura 9: Competencia por Zn(II) entre el quelante cromogénico PAR y la apo- proteína NDM-1.....	49
Figura 10: Determinación de la constante de afinidad por Zn(II) de NDM-1.....	50
Figura 11: Titulación de apo-NDM-1 con CoSO ₄	51
Figura 12: Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹¹³ Cd de bi- ¹¹³ Cd(II)-NDM-1.	54
Figura 13: Esquema de las etapas involucradas en la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos en medios alcalino y ácido.	58
Figura 14: Esquema de la hidrólisis de antibióticos β -lactámicos por S β LS.....	59
Figura 15: Propuesta de la formación del complejo ES durante la hidrólisis de carbapenemes en M β LS bimetálicas.....	60
Figura 16: Derivados cromogénicos de cefalosporinas.	62
Figura 17: Intermediarios de reacción propuestos para la hidrólisis de imipenem por BcII.	63
Figura 18: Mecanismo de hidrólisis de meropenem por NDM-1 propuesto por simulaciones computacionales QM-MM.....	64
Figura 19: Productos generados durante la hidrólisis de imipenem.	65
Figura 20: Mecanismo mínimo propuesto para la hidrólisis de carbapenemes por M β LS B2.	66
Figura 21: Hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1.....	69
Figura 22: Mecanismos de reacción ensayados para la hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1.....	71
Figura 23: Hidrólisis de meropenem catalizada por bi-Zn(II)-NDM-1.....	73
Figura 24: Hidrólisis de imipenem catalizada por bi-Co(II)-NDM-1.....	75
Figura 25: Titulación de bi-Co(II)-NDM-1 con imipenem hidrolizado.	77
Figura 26: Mecanismo de reacción propuesto para la hidrólisis de imipenem por bi-Co(II)-NDM-1.	78
Figura 27: Simulación de especies formadas durante la hidrólisis de imipenem por bi-Co(II)-NDM-1.	80
Figura 28: Mecanismo de reacción para la hidrólisis de carbapenemes por NDM-1.....	80
Figura 29: Análisis de la población de tautómeros producidos durante la hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1.....	81
Figura 30: Estructuras obtenidas por QM-MM de los intermediarios de reacción formados durante la hidrólisis de meropenem.	82
Figura 31: Distribución de aguas cercanas al sitio activo de bi-Zn(II)-NDM-1 durante el proceso de hidrólisis de meropenem.....	84
Figura 32: Estructuras de los posibles complejos EP.....	85
Figura 33: Mecanismos propuestos para la hidrólisis de carbapenemes por M β LS.....	87
Figura 34: Parámetros cinéticos para NDM-1, VIM-2 e IMP-1.	92
Figura 35: Alineamiento de secuencia del L3 de las variantes de NDM-1.	93
Figura 36: Inmunodetección de la expresión de las variantes en el L3 de NDM-1 ancladas a membrana en <i>E. coli</i> DH5 α	94
Figura 37: CIMs de cepas productoras de NDM-1 y variantes en el L3 frente a cefotaxima a concentraciones crecientes de DPA.	99
Figura 38: <i>Western blot</i> que muestra la expresión de NDM-1 y variantes en el L3 en células totales tratadas con DPA.	100
Figura 39: Modelos de competencia por Zn(II) entre PAR y las enzimas (E) derivadas de NDM-1.	100
Figura 40: Espectros de las variantes en el L3 de NDM-1 sustituidas con Co(II).....	102
Figura 41: Hidrólisis de nitrocefina catalizada por las variantes en el L3 de NDM-1.....	104

Figura 42: Hidrólisis de imipenem catalizada por las variantes en el L3 de NDM-1.	105
Figura 43: Hidrólisis de meropenem catalizada por las variantes en el L3 de NDM-1.....	106
Figura 44: Alineamiento de las estructuras cristalográficas de NDM-1, L3IMP y L3Pro.	107
Figura 45: Análisis de la variación en la posición del L3 de NDM-1, L3IMP y L3Pro	108
Figura 46: Interacciones hidrofóbicas del residuo Trp64 en L3IMP.	109

Índice de Tablas

Tabla 1: λ y $\Delta\epsilon$ utilizados para seguir las reacciones de hidrólisis espectrofotométricamente y cuantificar sustratos.....	37
Tabla 2: Parámetros cinéticos en estado estacionario medidos para bi-Zn(II)-NDM-1.....	48
Tabla 3: Parámetros cinéticos en estado estacionario para bi-Zn(II) y bi-Co(II)-NDM-1.....	53
Tabla 4: Parámetros cinéticos en estado estacionario para bi-Zn(II) y bi- ¹¹³ Cd(II)-NDM-1.....	55
Tabla 5: Constantes cinéticas y valores de absorptividad molar correspondientes a la hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1.....	72
Tabla 6: Constantes cinéticas y valores de ϵ correspondientes a la hidrólisis de imipenem por bi-Co(II)-NDM-1.....	79
Tabla 7: Distancias (Å), ángulos (°) y cargas de Mulliken relevantes de las estructuras optimizadas por QM-MM a partir de la estructura 4RBS.....	83
Tabla 8: Rendimiento y contenido de Zn(II) de las purificaciones de las variantes en el L3.....	95
Tabla 9: Temperaturas medias de desnaturalización (T_M) de las variantes en el L3.....	96
Tabla 10: Concentración inhibitoria mínima de diferentes β -lactámicos para las variantes en el L3.....	97
Tabla 11: Parámetros cinéticos en estado estacionario medidos para las variantes en el L3.....	98
Tabla 12: Constantes de disociación de Zn(II) obtenidas para NDM-1 y las variantes en el L3.....	101

Abreviaturas y Símbolos

- **3H:** sitio de unión a metal 1 de M β Ls.
- **Abs:** Absorbancia.
- **BBL:** numeración consenso de los residuos de M β Ls.
- **CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima.
- **DCH/DHH:** sitio de unión a metal 2 de M β Ls B1 o B3, respectivamente.
- **DO_{600nm}:** densidad óptica a 600 nm.
- **DPA:** ácido dipicolínico.
- **E:** enzima.
- **EDTA:** ácido etilén diamino tetraacético.
- **EI:** complejo enzima:intermediario.
- **EP:** complejo enzima:producto.
- **ES:** complejo enzima:sustrato o complejos de Michaelis.
- **HEPES:** tampón orgánico, N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'-(2- ácido etanosulfónico).
- **IPTG:** isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
- ***k_{cat}*:** número de recambio.
- ***K_D*:** constante de disociación.
- ***K_M*:** constante de Michaelis-Menten.
- **L10:** bucle 10 de M β Ls.
- **L3:** bucle 3 de M β Ls.
- **LB:** Luria Bertani, medio rico utilizado para crecimiento de bacterias.
- **MBP:** *membrane binding proteins*.
- **M β Ls:** Metalo-Beta-Lactamasas.
- **P:** producto.
- **PAR:** 4-(2-piridilazo)-resorcinol.
- **PBP:** proteínas de unión a penicilina (*penicillin binding protein*).
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.
- **QM-MM:** simulaciones computacionales híbridas de mecánica-cuántica y mecánica-molecular (*Quantum Mechanics-Molecular Mechanics*).
- **RMN:** espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.
- **S:** sustrato.

- **SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio.
- **SβLs:** Serin-Beta-Lactamasas.
- **TEV:** proteasa del *Tabacco Etch Virus*.
- **Tris:** tampón orgánico, Tris-hidroximetil amino metano
- **UV-visible:** ultravioleta-visible.
- **Wat₁:** molécula de agua u oxhidrilo que se encuentra coordinada a puente entre iones metálicos en el sitio activo de MβLs.
- **Wat₂:** molécula de agua que se encuentra coordinada al ion metálico del sitio 2 de MβLs.
- **Zn1:** ion Zn(II) localizado en el sitio 1 de MβLs.
- **Zn2:** ion Zn(II) localizado en el sitio 2 de MβLs.
- **ε:** coeficiente de absortividad molar.
- **λ:** longitud de onda.
- **λ_{max}:** longitud de onda máxima.
- **bla_{NDM-1}:** gen codificante para la MβL NDM-1.

Anglicismos

- *Docking*
- *Western blot*

Capítulo 1. Introducción General

1.1. Antibióticos- β -lactámicos

1.1.1. La era antibiótica

“Mientras trabajaba con variantes de *staphylococcus* varias placas de cultivo se dejaron de lado en el laboratorio y se examinaron de vez en cuando. En los exámenes, estas placas fueron expuestas necesariamente al aire y se contaminaron con varios microorganismos. Se observó que alrededor de una gran colonia contaminante, las colonias de *staphylococcus* se volvían transparentes y obviamente se sometían a lisis... Se encontró que el caldo donde se había cultivado a temperatura ambiente durante una o dos semanas había adquirido marcadas propiedades inhibitorias, bactericidas y bacteriolíticas para muchas de las bacterias patógenas más comunes.”⁽¹⁾

Así fue como en 1929 Alexander Fleming observó por primera vez el efecto antibacteriano de la penicilina. Recién en 1940, Howard Florey y Ernst Chain propulsaron la producción de este antibiótico a gran escala⁽²⁾. De este modo cambiaron las posibilidades de vida de los heridos de la Segunda Guerra Mundial, a partir de 1943, cuando se acentuó su uso masivo⁽³⁾. Este fue el inicio de la “era antibiótica”, donde comenzó a ser posible tratar enfermedades con altas tasas de mortandad como la neumonía, la sepsis de heridas y la tuberculosis⁽⁴⁾. La estructura de la penicilina fue dilucidada por Abrahams y Chain en ese mismo año⁽⁵⁾. Este compuesto resultó ser una molécula pequeña, no proteica, cuya reactividad radicaba en un anillo lactama de cuatro miembros, llamado anillo β -lactámico, que se encontraba fusionado a un anillo de tiazolidina (Figura 1).

Sin embargo, tal como Fleming había anticipado, el abuso de este compuesto, especialmente en dosis inferiores a las recomendadas, dio origen al surgimiento de cepas resistentes⁽⁶⁾. En 1953 el 80 % de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales eran resistentes a la penicilina⁽⁷⁾. Para hacer frente a esta situación comenzaron a sintetizarse derivados semi-sintéticos que fuesen capaces de evadir la resistencia bacteriana, como la meticilina y la oxacilina. A la familia de compuestos con actividad antimicrobiana que compartían la estructura central de anillo de β -lactama se los llamó antibióticos β -

lactámicos (Figura 1)⁽⁸⁾. La época de oro de la era antibiótica duró hasta 1980 y estuvo caracterizada por una gran producción de nuevos antibióticos. Actualmente se dispone de distintas clases de estos compuestos, como ser: β -lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos, entre otros⁽⁴⁾. Sin embargo, en el 60 % de los tratamientos contra enfermedades infecciosas se utilizan antibióticos β -lactámicos⁽⁹⁾.

Estudios epidemiológicos demostraron una relación directa entre el consumo de antibióticos y la emergencia y diseminación de cepas bacterianas resistentes⁽¹⁰⁾. La resistencia puede surgir espontáneamente por mutaciones o puede transmitirse por eventos de transferencia horizontal, donde los genes que aportan resistencia se transmiten en elementos genéticos móviles entre diferentes especies de bacterias. La acción de los antibióticos elimina a las bacterias sensibles pero no a las resistentes, las cuales se reproducen y aumentan su población producto de la selección natural⁽⁶⁾. A pesar de las advertencias acerca del uso excesivo de los antibióticos, estos compuestos son prescritos con desmesura en todo el mundo y en muchos países su compra está desregulada.

Se ha demostrado que entre el 30 % y el 50 % de las indicaciones de tratamiento antibiótico resultan incorrectas en cuanto a la elección del compuesto o tiempo de administración⁽⁶⁾. En un porcentaje similar, los antibióticos prescritos en las unidades de cuidados intensivos son innecesarios, inapropiados o en dosis subóptimas. Esto provoca el desarrollo de la resistencia antibiótica por medio de cambios en la expresión de genes de virulencia, transferencia horizontal de genes y mecanismos de mutagénesis autoinducida. Los productos antibacterianos utilizados en limpieza o como productos higiénicos empeoran la situación ya que limitan el desarrollo de la inmunidad ambiental, comprometiendo la versatilidad del sistema inmune de niños y adultos⁽¹¹⁾. Además, el 80 % de los antibióticos vendidos en Estados Unidos son utilizados para promover el crecimiento y prevenir infecciones de animales de granja, favoreciendo el desarrollo de resistencia bacteriana en el ambiente⁽¹¹⁾.

En los últimos años se produjo una baja en el descubrimiento de nuevos antibióticos, y antibióticos que se encontraban fuera de uso por provocar fuertes efectos adversos debieron volver a utilizarse para contraatacar la resistencia bacteriana⁽¹¹⁾. La teixobactina es el primer antibiótico descubierto en los últimos 27 años y aún se están realizando las pruebas clínicas para permitir su uso⁽¹²⁾. Debido a que los antibióticos son útiles por períodos cortos de tiempo y que su precio de venta es bajo, el desarrollo de nuevos antimicrobianos ya no es considerado una inversión prudente por las empresas farmacéuticas. En los últimos años, 15 de las principales 18 compañías más importantes

han abandonado esta línea de investigación y han volcado sus esfuerzos al desarrollo de drogas para tratar condiciones crónicas como diabetes, asma o desórdenes psiquiátricos. Los nuevos antibióticos son reservados para casos comprometidos para evitar el desarrollo de resistencias, por lo que los compuestos viejos se comercializan en mayor medida que los nuevos, disminuyendo la rentabilidad de estos últimos⁽⁶⁾.

El incremento en la velocidad de generación de resistencias bacteriana y la falta de antibióticos basados en nuevos blancos de acción, llevan a una crisis en la era antibiótica, donde las armas para luchar contra bacterias comienzan a ser escasas^(11, 13). En este contexto, se propone la generación de compuestos inhibidores de los mecanismos de resistencia bacteriana para ser co-administrados junto con los antibióticos, como una alternativa para restaurar la efectividad de los tratamientos⁽¹⁴⁾.

1.1.2. Clases de antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos pueden agruparse en seis familias de acuerdo a sus características estructurales: penam, cefem, carbapenem, monobactam, penem y tripenem; siendo las tres primeras las más utilizadas (Figura 1)⁽⁴⁾.

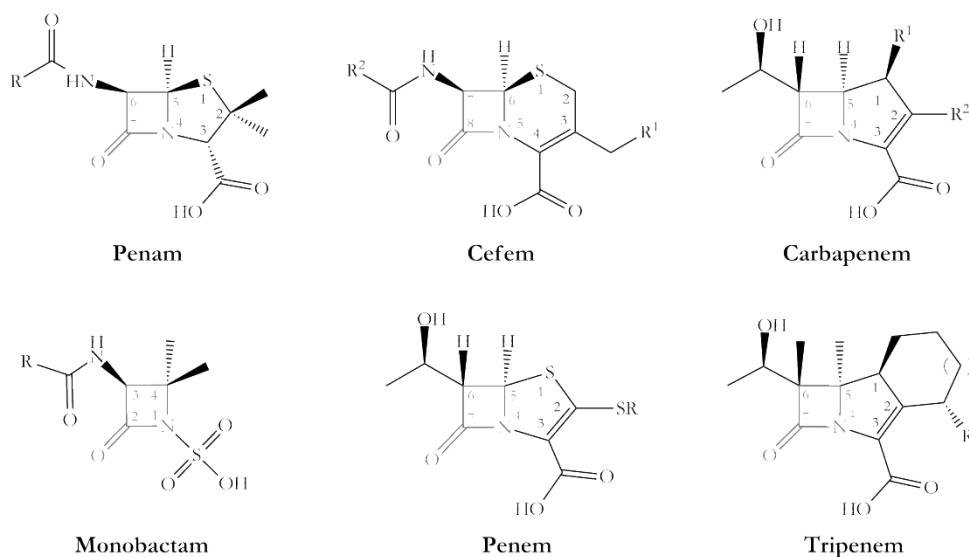


Figura 1: Estructura de los núcleos de las distintas clases de antibióticos β -lactámicos.

El anillo β -lactama, común a todos los compuestos, se indica en color gris.

La estructura básica de las penicilinas descubiertas por Fleming es el anillo de penam. A partir del compuesto precursor, el ácido 6-aminopenicilánico, se pueden obtener

numerosos derivados con propiedades diversas, tales como resistencia al medio ácido (que permiten su administración por vía oral) y extensión del espectro antimicrobiano.

El cefem constituye el núcleo de las cefalosporinas, que son los compuestos que suceden históricamente a las penicilinas. Éstos poseen mayor complejidad estructural que sus antecesores, ya que presentan dos sustituyentes variables (R^1 y R^2 en C3 y C9, respectivamente), y esto los convirtió en el grupo de antibióticos más explotado comercialmente. Existen numerosas variantes de las cefalosporinas, principalmente derivados semi-sintéticos, las cuales se agrupan en cuatro generaciones según sus características antimicrobianas, siendo las de mayor espectro de acción las de tercera y cuarta generación⁽¹⁵⁾.

Las monobactamas constituyen un grupo menor de antibióticos cuyo único representante en la clínica es el aztreonam. Este compuesto carece del segundo anillo que se encuentra fusionado al de β -lactama e incorpora un grupo aniónico (sulfonato) unido directamente al nitrógeno⁽¹⁶⁾.

La exploración de nuevos sistemas de anillos β -lactámicos dio origen a los triapenemes. Exceptuando al sanfetrinem, en su mayoría estos compuestos no presentan actividad antibacteriana fuerte y son muy difíciles de sintetizar en gran escala, lo que hizo que este grupo no prosperara más allá de su interés estructural⁽⁴⁾.

Los penemes son una clase sintética de β -lactámicos con poco desarrollo debido a su dificultosa producción en gran escala. Las investigaciones en estos compuestos fueron pospuestas por la fabricación de carbapenemes que resultaron ser mucho más potentes⁽⁴⁾.

Los carbapenemes se asemejan a las penicilinas por el hecho de tener al anillo de β -lactama fusionado a un anillo de cinco miembros, sin embargo, difieren en la presencia de una insaturación entre C2-C3 y el átomo de azufre es reemplazado por un carbono. Son producidos por varias especies de *Streptomicetes* y bacterias como *Serratia* y *Erwinia*. La tienamicina (descubierta en 1979) es el antibiótico producido naturalmente, más potente, de mayor espectro bacteriano y no tóxico. Si bien este compuesto es inestable al disolverse en solución acuosa, su descubrimiento abrió la puerta a la generación de derivados, por lo que en la actualidad se conocen más de 50 carbapenemes⁽³⁾. El imipenem es un derivado semi-sintético de la tienamicina que posee mayor potencia y estabilidad. Como este compuesto es hidrolizado por enzimas renales y es nefrotóxico, debe ser co-administrado junto con cilastatina que aumenta su estabilidad y disminuye su acumulación. El meropenem es un derivado del imipenem que posee un sustituyente 1β -metilo que elimina la necesidad de

administrarlo junto con cilastatina y puede ser inyectado en altas dosis previo a procedimientos quirúrgicos (Figura 2). Ambos compuestos poseen una gran relevancia clínica debido a su amplio espectro de sustrato y por este motivo son reservados como antibióticos de último recurso. Sin embargo, la evolución de bacterias resistentes a carbapenemes pone en riesgo los tratamientos clínicos de alta complejidad. El desafío actual dentro de los carbapenemes consiste en generar derivados con un espectro aún mayor que incluya a los patógenos problemáticos⁽⁴⁾.

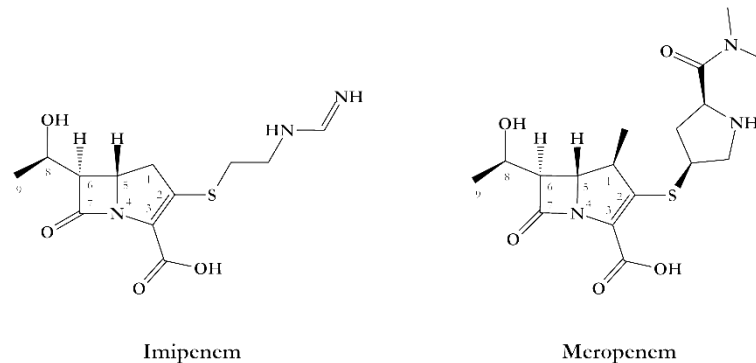


Figura 2: Estructuras de los carbapenemes imipenem y meropenem.

1.1.3. Mecanismo de acción de antibióticos β -lactámicos

La pared celular bacteriana confiere resistencia osmótica gracias a una capa de peptidoglicano que está compuesto por péptidos y glicanos que se encuentran entrecruzados y unidos por uniones covalentes. Las “proteínas de unión a penicilina” (PBPs, por sus siglas en inglés) son enzimas claves para la formación de esta capa. Estas enzimas son bi-funcionales ya que contienen dominios de transpeptidación (responsables de conectar las hebras peptídicas por enlaces amidas) y de transglicosilación (necesario para incorporar nuevas unidades de peptidoglicano)⁽¹⁷⁾.

Los antibióticos β -lactámicos actúan como pseudosustratos de las PBPs debido a su similitud estructural con el dímero de D-Ala terminal del peptidoglicano, el sustrato natural del dominio transpeptidasa. En el caso de bacterias Gram-negativas, estas proteínas se encuentra en el espacio periplasmático o ancladas a la membrana interna con el sitio activo expuesto al periplasma, por lo que el antibiótico sólo debe atravesar la membrana externa para encontrar su blanco de acción⁽¹⁸⁾. La reacción con el sustrato natural cursa mediante dos pasos: uno de acilación al residuo de Ser del sitio activo, donde se rompe el dímero de D- Ala y el otro de desacilación, donde el grupo acilo se transfiere a un grupo amino de una cadena vecina para el entrecruzamiento. El paso de desacilación que tiene lugar con el

sustrato natural no ocurre con el antibiótico β -lactámico, sino que éste queda unido en forma irreversible a la enzima, previniendo el entrecruzamiento. Se cree que al debitar la pared celular se provocaría la lisis por estrés osmótico. Sin embargo, la intervención en la formación de la pared también debilitaría la estructura general de la bacteria, lo que induciría procesos de autólisis y dispararía mecanismos de muerte celular programada⁽¹⁷⁾.

1.1.4. Resistencia bacteriana a antibióticos β -lactámicos

Las resistencias bacterianas a los antibióticos pueden dividirse entre aquellas que ocurren a nivel del metabolismo primario (donde se alteran o adquieren proteínas y enzimas) y aquellas que ocurren en el metabolismo secundario. Estos mecanismos incluyen: la delección de porinas de membranas o la adquisición y activación de bombas de eflujo (lo que disminuye la entrada de los antibióticos y el encuentro con PBP), la expresión de PBPs de afinidad disminuida por β -lactámicos y la generación de enzimas con actividad hidrolítica que inactivan los compuestos (β -lactamasas). Las modificaciones en la pared celular y la producción de β -lactamasas son los mecanismos de resistencia más eficaces⁽¹⁷⁾. Estas estrategias pueden ser utilizadas por Gram-positivos y Gram-negativos, y se combinan de forma efectiva⁽¹⁹⁾.

Las PBPs modificadas son resultado de la activación de la respuesta SOS que da lugar a la activación de un mecanismo de transcripción generador de mutaciones. El ejemplo más relevante de este tipo de resistencia es el caso de cepas de *S. aureus* resistentes a metilina que poseen una PBP accesoria con reactividad disminuida frente a β -lactámicos. La modificación de PBPs es también el mecanismo primario de resistencia a β -lactámicos del género *pneumococo* y *streptococos* α -hemolíticos. Otras bacterias como *Enterococcus faecium* poseen L,D-transpeptidasas que utilizan como dador de acilo al dímero L-Lys-D-Ala, en lugar del dímero de D-Ala⁽¹⁹⁾.

La producción de β -lactamasas es la mayor causa de resistencia bacteriana a antibióticos⁽²⁰⁾. Estas enzimas son hidrolasas cuya actividad deja a los antibióticos β -lactámicos inefectivos por medio de la ruptura del anillo β -lactama, como se muestra en la Figura 3⁽¹⁷⁾. Existen dos grandes grupos de β -lactamasas: las serin- β -lactamasas (S β Ls) y las metalo- β -lactamasas (M β Ls). Las S β Ls son las β -lactamasas más antiguas y mejor estudiadas. El mecanismo de acción de estas enzimas radica en un residuo de serina ubicado en el sitio activo y es una adaptación del mecanismo de las PBPs⁽¹⁹⁾. El uso intensivo de antibióticos β -lactámicos resultó en una rápida diversificación de las familias

de β -lactamasas, siendo que al día de hoy existen más de 2000 enzimas diferentes dentro de esta clase⁽²¹⁾. Las β -lactamasas pueden dividirse en 4 subclases (A, B, C y D), dentro de las cuales las clases A, C y D corresponden a S β L⁽¹⁷⁾. La clase B de enzimas corresponde a las M β Ls, que son metaloproteínas que utilizan un mecanismo de hidrólisis dependiente de Zn (II) y que no comparten homología estructural, mecánica o de secuencia con las S β Ls o las PBP^s⁽²²⁾. En ensayos clínicos puede diferenciarse las S β Ls de las M β Ls porque estas últimas son inhibidas por quelantes de metal como el ácido etilén diamino tetraacético (EDTA) o ácido dipicolínico (DPA)⁽²³⁾.

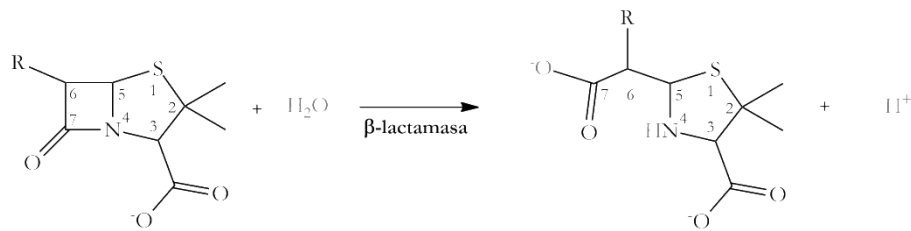


Figura 3: Esquema simple de la reacción catalizada por β -lactamasas.

El lado que se visualiza corresponde a la cara α del compuesto.

1.2. Las metalo- β -lactamasas

1.2.1. Relevancia clínica de las M β Ls

Las M β Ls pueden degradar todas las clases de β -lactámicos excepto monobactámicos y se caracterizan por su actividad frente a carbapenemes (actividad carbapenemasa). Esta es una característica preocupante debido a que estos compuestos son resistentes a la acción de la mayoría de las S β Ls y poseen amplio espectro de actividad⁽²⁰⁾. La primera de estas enzimas fue descubierta en 1965 y se trató de la M β L de *Bacillus cereus* (un microorganismo inocuo del suelo) llamada BcII⁽²⁴⁾. Sin embargo, antes de la década del 80, el reducido número de M β Ls contrastaba con la gran cantidad de S β Ls, por lo que su estudio era considerado una simple curiosidad⁽²⁵⁾. Con la introducción de los carbapenemes en la clínica, la resistencia a estos compuestos en cepas de *Bacteroides fragilis* que expresaban la proteína CcrA comenzó a crecer y diseminarse⁽²⁶⁾. Esta proteína resultó ser una M β L que tenía capacidad de hidrolizar todos los antibióticos β -lactámicos disponibles⁽²⁷⁾. A partir de ese punto, comenzó a aislarse una creciente cantidad de nuevas M β Ls, especialmente en Japón donde la administración de carbapenemes se encuentra más difundida^(28, 29). Favorecido por el hecho de que gran parte de estas enzimas están codificadas en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, en la actualidad, las cepas productoras

de MβLs se encuentran distribuidas a nivel mundial. La gran diseminación, diversidad y amplio espectro de sustrato de estas enzimas, constituyen una seria amenaza para el futuro de los antibióticos β-lactámicos⁽²¹⁾.

1.2.2. Biogénesis, procesamiento y contenido metálico de MβLs *in bacteria*

Las MβLs son sintetizadas como precursores en el citoplasma bacteriano, y luego son secretadas al espacio periplasmático en las bacterias Gram-negativas o al espacio extracelular en las Gram-positivas, gracias a sus péptidos de señalización amino-terminal⁽¹⁷⁾. En Gram-negativos, la biogénesis de las MβLs requiere de la acción conjunta del sistema principal de chaperones DnaK y la maquinaria de secreción Sec, que dirige a estas enzimas al espacio periplasmático, donde se produce el correcto plegamiento y la incorporación de Zn(II)⁽³⁰⁾.

A fin de mantener los niveles de Zn(II) (y otros metales de transición) por debajo de su concentración tóxica, los organismos han desarrollado mecanismos de homeostasis que regulan las concentraciones de metal y aseguran su correcta incorporación en metaloproteínas^(31, 32). En el citoplasma bacteriano, los niveles de Zn(II) son mantenidos por un sistema de homeostasis que incluye la acción del importador de alta afinidad ZnuABC, que incorpora el metal disponible en el periplasma. Para la mayoría de las bacterias Gram-negativas no se conocen mecanismos de acumulación de Zn(II) en el periplasma, por lo que la concentración periplasmática de este metal dependería de su simple difusión desde el medio extracelular a través de porinas de membrana externa⁽³³⁾.

La necesidad de las bacterias patógenas de utilizar Zn(II) para su crecimiento y para la activación de una serie de factores de virulencia, es tomada como una ventaja por el sistema inmune de los hospedadores, que secuestran el Zn(II) presente en medio a través de un proceso denominado inmunidad nutricional. El mismo se caracteriza por la producción de proteínas quelantes, como la calprotectina, que disminuyen la cantidad de metal disponible en el sitio de infección^(33, 34). La reducción en la disponibilidad de Zn(II) durante una infección ocasiona que los niveles periplasmáticos de este metal se vean limitados por el medio externo y por los requerimientos en el citoplasma. Como la incorporación de metal en MβLs se da por una competencia termodinámica, estas enzimas se encuentran ante una gran presión de selección compitiendo por el Zn(II) disponible. Esto hace que la optimización de la afinidad por metal sea esencial para la resistencia⁽³⁵⁾ y

que los procesos evolutivos favorezcan las variantes de MBLs que poseen alta afinidad por Zn(II)⁽³¹⁾.

1.2.3. Clasificación de las MβLs

Las MβLs son miembros de una familia de metaloenzimas que incluye una gran variedad de hidrolasas. Desde el punto de vista molecular, las MβLs pueden ser divididas en tres subclases: B1, B2 y B3 (Figura 4)⁽³⁶⁾. Esto se debe a que presentan una baja identidad de secuencia entre sí, llegando a menos del 10% en algunos casos y, por lo tanto, constituyen un grupo de proteínas muy divergentes⁽³⁷⁾. Estos grupos difieren en la identidad de los residuos esenciales en el sitio activo, los requisitos de contenido de metal para su actividad y el perfil de sustrato⁽²³⁾.

La familia mayoritaria es la B1, esta familia incluye a la enzima modelo de estudio BcII, y a las familias de enzimas de relevancia clínica NDM, VIM, IMP y SPM. Los genes que las codifican pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano o en elementos genéticos móviles. Esta última característica les permitió diseminarse entre patógenos Gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*, entre otras. Las MβLs B1 necesitan dos iones Zn(II) para ser activas⁽³⁸⁾ y poseen un amplio espectro de sustrato. Por el contrario, las MβLs B2 son monometálicas, de codificación cromosomal y solo pueden hidrolizar carbapenemes con alta eficiencia. Este grupo incluye a la enzima Sfh-I de *Serratia fonticola*, CphA de *Aeromonas hydrophila* e ImiS de *Aeromonas sobria*. La subclase B3 posee solo 9 residuos conservados con otras MβLs. Estas enzimas poseen espectro de sustrato extendido y pueden ser funcionales con uno o dos iones Zn(II), como es el caso de GOB-18 de *Elizabethkingia meningoseptica*⁽²⁰⁾. Dentro de esta última familia también se encuentran las enzimas L1 de *Stenotrophomonas maltophilia* y FEZ-1 de *Legionella gormanii*, que son activas con dos iones Zn(II).

1.2.4. Estructura de las MβLs

1.2.4.i. Estructura secundaria de MβLs

Las MβLs son enzimas monoméricas (con excepción de la B3 L1 que es tetramérica) y su peso molecular oscila entre 25 y 28 kDa⁽³⁷⁾. Todas comparten una topología común en forma de sándwich αβ/βα, con dos láminas β centrales y cinco α-hélices expuestas al solvente (Figura 4 A). Más allá de poseer un plegamiento general

común, estas enzimas poseen una gran diversidad de secuencia, donde se han evidenciado interrupciones e inserciones. Es por esto que al intentar alinear las secuencias de diferentes miembros de estas familias, resulta problemático comparar las posiciones de los aminoácidos conservados. Para facilitar la comparación de los residuos, se construyó un esquema de numeración estándar denominado “BBL” en base a alineamientos de secuencia y estructura⁽³⁹⁾. Este esquema de numeración será utilizado a lo largo de este trabajo.

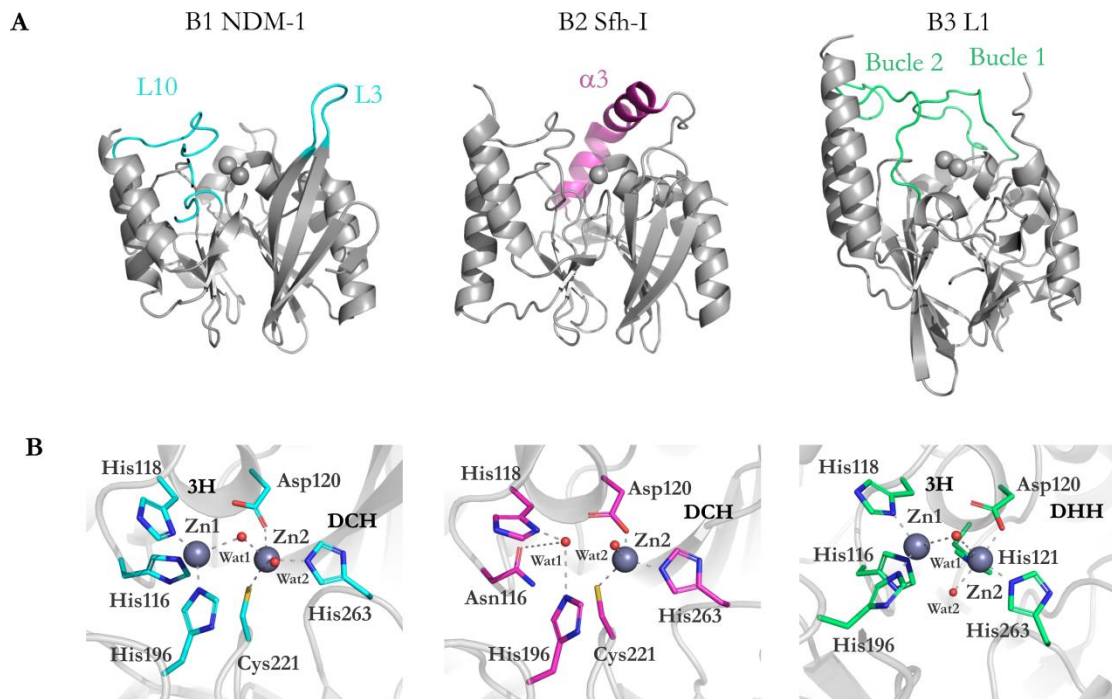


Figura 4: Estructuras de las tres subclases de MβLs.

A: Estructuras representativas de MβLs de las diferentes subclases: B1 NDM-1 (izquierda, PDB 3SPU), B2 SfhI (centro, PDB 3SD9⁽⁴⁰⁾) y B3 L1 (derecha, PDB 1SML⁽⁴¹⁾). Los residuos involucrados en el reconocimiento inicial de sustratos se encuentran indicados en color. B: Estructura de los sitios activos de las diferentes MβLs mostradas en la figura A. Los átomos de Zn(II) se muestran como esferas grises y las aguas como esferas rojas. Las coordinaciones de indican con líneas punteadas.

El sitio activo (Figura 4 B) está situado en un surco poco profundo delimitado por la interface de los dos dominios $\alpha\beta$ ⁽²⁹⁾. Flanqueando el sitio catalítico de las MBLs de subclase B1 se encuentran dos importantes bucles, nombrados L3 y L10 (Figura 4 A). Estos bucles poseen residuos de cadenas laterales hidrofóbicas que interaccionarían con los sustratos e inhibidores, posicionándolos en el sitio activo (Secciones 1.2.5 y 1.3.4)⁽²⁰⁾. Se ha demostrado que la eliminación del L3 produce una abrupta caída de la actividad enzimática frente a varios sustratos, con excepción de imipenem que, a diferencia de otros sustratos,

no posee un anillo aromático voluminoso⁽⁴²⁾. Cumpliendo una función similar, las MβLs B2 poseen una α-hélice elongada (α3) que se cierra sobre el surco del sitio activo (Figura 4 A). Esta hélice posee un pliegue cerca del residuo Trp150, que permite que la estructura siga la curvatura de la proteína y provee de una superficie hidrofóbica que contribuye a la unión de carbapenemes⁽²⁰⁾. El hecho de que las B2 sean carbapenemasas exclusivas se atribuye a que esta hélice limita la accesibilidad de sustratos voluminosos⁽⁴³⁾. Dos bucles con alta movilidad flanquean el sitio activo de las MβLs B3: el bucle 1 y el bucle 2. La importancia de estos residuos se vio en experimentos de *docking* de sustratos en GOB-18⁽⁴⁴⁾. En las B3 L1 y FEZ-1 se ha reportado que parte de los residuos que forman el bucle 1 se cierran sobre el sitio activo durante el reconocimiento de sustratos, y mutaciones en estos residuos incrementaron los valores de K_M frente a cefalosporinas⁽²⁰⁾.

1.2.4.ii. Organización del sitio Activo de MβLs

Las MBLs poseen dos sitios de unión a Zn(II), como se muestra en la Figura 4 B⁽²³⁾. Cada sitio metálico incluye elementos de ambas mitades de la proteína y del motivo conservado H₁₁₆XH₁₁₈XD₁₂₀, que es característico de toda la superfamilia. Las enzimas B1 necesitan dos iones Zn(II) para ser activas^(35, 38). Estos metales se encuentran separados 3,5-3,7 Å y poseen una molécula de agua/hidróxido coordinada a puente entre ambos (Wat1)⁽²³⁾. Un Zn(II) (Zn1 en el sitio 1 o 3H) posee geometría de coordinación tetraédrica y está coordinado a los residuos His116, His118, His196 y la molécula Wat1 (que se encuentra levemente más cerca a este metal). El otro ion ocupa el sitio 2 o DCH y es nombrado como Zn2, tiene geometría piramidal-trigonal y se coordina a los residuos Asp120, Cys221, His263, a la molécula Wat1 y a una molécula de agua adicional (Wat2)⁽²⁰⁾.

En las enzimas B3, los residuos del sitio 3H están conservados pero, en el sitio 2, la Cys221 es reemplazada por un residuo de Ser. Esto hace que el Zn2 se coordine a los residuos Asp120, His121, His263 y a Wat1, por lo que este sitio es nombrado DHH. La Ser221 no interacciona directamente con el metal pero sí lo hace con una molécula de agua conservada que podría servir de dador de protones durante la reacción de hidrólisis⁽²⁰⁾. Algunas B3, como GOB-18, pueden ser totalmente activas con un único ion metálico que se ubicaría en el sitio 2⁽⁴⁴⁾.

La conservación de los residuos de unión a metal sugiere que todas las MβLs tienen el potencial de unirse a dos metales, sin embargo no todas son activas de esa forma⁽²⁹⁾. Las MβLs B2 son completamente activas al unir un único Zn(II) y muestran inhibición de su

actividad al unirse a un segundo ion metálico. El Zn(II) se ubica en el sitio 2, que tiene la misma conformación al sitio DCH de las enzimas B1^(40, 45). El sitio de unión al segundo Zn(II) no sería el sitio tradicional 3H, sino que el metal se uniría a otros residuos como Met o Glu en la posición 146, en lugar de unirse a la His118⁽²⁰⁾. Este sitio suele ser ocupado por una molécula de agua (Wat1).

1.2.4.iii. Segunda esfera de coordinación de MβLs

La conexión del sitio activo con la matriz proteica define la función específica de las proteínas. Los residuos de segunda esfera de coordinación son aquellos residuos que interactúan directamente con un ligando metálico y no participan de la unión al metal⁽⁴⁶⁾. Estos residuos forman redes complejas de puentes hidrógeno que involucran a los ligandos metálicos, y residuos y aguas que rodean al sitio activo. Estas redes de interacciones modulan, de forma indirecta, la orientación y polarización de los ligandos metálicos.

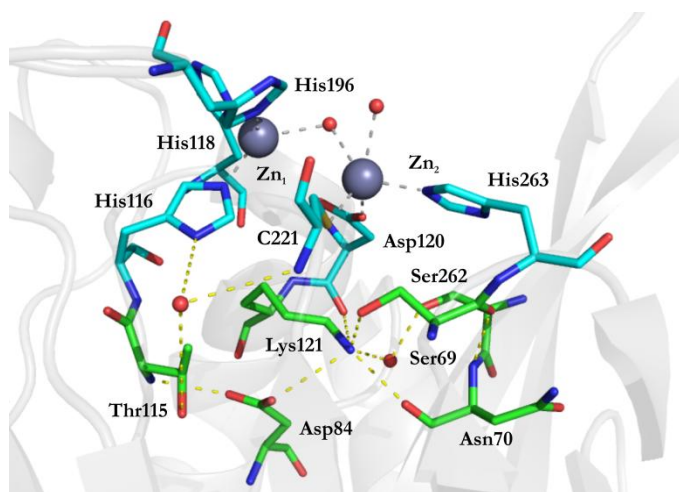


Figura 5: Segunda esfera de coordinación de NDM-1.

Red de puentes hidrógeno que se encuentra debajo del sitio activo de NDM-1 (conexiones amarillas). Se muestran los ligandos metálicos (turquesa) y los residuos de segunda esfera involucrados en las interacciones (verdes). Los iones Zn(II) son representados como esferas grises y las aguas como rojas. La imagen fue generada utilizando PyMol⁽⁴⁷⁾ en base a la cadena A de la estructura con código de PDB 3SPU.

En MβLs, estos residuos se encuentran en la base del sitio activo y forman redes de puentes hidrógeno que conectan ambas mitades el sitio catalítico entre sí y con diversas regiones de la proteína^(20, 23). Esta red involucra residuos conservados como Thr/Ser115 (B1, B2, y B3), Asn70 y Gly262 (B1 y B2) y puede presentar pequeñas variaciones dentro

de las subclases. Como se muestra en la Figura 5, en la MβL B1 NDM-1 esta red está formada por las interacciones que siguen el camino His116 (sitio 1) → Thr115 → Asp84 → Lys121 → Ser262, Ser69, Asn70 (ubicados en la base del L3) y Asp120 (sitio 2). La posición 121 resulta primordial en esta red ya que conecta residuos de diferentes regiones de la proteína. Los residuos que se localizan en la posición 70 y 262 son importantes porque conectan la base del bucle L3 con el sitio activo, su relevancia fue evidenciada en estudios de evolución molecular dirigida realizados en BcII⁽⁴⁸⁾. La importancia del residuo en posición 262 también fue corroborado en enzimas de la familia IMP mediante experimentos de aleatorización de codones que mostraron un cambio en el perfil de sustrato al mutarse esta posición^(49, 50). Estudios realizados en SPM-1 demuestran que los residuos de segunda esfera pueden modular la especificidad de sustrato de MβLs y alterar la afinidad por Zn(II)⁽⁵¹⁾.

1.2.5. Inhibición de MβLs

Se conocen dos estrategias principales para contrarrestar la amenaza clínica causada por la producción de β-lactamasas: la síntesis de nuevos antibióticos β-lactámicos que no sean hidrolizados por estas enzimas y la búsqueda de inhibidores de las β-lactamasas. Actualmente sólo se cuenta con inhibidores de uso clínico para las SβLs, como ser el ácido clavulánico y el tazobactam⁽⁵²⁾. Los inhibidores de estas enzimas fueron diseñados en base a su mecanismo catalítico (Sección 4.1), y dan lugar a una inhibición irreversible, mediante la formación de un aducto covalente con la enzima⁽⁵²⁾. Las MβLs utilizan un mecanismo totalmente diferente para la catálisis por medio de un sitio activo metálico, por lo cual los inhibidores de uso clínico disponibles para SβLs no son efectivos contra las MβLs⁽¹⁹⁾.

En la actualidad no existen compuestos inhibidores de MβLs aprobados para su uso clínico. La causa fundamental de esto ha sido el sesgo impuesto por el supuesto de que estas enzimas emplearían el mismo mecanismo catalítico que las SβLs⁽²³⁾. Sin embargo, se conocen varios compuestos con capacidad de inhibir MβLs. Estos compuestos pueden dividirse entre aquellos que actúan mediante unión a los iones metálicos y los que actúan por otras vías^(14, 53). En este último grupo se encuentran inhibidores irreversibles que interaccionan con ligandos directos al metal como la Cys221 o con residuos conservados como la Lys224 o residuos del bucle L10⁽⁵⁴⁻⁵⁹⁾. Estos inhibidores no poseen la selectividad, la estabilidad o la potencia requerida para los tratamientos clínicos, pero su mecanismo de

acción provee un buen punto de partida para el desarrollo de nuevos compuestos, especialmente porque los inhibidores covalentes han sido muy útiles para SβLs⁽⁶⁰⁾.

Los inhibidores de unión a Zn(II) funcionan en base a dos mecanismos. En el primero, la inhibición produce la formación de un complejo ternario que bloquea en forma competitiva la unión de sustrato⁽⁶¹⁾; en el segundo, los compuestos quelantes quitan el Zn(II) del sitio activo secuestrando al metal durante el equilibrio⁽⁶²⁾. Dentro del primer grupo, se encuentran compuestos con una gran variedad de grupos funcionales que pueden unirse a los iones metálicos como: tioles y carboxilatos de tioles⁽⁶³⁻⁷¹⁾, pirroles y heterociclos⁽⁷²⁾, ácido dicarboxílico^(61, 73, 74), mercaptosulfonatos⁽⁷⁵⁾, boronatos⁽⁷⁶⁾ y rodaninas⁽⁷⁷⁾. Entre estos compuestos, se han encontrado drogas clínicas que pueden inhibir MβLs como el captopril⁽⁶⁴⁾ y sus derivados⁽⁷⁸⁾ (compuestos que controlan la presión sanguínea por medio de la unión de Zn(II) a un grupo tiol libre), el tiorfan (derivado del racecadotril, droga utilizada contra la diarrea), el dimercaprol (quelante de metales, utilizado en la intoxicación por metales)⁽⁷¹⁾, entre otros.

Recientemente nuestro grupo ha desarrollado una serie de bistiazolidinas capaces de inhibir MβLs^(63, 79). Estos compuestos mimetizan el esqueleto de los antibióticos β-lactámicos pero no son susceptibles a la hidrólisis, y mostraron actividad frente a las tres subclases de MβLs. El compuesto L-CS319 es un inhibidor que actúa en el rango bajo mM, e inhibe la acción de NDM-1 en *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *Providencia rettgeri*, sin mostrar toxicidad en células humanas. La unión de este compuesto se produce por interacción con los iones Zn(II), con la Lys224 a través de dos moléculas de agua, con el Trp87 y con los residuos del bucle L3 Met61 y Val67 (Figura 6)⁽⁷⁹⁾. Estas interacciones son similares a las que se han observado en estructuras cristalográficas de aductos enzima:producto (EP) (Sección 1.3.4).

Dentro de los compuestos que actúan removiendo el metal del sitio activo se encuentran el EDTA y derivados, que pueden dar origen a una inhibición muy potente al quitar el metal del sitio activo^(80, 81). Si bien las MβLs pueden reconstituirse al unir Zn(II) *in vitro*, la disponibilidad de este metal es limitada dentro de las células⁽³²⁾, lo que hace a estos mecanismos irreversibles. Sin embargo, su interacción es con los iones metálicos y no con la proteína en sí, por lo que estos compuestos no poseen gran especificidad en sus proteínas blanco y no son muy efectivos contra MβLs con alta afinidad por metal. El último compuesto de este tipo que se ha reportado es la aspergilomarasmina A que presenta un fuerte efecto inhibitorio sobre NDM-1⁽⁸⁰⁾.

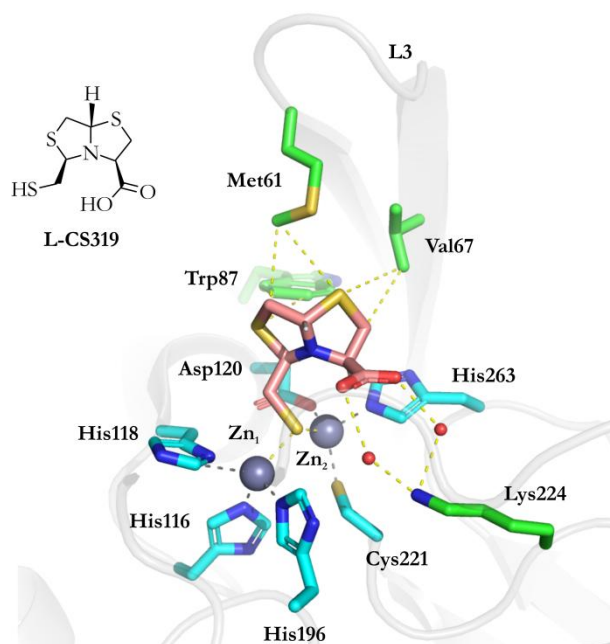


Figura 6: Unión del inhibidor L-CS319 a NDM-1.

Interacción del inhibidor L-CS319 (rosa) con NDM-1 (conexiones amarillas). Se muestran los ligandos metálicos (turquesa) y los residuos involucrados en las interacciones con el compuesto (verde). Los iones Zn(II) son representados como esferas grises y las aguas como rojas. La imagen fue generada utilizando PyMol⁽⁴⁷⁾ en base a la cadena B de la estructura con código de PDB 4U4L.

Las investigaciones en este campo tienen como objetivo principal encontrar compuestos inhibidores que sean igualmente efectivos contra todas las β -lactamasas. Los derivados del ácido borónico son compuestos que inhiben S β Ls y PBPs, debido a su geometría tetraédrica y propiedades electrónicas que mimetizan el intermediario formado durante la catálisis de estas enzimas (Sección 4.1.2). Recientemente el grupo liderado por Schofield C.J. en Oxford, ha demostrado que estos compuestos también pueden inhibir M β Ls⁽⁷⁶⁾. Sin embargo, la disparidad en la estequiometría y coordinación de los iones metálicos, las diferencias en los procesos de reconocimiento de sustratos y la divergencia en la secuencia entre las tres subclases, hacen que ese proceso sea dificultoso y que los compuestos conocidos no sean igualmente efectivos contra todas estas enzimas. Es por esto que muchos esfuerzos han sido enfocados a la creación y optimización de inhibidores para la subclase B1 que es la de mayor relevancia clínica⁽⁸²⁾. La baja identidad de secuencia dentro de la subfamilia hace que las superficies de unión de los sustratos que rodean al sitio activo sean muy diferentes, dificultando el diseño de inhibidores no competitivos o alostéricos⁽⁸³⁻⁸⁵⁾. Esto sugiere que la clave se encuentra en generar interacciones con los iones del sitio activo que se encuentran conservados, optimizando su afinidad por medio de

sustituyentes que interaccionen con las secciones de la estructura proteica con menor tendencia a ser mutadas. Un ejemplo de esto son los residuos de las cadenas que rodean al sitio activo que solo toleran una baja tasa de mutaciones sin que se deteriore su actividad catalítica, como la Lys224 de B1, la Ser221 de B2 y la Ser223 de B3, y los residuos que proveen de superficie hidrofóbica a la base del bucle L3 de las B1, como la Val67.

1.3. La M β L NDM-1

1.3.1. Diseminación de NDM-1

La M β L B1 NDM-1 (*New Delhi Metallo- β -Lactamase-1*) se identificó por primera vez en 2008 en un paciente sueco de ascendencia india, que previamente había sido hospitalizado en ese país^(86, 87). Este paciente estaba infectado como una cepa de *K. pneumoniae* que poseía un plásmido transmisible que le otorgaba resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, inclusive los carbapenemes (imipenem, meropenem y ertapenem)⁽⁸⁸⁾. Debido a su rápida diseminación a nivel global y la capacidad de su plásmido transmisor de ser expresado por un gran número de patógenos Gram-negativos, NDM-1 está próxima a convertirse en la carbapenemasa más diseminada en el mundo⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾. Si bien los reportes iniciales mostraban una correlación epidemiológica entre la aparición de NDM-1 e India, los viajes internacionales y el turismo médico propulsaron la propagación de esta resistencia⁽⁹¹⁾.

El gen *bla*_{NDM-1} que codifica a NDM-1 es comúnmente encontrado en miembros de las especies *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*⁽⁸⁷⁾. En un principio, NDM-1 sólo había sido identificada en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes que habían sido aisladas de pacientes hospitalizados. Pronto la resistencia se extendió a muchas otras especies patógenas como *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Shigella boydii* y *Vibrio cholerae*. En 2010, un estudio demostró la presencia del gen *bla*_{NDM-1} en 51 de las 171 muestras de agua tomadas de calles o ríos de Nueva Delhi y en 2 de las 50 muestras de agua potable; por lo que la resistencia no estaría solo confinada a hospitales⁽⁹²⁾. Además se ha aislado NDM-1 de cepas de *E. coli* y de *Acinetobacter lwoffii* en animales de granja, por lo que la resistencia también se esparce a través de la cadena de alimentación⁽⁹³⁾. Siguiendo a NDM, las descripciones de cepas resistentes a los carbapenemes se deben a la expresión de M β LS de la familia IMP (*Imipenem-resistance*) y VIM (*Verona Integron-encoded M β L*), siendo VIM-2 la más prevalente. Estas enzimas son codificadas, principalmente, en integrones. Cuando estos

integrones se asocian a transposones o plásmidos, pueden ser rápidamente transferidos entre especies⁽⁹⁴⁾.

El gen codificante para NDM-1 ha sido encontrado en plásmidos de diferentes tamaños, junto con genes implicados en la movilidad, islas de patogénesis y otros elementos de resistencia como β -lactamasas y genes de resistencia a cloranfenicol, aminoglicósidos y eritromicina. Este elemento genético es fácilmente transferible entre especies, por lo que es común aislar del mismo paciente más de un tipo bacteriano que contiene el mismo plásmido, inclusive en ausencia de enfermedad⁽⁸⁹⁾. Las bacterias que expresan NDM-1 suelen ser sensibles a los tratamientos con colistina o tigeciclina⁽⁹⁵⁾, pero recientemente se aisló en carne de pollo una cepa de *E. coli* que, además de expresar una variante de NDM, también expresa una resistencia a colistina, llamada MCR-1⁽⁹⁶⁾. Estas cepas multi-resistentes son llamadas “superbacterias” y son responsables de un problema de alerta clínica mundial^(89, 90).

1.3.2. Estructura y variantes alélicas de NDM

Las enzimas de la familia NDM pertenecen a la clase B1 de M β LS, por lo que poseen dos sitios de unión a Zn(II) (Figura 4 B)⁽⁹⁷⁾ y son monoméricas (aunque se ha reportado que pueden formar dímeros parciales interaccionando a través de su bucle 10). La proteína sin procesar posee 270 residuos de aminoácidos, lo que corresponde a un peso de 28 kDa, y el plegamiento globular conservado de las B1 (Figura 4 A)⁽⁹⁸⁾. Las M β LS con las que NDM-1 comparte mayor porcentaje de homología son VIM-1 y VIM-2 (32,4%)⁽⁸⁶⁾.

NDM-1 comparte el plegamiento característico $\alpha\beta\beta\alpha$ de las M β LS^(97, 99-102). El extremo amino-terminal es más largo que el de otras enzimas B1, como VIM-2 e IMP-1, y forma dos láminas β adicionales. Los extremos de estas estructuras quedan próximos al bucle L3 y contribuirían a aumentar la hidrofobicidad de esta región⁽⁹⁹⁾. Los bucles L3 y L10 se encuentran considerablemente desplazados hacia afuera con respecto a otras B1. Esto los ubica más alejados del sitio activo, dando lugar a un surco catalítico más abierto que permite incorporar mayor variabilidad de sustratos^(97, 100, 102).

Al día de la fecha, se conocen 17 variantes naturales de NDM-1 que se encuentran mundialmente distribuidas. Estudios realizados en nuestro grupo demostraron que estas variantes han acumulado mutaciones que promueven su estabilidad y su afinidad por Zn(II)⁽¹⁰³⁾. Estos resultados sugieren que la limitación de Zn(II) en el medio podría favorecer la evolución de M β LS. Dentro de las enzimas de la familia NDM se observa una

divergencia notablemente menor a la observada en las familias IMP y VIM. Las variantes de IMP poseen entre 1 y 49 sustituciones, mientras que las de VIM entre 1 y 72. Las mutaciones más relevantes en estas familias se encuentran en los dos bucles que rodean al sitio activo⁽¹⁰⁴⁾. En la familia NDM la variabilidad es mucho menor, ya que siete de las variantes difieren en un único cambio de aminoácidos, mientras que el resto presenta un máximo de 5 sustituciones. Solo las variantes NDM-10 y NDM-12 tuvieron sustituciones cercanas al sitio activo^(103, 105).

1.3.3. Localización celular de NDM-1

Todas las M β Ls caracterizadas hasta hace poco tiempo son enzimas periplasmáticas solubles; sin embargo, recientemente se demostró que NDM-1 se encuentra anclada a membrana^(106, 107). Esto se debe al hecho de poseer una secuencia de lipidación (LSGC) en su extremo amino-terminal que determina su anclaje. Luego de la exportación al citoplasma en forma desplegada, la señal en NDM-1 es reconocida por un sistema de lipidación conservado en bacterias que adiciona covalentemente un grupo lipídico a la Cys de la secuencia. El proceso de anclaje es producto de la acción de enzimas del sistema Lol que promueve el posicionamiento de la enzima en la cara interna de la membrana externa de Gram-negativos⁽¹⁰⁸⁾.

El anclaje a membrana le otorga ventajas a NDM-1 que podrían ayudar a entender los motivos de su rápida diseminación mundial, como una mayor resistencia a la limitación de metal y mayor estabilidad⁽¹⁰⁶⁾. El Zn(II) juega un papel esencial en la estabilidad *in vivo* de las M β Ls, dado que las formas carentes de metal (apo-enzimas) son rápidamente degradadas en el espacio periplasmático. El anclaje a membrana le permitiría a NDM-1 tolerar las condiciones de baja disponibilidad de Zn(II), producto de las defensas del hospedador durante un proceso infeccioso. Además, la localización de NDM-1 en la membrana externa facilita su secreción a vesículas de membrana, las cuales poseen actividad β -lactamasa y pueden proteger a bacterias sensibles frente a antibióticos β -lactámicos⁽¹⁰⁶⁾.

1.3.4. Interacciones con sustratos en NDM-1

Debido a la variabilidad de secuencia entre las M β Ls (inclusive las de la misma subclase), es difícil generalizar acerca de la unión de sustratos y catálisis en estas enzimas. Sumado a esto, la carencia de estructuras cristalográficas de M β L formando complejos con

sustratos o productos acentuó ese problema. La primera de estas estructuras fue publicada en el año 2004 y se trató de CphA (enzima de subclase B2) unida a biapenem hidrolizado (un carbapenem)⁽⁴⁵⁾. La segunda estructura en ser reportada fue la de la B3 L1 con el producto de hidrólisis de moxalactam (perteneciente a la familia de las cefalosporinas)⁽¹⁰⁹⁾. Sin embargo, los estudios que más información proveyeron respecto al tema fueron las estructuras cristalográficas publicadas a partir de 2011, donde se encuentra a la enzima NDM-1 formando complejos EP con una serie de diferentes sustratos hidrolizados. Entre estas estructuras se pueden encontrar complejos con: penemes (faropenem⁽¹¹⁰⁾, ampicilina^(99, 110), bencilpenicilina, metilicina y oxacilina⁽¹⁰⁷⁾), cefemes (cefuroxima y cefalexina⁽¹¹¹⁾) y carbapenemes (meropenem e imipenem^(107, 112)). Las interacciones de NDM-1 con meropenem, cefalexina y bencilpenicilina hidrolizadas se muestran en la Figura 7.

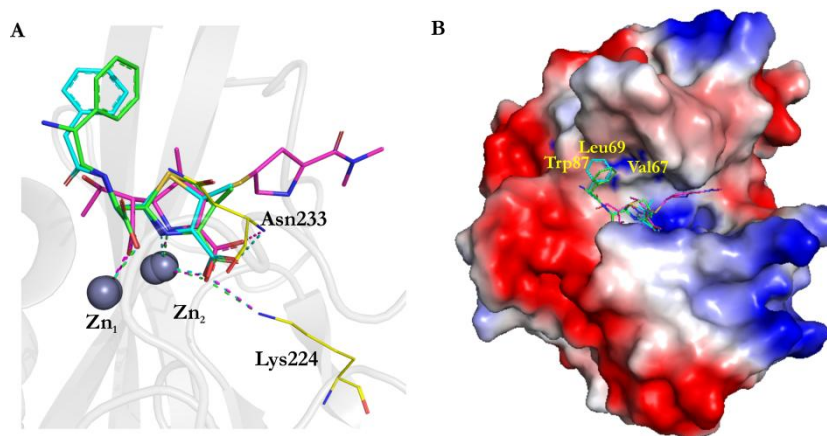


Figura 7: Unión de sustratos hidrolizados de diversas familias en NDM-1.

Esquemas de las interacciones producidas durante la unión de meropenem (magenta, PDB 4EYL), bencilpenicilina (turqueza, PDB 4EYF) y cefalexina (verde, PDB 4RL2) en NDM-1. A: Sitio activo de las estructuras. Las interacciones con los iones Zn(II), la Lys224 y el Asn233, se muestran como líneas punteadas del color correspondiente al sustrato. B: Superficie de la enzima donde se muestra como se ubican los productos en el surco catalítico. Se encuentran marcadas las regiones correspondientes al Trp87, a la Val67 y a la Leu69. Las zonas con carga positiva se colorean en azul y las zonas con carga negativa en rojo. Imágenes generadas en PyMol⁽⁴⁷⁾.

En todas las estructuras de EP de NDM-1, se observa que el anillo β -lactámico hidrolizado y el anillo de fusión de 5 o 6 miembros, coordinan a los iones metálicos del sitio activo^(99, 107, 110-112). El carboxilato C7 (que se forma durante la hidrólisis del enlace C-N) se une al Zn1, y el N y los oxígenos del carboxilato C3 se unen al Zn2. Por otro lado, estos estudios indicaron que el producto de hidrólisis de carbapenemes se une en una forma

diferente a la observada para las penicilinas. En las estructuras de carbapenemes^(107, 112) no se observa la presencia del agua a puente entre los iones metálicos, la que sí puede observarse en las estructuras de penicilinas y cefalosporinas (Figura 7 A)^(99, 107, 110, 111). En los carbapenemes, el N y el carboxilato C3 interactúan en forma similar a las penicilinas. Sin embargo, el carboxilato C7 resultante de la hidrólisis se intercala entre ambos Zn(II) resultando en una tetracoordinación para el Zn1 y una hexacoordinación para el Zn2 (en las penicilinas este carboxilato se aleja del Zn2 y queda coordinado únicamente al Zn1). En las estructuras, también puede observarse la interacción entre el carboxilato de C3 con la cadena lateral de la Lys224 y el N de la cadena principal del Asn233, de los que se encuentra a distancia de coordinación.

Los anillos de los penames, penemes y cefemes, muestran su cara β hacia la superficie hidrofóbica formada por las cadenas laterales del Trp87, y la Leu59 y la Val67 en el bucle L3 (Figura 7 B)^(99, 107, 110-112). Los sustituyentes laterales de los antibióticos se ubican en surcos estrechos que se extienden desde el sitio activo, donde se han identificado pocas interacciones específicas^(102, 110, 111). Estas interacciones también fueron observadas en experimentos de *docking* con cefalosporinas⁽¹¹³⁾. La importancia estos residuos se estudió realizando sustituciones de los mismos por diferentes aminoácidos⁽¹¹³⁾. Las sustituciones L59A, V67G y W87A, atenuaron la actividad enzimática debido a la reducción de la superficie hidrofóbica de contacto y falta de interacciones que mantendría la posición del bucle L3. En otras B1, la posición 67 puede ser ocupada por una Tyr (VIM-2 y BlaB) y la 87 por una Phe (IMP-1), las que también cumplirían la función de estabilizar la posición del L3 por interacciones hidrofóbicas⁽¹¹⁴⁾. La caracterización del proceso de unión de sustrato por cristalografía de rayos X, RMN y estudios funcionales realizados en M β LS B1, demostraron que el bucle L3 se cierra sobre inhibidores durante la unión y sobre sustratos durante la catálisis⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾. Sin embargo, en los complejos EP de NDM-1, este bucle se encuentra en una conformación abierta y extendida.

1.3.5. Estudios del mecanismo de reacción de M β LS

Los tres pasos principales involucrados en la hidrólisis de antibióticos β -lactámicos son: el ataque nucleofílico al grupo carbonilo, la ruptura del enlace C7-N y la protonación del N⁽¹¹⁸⁾. Dentro de este esquema general hay varios puntos de debate, como ser la acumulación de intermediarios de reacción, las identidades del nucleófilo y del dador de protones, y la función de cada ion metálico durante la catálisis. Las primeras propuestas de

mecanismos de hidrólisis de M β LS fueron hechas en base al mecanismo de las S β LS^(29, 119). Como se explica en más detalle en la Sección 4.1.2, en estas enzimas el ataque nucleofílico es producido por un residuo activado de Ser, que da lugar a un estado de transición de alta energía con un carbono tetraédrico, conocido como intermediario tetraédrico, en donde la carga negativa es estabilizada por una hendidura con carga positiva conocida como “cavidad oxianiónica”⁽¹²⁰⁾. La carencia de la Ser70 y de la cavidad oxianiónica hace imposible que la reacción en las M β LS curse por el mismo mecanismo que en las S β LS⁽¹¹⁸⁾.

Las diferencias estructurales entre las M β LS B1, B2 y B3 dan lugar a importantes variaciones en su mecanismo de acción. La principal de ellas está relacionada con el requerimiento metálico de estas enzimas. En las enzimas binucleares B1 y B3, el Zn(II) ubicado en el sitio 1 actúa como un ácido de Lewis que realiza la activación nucleofílica de un hidróxido ubicado en el sitio activo, del mismo modo que ha sido reportado para otras hidrolasas dependientes de Zn(II)^(121, 122). En contraste, las enzimas B2 son monometálicas, y realizan la activación del nucleófilo mediante una red de interacciones con residuos del sitio activo, especialmente aquellos que ocupan en el sitio 2⁽¹²³⁾. Los residuos His118 e His196 están involucrados en la activación nucleofílica en ambas enzimas, ya sea por coordinación del Zn1 en las enzimas dimetálicas o interaccionando directamente con el nucleófilo en las monometálicas. La función y esencialidad del Zn2 está preservada en todas las M β LS, por lo que se especula que todas estas enzimas podrían compartir pasos claves en el mecanismo de reacción⁽¹¹⁸⁾. Este metal realiza las principales interacciones electrostáticas que mantienen al sustrato unido (Sección 1.3.4). Diversos estudios mecanísticos^(121, 124-126), mutagénicos^(127, 128) y cristalográficos^(110, 111), proponen que el Zn2 podría estabilizar un intermediario de reacción con características aniónicas, en el que se ha producido la ruptura del enlace C7-N pero no la protonación. Este intermediario podría acumularse durante la hidrólisis de carbapenemes y cefalosporinas, pero no de penicilinas, debido a las diferencias estructurales entre los diferentes sustratos que impactarían en la acumulación del intermediario⁽¹²⁶⁾.

La mayor parte de los estudios mecanísticos han sido realizados en M β LS binucleares, como CcrA⁽¹²⁸⁾, IMP-1⁽¹²⁵⁾, BcII^(121, 126, 129) y NDM-1^(111, 113, 124, 129-135) de la subclase B1, y L1⁽¹²²⁾ de la B3. Los estudios realizados en NDM-1 se vieron facilitados por el empleo de derivados cromogénicos de las cefalosporinas, como la nitrocefina o el cromacef, que actúan como sondas de los pasos de reacción^(124, 129, 132-136). En diversas M β LS, inclusive NDM-1, durante la hidrólisis de estos compuestos se produce la formación de un intermediario de reacción aniónico^(124, 129, 132-135). La hidrólisis de cefalexina (un compuesto de

la familia de las cefalosporina) mediada por NDM-1, ha sido estudiada por simulaciones de dinámica molecular, donde se propuso que la hidrólisis también daría lugar a la formación de intermediarios aniónicos⁽¹³¹⁾. La generación de productos diferentes durante la hidrólisis de penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes por NDM-1, fue propuesto por el estudios cristalográficos, computacionales y de resonancia magnética nuclear (RMN)^(112, 131). El mecanismo de hidrólisis de carbapenemes por NDM-1 ha sido estudiado por simulaciones computacionales híbridas de mecánica-cuántica y mecánica-molecular (QM-MM)⁽¹³⁰⁾. Sin embargo, este proceso no se ha estudiado experimentalmente, por lo que no se dispone evidencia de la formación de intermediarios de reacción con estos compuestos.

1.4. Objetivos de esta Tesis

La evolución de la resistencia bacteriana a los tratamientos antibióticos es un problema de relevancia mundial debido, principalmente, al esparcimiento de enzimas con actividad carbapenemasa entre bacterias patógenas de diferentes especies. Los carbapenemes son los antibióticos utilizados como último recurso en la clínica, por lo que la resistencia bacteriana a estos compuestos deja sin opciones de tratamiento a los pacientes críticos. Entre las carbapenemasas más potentes se encuentra la M β L B1 NDM-1, cuya diseminación se vio favorecida por su codificación plasmídica junto a otros genes de resistencia y patogenicidad. En este contexto, el diseño de compuestos inhibidores activos contra esta enzima resulta de extrema urgencia médica. El conocimiento del mecanismo de acción de NDM-1 durante la hidrólisis de carbapenemes (que al momento no cuenta con evidencia experimental sólida) y el estudio de los determinantes estructurales involucrados en la unión de sustratos a esta enzima, podrían ser piezas claves para el diseño racional de compuestos inhibidores. Basado en estas premisas, los objetivos propuestos para la realización del presente trabajo de Tesis fueron:

1. Obtener la proteína NDM-1 en forma soluble y realizar variantes en las que su metal nativo, Zn(II), sea reemplazado por Co(II) y Cd(II), lo que permitiría realizar estudios espectroscópicos del sitio activo.
2. Estudiar el mecanismo de reacción mínimo para la hidrólisis de carbapenemes por NDM-1, en base a estudios de cinética rápida y diferentes espectroscopías.
3. Estudiar el rol funcional del bucle flanqueante al sitio activo L3 en el reconocimiento de sustratos y en el mecanismo de acción NDM-1.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1. Cepas, plásmidos, medios de cultivo y soluciones amortiguadoras

2.1.1. Cepas utilizadas

Para el mantenimiento de plásmidos y transformación del vector pMBLc:

- *Escherichia coli* DH5 α F⁻, *endA1*, *glnV44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *deoR*, *mapG*, Φ 80
lacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(rK⁻ mK⁺), λ -

Para la expresión de proteínas recombinantes:

- *Escherichia coli* BL21(DE3) F⁻, *ompT*, (rB-mB⁺), *dcm*, *gal*, (λ DE3)

La misma posee el gen de la enzima ARN polimerasa del fago T7 (lisógeno λ DE3), bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) o lactosa. Cuando esta cepa se transforma con un vector que contiene un promotor específico para la ARN polimerasa del fago T7 (un promotor fuerte), puede expresar genes ubicados corriente abajo de manera controlada por el agregado de IPTG o lactosa al medio de cultivo.

2.1.2. Medios de cultivo

- Medio de cultivo líquido Luria- Bertani (LB): triptona de caseína 1% P/V, extracto de levadura 0,5% P/V, NaCl 1% P/V (Sigma).

- Medio de cultivo sólido Luria- Bertani (LB): triptona de caseína 1% P/V, extracto de levadura 0,5% P/V, NaCl 1% P/V, agar- agar 1,5% P/V (Sigma).

- Medio mínimo M9: Na₂HPO₄·2H₂O 50 mM, KH₂PO₄ 25 mM, NaCl 10 mM a pH 8,2, Glucosa 4 g/L, NH₄Cl 1 g/L, MgSO₄ 5 mM, CaCl₂ 0,2 mM.

- Medio rico SOC: peptona de carne 2% P/V, extracto de levadura 0,5 % P/V, KCl 2,5 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y Glucosa 20 mM.

Cuando se utilizaron antibióticos como agentes de selección, los medios se suplementaron con 50 μ g/ml de kanamicina o 20 μ g/ml de gentamicina.

2.1.3. Plásmidos

- pET-NDM-1 Δ 38: este vector se construyó insertando la región correspondiente a los residuos 39-270 del gen *bla*_{NDM-1} entre los sitios *NdeI* y *BamHI* del plásmido comercial pET28a(+) (Novagen). La delección de los primeros 38 aminoácidos en la secuencia de NDM-1 imposibilitó el anclado de la enzima en la membrana bacteriana, debido a la eliminación de la secuencia de lipidación LSGC. La construcción de este vector fue realizada utilizando la secuencia codificante de NDM-1 presente en el plásmido pET26-*bla*_{NDM-1} generosamente provisto por el Dr. James Spencer, universidad de Bristol, Reino Unido. Los plásmidos de la línea pET28 permiten la sobreexpresión de proteínas recombinantes mediante un promotor inducible reconocido por la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Dado que el promotor del plásmido no es reconocido por las polimerasas bacterianas, la cepa hospedadora debe ser capaz de expresar la RNA Polimerasa T7. La inducción del plásmido se produce mediante lactosa o isopropil- β -D-tio-galactósido (IPTG). Los vectores presentan bajo control del promotor T7 una secuencia codificante para 6 Histidinas (His-Tag) seguida por un sitio de corte para la proteasa trombina y un sitio de múltiple clonado. De esta manera, los genes pueden expresarse como fusión amino-terminal a His-Tag, permitiendo purificar la proteína generada empleando cromatografía de afinidad, y remover la fusión mediante tratamiento con la proteasa. Los vectores contienen un marcador de resistencia a kanamicina.

- pET-TEV-NDM-1 Δ 38: plásmido derivado del pET28a(+) en el que se reemplazó el sitio de corte de la proteasa trombina por el de la proteasa TEV (cuyo nombre hace referencia a las siglas del nombre en inglés del virus del cual se extrajo por primera vez, *Tabacco Etch Virus*)^(137, 138), y en el que se insertó la región correspondiente a los residuos 39-270 del gen *bla*_{NDM-1} entre los sitios *NdeI* y *BamHI*. En el laboratorio ya se disponía del vector sobre el cual realizar el clonado. Sobre este mismo plásmido fueron clonadas las secuencias correspondientes a las variantes en el L3, dando origen a los plásmidos: pET-TEV-L3IMP, pET-TEV-L3VIM y pET-TEV-L3Pro. Estas construcciones fueron utilizadas para la purificación de las enzimas solubles.

- pMBLe-StrepTag: vector construido en el laboratorio por el Dr. Lisandro González y el Lic. Guillermo Bahr que permite la expresión periplasmática de M β LS⁽¹⁰⁶⁾. El plásmido pMBLe fue utilizado en todos los experimentos de biología molecular y expresión de las variantes de NDM que no requirieran de la forma soluble de las proteínas. El vector posee un origen de replicación de amplio espectro y resistencia a gentamicina, un

antibiótico no β -lactámico, por lo que no interfiere en la determinación de la resistencia otorgada por las β -lactamasas. Ambos elementos provienen del plásmido pBBR1, el cual tiene un número de copias medio. Los genes codificantes para NDM-1 y sus variantes en su forma sin procesar, se encuentran clonados en el plásmido corriente abajo del promotor pTac y entre sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *HindIII*. Este promotor es inducible por IPTG y permite una producción controlada de las lactamasas, lo cual resulta esencial para lograr niveles de expresión comparables a los observados *in vivo* bajo el promotor nativo. Además, las proteínas se expresaron fusionadas en su extremo carboxilo-terminal un péptido de ocho aminoácidos (WSHPQFEK) llamado StrepTag. Esta secuencia facilita la posterior detección de las proteínas a las que se encuentra fusionada mediante anticuerpos anti-StrepTag. En el laboratorio se comprobó previamente que la adición de esta secuencia no afecta la capacidad de las MBLs de conferir resistencia⁽¹⁰⁶⁾.

Para la conservación de plásmidos, se transformaron células de *E. coli* DH5 α y se obtuvieron cultivos saturados en LB que fueron almacenados a -70 °C luego del agregado de 30 % v/v de glicerol estéril.

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína NDM-1, donde se encuentran marcado en cursiva y subrayada la secuencia de lipidación, en negrita y subrayada la Met39 y sólo en negrita los residuos del L3 que fueron modificados en las variantes:

MELPNIMHPV AKLSTALAAA LMLSGCMPGE IRPTIGQQME TGDQRFGDLV FRQLAPNVWQ
 HTSYLDMPGF **GAV**SNGLIV RDGGRVLVVD TAWTDDQTAQ ILNWIKQEIN LPVALAVVTH
 AHQDKMGGMD ALHAAGIATY ANALSNQLAP QEGMVAQAHS LTFANGWVE PATAPNFGPL
 KVFYPPGPGHT SDNITVGIDG TDIAFGGCLI KDSKAKSLGN LGDADTEHYA ASARAFGAAP
 PKASMIVMSH SAPDSRAAIT HTARMADKLR

La construcción de las variantes en el L3 de NDM-1 estuvo a cargo de María Fernanda Mojica del laboratorio de Robert Bonomo en la universidad CASE de Cleveland, Estados Unidos. En éstas, la secuencia marcada en negrita fue reemplazada por los aminoácidos presentados debajo, mientras que el resto de la proteína permaneció inalterado:

L3VIM: ATQSF~~MPGF~~DGAVYP

L3IMP: SFEEVNGWGVVP

L3Pro: SYLDMPGFGAVAP

2.1.4. Soluciones amortiguadoras

- TAE: Tris- acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.
- Solución amortiguadora HEPES: HEPES 10 mM, NaCl 200 mM, pH 7,5.
- Solución amortiguadora HEPES para medidas de cinética transiente: HEPES 100 mM, NaCl 200 mM, pH 7,5.
- Solución amortiguadora para determinaciones de afinidad: MOPS 50 mM; NaCl 0,1 M; pH 7,3.
- Solución amortiguadora A: Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, pH 8.
- Solución amortiguadora B: Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, Imidazol 500 mM, 10 mM β -mercaptoetanol, pH 8.
- Solución de bloqueo para *Western Blot*: leche descremada al 5% P/V y Tween-20 al 0,1% V/V en solución amortiguadora PBS.
- Solución amortiguadora PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4.
- Solución Tris-Sacarosa: solución de Tris-HCl 20 mM, pH 8, EDTA 0,1 mM, sacarosa 20 %, lisozima 1 mg/mL, PMSF 0,5 mM

2.2. Técnicas concernientes a la manipulación de ácidos nucleicos

2.2.1. Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se purificó mediante el Método de Lisis Alcalina⁽¹³⁹⁾ y los reactivos del sistema de purificación “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) según indicaciones del fabricante. El grado de pureza e integridad se chequeó por electroforesis en gel de agarosa según se describe en la Sección 2.2.2. La estimación de las concentraciones de las soluciones de ADN se obtuvo por comparación directa con la intensidad de las bandas del patrón de tamaño molecular de concentración conocida (ADN de fago λ digerido con *HindIII* 100 ng/ μ L). Cuando fue necesario, se estimó la concentración de ADN espectrofotométricamente, teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm con un paso óptico de 1 cm equivale a 50 μ g/ml de ADN doble hebra.

2.2.2. Electroforesis en geles de agarosa

La preparación de geles de agarosa para el análisis de fragmentos de ADN, se llevó a cabo utilizando sistemas de tipo submarino⁽¹³⁹⁾. Se realizaron geles con una concentración de agarosa variable (entre 1 y 2 % P/V), dependiendo del tamaño de las moléculas de ADN a resolver, preparados en la solución amortiguadora TAE (Sección 2.1.4). Antes de la gelificación se adicionó el colorante que se une al ADN doble hebra Gel Green (Biotium), a la concentración final indicada por el proveedor. Para la visualización de las bandas se empleó un transiluminador de luz azul Safe Imager (Invitrogen), que permite la excitación de la fluorescencia del colorante que tiene su máximo a 500 nm. Para sembrar las muestras, se mezclaron previamente con 10 % V/V de una solución de azul de bromofenol 0,25 % P/V; xilenocianol 0,25 % P/V y glicerol 30 % V/V en agua destilada estéril. Las electroforesis fueron realizadas utilizando TAE como solución de corrida, con una diferencia de potencial constante de 80 V. Como marcadores de peso molecular se utilizaron ADN del fago λ digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* o Ladder 100 pb (Invitrogen).

2.2.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión de productos de ADN se realizó bajo las condiciones recomendadas por el proveedor de las enzimas de restricción (Promega o Thermo Fisher Scientific). Las reacciones para cortes de chequeo se realizaron en general en un volumen final de 20 μ l, utilizando 0,3 μ l de enzima (de concentración 10 U/ μ l), 3 μ l de ADN plasmídico (de concentración aproximada 100 ng/ μ l), 2 μ l del medio de reacción 10 X correspondiente y 2 μ l de BSA 10 mg/ml. Cuando los cortes se realizaron con fines de clonado, se utilizó típicamente un volumen final de 50 μ l, utilizando 1 μ l de enzima y 10 μ l de ADN plasmídico. En ambos casos se utilizaron incubaciones de 2-3 h, a 37 °C. En los casos en que se realizaron digestiones con dos enzimas, se empleó un medio de reacción en el que ambas fuesen activas. De lo contrario, se procedió al corte secuencial, el producto obtenido luego del corte con la primera enzima se purificó a partir de un gel de agarosa y se digirió con la segunda enzima.

2.2.4. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema comercial “Wizard SV Gel and PCR Clean- Up System” (Promega), que se basa en la unión del ADN a una membrana de silica en presencia de sales caotrópicas.

2.2.5. Reacciones de ligación

Las ligaciones de los fragmentos de ADN se realizaron con la enzima T4 ADN ligasa, de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Promega). Se usó una concentración molar del fragmento 3 veces mayor a la del vector (para minimizar la religación del mismo) en un volumen final de 50 μ l. Se realizaron controles de religación del vector sin el agregado de inserto. Las reacciones se llevaron a cabo a 4 °C durante 16 h. En todos los casos se realizaron ligaciones direccionales.

2.2.6. Reacciones en cadena de la polimerasa

Para el clonado de la secuencia codificante de NDM-1- Δ 38 entre los sitios de corte *NdeI* y *BamHI* del vector pET28a(+), se utilizó el producto de la reacción llevada a cabo utilizando como molde el plásmido pET26-*bla*_{NDM-1} y los siguientes cebadores, presentados en dirección 5'→3':

- Fw NDM-1 D38: CCCGACGATTGGCCAGCATATGGAAACTGGCG

- T7 terminator: GCTAGTTATTGCTCAGCGGT

Las amplificaciones se llevaron a cabo en 50 μ L de medio de reacción conteniendo 200 ng de ADN molde, 0,3 μ moles de cada oligonucleótido mutagénico, 1 U de ADN polimerasa Pfx platinum (Invitrogen), 0,3 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 mM de MgSO₄ y 1X de la solución de reacción provista para la enzima. Para todos los casos se realizaron controles negativos sin el agregado de ADN molde. Para el proceso se utilizó un termociclador (MJ Mini™ Personal Thermal Cycle, Biorad) con un programa que consistía en una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización por 30 s a 92 °C, 60 s de hibridación a 60 °C y una extensión durante 1 min a 68 °C, y por último una extensión final a 68°C durante 10 minutos.

2.3. Técnicas de Microbiología

2.3.1. Preparación y transformación de células de *E. coli* utilizando CaCl_2

Este método se empleó para transformar células de *E. coli* tanto con ADN plasmídico como con mezclas de ligación o mutagénesis⁽¹³⁹⁾. Se inoculó una colonia en medio líquido LB y se creció a 37 °C durante 16 h con agitación. Se realizó una dilución 1:100 del cultivo saturado en medio LB (suplementado con el antibiótico correspondiente según el plásmido a transformar), y se lo dejó crecer a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de aproximadamente 0,4 unidades. A continuación, se fraccionó el cultivo en alícuotas de 1 ml por cada evento de transformación a realizar. Los tubos se centrifugaron durante 2 min a 3.200 r.c.f. en una centrífuga refrigerada a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes, y las células se resuspendieron en 500 μl de CaCl_2 0,1 M frío. Se centrifugaron nuevamente las células bajo las mismas condiciones, y se resuspendieron en 100 μl de CaCl_2 0,1 M frío. Luego, se adicionó a las células 2 μl de plásmido superenrollado concentrado o de una dilución 1/5 de la mezcla de ligación. En todos los casos, se incubó en hielo durante 1 h. Después se les aplicó un choque térmico de 2 min a 42 °C, y se las incubó durante 1 h a 37 °C en medio SOC con agitación para permitir su recuperación. Finalmente, las células se sembraron en placas de Petri conteniendo LB- agar suplementado con el antibiótico al cual confería resistencia el plásmido transformado y se crecieron durante 16 h a 37 °C. Como control negativo se siguieron los mismos pasos, sin el agregado de ADN plasmídico. En todos los casos, la correcta incorporación del plásmido de interés fue comprobado por secuenciación.

2.3.2. Preparación de extractos de periplasma, esferoplastos y células totales

Para la preparación de células totales utilizadas para analizar los niveles de expresión de las variantes en el L3 de NDM-1, se inocularon 3 mL de medio líquido LB suplementado con gentamicina, con colonias de *E. coli* DH5 α conteniendo cada una de las variantes de NDM-1 clonadas en el plásmido pMBLe. Estos cultivos se crecieron en agitación a 37 °C, hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 0,5-0,6 unidades. A continuación, se procedió a la inducción con 100 μM de IPTG y se continuó el crecimiento durante 2 h. Se procedió a medir la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ final de cada cultivo y se cosecharon las células por

centrifugación a 3.200 r.c.f. durante 3 min. Por último, se resuspendió el pellet celular en solución de siembra SDS-PAGE (glicerol 5 % V/V, SDS 2 % P/V, β -mercaptoetanol 0,1 % V/V, azul de bromofenol 0,1 mg/mL), en un volumen igual a $DO_{600nm} \times 100 \times mL$ de cultivo procesado, esto permitió igualar la cantidad de células en cada preparación. Los preparados fueron incubados a 100 °C durante 5 minutos para su posterior siembra.

Para la preparación de extractos de periplasma y esferoplastos, se inocularon colonias de las mismas células utilizadas en las preparaciones de extractos de células totales en 3 mL de medio líquido LB suplementado con gentamicina. Estos cultivos se crecieron con agitación durante 16 h a 37 °C. A continuación se realizaron diluciones 1/100 de cada cultivo en 10 mL de medio líquido LB suplementado con gentamicina. Cada cultivo se creció 2:30 h, tras lo cual fueron inducidos con IPTG y se continuó su crecimiento hasta aproximadamente una DO_{600nm} de 2 unidades. Se cosecharon las células por centrifugación a 3.200 r.c.f., y se las lavó con solución amortiguadora TrisHCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM. Luego se resuspendieron las células en una solución Tris-Sacarosa. La mezcla se homogeneizó suavemente y se incubó durante 30 min en cámara fría. Luego, las muestras se centrifugaron durante 2 min a 6.400 r.c.f. El sobrenadante obtenido correspondió a los extractos de periplasma. Los extractos de esferoplastos (células permeabilizadas por tratamiento con lisozima) fueron obtenidos al lavar y resuspender el pellet en solución Tris-Sacarosa. Todos los pasos fueron realizados a 4 °C. Para la siembra de las muestras en SDS-PAGE, se alicuotaron 120 μ L de cada preparación, se agregaron 30 μ L de solución de siembra SDS-PAGE y se las incubó a 100 °C durante 10 min.

Para la realización del *Western Blot* mostrado en la Figura 37, los extractos de células totales fueron preparados de la forma antes descrita, con la salvedad de que, una vez finalizada la inducción, los cultivos celulares de 10 mL fueron divididos en dos partes iguales y a una de ellas se le agregó 250 μ M de DPA.

2.3.3. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) para los distintos antibióticos se determinaron en medio sólido LB mediante el método de macrodilución en agar. Los antibióticos ensayados fueron imipenem, meropenem, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima y cefepime. Como cepa hospedadora para las determinaciones se utilizó a *E. coli* DH5 α . Para ello se transformó con los plásmidos pMBLe conteniendo los genes correspondientes a NDM-1 y las variantes en el L3. Se partió de un inóculo de cada cepa crecido durante

toda la noche a 37 °C en medio selectivo conteniendo gentamicina y se realizó una dilución 1/100 en medio fresco que se dejó crecer hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 0,1 unidades. Se realizó la dilución correspondiente con medio líquido LB para obtener una DO_{600nm} final de 0,01 y se sembraron gotas de aproximadamente 2 μ L (utilizando un multi-inoculador) en placas de LB-agar conteniendo 20 μ g/mL de gentamicina, 100 μ M de IPTG (excepto para el caso de ceftazidima, donde la inducción se realizó con 20 μ M de IPTG) y distintas concentraciones del antibiótico β -lactámico a ensayar.

Para evaluar la resistencia a la limitación de metal de NDM-1 y las variantes en el L3, se realizaron determinaciones de CIMs en placas de medio LB-agar suplementado con ácido dipicolínico (DPA) 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M y 700 μ M. El DPA es un quelante de metales divalentes que, a diferencia del EDTA, puede utilizarse en altas concentraciones sin afectar la sobrevivencia de las bacterias. Se realizaron, además, placas sin DPA y con 500 μ M de $ZnSO_4$. El valor de CIM obtenido en condiciones de exceso de metal fue considerado como el valor máximo que podría obtenerse. Los valores obtenidos fueron graficados como porcentaje, tomando como 100 % el valor medido en exceso de metal.

2.4. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

2.4.1. Inducción en células de *E. coli* y ruptura celular

Para la purificación de las proteínas recombinantes en forma soluble, los plásmidos pET-NDM-1 Δ 38 y pET-TEV-NDM-1 Δ 38 (y sus derivados, los plásmidos pET-TEV-L3VIM, pET-TEV-L3IMP y pET-TEV-L3Pro), fueron transformados en células de *E. coli* BL21 (DE3). Como primer paso, se inoculó una colonia de la cepa deseada en medio rico LB suplementado con kanamicina. Los cultivos se crecieron a 37 °C y con agitación hasta alcanzar saturación. Se realizó una dilución 1/100 de estos cultivos en un erlenmeyer de 6 L conteniendo 1 L de medio rico LB o medio mínimo M9, suplementado con 50 μ g/mL de kanamicina y se continuó su crecimiento a 37 °C. Cuando se alcanzó una DO_{600nm} aproximada de 0,6 unidades, la expresión fue inducida por la adición de 0,5 mM IPTG y se adicionó 0,5 mM de $ZnSO_4$ para optimizar la incorporación de metal. Las células fueron incubadas durante 16 h con agitación a 18 °C.

Todos los pasos de purificación siguientes fueron llevados a cabo a 4 °C. Las células fueron centrifugadas a 6.400 r.c.f. durante 20 min en una centrífuga Sorvall (Dupond) y el

pellet fue resuspendido en solución amortiguadora A suplementada con DNAsa A 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MgCl_2 4 mM y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 2 mM. La ruptura celular se realizó utilizando un homogeneizador de alta presión EmulsiFlex-C3 (AVESTIN, Inc.) o un sonicador Sonifer (Branson modelo 250) aplicando 6-8 pulsos a 40 % de potencia, cada uno de 30 s, separados por intervalos de 60 s. Posteriormente se clarificó el lisado celular por centrifugación durante 1 h a 15.000 r.c.f. El sobrenadante de esta centrifugación constituye el extracto crudo a partir del cual se obtuvieron las diferentes proteínas de fusión.

2.4.2. Separaciones Cromatográficas

El extracto crudo fue sembrado en una resina de Ni-sefarosa y equilibrado con solución A. El lavado de la columna se realizó con 100 mL de una mezcla de soluciones amortiguadoras A y B en 96 % y 4 %, respectivamente. La proteína recombinante fue eluída utilizando un gradiente lineal (4-100 % en 100 mL) de solución amortiguadora B. La proteína eluída se encontraba fusionada a una cola de poli histidinas. Para remover esta secuencia, la elución fue mezclada con la proteasa correspondiente (trombina o TEV, según el caso) en una relación 1:50, y la mezcla fue incubada durante 16 h a 4 °C en una diálisis contra 100 volúmenes de solución A. Luego de este proceso, la mezcla fue sembrada nuevamente en una resina de Ni-sefarosa para separar la cola de His, la proteína sin cortar y la proteasa TEV, de las proteínas de interés. La proteína cortada eluyó al lavar la columna con 98 % de solución amortiguadora A y 2 % de B. La pureza de la proteína fue determinada mediante SDS-PAGE. Cuando la pureza de la muestra final no resultó satisfactoria, se incluyó un tercer paso de separación cromatográfica utilizando una columna de exclusión molecular (Superdex 75). El equilibrado de la columna y la elución de las muestras proteicas se realizó con solución amortiguadora HEPES.

Con el fin de aumentar el porcentaje de proteína metalada, una vez finalizados los pasos de purificación, la muestra proteica fue concentrada hasta llegar a una concentración aproximada de 150 μM . Luego, se realizaron dos diálisis en solución amortiguadora HEPES con 300 μM de ZnSO_4 y tres con la misma solución sin agregado de metal para quitar el exceso del mismo. Todos los pasos de diálisis fueron realizados a 4 °C y durante un mínimo de 6 h.

2.4.3. Cuantificación de las muestras de proteínas

La concentración de NDM-1 Δ 38 fue determinada mediante espectroscopía de absorción electrónica, empleando un coeficiente de absorción molar a 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}}$) de 27.960 M⁻¹.cm⁻¹. Este valor fue obtenido por el programa Expansy⁽¹⁴⁰⁾ y estuvo en concordancia con los reportados por otros grupos^(100, 124). El valor de $\epsilon_{280\text{nm}}$ calculado para las variantes en el L3 L3VIM y L3Pro fue el mismo que para NDM-1 y para L3IMP fue 31.970 M⁻¹.cm⁻¹. Los espectros correspondientes fueron registrados en un espectrofotómetro Jasco V-550 o Jasco V- 670.

2.4.4. Concentración de muestras de proteínas

Para concentrar las soluciones de proteína, se utilizaron dispositivos de concentración Amicon Ultra con un valor de corte de 10 kDa, en su versión de 15 ml. La solución de proteína se colocó en el compartimiento superior del dispositivo, se concentró mediante centrifugación a 4.000 r.c.f. y a 4°C en una centrífuga refrigerada y se descartó la solución filtrada del compartimiento inferior. Este protocolo se repitió las veces necesarias para alcanzar la concentración deseada.

2.5. Detección de proteínas

2.5.1. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se prepararon geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, con una concentración de poliacrilamida 12 o 14 % P/V para el gel de separación (12 o 14 % P/V de Acrilamida- Bisacrilamida 30:0,8 en Tris-HCl 0,126 M pH 8,8, SDS 0,26 % P/V) y 4,5 % P/V para el gel de concentración (4,5 % P/V de Acrilamida- Bisacrilamida 30:0,8 % P/V en Tris-HCl 0,126 M pH 6,8, SDS 0,26 % P/V)⁽¹⁴¹⁾. Las muestras de proteína fueron incubadas en solución de siembra (glicerol 5 % V/V, SDS 2 % P/V, β - mercaptoetanol 0,1 % V/V, azul de bromofenol 0,1 mg/ml) durante 5 min a 100 °C y posteriormente centrifugadas 5 min a 8.300 r.c.f. en una microcentrífuga a temperatura ambiente. El sistema de electroforesis empleado fue el Miniprotean III (BioRad). La corrida electroforética se realizó utilizando como solución amortiguadora Tris 0,3 % P/V, glicina 1,44 % P/V, y SDS 0,1 % P/V, aplicando una corriente constante de 30 mA. Luego de la

corrida, los geles fueron fijados durante 10 min con una solución de etanol: ácido acético: agua (25:10:75), y teñidos durante 10 min con una solución de azul de Coomassie R250 al 1 % (P/V) en etanol:ácido acético: agua (50:10:40). La decoloración del gel se llevó a cabo mediante lavados sucesivos con etanol: ácido acético: agua (25:10:75) o incubando el gel en agua hirviendo hasta llegar a la decoloración deseada.

2.5.2. Western Blots

Las muestras de proteínas fueron separadas a través de SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 12 o 14%. Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF, utilizando como medio de transferencia una solución conteniendo Tris 250 mM, glicina 192 mM y metanol 20 % V/V. La transferencia se realizó a 100 V durante 1 h o 25 V durante 16 h con agitación en cámara fría, utilizando el sistema MiniProtean II de BioRad. La transferencia adecuada de las proteínas se confirmó tiñendo reversiblemente la membrana con una solución de Ponceau S (Sigma) al 0,1 %. Luego se procedió al bloqueo de la membrana con solución de bloqueo, realizando 4 cambios de la solución, separados por períodos de incubación de 15 minutos. Para la detección de las proteínas de interés, la membrana se incubó durante 1 h con un anticuerpo monoclonal anti-StrepTag de ratón (Novagen, disuelto 1/1.000 en solución de bloqueo), que permite detectar las proteínas de interés, y con anti-GroEL de conejo (cedido por el Dr Alejandro Viale, disuelto 1/90.000, permite analizar extractos citoplasmáticos y de membrana) y con anti-MBP (Rockland, disuelto 1/4.000, para muestras de periplasma), los que permitieron realizar el control de carga. Luego de cuatro lavados de 15 min con la solución de bloqueo, se agregaron los anticuerpos secundarios: anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo, conjugados a la enzima fosfatasa alcalina (BioRad), y se incubaron durante 1 h. El revelado final se realizó mediante la reacción cromogénica catalizada por esta enzima en presencia de los sustratos fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP, 0,1 mg/mL) y nitroazul de tetrazolio (NBT, 0,3 mg/mL), en medio Tris 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM.

2.6. Técnicas para la caracterización bioquímica de las proteínas

2.6.1. Determinación del contenido de Zn(II) utilizando el quelante colorimétrico PAR

La cantidad de Zn(II) de las muestras proteicas fue medida mediante unión al compuesto colorimétrico 4- (2- piridilazo)- resorcinol (PAR)^(35, 142). Este quelante de cationes divalentes en su forma libre posee un máximo de absorción a 414 nm, mientras que al estar unido a Zn(II) el mismo se ubica a 500 nm. El método de determinación de Zn(II) en la muestra de proteína se basa en la liberación del metal por medio de desnaturalización de la muestra proteica y el posterior agregado de PAR para formar complejos con todo el metal disponible. Para esto, se construyó una curva de calibración en un rango de concentraciones de Zn(II) de 0 a 12 μ M con una solución de estándar espectroscópico de ZnCl₂ de concentración conocida (Sigma). Las mezclas fueron realizadas en una solución de cloruro de guanidinio 4 M, PAR 100 μ M y HEPES 50 mM a pH 7,5, previamente tratada con Chelex 100 (Sigma). De cada muestra se registró el espectro correspondiente entre 320 y 600 nm (en un espectrofotómetro Jasco V- 550 o Jasco V- 670). Se graficó la absorbancia correspondiente al máximo del complejo (PAR)₂Zn (Abs_{500nm}), corregida por la línea de base (restando el valor de Abs_{600nm}), contra la concentración de Zn(II) en el medio, y se ajustó a una línea recta. Los parámetros obtenidos del ajuste fueron empleados para la determinación de Zn(II) en muestras de proteína desnaturalizadas. Para las muestras de enzima, se diluyó la muestra proteica a 3 μ M, en la misma solución en que fue realizada la curva. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente se registró el espectro de absorción de cada muestra entre 300 y 600 nm. Para obtener la concentración de Zn(II) en la muestra incógnita, se interpoló el valor corregido de Abs_{500nm} en la curva de calibración antes realizada. Como blanco se utilizó la solución amortiguadora empleada en el último cambio de diálisis, la que fue sometida al mismo tratamiento que la muestra de enzima. La concentración de equivalentes de Zn/molécula de proteína se obtuvo como la diferencia entre la concentración de Zn(II) obtenida en la muestra y la concentración de Zn(II) medida para el blanco.

2.6.2. Medida de la afinidad por Zn(II)

Para la determinación de las constantes de disociación correspondientes al primer y segundo evento de unión de Zn(II) para NDM-1 o las variantes en el L3, se realizaron

curvas de titulación de soluciones de Zn(II) 1,5 μM y PAR 3 μM o 6 μM con cantidades crecientes de la apo-enzima, hasta alcanzar una concentración 3 μM de la misma. El medio de reacción utilizado fue MOPS 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,3, a 25° C. Cada punto de la curva de titulación se construyó por separado y por triplicado, llevándose a un volumen final de 500 μL . Se registraron los espectros de absorción entre 320 y 600 nm de cada punto de la titulación, en cubetas de paso óptico de 1 cm, en un equipo Jasco V-550. Los datos de absorbancia a 414 y 500 nm para cada concentración de apo-enzima se corrigieron restando el valor de $\text{Abs}_{600\text{nm}}$, tomado como línea de base. Los datos provenientes de las titulaciones se ajustaron con el programa DynaFit3 (Biokin)⁽¹⁴³⁾ a los modelos de equilibrio mostrados en la Figura 39. En el esquema A, K_{d1} y K_{d2} son las constantes de disociación macroscópicas del primer y segundo evento de unión de Zn(II) a la apo-enzima, en el esquema B, K_{d12} es la constante de disociación observada para un único evento de disociación de ambos iones metálicos, este valor de constante sería equivalente al producto $K_{d1} \cdot K_{d2}$. Los ajustes se realizaron al modelo A, excepto para la variante L3Pro en la que no fue posible ajustar a ese modelo, pero si al modelo B. Esto pudo ocurrir porque ambas constantes fueron muy similares o porque K_{d2} era mucho más grande que K_{d1} . Para los ajustes se emplearon los valores de $K_{d(\text{PAR})2\text{Zn}}$ $2,6 \times 10^{-12} \text{ M}^2$ y $\epsilon_{\text{PAR}2\text{Zn}414\text{nm}}$ $13.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, determinados previamente en las condiciones de reacción ensayadas⁽³⁵⁾.

2.6.3. Medida de actividad en estado estacionario y cuantificación de antibióticos β -lactámicos

Todas las caracterizaciones cinéticas se llevaron a cabo por el método de velocidades iniciales, en medio HEPES 10 mM pH 7,5; NaCl 0,2 M; BSA 50 $\mu\text{g/ml}$, ZnSO_4 , CoSO_4 o CdCl_2 20 μM (según el tipo de variante metálica ensayada), a 30 °C. El progreso de la reacción fue seguido midiendo la absorbancia en función del tiempo, a la longitud de onda en la que se produce la máxima disminución de la absorción debido a la hidrólisis de sustrato (Tabla 1), utilizando valores publicados de los cambios en los coeficientes de absorptividad molar (ϵ) y longitudes de onda (λ) correspondientes^(127, 144). Las medidas se realizaron en espectrofotómetros Jasco V- 550 o Jasco V- 670, y en cubetas de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico. En primer lugar, se determinaron las velocidades iniciales de reacción a distintas concentraciones de sustrato, midiendo el cambio de absorbancia asociado a la hidrólisis del compuesto β - lactámico en función del tiempo. Los puntos de la zona lineal inicial fueron ajustados a una recta cuya pendiente corresponde al valor de

velocidad inicial, en unidades de min^{-1} . Este valor dividido por el $\Delta\epsilon$ correspondiente y por el paso óptico de la cubeta utilizada es la velocidad de reacción en $\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. Se realizaron ajustes no lineales de los datos de velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato a la ecuación de Michaelis- Menten, a partir de los cuales se obtuvieron los parámetros cinéticos k_{cat} y K_M de la enzima frente a cada antibiótico:

$$\frac{v_{inicial}}{[E]} = k_{cat} \times \frac{[S]}{(K_M + [S])}$$

donde [E] corresponde a la concentración de enzima y [S] la de sustrato. En todos los casos se verificó previamente la existencia de una relación lineal entre la velocidad inicial y la concentración de enzima en el rango de concentración de sustrato abarcado. Para el cálculo de k_{cat} se tuvo en cuenta la concentración de la enzima activa, la cual se obtuvo corrigiendo la concentración de enzima según los equivalentes de Zn(II)/molécula determinados, como se describió previamente⁽¹⁴⁵⁾.

Para determinar la concentración de soluciones de sustrato se empleó el método de consumo total, con cantidades catalíticas de diferentes MβLs. La concentración de los antibióticos se estimó finalmente a partir de los valores conocidos de absortividad diferencial ($\Delta\epsilon$), presentados en la Tabla 1.

Tabla 1: λ y $\Delta\epsilon$ utilizados para seguir las reacciones de hidrólisis espectrofotométricamente y cuantificar sustratos.

Sustrato	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Imipenem	300	-9.000
Meropenem	300	-6.500
Ertapenem	295	-9.970
Ceftazidima	350	-9.000
Cefepime	260	-10.000
Cefotaxima	260	-7.500
Nitrocefina	485	17.400
Penicilina G	235	-775
Piperacilina	235	-820

2.6.4. Medidas de estabilidad térmica

Para la realización de estas medidas se utilizó el compuesto SyproOrange (Sigma). Este compuesto se une a los residuos hidrofóbicos de las proteínas desplegadas, cambiando

su espectro de fluorescencia. Se realizaron mezclas de 20 μg de proteínas holo o apo y 2 μL de SyproOrange 300 X, en solución amortiguadora HEPES, previamente tratada con Chelex 100 (Sigma) para eliminar trazas de metal, en tubos aptos para ser utilizados en un termociclador en tiempo real. Los cambios en la intensidad de la fluorescencia en las diferentes mezclas fueron medidos por triplicado en un termociclador de tiempo real Realpex (Eppendorf), donde se realizó un gradiente de temperatura de 15°C a 80°C y se registraron los cambios de fluorescencia emitida entre 520 y 550 nm. La variación de fluorescencia en función de la temperatura fue ajustada al modelo no lineal de sigmoidea de Boltzmann, cuyo punto medio corresponde al valor de temperatura de melting (T_M) para cada enzima⁽¹⁴⁶⁾. Los valores informados corresponden a un promedio de los triplicados obtenidos para medidas independientes.

2.7. Técnicas vinculadas al estudio de las variantes metálicas

2.7.1. Preparación de apo-enzimas

Para obtener muestras de apo-enzimas de NDM-1 y de las variantes en el L3 se procedió como había sido puesto a punto en nuestro laboratorio para BcII⁽¹⁴⁵⁾. Una fracción de la muestra de proteína purificada se sometió a dos pasos de diálisis contra 100 volúmenes de la solución amortiguadora HEPES con 20 mM del quelante EDTA. La eliminación de quelante se realizó mediante dos pasos de diálisis contra 100 volúmenes de una solución HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 2 M. El exceso de sal fue extraído a través de tres pasos de diálisis contra 100 volúmenes de solución amortiguadora HEPES. Cada paso de diálisis tuvo una duración de al menos 6 horas y todo el procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. Todas las soluciones reguladoras utilizadas fueron tratadas con la resina Chelex 100 (Sigma) para extraer trazas de cationes divalentes.

2.7.2. Preparación y estudio de las variantes con Co(II)

La obtención de las variantes metálicas se realizó por adición lenta y en frío, de una solución de CoSO_4 a muestras de proteína apo de concentración entre 300 y 500 μM . Los agregados correspondieron a 0,1 equivalentes de proteína y la muestra se homogeneizó luego de cada adición. El CoSO_4 se disolvió en agua destilada hasta una concentración aproximada de 100 μM . La concentración de metal en la solución fue cuantificada por su

$\epsilon_{515\text{nm}}$ de $4,6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para efectuar la titulación, se realizó una dilución 1/10 de la preparación en solución amortiguadora HEPES.

La incorporación de Co(II) fue seguida por espectroscopía de absorción, en el rango 300-750 nm, en cubetas de 1 cm de paso óptico. Del gráfico de los cambios de absorbancia observados a diferentes longitudes de onda contra la cantidad de equivalentes de Co(II) agregados, pudo obtenerse la cantidad de equivalentes de Co(II) incorporados por la preparación. Esta cantidad corresponde al punto en que se produce la intersección de las rectas definidas por los puntos iniciales y finales de la titulación, como se muestra en la Figura 11 B. En todas las titulaciones realizadas, la cantidad de equivalentes de Co(II) incorporados fue igual a los equivalentes de Zn(II) que la proteína poseía originalmente. La obtención de los valores de ϵ para las longitudes de onda donde se observaba mayor cambio, se obtuvo de graficar los valores de absorbancia obtenidos en el punto final de la titulación contra la concentración de enzima; los datos provinieron de preparaciones independientes de enzima.

2.7.3. Preparación y estudio de las variantes con Cd(II)

En un primer intento, la incorporación de Cd(II) a la proteína apo se realizó a partir de una solución de $^{113}\text{CdCl}_2$ que había sido preparada por la disolución de 5,5 mg de ^{113}CdO en 50 μL de HCl 37% V/V y adicionando, luego, 450 μL de HEPES 100 mM pH 7,5, NaCl 200 mM. Cuando se realizaron agregados de 0,1 equivalentes de esta solución a la preparación de apo-proteína, se observó la formación de un precipitado blanco que se resuspendió rápidamente. Luego de agregar 4 equivalentes de metal a la solución proteica, no se observó actividad al mezclar 2 μL de preparación con 2 μL de nitrocefina 100 μM (la hidrólisis de nitrocefina se evidencia por un cambio de color de amarillo a rojo, propio del compuesto hidrolizado). La inactividad de la proteína metalada con Cd(II) había sido reportado anteriormente⁽¹¹⁰⁾.

A fin de evitar la formación de turbidez, se adicionaron 30 μL de NaOH 10 N a 500 μL de la solución anterior, más 500 μL de HEPES 100 mM pH 7,5, NaCl 200 mM. Esto dio lugar a una solución de $^{113}\text{CdCl}_2$ 40 mM, pH 7,5. Se realizaron agregados de 0,1 equivalentes de Cd(II) a la solución de apo-proteína mantenida a 4 °C y se homogeneizó la solución luego de cada agregado. En este caso no se observó turbidez y la proteína mostró actividad durante la prueba rápida con nitrocefina y en las siguientes determinaciones de actividad.

La incorporación de Cd(II) a ambos sitios metálicos fue estudiada por resonancia magnética nuclear (RMN) de $^{113}\text{Cd(II)}$ utilizando un protocolo puesto a punto para otras MβLs^(145, 147). Se utilizó una preparación de 2 mM de bi- $^{113}\text{Cd(II)-NDM-1}$ disuelta en HEPES 100 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, 5% D₂O. Para estudiar la formación del complejo enzima:inhibidor, se agregaron 2 mM del compuesto L-CS319, para obtener una relación 1:1 del complejo. El volumen final de muestra fue 500 μL y la temperatura fue mantenida a 298 K durante la adquisición. Los experimentos fueron realizados en un espectrómetro Bruker Avance II 600 a 133 MHz. La referencia externa utilizada fue Cd(ClO₄)₂. Los espectros se registraron haciendo uso de una sonda de detección directa (BBO) operando a 133 MHz. Cada espectro se adquirió acumulando 400.000 FIDs usando 32.768 puntos con un tiempo de adquisición de 100 ms, un ancho espectral de 160.000 Hz (1.200 ppm) y un tiempo de relajación de 500 ms. Las FIDs se procesaron multiplicándolas por un factor pre-exponencial de 800 Hz antes de la transformada de Fourier. El tiempo de adquisición total de cada espectro fue superior a las 50 h. Los espectros fueron procesados y analizados con TopSpin 3.0.

2.8. Técnicas aplicadas al estudio del mecanismo de reacción

2.8.1. Medidas de cinética transiente

Los experimentos de cinética transiente se realizaron en un espectrómetro de mezcla rápida y flujo detenido Applied Photophysics SX.18-MVR, acoplado a un arreglo de fotodiodos que permite registrar espectros entre los 300-720 nm, a partir de los 2 ms de reacción, con un tiempo de integración de 1,28 ms. La temperatura de la unidad de mezcla (jeringas de reactivos y celda de medida) se controló con un baño y circulador termostatzado Lauda RC6 y fue mantenida a 6 °C. La celda de medida tiene un volumen de 20 μl; es prismática, sus dimensiones son 0,1 x 0,2 x 1,0 cm, y las medidas se efectuaron a través del paso óptico de 1,0 cm. En todos los casos, la apertura de los monocromadores fue de 2 mm. La referencia se fijó con la solución amortiguadora utilizada para los ensayos: HEPES 100 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M, ZnSO₄ 0,3 mM o 2 equivalentes de CoSO₄. Los reactivos fueron almacenados en jeringas de 2,5 mL. Todas las mezclas se realizaron en relaciones 1:1 de ambos reactivos, las concentraciones de enzima y sustrato reportadas en las secciones de resultados son las presentes en el medio de reacción.

2.8.2. Ajuste de los datos a diferentes modelos de reacción

El conjunto de datos correspondientes a los cambios de la absorbancia a distintas longitudes de onda se ajustaron simultáneamente a diversos modelos cinéticos mediante análisis por regresión no lineal empleando el programa DynaFit4⁽¹⁴³⁾. Los coeficientes de extinción molar conocidos fueron fijados. Los valores de ϵ utilizados para realizar los ajustes de la hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1 fueron: $\epsilon_{E\ 300nm} = 4.937\ M^{-1}.cm^{-1}$, $\epsilon_{E\ 390nm} = 46\ M^{-1}.cm^{-1}$, $\epsilon_{S\ 300nm} = 7.210\ M^{-1}.cm^{-1}$, $\epsilon_{S\ 390nm} = 67\ M^{-1}.cm^{-1}$, $\epsilon_{EP\ 300nm} = 5.568\ M^{-1}.cm^{-1}$, $\epsilon_{EP\ 390nm} = 86\ M^{-1}.cm^{-1}$, $\epsilon_{P\ 300nm} = 630\ M^{-1}.cm^{-1}$ y $\epsilon_{P\ 390nm} = 40\ M^{-1}.cm^{-1}$. Los valores de ϵ empleados para realizar los ajustes de la hidrólisis de imipenem por bi-Co(II)-NDM-1 fueron: $\epsilon_{E\ 412nm} = 409\ M^{-1}.cm^{-1}$, $\epsilon_{E\ 567nm} = 295\ M^{-1}.cm^{-1}$, $\epsilon_{E\ 642nm} = 239\ M^{-1}.cm^{-1}$, $\epsilon_{S\ 412nm} = 15\ M^{-1}.cm^{-1}$ y $\epsilon_{P\ 300nm} = 630\ M^{-1}.cm^{-1}$.

Las simulaciones de especies fueron realizadas con el programa DynaFit 3⁽¹⁴³⁾. Para ello se le proporcionó al programa el mecanismo de reacción y los valores de constantes cinéticas calculadas y conocidas.

2.8.3. Titulación de bi-Co(II)-NDM-1 con imipenem hidrolizado

Para estudiar la formación de un complejo enzima:producto estable entre bi-Co(II)-NDM-1 e imipenem hidrolizado, se procedió a la titulación de la enzima con cantidades crecientes del producto hidrolizado por cantidades mínimas de la enzima. El proceso fue seguido en un espectrofotómetro Jasco V- 670, termostatzado a 4°C. La condensación de la cubeta fue evitada por medio del flujo de N₂. La reacción fue realizada en HEPES 100 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M, CoSO₄ 1,5 mM. La concentración de enzima utilizada fue 705 μ M y el imipenem hidrolizado varió de 93 μ M a 3,9 mM. La variación de absorbancia observada a 680 nm fue ajustada al modelo $E + P \leftrightarrow EP$, utilizando el programa DynaFit 4⁽¹⁴³⁾. La constante de equilibrio obtenida (K_{eq}) fue $1,1 \pm 0,1$ mM.

2.8.4. RMN de ¹H de los productos de hidrólisis de imipenem

Los productos resultantes de la hidrólisis de imipenem catalizada por bi-Zn(II)-NDM-1 y HCl fueron monitoreadas por RMN de ¹H. Las soluciones de 2 mg/mL de imipenem en Na₂PO₄ 100 mM pH 7, en 100 % D₂O, fueron incubadas con enzima o ácido a 25 °C, hasta la completa hidrólisis del compuesto, la cual fue monitoreada por espectroscopía de absorción. Se insertaron en un tubo de RMN 500 μ L de la mezcla y se

realizó un espectro de RMN 1D en un equipo Bruker Avance de 600 MHz, equipado con una sonda TXI. Se utilizó un ancho espectral de 10.204 Hz y se realizaron 64 escaneos. Las FIDs se procesaron multiplicándolas por un factor pre-exponencial de 1 Hz antes de realizar la transformada de Fourier. Los espectros fueron procesados y analizados con TopSpin 3.0. La asignación de las señales fue tomada de Ratcliffe *et al.* 1989⁽¹⁴⁸⁾. Todos los espectros de la serie fueron graficados en la misma escala.

Capítulo 3. Caracterización Bioquímica y Biofísica de NDM-1

3.1. Introducción: uso de la sustitución de metal para generar sondas espectroscópicas en MβLs

La estructura de NDM-1 soluble ha sido estudiada por cristalografía de rayos X, donde se ha visto que esta enzima posee dos iones Zn(II) esenciales, que se encuentran coordinados a los residuos que forman el sitio activo (Sección 1.2.4.ii y Figura 4)^(97, 99-102). El Zn es el metal de transición más abundante después del Fe, y su abundancia natural es de 65 ppm. Este metal no exhibe química redox, debido a que su único estado de oxidación es Zn(II), lo que impide reacciones colaterales indeseadas como pueden ocurrir con complejos de Cu(II) y Fe(II). El Zn(II) es un ion de configuración electrónica d¹⁰, por lo cual no hay geometría de coordinación favorecida por efectos estabilizadores del campo cristalino. Las geometrías de coordinación en enzimas de Zn(II) resultan variadas, incluyendo configuraciones de tipo tetraédrico, piramidal con base cuadrada, bipiramidal trigonal y octaédrica. Esto hace que el requerimiento energético para el cambio del número de geometría de coordinación durante procesos de catálisis sea mínimo⁽¹⁴⁹⁾ y que se vea favorecida la cinética por interacciones con ligandos.

La presencia de iones metálicos en enzimas suele abrir las puertas a estudios conformacionales por medio de diversas técnicas espectroscópicas. Sin embargo, como el Zn(II) posee su capa de electrones d completa, resulta silencioso en la mayoría de las técnicas espectroscópicas utilizadas para el estudio de metaloproteínas⁽¹⁵⁰⁾. Ante la limitación de estudiar espectroscópicamente el ion Zn(II), se ha utilizado abundantemente la sustitución por Co(II) y Cd(II)^(145, 147, 151-158). Estos metales, aunque naturalmente mucho menos abundantes que el zinc (con abundancia natural de 20 ppm y 0,1 ppm, respectivamente), poseen características similares al ion nativo, como ser su radio iónico, electronegatividad y valencia.

El Co(II) es un ion metálico de transición con 7 electrones d que, en su estado de alto spin (el más común en metaloproteínas) posee 3 electrones desapareados ($s = 3/2$).

Esta configuración electrónica hace posible su estudio mediante distintas técnicas espectroscópicas, como la espectroscopía de absorción en el rango UV-visible. El uso de Co(II) como sustituto del Zn(II) en metaloenzimas (inclusive en MβLs) ha sido validado por el hecho de que los derivados presentan actividades comparables a las de las enzimas nativas y retienen, mayormente, la estructura del sitio metálico^(145, 151-155).

La espectroscopía de absorción en el rango UV-visible de Co(II) es útil para estudiar la coordinación de los iones en el caso de que éstos estén en un estado de espín alto. Esto incluye a las transiciones internas y a las de transferencia de carga entre el metal y un ligando. Las transiciones internas o de campo ligando ocurren entre niveles de orbitales d de acuerdo al entorno químico alrededor del ion metálico, dentro del cual la geometría de coordinación juega un rol importante. Es posible inferir la simetría del metal en base a reglas basadas en estudios de complejos de coordinación y de enzimas con Co(II)⁽¹⁵⁹⁾. Los ϵ más bajos fueron observados en especies con geometría octaédrica (coordinación 6) y los más altos fueron para las especies tetraédricas (con número de coordinación 4). Los casos intermedios, como en las especies pentacoordinadas, son los más difíciles de discernir. La transferencia de carga puede darse en dirección metal a ligando o ligando a metal, y dan origen a bandas en la región ultravioleta o visible del espectro. En el caso del ion Co(II) en MβLs, las bandas de transferencia de carga distintivas se encuentran cuando un residuo de Cys es un ligando, lo que vuelve favorable la transferencia de carga desde el ligando al metal. Esto da como resultado una banda de absorción con un alto ϵ (ya que es una transición permitida, a diferencia de las de campo ligando), alrededor de 350 nm.

Al igual que el Zn(II), el Cd(II) posee 10 electrones en su capa d, lo que lo hace espectroscópicamente silencioso e incoloro⁽¹⁶⁰⁾. Sin embargo, existen dos isótopos con spin nuclear $\frac{1}{2}$: ^{113}Cd y ^{111}Cd , que son útiles para realizar estudios espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (RMN)⁽¹⁵⁷⁾. Entre éstos, el ^{113}Cd es más sensible y, por lo tanto, el más utilizado. La resonancia magnética nuclear de cadmio se ha utilizado para el estudio de complejos metálicos, proteínas y otros compuestos de interés biológicos. Si bien se han descrito pocas enzimas que utilicen Cd(II) en la naturaleza^(161, 162), la sustitución de Zn(II) por Cd(II) suele dar origen a proteínas que mantienen su actividad catalítica⁽¹⁵⁷⁾, inclusive MβLs^(147, 156, 158, 163, 164). En contraste con esto, estudios realizados en NDM-1 indican que la enzima sería inactiva al realizar dicha sustitución⁽¹⁰⁰⁾. La realización de estudios utilizando una enzima metalada pero inactiva podría proporcionar información acerca de la coordinación de los metales en complejos enzima:sustrato (ES), ya que de otra forma el sustrato sería degradado y este complejo no podría observarse.

Con el fin de realizar una caracterización bioquímica de la enzima NDM-1 y estudiar la coordinación de los iones metálicos en el sitio activo, se propuso purificar la enzima en su forma soluble y realizar una caracterización cinética de la enzima salvaje, seguido de la sustitución de los iones metálicos nativos por Co(II) y Cd(II), y del estudio de las propiedades espectroscópicas de estas variantes por medio de espectroscopía de absorción UV-visible y RMN, respectivamente.

3.2. Resultados: caracterización de NDM-1 soluble

3.2.1. Expresión y purificación

A diferencia de la mayor parte de las M β Ls, NDM-1 posee en su extremo carboxilo terminal una secuencia de lipidación que es la responsable de que la enzima se localice en la membrana externa de las bacterias y no permanezca soluble en el periplasma^(102, 106). El anclaje a membrana le otorga a NDM-1 la capacidad de ser secretada en vesículas y aumenta su estabilidad. La secuencia de lipidación consta de los residuos LSGC, que se encuentran entre las posiciones 23 y 26. Por lo tanto, para realizar una caracterización bioquímica de la forma soluble de esta enzima, fue necesario realizar una delección del extremo amino-terminal.

En el laboratorio se contaba con un plásmido de la línea pET26 que contenía la secuencia codificante para la proteína NDM-1, extraída de *Klebsiella pneumoniae*, que había sido cedido por nuestro colaborador James Spencer (University of Bristol, Inglaterra). Los grupos que hasta el momento habían logrado purificar NDM-1 en forma soluble lo habían hecho expresando proteínas recombinantes con diferentes delecciones en el extremo amino-terminal^(98, 100-102, 124, 165). Siendo que eran aquellas delecciones de más de 36 aminoácidos las que mostraron mejores rendimientos, se decidió realizar una delección de los primeros 38 aminoácidos de NDM-1 y la proteína resultante fue llamada NDM-1 Δ 38 (aminoácidos 39 a 270). La secuencia codificante para esta proteína fue clonada en el plásmido pET28a(+), entre los sitios *NdeI* y *BamHI*, este vector fue nombrado pET-NDM-1 Δ 38. Esta estrategia permitió la expresión inducible mediante IPTG de la proteína de interés, fusionada a una cola de poli-histidinas en el extremo amino, que podría ser eliminada mediante tratamiento con la proteasa comercial trombina. La expresión se realizó en bacterias de la línea *E. coli* BL21 (DE3) crecidas en medio mínimo (M9) y los extractos proteicos se separaron por cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel sefarosa que interaccionan con la

cola de poli-histidinas. La cola de histidina fue removida por tratamiento con trombina luego de un primer pasaje por la columna. La proteína NDM-1 Δ 38 fue obtenida luego de un segundo paso de purificación, utilizando la misma columna, donde se separó la proteína no cortada de la cola y otras impurezas.

Cuando se sembró el extracto proteico obtenido al finalizar la purificación en un gel SDS-PAGE al 14% (Figura 8), se observaron dos bandas mayoritarias, una que correspondía al peso esperado de 28 kDa y una segunda más pequeña con un peso cercano a 25 kDa. Al no observarse la presencia de la banda pequeña sin realizar el tratamiento con trombina y como ambas proteínas fueron reconocidas al realizar un ensayo de *Western Blot* utilizando anticuerpos anti-NDM, se concluyó que el producto más pequeño era resultado de un corte indeseado realizado por la proteasa.

Si bien no se identificaron regiones similares u homólogas al sitio de reconocimiento de la proteasa dentro de la secuencia de NDM-1, para sortear este problema se decidió reemplazar el sitio de reconocimiento de trombina en el plásmido pET-NDM-1 Δ 38 por el de la proteasa TEV^(137, 138), obteniéndose el vector pET-TEV-NDM-1 Δ 38. Los pasos de inducción y purificación no fueron modificados. En este caso, el tratamiento con TEV no generó ningún producto inespecífico, como se muestra en la Figura 8. Por último, para aumentar la pureza de la muestra, se añadió un tercer paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular con el que se obtuvo un rendimiento promedio de 100 mg/L de proteína y pureza comprobable por SDS-PAGE.

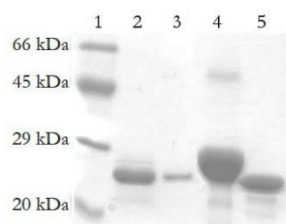


Figura 8: Purificación de NDM-1 Δ 38.

SDS-PAGE que muestra diferentes productos obtenidos durante la puesta a punto de la purificación de NDM-1 Δ 38. Calles: 1- Marcador de peso molecular, 2- NDM-1 Δ 38 expresada con fusión a cola de histidinas con sitio de corte de TEV luego del tratamiento con TEV y antes del segundo paso de purificación, 3- misma proteína que en calle 2 pero luego del pasaje por columna de níquel sefarosa, 4- misma proteína que en calle 2 sin tratamiento con TEV, 5- NDM-1 Δ 38 expresada con fusión a cola de histidinas con sitio de corte de trombina, tratada con trombina, sin purificar.

La correcta incorporación de metal en M β Ls es clave para el óptimo funcionamiento de estas enzimas. La relación de Zn(II)/enzima en cada ciclo de purificación se determinó mediante un ensayo colorimétrico con el reactivo 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) en condiciones desnaturalizantes (como se detalla en la Sección 2.6.1). Se considera que una preparación de M β L que requiera de dos iones Zn(II) para su funcionamiento es buena si la relación de Zn(II)/enzima de la preparación es mayor a 1,6. Esto significa que el 80 % de las proteínas de la preparación se encuentran correctamente metaladas. En las pruebas iniciales de purificación, la relación entre la cantidad de iones Zn(II) y la cantidad de enzima era cercana a 1, lo que indicaba que se trataba de una población heterogénea, donde cerca del 50% de las proteínas no contenían metal y, por lo tanto, eran inactivas. Para aumentar esta relación, fue necesario suplementar el medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano con 0,5 mM de ZnSO₄ al momento de la inducción y realizar dos pasos de diálisis contra HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM; ZnSO₄ 300 μ M al finalizar los pasos de purificación. En promedio, las purificaciones realizadas siguiendo este protocolo mejorado contuvieron 1,7 equivalentes de Zn(II) por enzima. En todos los experimentos realizados, la cantidad de proteína activa fue calculada teniendo en cuenta el contenido de metal de cada preparación⁽³⁵⁾.

3.2.2. Medidas de actividad en estado estacionario

Para estudiar la capacidad de NDM-1 de hidrolizar diferentes sustratos, se realizaron medidas de actividad contra representantes de las diferentes familias de antibióticos β -lactámicos. Los experimentos se efectuaron midiendo la cinética de consumo de sustrato por espectroscopía de absorción, bajo condiciones de estado estacionario, a 30 °C. Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación integrada de Michaelis-Menten (Sección 2.6.3). En todos los casos, el medio de reacción contuvo 20 μ M de ZnSO₄ para evitar la disociación de metal durante el proceso de hidrólisis⁽³⁵⁾. Los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Los valores obtenidos para k_{cat}/K_M indican que la forma soluble purificada de NDM-1 posee amplio espectro de sustrato, al igual que todas las M β Ls B1. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros grupos, inclusive por aquellos que habían utilizado otras construcciones para purificar NDM-1^(86, 98, 100, 166, 167). Excluyendo a los valores observados para nitrocefina, que es un compuesto que no posee actividad clínica pero que es eficientemente hidrolizado por M β Ls, las k_{cat} para los diferentes sustratos

ensayados se encuentran en el mismo orden de magnitud. Dentro de los carbapenemes, NDM-1 posee preferencia por ertapenem ya que la K_M observada es 6 veces menor que para otros carbapenemes. No se observan preferencias dentro de la familia de las cefalosporinas o de las penicilinas.

Tabla 2: Parámetros cinéticos en estado estacionario medidos para bi-Zn(II)-NDM-1.

	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
Imipenem	150 ± 30	570 ± 30	4 ± 1
Meropenem	140 ± 20	960 ± 40	7 ± 1
Ertapenem	25 ± 2	420 ± 10	17 ± 2
Ceftazidima	60 ± 10	620 ± 20	10 ± 2
Cefepime	50 ± 10	300 ± 20	6 ± 2
Nitrocefina	$1,3 \pm 0,3$	38 ± 2	29 ± 8
Penicilina G	80 ± 10	690 ± 20	8 ± 1
Piperacilina	120 ± 10	1190 ± 40	10 ± 1

Medidas realizadas en base a la cinética de consumo de sustrato por espectroscopía de absorción, bajo condiciones de estado estacionario. Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten. El medio de reacción utilizado fue HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, ZnSO₄ 20 μM y BSA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La temperatura se mantuvo a 30 °C

3.2.3. Estimación de las constantes de afinidad por Zn(II)

Al ser el Zn(II) un cofactor esencial de NDM-1, la afinidad de la enzima por este metal es clave para su correcto funcionamiento. Las constantes de disociación (K_d) de Zn(II) en M β Ls suelen estar en el rango de los nM^(35, 38), mientras que otras enzimas periplasmáticas que utilizan Zn(II) (como la fosfatasa alcalina) poseen constantes de disociación en el rango de los pM⁽¹⁶⁸⁾. Para medir la afinidad por este metal se ha propuesto realizar un estudio por competencia con el quelante cromogénico PAR^(35, 142), el cual también ha sido empleado exitosamente para medir afinidades por Zn(II) en otras proteínas⁽¹⁶⁹⁻¹⁷¹⁾. La afinidad del PAR por el Zn(II) (a diferencia de otros compuestos como Mag-Fura⁽¹⁷⁰⁾) se encuentra en el mismo orden que la de las M β Ls⁽³⁵⁾, haciendo posible estudiar la competencia en forma correcta. El PAR presenta en su forma libre un máximo de absorción a 414 nm y el espectro del mismo varía al complejarse con metales divalentes. En el caso del complejo (PAR)₂Zn, el máximo de absorbancia se encuentra a 500 nm (Figura 9 A). Por lo tanto, mediante el estudio de las variaciones de absorbancias a 414 nm y a 500 nm puede determinarse la concentración de PAR libre y complejo en una mezcla

de PAR y Zn(II) en la que se realizan agregados sucesivos de M β L en forma apo (sin metal). Las variaciones de absorbancia a estas longitudes de onda pueden ajustarse a diferentes modelos de competencia y así determinar las constantes de afinidad de la enzima por el metal.

Para realizar este ensayo con NDM-1, fue necesario obtener la enzima en su forma apo (sin metal), lo que se hizo mediante tratamiento con el quelante EDTA (Sección 2.7.1). La constante de disociación del complejo (PAR)₂Zn en las condiciones de reacción utilizadas había sido medida anteriormente en nuestro grupo⁽³⁵⁾. Los espectros obtenidos para el ensayo de competencia con una solución 6 μ M de PAR se muestran en la Figura 9 B.

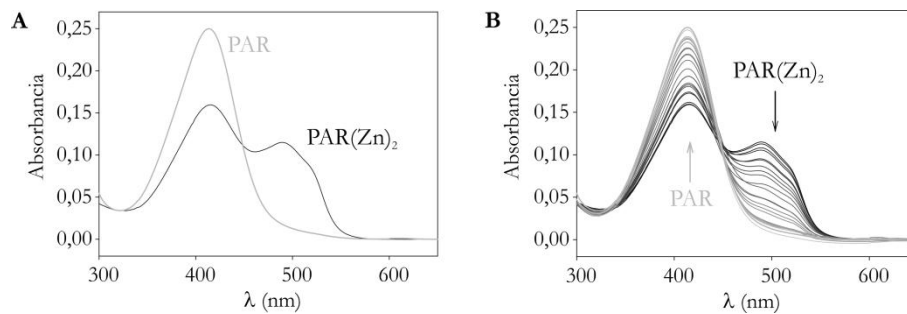


Figura 9: Competencia por Zn(II) entre el quelante cromogénico PAR y la apo- proteína NDM-1.

Espectros de absorción correspondientes a experimentos de competencia por Zn(II) (1,5 μ M) entre el quelante cromogénico PAR (6 μ M) y la apo-proteína NDM-1. A: Espectro inicial de la titulación, sin agregado de enzima (negro), y espectro final donde solo que observa PAR libre (gris claro). B: Progreso de los espectros adquiridos durante la titulación por el agregado de enzima (transición de negro a gris claro). La disminución del complejo (PAR)₂Zn se indica con una flecha sobre la banda a 500 nm, donde se observa el máximo de absorbancia del complejo; el aumento del PAR libre (producido por el agregado de enzima) se evidencia por un aumento de la absorbancia a 414 nm.

Los cambios de absorbancia a 414 nm y 500 nm observados durante el experimento pudieron ser ajustados, utilizando el programa DynaFit 3⁽¹⁴³⁾, a un modelo en el que NDM-1 incorpora dos iones metálicos en forma secuencial, como se muestra en la Figura 10. De esta forma fue posible obtener los valores de las constantes de disociación macroscópicas del primer y segundo evento de unión:

- K_{d1} : 6 ± 4 nM
- K_{d2} : 17 ± 6 nM

Puede observarse que la incorporación del primer ion metálico es levemente más favorable que la incorporación del segundo, sin embargo ambas constantes de disociación son similares y están en el rango nanomolar.

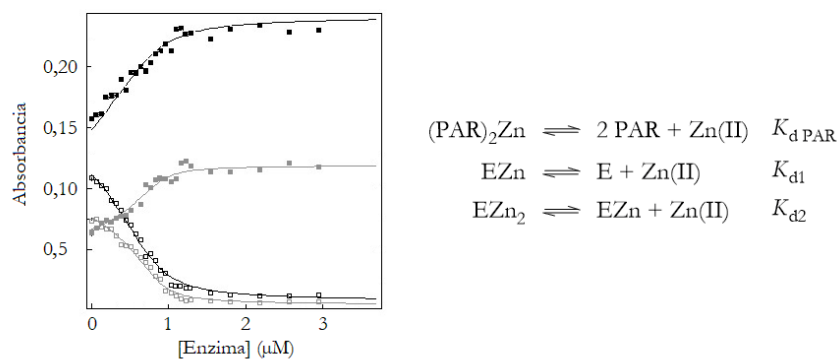


Figura 10: Determinación de la constante de afinidad por Zn(II) de NDM-1.

Ensayo de competición con PAR para la determinación de la afinidad por Zn(II) de NDM-1. Se agregaron concentraciones crecientes de apo-proteína a una solución que contenía ZnSO₄ 1,5 μM y PAR 6 μM (negro) o 3 μM (gris). Los cambios de absorbancia a 414 nm (puntos rellenos) corresponden a la presencia de PAR libre y los cambios a 500 nm (puntos sin relleno) corresponden al complejo (PAR)₂Zn. A medida que la cantidad de enzima aumenta, se observa un aumento del PAR libre y una disminución del complejo (PAR)₂Zn. Las medidas se realizaron en solución amortiguadora MOPS 40 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3, previamente tratada con Chelex 100, a 25°C. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas. Los ajustes (líneas continuas) se realizaron con el programa DynaFit3⁽¹⁴³⁾ en base al modelo que se muestra a la derecha.

3.2.4. Empleo de Co(II) como sonda espectroscópica en NDM-1

Con el fin de estudiar la coordinación de los iones metálicos en el sitio activo de NDM-1 mediante espectroscopía de absorción UV-visible, se reemplazaron los iones Zn(II), naturalmente presente en la enzima, por Co(II). Como se explicó en la introducción de este capítulo, el Co(II) ha sido ampliamente utilizado para reemplazar al Zn(II). El primer paso en la obtención de este derivado fue la generación de apo-NDM-1 la cual se realizó mediante diálisis con EDTA (Sección 2.7.1). La proteína sustituida con Co(II) se obtuvo mediante una lenta adición de CoSO₄ disuelto en HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM a la solución proteica. La metalación fue monitoreada mediante espectros de absorción realizados luego de cada agregado de 0,1 equivalentes de Co(II).

En la Figura 11, pueden observarse los espectros diferenciales obtenidos durante la titulación. A medida que comienza a incorporarse Co(II) aumentan las bandas características de la proteína bi-Co(II)-NDM-1 y este aumento se detiene cuando la

proteína deja de incorporar metal. A 321 nm puede observarse una banda de transferencia de carga ligando-metal, producto de la interacción de la Cys221 con el ion Co(II) que ocupa el sitio DCH. Entre 500 nm y 750 nm se observa el patrón de 5 bandas de campo ligando (bandas d-d), que son producto de la coordinación en el sitio activo de los dos iones metálicos. Los λ_{\max} de estas bandas son: 518 nm, 550 nm, 615 nm, 638 nm y 685 nm. Al graficar los cambios de absorbancia durante la titulación a las λ_{\max} de las bandas más intensas (321 nm, 550 nm y 615 nm), puede observarse que todas las rectas aumentan al mismo tiempo (Figura 11 C).

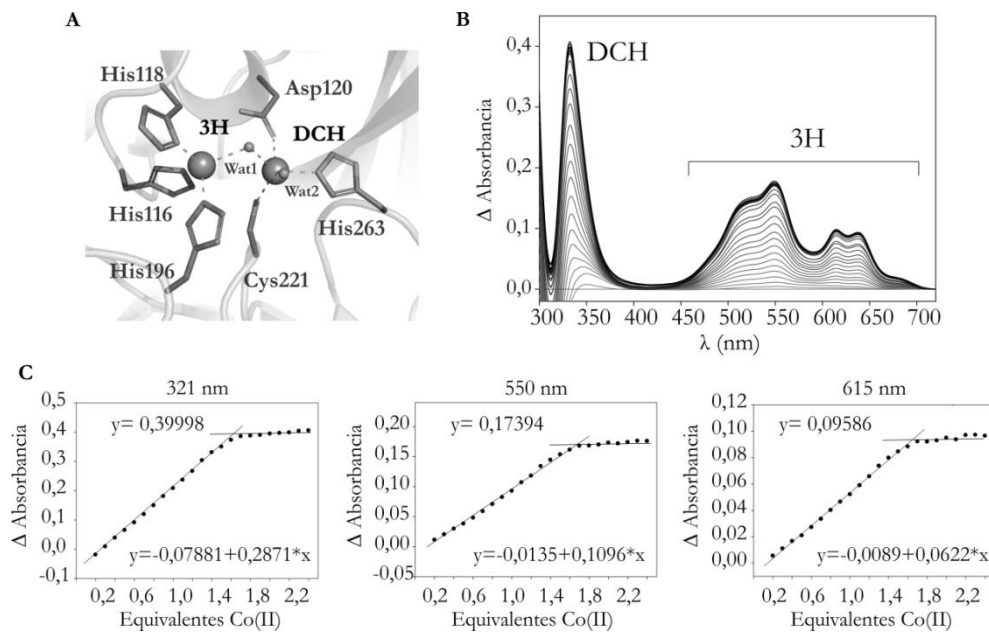


Figura 11: Titulación de apo-NDM-1 con CoSO₄

A: Sitio activo de NDM-1. B: Espectros diferenciales obtenidos durante la titulación de apo-NDM-1 (413 μ M) con CoSO₄ en HEPES 10 mM pH 7,5 y NaCl 200 mM. Se realizó un espectro por cada agregado de 0,1 equivalentes de Co(II) y se graficaron de gris a negro en función del incremento en la concentración de metal. Los espectros diferenciales fueron obtenidos por sustracción del espectro de la apo enzima y fueron normalizados llevando a valor cero la absorbancia medida a 720 nm. B: Cambios en la intensidad de absorbancia a 321 nm, 550 nm y 615 nm en función de los equivalentes de Co(II) agregados (puntos). Las líneas rectas indican el ajuste a las ecuaciones lineales de los cambios de absorbancia observados; las ecuaciones correspondientes se indican en los gráficos. En todos los casos los valores de R fueron mayores a 0,98. Mediante cálculos realizados en base a los ajustes, pudo obtenerse la cantidad de equivalentes de Co(II) incorporados por la enzima; en este caso el valor fue de 1,7 equivalentes con todas las longitudes de onda analizadas, lo que se corresponde con la cantidad inicial de Zn(II) de la enzima.

El punto final de la titulación puede definirse por la intersección de las rectas obtenidas al realizar un ajuste lineal de los puntos iniciales y finales. Las ecuaciones correspondientes a estos ajustes se muestran en los gráficos de la Figura 11 C. Para todas las longitudes de onda analizadas el punto de intersección se observa a 1,7 equivalentes de Co(II). Esta cantidad de equivalentes se corresponde con la cantidad de Zn(II) que tenía la proteína antes del proceso de remoción de metal. Esto indica que, igual que ocurre en otras MβLs^(145, 172), NDM-1 fue estable durante el proceso.

Para obtener los valores de los coeficientes de absorptividad molar (ϵ) de las bandas de mayor intensidad de la proteína bi-Co(II)-NDM-1, fue necesario realizar preparaciones de enzima independientes y graficar las absorbancias observadas en el punto final de la titulación contra la concentración de enzima. De la pendiente de las gráficas pudo estimarse: $\epsilon_{321\text{nm}} = 3777 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{550\text{nm}} = 516 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{615\text{nm}} = 282 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

De acuerdo a las estructuras cristalográficas de la enzima bi-Zn(II)-NDM-1^(100, 102) (Figura 11 A), el metal del sitio 3H presenta coordinación tetraédrica mientras que el del sitio DCH se encuentra pentacoordinado (adoptando una geometría bipiramidal trigonal). Los valores de $\epsilon_{550\text{nm}}$ y $\epsilon_{615\text{nm}}$ corresponderían a un ion con geometría tetraédrica distorsionada⁽¹⁵⁹⁾, lo que indica que serían producto del Co(II) del sitio 3H. La coordinación del Co(II) del sitio DCH hace que sus bandas sean muy poco intensas ($\epsilon \approx 20 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), por lo que su contribución se solapada por las bandas más intensas. En consecuencia, las bandas d-d observadas se deben principalmente al Co(II) que ocupa el sitio 3H y en menor medida al que ocupa el sitio DCH. La intensa banda de transferencia de carga a 321 nm es típica de la interacción de una Cys (Cys 221 del sitio DCH) con el Co(II).

Por último, para comprobar que el Co(II) sea un buen sustituto funcional del Zn(II), se determinaron los parámetros cinéticos en estado estacionario de la variante frente a diferentes sustratos (Tabla 3). Los valores de eficiencia catalítica de la enzima sustituida se encuentra en el mismo orden de magnitud que la enzima con el ion nativo. La leve disminución observada se debe principalmente a una disminución de los valores de k_{cat} , que llega a ser hasta 5 veces menor para imipenem. Al ser la caída en la actividad pequeña y comparable a la disminución observada con otras enzimas sustituidas⁽¹²⁶⁾, se puede afirmar que el Co(II) es un excelente sustituto del Zn(II) en esta enzima. La baja en la actividad podría presentarse como una ventaja al momento de estudiar los pasos catalíticos de la reacción de hidrólisis, ya que sería más fácil observar especies de vida media corta.

Tabla 3: Parámetros cinéticos en estado estacionario para bi-Zn(II) y bi-Co(II)-NDM-1.

		K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
Imipenem	bi-Zn(II)-NDM-1	150 ± 30	570 ± 30	4 ± 1
	bi-Co(II)-NDM-1	80 ± 30	99 ± 6	$1,2 \pm 0,5$
Ceftazidima	bi-Zn(II)-NDM-1	60 ± 10	620 ± 20	10 ± 2
	bi-Co(II)-NDM-1	46 ± 9	310 ± 10	6 ± 1

Medidas realizadas en base a la cinética de consumo de sustrato por espectroscopía de absorción, bajo condiciones de estado estacionario. Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten. El medio de reacción utilizado fue HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, ZnSO_4 20 μM o CoSO_4 20 μM (según el caso) y BSA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La temperatura se mantuvo a 30 °C

3.2.5. Empleo de Cd(II) como sonda espectroscópica en NDM-1

Como técnica adicional para el estudio del sitio activo de NDM-1 se propuso realizar espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) utilizando una variante de la enzima sustituida con $^{113}\text{Cd(II)}$. Para obtener la variante metalo-sustituida, se adicionaron 4 equivalentes de Cd(II) a partir de una solución concentrada de $^{113}\text{CdCl}_2$ pH 7,5 a una muestra de apo-enzima. Los agregados fueron realizados en frío y homogeneizando lentamente luego de cada alícuota. Realizando una prueba rápida de actividad frente al sustrato colorimétrico nitrocefina, se comprobó que la muestra proteica poseía actividad hidrolítica, en contraste con resultados previos de otros grupos⁽¹¹⁰⁾. Si la solución de $^{113}\text{CdCl}_2$ no era llevada a pH luego de su preparación y el proceso no era realizado en frío, la enzima resultante de la titulación carecía de actividad, como se explica en la Sección 2.7.3.

La correcta unión de $^{113}\text{Cd(II)}$ a la proteína sustituida, fue corroborada mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{113}Cd . En el espectro presentado en la Figura 12 se observan dos señales a 263 ppm y 86 ppm. Los desplazamientos químicos de $^{113}\text{Cd(II)}$ dependen de su entorno inmediato reflejando, principalmente, la naturaleza y número de ligandos y, en menor medida, la geometría de coordinación⁽¹⁵⁷⁾. Los iones $^{113}\text{Cd(II)}$ coordinados únicamente a átomos de oxígeno, presentan señales alrededor de 0 ppm. En cambio, en los ligandos con dadores de oxígeno y nitrógeno, las señales se ubican entre los 100 y 250 ppm. Al incorporar ligandos con átomos de azufre unidos, las señales se desplazan más allá de los 250 ppm. De esta información puede concluirse que la señal a 86 ppm debería corresponder a coordinaciones con átomos de oxígeno, como las que ocurren con las histidinas en el sitio 3H (Figura 11 A). El metal del sitio DCH está

coordinado a átomos de O (His263), N (Asp 120) y S (Cys221); esta variedad de ligandos produciría un desplazamiento químico mayor, por lo que su señal corresponde a la observada a 263 ppm.

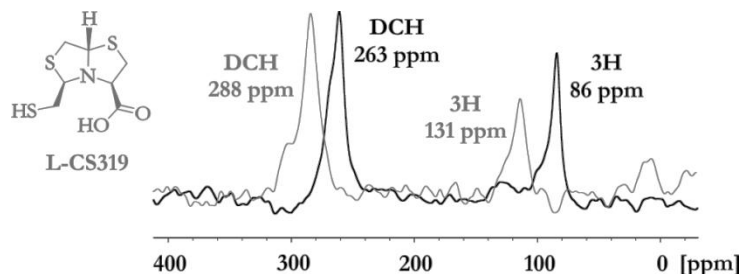


Figura 12: Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{113}Cd de bi- $^{113}\text{Cd}(\text{II})$ -NDM-1.

Espectros obtenidos de una solución 2 mM de enzima (negro) y de 2 mM de enzima con 2 mM de inhibidor L-CS319 (gris), disueltos en HEPES 10 mM pH 7,5 y NaCl 200 mM, a 25 °C. Se pueden diferenciar dos señales correspondientes a los iones en cada sitio metálico (sitio DCH y sitio 3H), que se desplazan en presencia del inhibidor.

En el laboratorio se desarrolló una serie de compuestos inhibidores de M β Ls (inclusive NDM-1) que poseen esqueleto de bistiazolidinas^(63, 79). Estos compuestos son biciclos que mimetizan la estructura de las penicilinas y poseen además un grupo tiol que interacciona a puente con los iones metálicos (Sección 1.2.5 y Figura 6). En la Figura 12 se observa un corrimiento a bajo campo de las señales provenientes de los metales ubicados en los sitios 3H y DCH (131 y 288 ppm, respectivamente) ante el agregado de la bistiazolidina L-CS319. Este desplazamiento a campos bajos es consistente con la unión del grupo tiol de este inhibidor a ambos iones $^{113}\text{Cd}(\text{II})$, que suman un ligando con átomo de S.

Para evaluar la actividad de la enzima bi-Cd(II)-NDM-1, se determinaron los parámetros cinéticos en estado estacionario (Tabla 4). A diferencia de lo reportado anteriormente⁽¹¹⁰⁾, la enzima exhibió eficiencias catalíticas comparables a la enzima salvaje frente a imipenem y penicilina G. Si bien hay una disminución en los valores de K_M y k_{cat} , estas son proporcionales y no afectan considerablemente a la eficiencia catalítica. No fue posible obtener los parámetros cinéticos para la hidrólisis de ceftazidima y cefepime ya que se observó una inhibición de la actividad enzimática antes de que se alcanzara la velocidad máxima de hidrólisis. Con la enzima salvaje se observó inhibición en la actividad causada por estos sustratos pero sólo cuando éstos se encontraban en concentraciones tres veces mayores al valor de K_M .

Tabla 4: Parámetros cinéticos en estado estacionario para bi-Zn(II) y bi-¹¹³Cd(II)-NDM-1.

		K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
Imipenem	bi-Zn(II)-NDM-1	150 ± 30	570 ± 30	4 ± 1
	bi- ¹¹³ Cd(II)-NDM-1	40 ± 20	77 ± 4	2 ± 1
Penicilina G	bi-Zn(II)-NDM-1	80 ± 10	690 ± 20	8 ± 1
	bi- ¹¹³ Cd(II)-NDM-1	80 ± 20	200 ± 10	$2,5 \pm 0,7$

Medidas realizadas en base a la cinética de consumo de sustrato por espectroscopía de absorción, bajo condiciones de estado estacionario. Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten. El medio de reacción utilizado fue HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, ZnSO₄ 20 μM o ¹¹³CdCl₂ 20 μM (según el caso) y BSA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La temperatura se mantuvo a 30 °C.

3.3. Discusión: estudio de la coordinación de los iones metálicos en NDM-1

Al iniciar este trabajo de Tesis se creía que todas las M β LS se expresaban naturalmente en forma soluble. Más tarde, resultados del grupo mostraron que NDM-1 y todas sus variantes alélicas se expresaban ancladas a la membrana externa bacteriana⁽¹⁰⁶⁾. Este anclaje era debido a la presencia de la secuencia de lipidación LSGC que se encuentra en el extremo amino-terminal. Para lograr obtener la enzima en forma soluble fue necesario realizar una deleción de esta secuencia. En base a la bibliografía disponible en ese momento, se vio que los mejores resultados eran obtenidos al realizar una deleción de los primeros 38 aminoácidos^(98, 100-102, 165). Realizada esta construcción, fue posible obtener la proteína soluble con buen rendimiento, pureza y contenido de Zn(II). La enzima soluble purificada fue activa frente a antibióticos β -lactámicos de diferentes familias, como había sido reportado anteriormente^(86, 98, 100, 166, 167).

La afinidad por Zn(II) de NDM-1 se determinó por competencia con el quelante colorimétrico PAR. El análisis de estos experimentos reveló que la incorporación de los iones metálicos se produce en forma secuencial. Los valores de constantes obtenidos se encuentran en el mismo rango que los determinados para BcII ($K_{d1} = 2 \pm 3$ nM y $K_{d2} = 9 \pm 4$ nM)⁽³⁵⁾ y VIM-2 ($K_{d1} = 2,9 \pm 0,9$ nM y $K_{d2} = 7,2 \pm 0,8$ nM, resultados no publicados de nuestro grupo). En general, las hidrolasas dependientes de Zn(II) muestran afinidades por estos iones con valores de K_d en el rango pM o menor, por lo cual las M β LS no se encuentran entre las enzimas que son capaces de competir fuertemente por la unión a Zn(II).

Se comprobó que los iones Co(II) y Cd(II) pueden emplearse como sondas espectroscópicas funcionales en NDM-1. Si bien las eficiencias catalíticas ensayadas fueron menores que para la enzima con Zn(II), esta disminución no fue mayor a un orden de magnitud, con lo que no se considera una disminución significativa.

La eficiencia de la sustitución por Co(II) en NDM-1 también fue reportada por Yang *et al.*⁽¹⁷³⁾. La utilización de Co(II) como sonda espectroscópica abre la puerta al estudio de la coordinación de los iones metálico en el sitio activo por medio de espectroscopía UV-visible. La principal ventaja de esta técnica es la rápida obtención de resultados, ya que con la utilización de un arreglo de fotodiodo acoplado a un equipo de mezcla rápida, pueden obtenerse espectros completos cada 1 ms se de reacción. La presencia de una banda de transferencia de carga permite seguir cambios específicos en el sitio DCH, mientras que las bandas de campo ligando dan información de ambos sitios en forma conjunta. El espectro de absorbancia de bi-Co(II)-NDM-1 es similar en forma e intensidad de bandas a los de bi-Co(II)-BcII^(145, 174), bi-Co(II)-VIM-2⁽¹³⁵⁾, bi-Co(II)-IMP-1⁽¹²⁵⁾ y bi-Co(II)-CcrA⁽¹⁵⁵⁾; confirmando que la coordinación de los metales en el sitio activo de estas enzimas está conservado frente a la sustitución metálica por Co(II).

La sustitución de Zn(II) por Cd(II) en muchas metalohidrolasas⁽¹⁵⁷⁾ (inclusive MβLs^(147, 156, 158)) da lugar a derivados activos. Sin embargo, en el caso de NDM-1 se había informado la obtención de un derivado bi-Cd(II) inactivo que habría permitido atrapar un complejo enzima:sustrato (ES) en un cristal⁽¹⁰⁰⁾. Mediante los procedimientos descritos en el presente capítulo, la incorporación de Cd(II) es eficiente y da lugar a un derivado activo cuando el metal se adiciona lentamente y en condiciones de pH y temperaturas controladas; de lo contrario el proceso de incorporación de metal produce cambios que inactivan a la enzima.

Los desplazamientos químicos observados para bi-Cd(II)-NDM-1 (86 ppm para el sitio 3H y 263 ppm para el DCH) son similares a los observados en BcII (140 y 260 ppm, respectivamente)⁽¹⁴⁷⁾. Estos valores indican que el entorno de los iones metálicos en ambas proteínas es similar. El efecto que produce el agregado del compuesto L-CS319 en las bandas correspondientes a ambos sitios (Figura 12), da información acerca de la unión del compuesto y permite corroborar que el tiol se localiza a puente entre los dos metales.

Mediante espectroscopía de absorción UV-visible de la variante bi-Co(II)-NDM-1 puede obtenerse información de la coordinación de los iones metálicos en el sitio activo. Sin embargo, los cambios que ocurren selectivamente en cada uno de los sitios no son

fáciles de analizar debido a la superposición de las señales de las bandas de campo ligando. La principal ventaja del estudio de las variantes con Cd(II) es que puede obtenerse información de ambos sitios en forma individual, ya que cada ion da lugar a una señal diferente, como se muestra en la Figura 12. La desventaja es que estos estudios son más lentos que para el caso de la enzima con Co(II), imposibilitando el estudio de procesos rápidos. Sin embargo, la utilización de esta enzima podría aplicarse al estudio de procesos lentos o irreversibles como la formación de complejos enzima:producto o enzima:inhibidor.

Capítulo 4. Estudio del Mecanismo de Hidrólisis de Carbapenemes por NDM-1

4.1. Introducción: hidrólisis de antibióticos β -lactámicos

4.1.1. Reactividad química de los antibióticos β -lactámicos

La hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos en medio alcalino tiene lugar por ataque nucleofílico del anión OH^- al carbono carbonílico del anillo β -lactama. La reacción involucra dos etapas (Figura 13): el ataque nucleofílico, que provoca la escisión del enlace C7-N, seguido por la protonación del nitrógeno de la β -lactama⁽¹⁷⁵⁾.

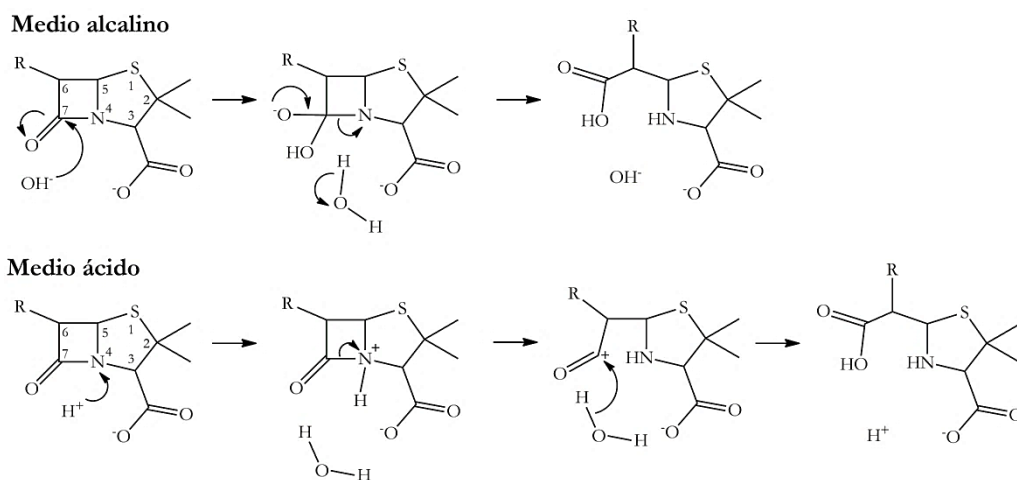


Figura 13: Esquema de las etapas involucradas en la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos en medios alcalino y ácido.

El lado que se visualiza corresponde a la cara α del compuesto.

Los antibióticos β -lactámicos también son hidrolizados en medio ácido (Figura 13)⁽¹⁷⁶⁾. El primer paso de la reacción consta de la protonación del N dando origen a un intermediario tetraédrico cargado positivamente y de carácter planar. Esta estructura se estabiliza por interacciones puente hidrógeno con moléculas de agua del solvente. El intermediario evoluciona por la ruptura del anillo y da lugar a otra especie transiente con la

carga positiva localizada sobre el C7. Esta relocalización de la carga favorece el ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua. La reacción finaliza con la apertura total del anillo y la formación del producto final.

4.1.2. Hidrólisis mediada por SβLs

Las SβLs emplean un residuo de Ser esencial en el sitio activo para catalizar la hidrólisis del anillo β-lactámico, a través del grupo oxhidrilo, que se encuentra activado por una red de puentes hidrógeno en el sitio activo de la enzima (Figura 14)⁽¹¹⁸⁾. El ataque nucleofílico del grupo oxhidrilo de la Ser70, induce la formación de un intermediario tetraédrico con un C sp³ (intermediario tetraédrico), que es estabilizado por una cavidad oxianiónica, de manera similar a lo que ocurre durante el mecanismo de las serín proteasas. La protonación del nitrógeno saliente conduce a la ruptura del enlace C7-N, formándose un complejo covalente acil-enzima (aducto covalente), similar al correspondiente en la reacción de las PBPs. En el caso de la hidrólisis de antibióticos β-lactámicos por SβLs, este complejo es inestable y el grupo acilo es posteriormente transferido hacia una molécula de agua para dar lugar al producto hidrolizado y a la enzima libre⁽¹²⁰⁾. Esta etapa final de desacilación suele ser el paso determinante de la velocidad de reacción del mecanismo de SβLs. El mismo ha sido validado por numerosos estudios mecanísticos, de mutagénesis y estructurales.

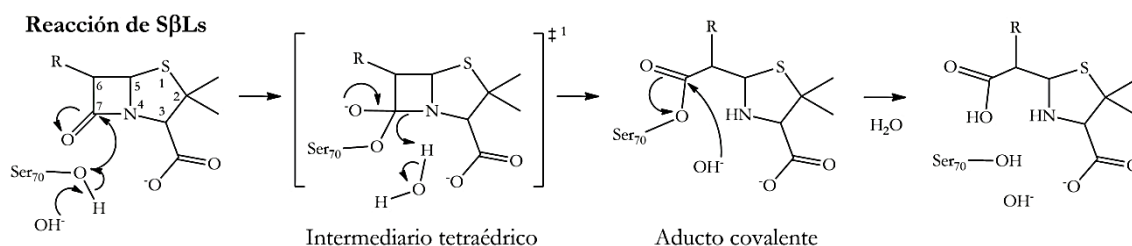


Figura 14: Esquema de la hidrólisis de antibióticos β-lactámicos por SβLs.

Esquema de reacción reportado para la hidrólisis de penicilinas por SβLs de clase A^(118, 120).

Los inhibidores de uso clínico desarrollados para SβLs (tales como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam) actúan como pseudo-sustratos de desacilación lenta, conduciendo a la inactivación de la enzima^(52, 177). Estos compuestos son llamados “inhibidores suicidas”, ya que se unen a la enzima y reaccionan formando un intermediario covalente tetraédrico, que se reacomoda en el sitio activo de forma tal que le permite

resistir a la desacilación⁽¹⁷⁸⁾. Otros inhibidores, como diversos aniones fosfonato y boronato sustituidos, reproducen las características estéricas y electrónicas del intermediario tetraédrico⁽¹⁷⁾. Los carbapenemes también actúan como inhibidores de la mayoría de las SβLs de clases A y C, porque durante su hidrólisis en estas enzimas se produce un intermediario tetraédrico que resiste la desacilación, inactivando a la enzima irreversiblemente⁽²³⁾.

4.1.3. Hidrólisis mediada por MβLs bimetálicas

4.1.3.i. Formación del complejo ES y ruptura del anillo β-lactama

La hidrólisis de antibióticos β-lactámicos por MβL cursa por un mecanismo totalmente diferente al de las SβLs. Las MβLs binucleares B1 y B3 en su estado libre contienen una molécula de agua a puente (Wat1) entre los iones metálicos, que además realiza una interacción de puente hidrógeno con el residuo Asp120 (Figura 4). La función de los iones metálicos en el sitio activo de las MβLs consistiría en activar a esa molécula de agua para el ataque nucleofílico. La acidez de Wat1 se incrementa en virtud de la unión a los iones metálicos, por lo que a pH neutro se encontraría desprotonada, como OH⁻ (Figura 15). Al igual que para la mayoría de las hidrolasas dependientes de Zn(II), es ampliamente aceptado que este ion hidróxido sea el responsable del ataque nucleofílico⁽¹¹⁸⁾. Sin embargo, anteriormente había sido propuesto al grupo carboxilato del Asp120 como el responsable del ataque nucleofílico. Esta hipótesis fue descartada por estudios mecanísticos realizados en distintos solventes y estudios computacionales que resaltan la esencialidad del Zn2 y proponen que el Asp120 ayudaría a posicionar a Wat1^(111, 179-181).

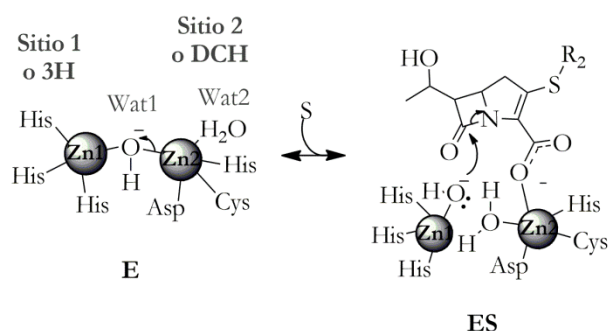


Figura 15: Propuesta de la formación del complejo ES durante la hidrólisis de carbapenemes en MβLs bimetálicas.

De manera similar a los complejos enzima:producto (EP), se propone que los sustratos se posicionan con el oxígeno de su anillo β -lactama apuntando hacia el Zn1 y el grupo carboxilo coordinado al Zn2 (Sección 1.3.4. y Figura 7)^(107, 109, 110). Luego de la unión del sustrato, Wat1 se disocia del Zn2, quedando unida solamente al Zn1, que la coloca en una posición favorable para el ataque nucleofílico (Figura 15). La formación de un hidróxido terminal da lugar a un nucleófilo más potente que un oxhidrilo a puente entre los dos iones metálicos. Luego de la ruptura del anillo, Wat2 queda a puente entre los iones.

4.1.3.ii. Formación de intermediarios de reacción

El estudio del mecanismo de acción de M β LS se vio facilitado al estudiar la hidrólisis de derivados cromogénicos de las cefalosporinas, como la nitrocefina o el cromacef (Figura 16 A), que actúan como sondas del mecanismo de reacción^(124, 129, 132-136). Estos compuestos poseen un sustituyente dinitroestirilo en el C3, que hace que el sustrato y el producto presenten bandas de absorción diferenciadas con máximos a 390 nm y 485 nm, respectivamente (Figura 16 B). La observación de los cambios a estas longitudes de onda durante la reacción de hidrólisis permite seguir la evolución de la concentración de las especies. En diversas M β LS, inclusive NDM-1, durante la hidrólisis de estos compuestos se produce la formación de un intermediario de reacción aniónico con máximo de absorbancia a 665 nm (Figura 16)^(124, 129, 132-136). Este intermediario posee una carga negativa deslocalizada sobre un sistema conjugado π (que abarca desde el enlace β -lactámico hasta el sustituyente dinitroestirilo) y que, además, es estabilizada por interacción con el Zn(II) del sitio DCH (Zn2). Este intermediario de reacción difiere ampliamente del de S β LS ya que no presenta un C sp³ y el enlace C7-N ya ha sido roto⁽²³⁾. La estabilidad de esta especie hace que la protonación del intermediario sea el paso limitante de la reacción. Los datos espectroscópicos para la hidrólisis de nitrocefina por NDM-1 se ajustan al mecanismo que incluye la formación de especies enzima:sustrato (ES), enzima:intermediario (EI) y enzima:producto (EP):



La generalización de estos hallazgos se ha visto limitada por el hecho de que estos compuestos no poseen aplicabilidad clínica, y sólo pudieron ser estudiados con enzimas de subclases B1 y B3, ya que las B2 son carbapenemasas exclusivas. Además, no todas las M β LS capaces de hidrolizar nitrocefina dan lugar a la formación detectable del intermediario^(125, 182). En estos casos no está claro si el Zn2 o el sustrato se posicionan de

forma diferente o si el intermediario aniónico no posee la vida media suficiente como para ser detectado⁽¹⁸³⁾. En general, la validez mecanística de este intermediario ha sido cuestionada, ya que se espera que el pKa del N en el anillo hidrolizado de cefalosporinas de relevancia clínica y penicilinas, sea mucho más alto que el que se obtiene para la hidrólisis de nitrocefina, lo que sugiere que no se formarían intermediarios análogos con estos sustratos⁽¹¹⁸⁾. En el caso de la nitrocefina, el extenso sistema de electrones π conjugados favorecería la acumulación de una especie aniónica en el N, y podría estar presentando una situación anómala que no representase al mecanismo de hidrólisis de antibióticos de impacto clínico⁽¹⁸³⁾. En efecto, durante la hidrólisis de bencilpenicilina por BcII no se observó la formación de intermediarios de reacción, sino la formación de dos complejos ES diferentes, siendo sólo uno de ellos productivo^(126, 145). Sin embargo, cálculos computacionales realizados para la hidrólisis de cefotaxima por CcrA, sugieren que el Zn2 podría estabilizar una carga negativa sobre el átomo de nitrógeno luego de la ruptura del enlace C-N⁽¹⁸⁴⁾.

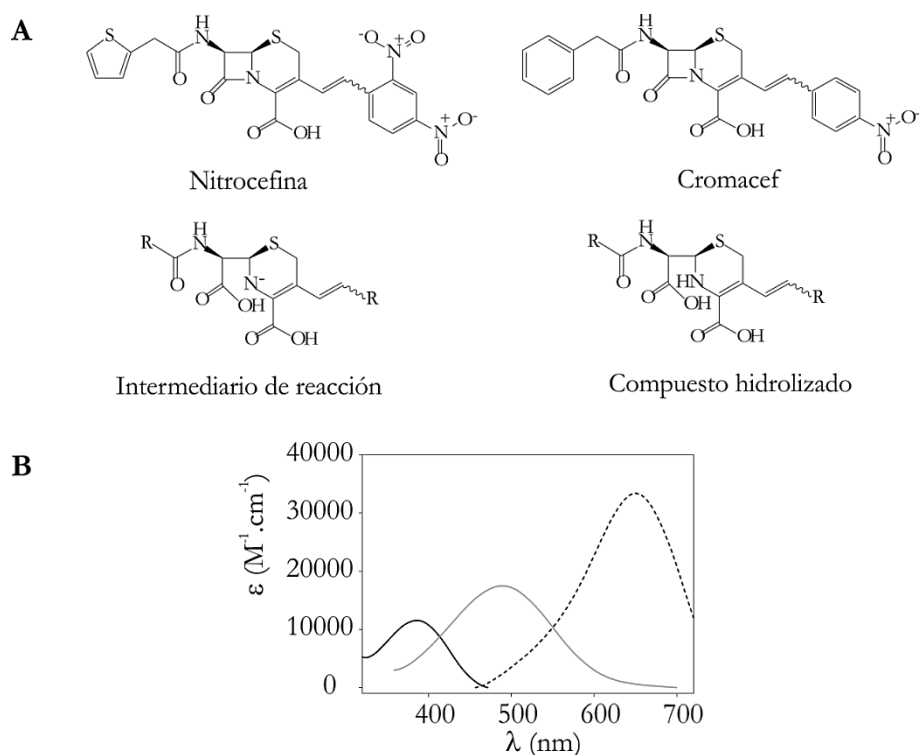


Figura 16: Derivados cromogénicos de cefalosporinas.

A: Estructuras de la nitrocefina y cromacef sin hidrolizar y de los compuestos hidrolizados y los intermediarios de reacción formados durante la hidrólisis de los mismos por M β Ls. B: Espectros de absorción de la nitrocefina sin hidrolizar, (línea continua negra, ϵ_{390nm} 11500 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$), hidrolizada (línea continua gris, ϵ_{485nm} 17420 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$) y al formar intermediarios de reacción (línea cortada negra, ϵ_{665nm} 32000 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$).

El mecanismo de hidrólisis de carbapenemes ha sido el menos estudiado debido a la escasa información espectroscópica brindada por estos compuestos. Estudios realizados en estado pre-estacionario de la hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II) y bi-Co(II)-BcII⁽¹²¹⁾, revelaron que la hidrólisis cursaba por medio de un mecanismo ramificado que involucraba dos intermediarios de reacción productivos (Figura 17). Estos intermediarios fueron observados por técnicas de mezclado rápido y monitoreo por espectroscopía UV-visible. Las características espectroscópicas de estos compuestos fueron similares a las del producto generado por deprotonación en medio orgánico y, por resonancia Raman, se pudo asignar a estos intermediarios a formas deprotonadas de un derivado de pirrolidina hidrolizado. Por lo tanto, se propuso que el ataque nucleofílico daría lugar a derivados en los que el anillo se encuentre hidrolizado, con carga negativa deslocalizada en un sistema π conjugado que involucrase a los átomos N, C3 y C2, y cuya estabilización dependiera de interacciones con el metal del sitio 2. Los intermediarios aniónicos propuestos para la hidrólisis de imipenem por BcII, tenían características similares al formado durante la hidrólisis de nitrocefina. Especies transientes con características espectroscópicas similares fueron reportados para la hidrólisis de meropenem por la M β L B1 SPM-1⁽¹⁸⁵⁾.

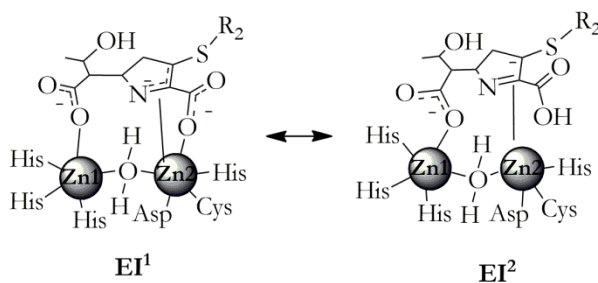


Figura 17: Intermediarios de reacción propuestos para la hidrólisis de imipenem por BcII.

Imagen adaptada de Tioni *et al.* 2007⁽¹²¹⁾. La molécula de agua a puente corresponde a Wat2.

La hidrólisis de carbapenemes por NDM-1 ha sido estudiada por simulaciones computacionales híbridas de mecánica-cuántica y mecánica-molecular (QM-MM)⁽¹³⁰⁾. El tratamiento cuántico se aplicó al sitio activo usando la teoría del funcional de la densidad, mientras que el resto de la proteína se modeló con un enfoque clásico. Estos autores proponen un mecanismo de reacción lineal con múltiples intermediarios de reacción aniónicos (Figura 18). La reacción comienza por el ataque nucleofílico del hidróxido a puente entre los iones metálicos, guiado por interacciones con el Asp120. Este paso da lugar al primer intermediario de reacción estable (especie 2 de la Figura 18). El ingreso de

una molécula de agua del solvente al sitio activo induce la formación del intermediario productivo (especie 3). La protonación en el N da lugar al complejo EP (especie 4) y posterior liberación del producto.

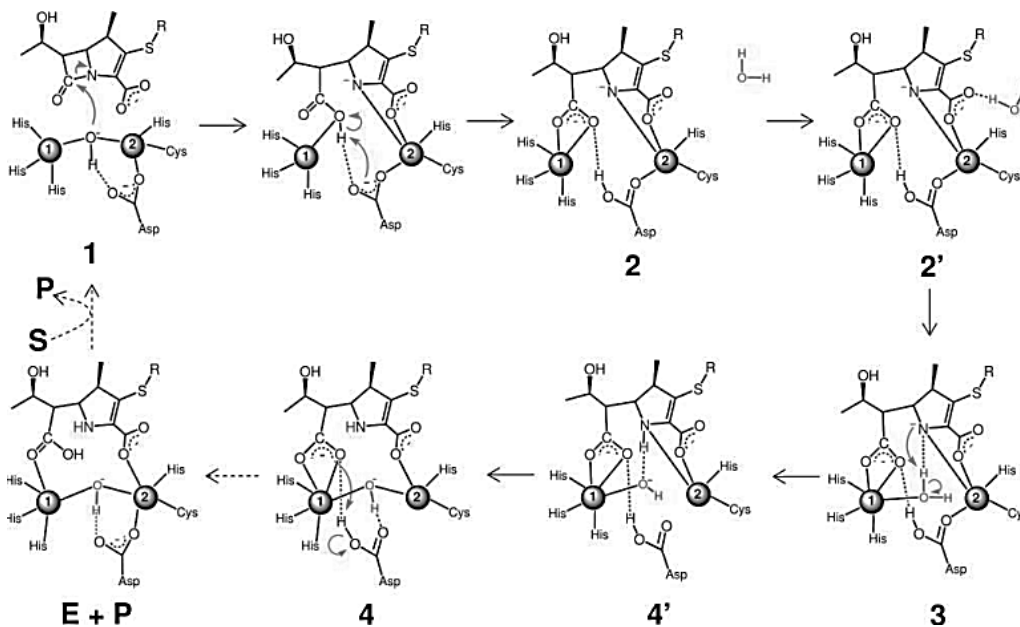


Figura 18: Mecanismo de hidrólisis de meropenem por NDM-1 propuesto por simulaciones computacionales QM-MM.

Las especies 2, 2', 3 y 4' corresponden a intermediarios de reacción; de ellos solo los intermediarios 2 y 3 son estables. Imagen extraída de Tripathi R. y Nair N. N. 2015⁽¹³⁰⁾.

4.1.3.iii. Generación de producto

La hidrólisis de carbapenemes puede dar lugar a diversos productos, como se muestra en la Figura 19⁽¹⁴⁸⁾. Estos productos difieren en el lugar de protonación y la localización del doble enlace en el anillo de pirrolidina: protonación en C2 y doble enlace entre N-C3 (producto Δ 1) o protonación en N y doble enlace entre C3-C2 (producto Δ 2). A su vez, según en lado del anillo por el cual tenga lugar la protonación sobre el C2, el producto Δ 1 puede ser α o β . Históricamente, se propuso que el principal producto formado por la hidrólisis en M β Ls es el Δ 2 (protonación en N) y que en solución esta especie puede tautomerizar a su forma más estable Δ 1 en una relación equimolar de los diastereómeros α y β . Esto ocurre porque, en solución, la probabilidad de protonación en ambas caras del anillo es la misma.

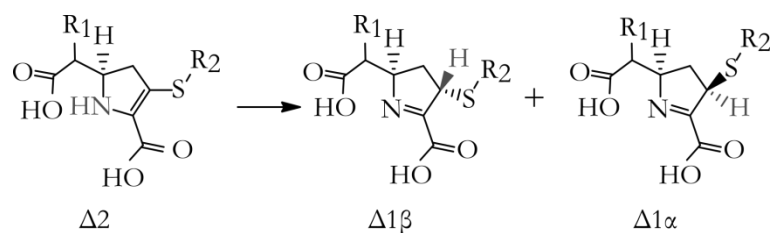


Figura 19: Productos generados durante la hidrólisis de imipenem.

Estudios realizados en BcII, proponen que la protonación de los intermediarios de reacción está a cargo de una molécula de agua (Wat2) posicionada a puente entre los dos metales⁽¹²¹⁾. El intermediario nombrado EI¹ (Figura 17), tiene su carga negativa mayormente localizada sobre el N y al ser protonado da lugar al tautómero $\Delta 2$. Cuando este producto es liberado al medio, da lugar a una relación $\Delta 1\alpha:\Delta 1\beta$ de 1:1. Si EI¹ no se protona, ocurriría una relocalización del doble enlace, generando el intermediario EI². En esta especie se favorece la localización de la carga negativa sobre el C2 que, debido a la orientación del ligando respecto al agua unida a puente (Wat2), se protona generando producto $\Delta 1\beta$. Este producto queda unido a la enzima formando un complejo EP estable. Las características estructurales de los intermediarios de reacción propuestos dan como resultado una mayor cantidad de la especie $\Delta 1\beta$ al hidrolizar imipenem con BcII, lo que fue corroborado por experimentos de RMN. Sin embargo, la identidad de los dadores de protones, particularmente el dador al C2, no ha sido claramente establecida.

La hidrólisis de cefalexina (un compuesto de la familia de las cefalosporina) mediada por NDM-1, ha sido estudiada por simulaciones de dinámica molecular⁽¹³¹⁾. Los autores proponen que el paso de ruptura del anillo β -lactama ocurre de la misma manera con ambos compuestos y es este caso también se observa la formación de intermediarios de reacción aniónicos estabilizados por interacción con el Zn²⁺. Sin embargo, el paso de protonación es dependiente de los sustituyentes del compuesto. En el caso de la cefalexina, la protonación ocurriría en el C3 y el dador de protones sería una molécula de agua que llega al sitio activo por interacción previa con la Lys224. La generación de productos diferentes durante la hidrólisis de penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes, también fue propuesto por el estudios cristalográficos y de resonancia magnética nuclear (RMN)⁽¹¹²⁾.

4.1.4. Hidrólisis mediada por MβLs B2

Las MβLs de subclase B2 son carbapenemasas eficientes, con poca o nula actividad frente a penicilinas y cefalosporinas. Estas enzimas (como CphA, ImiS y Sfh-I) muestran su máxima actividad en la forma monometalada y son inhibidas al unir el segundo ion metálico en un grado dependiente de su afinidad por metal⁽¹¹⁸⁾. El modelo de unión de sustratos y el mecanismo catalítico de estas enzimas (Figura 20) están basados en las estructuras cristalográficas de CphA⁽⁴⁵⁾ y Sfh-I⁽⁴⁰⁾ con carbapenemes hidrolizados (meropenem y biapenem) y cálculos teóricos⁽¹⁸⁶⁾.

La unión de sustratos ocurre a través de una coordinación directa con el carboxilato unido al Zn(II) e interacciones secundarias con la Lys224 y la Val67. El Zn(II) se ubica en el sitio 2 y en su esfera de coordinación posee una única molécula de agua (Wat2) a una distancia de 2,24 Å, lo que no se correspondería con un hidróxido (Figura 4 y Figura 20). Una segunda molécula de agua (Wat1) ocupa el sitio 1, interaccionando con el residuo His118 con una distancia de 2 Å. Esta molécula sería la responsable de realizar el ataque nucleofílico sobre el sustrato, por medio de la activación generada por interacciones con la His118 y el Asp120⁽⁴⁵⁾. El ion metálico en el sitio Zn2 promueve la escisión del enlace C-N mediante la coordinación indirecta del átomo de N⁽¹⁸⁶⁾.

Hidrólisis de carbapenemes por MβLs B2

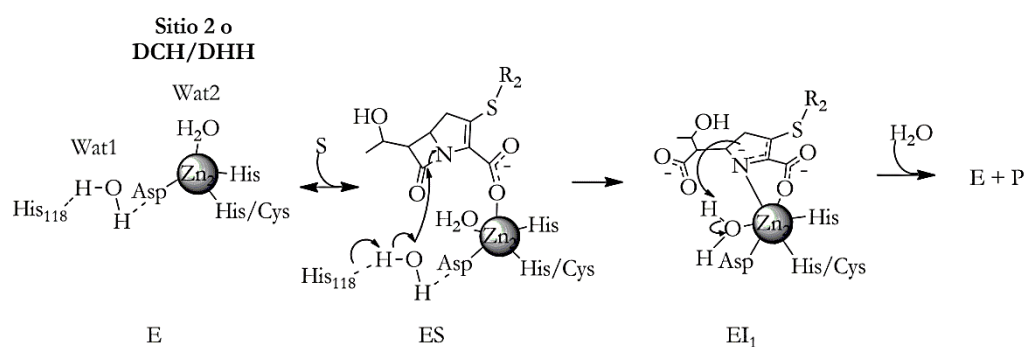


Figura 20: Mecanismo mínimo propuesto para la hidrólisis de carbapenemes por MβLs B2.

Imagen adaptada de Meini *et al.* ⁽¹¹⁸⁾.

El ataque nucleofílico da lugar a la apertura del anillo β-lactama y la generación de un intermediario de reacción aniónico. La presencia de esta especie fue evidenciada en experimentos de EPR con congelamiento rápido en la enzima ImiS⁽¹²³⁾. Estudios de cinética rápida empleando un equipo de flujo detenido en los que se monitorearon los cambios en

la fluorescencia intrínseca de ImiS durante la reacción, mostraron cambios en la señal durante la unión del sustrato y la liberación de producto, indicando que se producen cambios conformacionales en la enzima durante la reacción de manera similar a las M β Ls B1 y B3⁽¹²³⁾. La protonación de este intermediario por la molécula Wat2 es el paso limitante de la reacción. La subsiguiente disociación del producto del sitio metálico y la regeneración de Wat2, vuelven a la enzima a su estado original⁽⁴⁰⁾.

La principal diferencia con las M β Ls bimetálicas es que el ion metálico no está involucrado en la activación del agua que produce el ataque nucleofílico. El Zn(II) tiene la función de unir al sustrato y estabilizar el intermediario aniónico. La unión de un segundo metal desplazaría a la molécula de agua que ocupa el sitio 2, de modo que no se podría producir el ataque nucleofílico⁽¹¹⁸⁾; es por esto que la unión del segundo metal inactiva a estas enzimas.

4.1.5. Importancia del estudio de la hidrólisis de carbapenemes por M β Ls

El suministro de compuestos inhibidores de S β Ls (como como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam) a los tratamientos antibacterianos restaura la eficiencia de los antibióticos β -lactámicos frente a organismos productores de S β Ls⁽¹²⁰⁾. La mayor parte de estos compuestos fueron diseñados en base al mecanismo de acción de S β Ls y no son efectivos contra M β Ls debido a las diferencias en el mecanismo de reacción entre los dos tipos de lactamasas. La primera distinción evidente en el mecanismo de estas enzimas es la imposibilidad en las M β Ls de generar un aducto covalente acil-enzima debido a la falta del residuo esencial de Ser y de una cavidad oxianiónica. En cambio, las M β Ls emplean el ataque nucleofílico por medio de una molécula de agua activada en el sitio activo (por Zn(II) en la mayoría de los casos)⁽²³⁾.

La falta de inhibidores de uso clínico contra M β Ls, sumado a la diseminación global de estas enzimas, las convierte en la familia de mayor relevancia clínica en cuanto a resistencia^(23, 94, 187). Además, todas las M β Ls poseen la capacidad de hidrolizar carbapenemes, antibióticos utilizados como último recurso en la clínica. Por lo tanto, es clave para el avance en los tratamientos clínicos encontrar nuevos blancos para el desarrollo de antibióticos o compuestos inhibidores de esta familia de enzimas. Siendo que el desarrollo de inhibidores en base al mecanismo de S β Ls resultó efectivo⁽¹²⁰⁾, el conocimiento del mecanismo de acción de M β Ls podría ser un buen punto de partida para

el diseño de estos compuestos. Sin embargo, los estudios del mecanismo han sido sesgados por el conocimiento del mecanismo de SβLs y hoy en día se cuenta con escasa evidencia experimental. En base a lo expuesto, se propuso profundizar el estudio de hidrólisis de carbapenemes por NDM-1, utilizando diversas técnicas biofísicas, a fin de obtener información con base experimental acerca de la estructura de las especies generadas durante el proceso.

4.2. Resultados: estudio de la hidrólisis de carbapenemes por NDM-1

4.2.1. Hidrólisis de carbapenemes por bi-Zn(II)-NDM-1

El estudio del mecanismo de hidrólisis de carbapenemes por MβLs en su forma nativa se ve dificultado por el hecho de que estos compuestos no son buenos cromóforos. El imipenem y el meropenem presentan un λ_{max} a 300 nm, que se superpone con la banda de absorción a 280 nm de la enzima. Sin embargo, se ha reportado en diversas MβLs que la acumulación de intermediarios de reacción durante la hidrólisis de estos compuestos produce cambios de absorbancia característicos^(121, 132, 185). Debido a que éstas son especies de vida media muy corta, la forma de observar su acumulación es mediante experimentos de mezclado rápido. Utilizando un equipo de flujo detenido acoplado a un arreglo de fotodiodos, es posible observar los cambios en el espectro UV-visible entre los 300-720 nm, a partir de los 2 ms de reacción. Los experimentos presentados en este apartado fueron realizados en condiciones de pre-estado estacionario y la temperatura del equipo se mantuvo a 6 °C para favorecer la acumulación de las diferentes especies. Además, la presencia de exceso de Zn(II) en el medio de reacción permitió descartar la formación de enzima mono-metalada o apo enzima, como se observó que ocurría en el caso de BcII⁽¹²¹⁾.

4.2.1.i. Hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1

Al monitorear la hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1 en las condiciones descritas (Figura 21), puede observarse la disminución de la banda con máximo a 300 nm correspondiente al imipenem. Al realizar la diferencia de los espectros obtenidos con el primer espectro registrado, puede apreciarse una clara disminución en la intensidad de la absorbancia a 390 nm, acompañada de un leve aumento y posterior disminución de la absorbancia registrada a 343 nm. Estos cambios no se corresponden a los espectros de enzima (E), sustrato (S) o producto (P) libres. En base a experimentos realizados con otras

enzimas de clase B1^(121, 185), los cambios observados entre 340 nm y 400 nm corresponderían a la formación y consumo de intermediarios de reacción. Los cambios de absorbancia observados a 390 nm corresponderían a una primera especie enzima:intermediario (EI¹), mientras que los observados a 343 nm a una segunda (EI²).

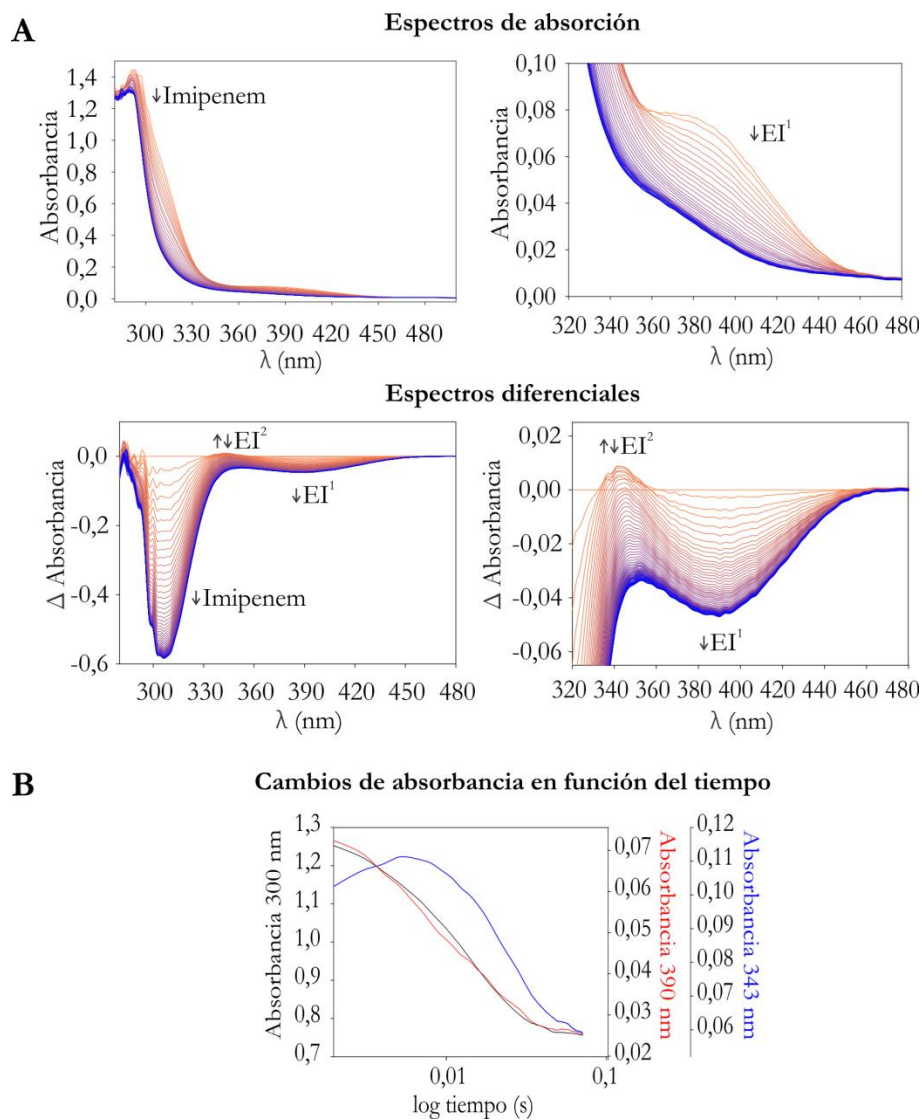


Figura 21: Hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1.

A: Espectro electrónico de absorción registrado durante la hidrólisis de 150 μM de imipenem con 100 μM de bi-Zn(II)-NDM-1, utilizando un arreglo de fotodiodos acoplado a un equipo de flujo detenido. Se registraron 1000 espectros en 10 s con una base de tiempo logarítmica. La medida se realizó en HEPES 100 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM y ZnSO₄ 300 μM , a 6 °C. Los espectros progresan de anaranjado (2 ms) a azul (0,07 s). El panel superior muestra la secuencia de espectros electrónicos registrados durante la reacción y el inferior la secuencia de espectros diferenciales obtenidos por la sustracción del espectro registrado a 2 ms. La acumulación de EI¹ se evidencia en etapas iniciales de la reacción por el cambio de absorbancia a 390 nm. EI² se acumula en una etapa posterior y su λ_{max} en el espectro diferencial se observa a 343 nm. Las flechas indican la acumulación y el consumo de las especies. B: Progreso la absorbancia registrada a 300 nm (λ_{max} imipenem), 390 nm (λ_{max} EI¹) y 343 nm (λ_{max} EI²) en función del tiempo.

La banda de absorción del complejo EI^2 se encuentra superpuesta a la banda de absorción del imipenem, por lo tanto, el máximo observado en el espectro diferencial no necesariamente se corresponde con la longitud de onda máxima de la especie. Los ajustes a diferentes modelos de reacción se vuelven más confiables si se utilizan datos obtenidos a diferentes longitudes de onda y de experimentos independientes con diferentes relaciones E:S. Es por esto que se realizaron experimentos con relación E:S 1:1, 1:3, con 50 μM y 100 μM de enzima, y se seleccionaron los cambios de absorbancia a 390 nm ($\lambda_{\text{max}} EI^1$) y 300 nm ($\lambda_{\text{max}} \text{imipenem}$) en función del tiempo, para realizar los ajustes a diferentes modelos de mecanismos de reacción. Para esto se utilizó el programa DynaFit 4⁽¹⁴³⁾ que hace uso del método de regresión no lineal por mínimos cuadrados para calcular los valores de constantes cinéticas y respuestas de las distintas especies (absortividad molar, ϵ). Los valores de las respuestas correspondientes a E, S y P, fueron fijados a los valores observados experimentalmente, como se detalla en la Sección 2.8.

Los mecanismos de reacción más destacables a los que los datos fueron ajustados se muestran en la Figura 22. En todos los modelos se incluyeron dos intermediarios de reacción ya que la formación de los mismos se evidenció experimentalmente. El primer modelo ensayado, modelo Zn-Imi 1 (Figura 22 A) intenta ajustar los datos experimentales a un modelo lineal, con dos intermediarios de reacción, siendo solo el segundo de ellos productivo. Al ajustar a este modelo, utilizando diversos valores iniciales de cada parámetro, todos los valores ajustados fueron indefinidos, lo que permite descartar un modelo de reacción lineal.

En el modelo Zn-Imi 2 (Figura 22 B), se ensaya un modelo ramificado con dos intermediarios de reacción, donde sólo el primero de ellos es productivo. En este modelo los intermediarios 1 y 2 podrían interconvertirse y sólo EI^1 daría lugar a la formación del producto. La formación de EI^2 dejaría a la enzima en un estado inactivado. Este modelo es similar al empleado por BcII al hidrolizar bencilpenicilina, con la diferencia que en ese caso se trata de dos complejos ES y no EI ⁽¹²⁶⁾. Nuevamente los ajustes no fueron exitosos y no se obtuvieron valores definidos para ninguno de los parámetros. De esta forma, se descarta un mecanismo ramificado con un único intermediario productivo.

El modelo Zn-Imi 3 de la Figura 22 C, es similar al propuesto para la hidrólisis de imipenem catalizada por la enzima BcII sustituida con Co(II) ⁽¹²¹⁾. En este caso, ambos intermediarios de reacción podrían dar lugar a productos. Sin embargo, el ajuste no coincide con los datos experimentales y no fue posible obtener valores definidos de constantes cinéticas para el modelo. El decaimiento esperado de la absorbancia a 300 nm

(líneas en tonos azules), correspondiente al consumo de sustrato, se produce luego de los 0,1 s, mientras que los datos experimentales (puntos azules) indican que el consumo de sustrato se produce antes de ese tiempo. Así mismo, en base al ajuste, la formación de EI¹ (líneas en tonos rojizos) ocurriría luego de los 0,01 s, sin embargo, en los experimentos no fue posible visualizar la formación de esta especie. De estas observaciones se puede concluir que la formación de un complejo ES estable postergaría la formación del EI¹, por lo que se consideró no incluir una especie ES en el modelo.

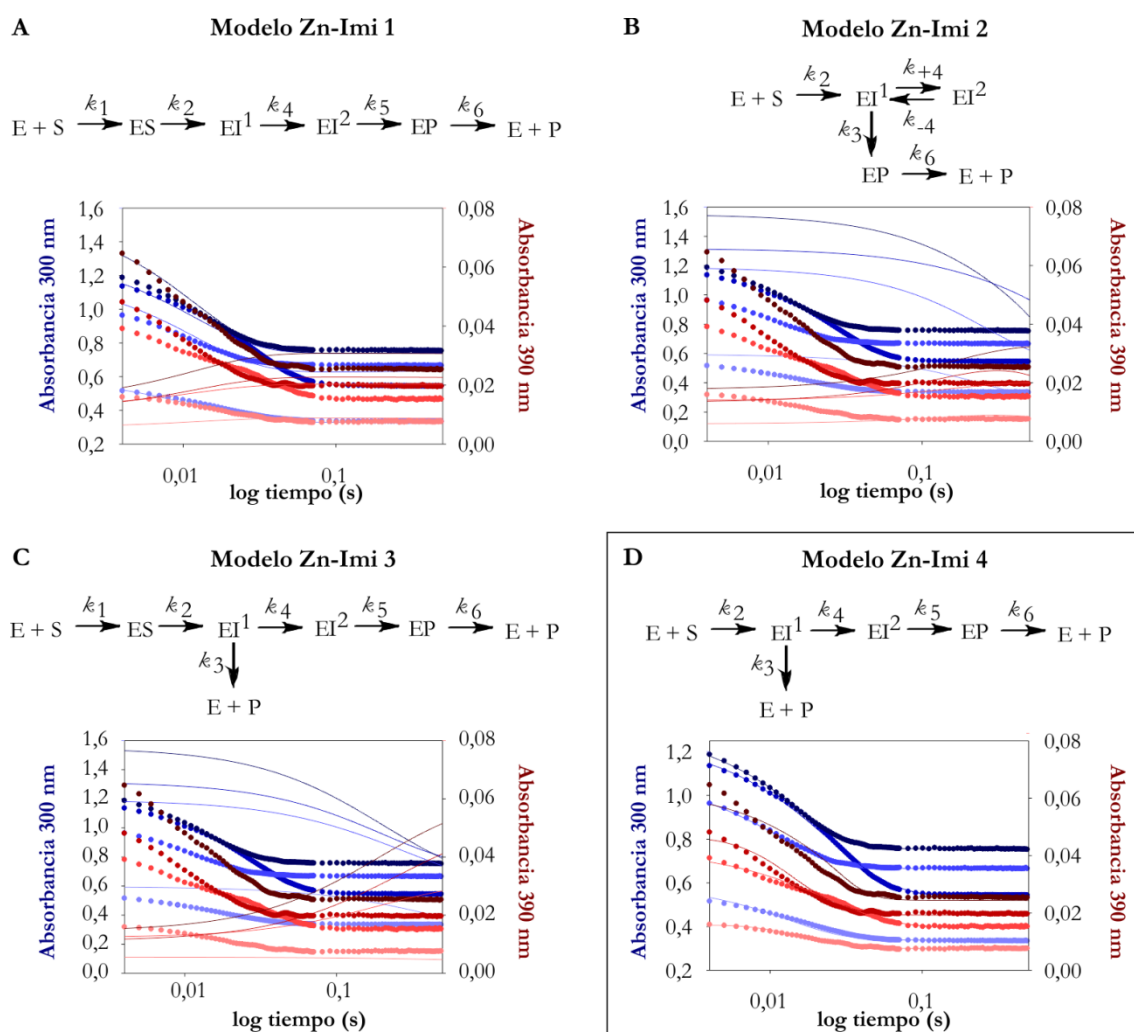


Figura 22: Mecanismos de reacción ensayados para la hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1.

Los paneles A-D muestran los ajustes a cuatro mecanismos de reacción diferentes (líneas continuas), de los cambios de absorbancia observados a 300 nm (puntos en tonos azules) y 390 nm (puntos en tonos rojos), durante la hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1. De tonos claros a oscuros las concentraciones iniciales de sustrato-enzima fueron: 50 μ M-47,5 μ M, 150 μ M-47,5 μ M, 100 μ M-95 μ M y 150 μ M-95 μ M. Las medidas fueron realizadas en HEPES 100 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM y ZnSO₄ 300 μ M, a 6 °C. El análisis se realizó con los datos obtenidos durante 0,5 s de reacción, utilizando el programa DynaFit 4⁽¹⁴³⁾. El panel D se encuentra recuadrado ya que muestra el mejor ajuste de los datos experimentales.

En base a esta última observación, se propuso el modelo Zn-Imi 4, Figura 22 D. En este modelo ramificado, ambos intermediarios son productivos y no se considera la acumulación del complejo de Michaelis. En este caso, fue posible estimar los valores correspondientes a los parámetros cinéticos y valores de ϵ desconocidos con errores aceptables, los que se muestran en la Tabla 5. Podría suponerse que la formación y consumo del complejo ES ocurre en el tiempo muerto del equipo, 2 ms, y por ello los datos experimentales no bastarían para incluir esta especie en el modelo. Debe notarse también que, si bien ambos intermediarios son productivos, solo a partir de EI² se forma un complejo EP antes de la liberación del P. Esta misma observación coincide con la realizada en la enzima modelo BcII⁽¹²¹⁾.

Tabla 5: Constantes cinéticas y valores de absortividad molar correspondientes a la hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1

Modelo Zn-Imi 4	
k_2	$17 \pm 1 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$
k_3	$48,7 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$
k_4	$42,8 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$
k_5	$0,0158 \pm 0,0008 \text{ s}^{-1}$
k_6	$0,077 \pm 0,007 \text{ s}^{-1}$
$\epsilon_{EI1 \text{ 300 nm}}$	$10.400 \pm 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$\epsilon_{EI2 \text{ 300 nm}}$	$7.000 \pm 2.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$\epsilon_{EI1 \text{ 390 nm}}$	$600 \pm 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$\epsilon_{EI2 \text{ 390 nm}}$	$260 \pm 50 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Se muestran los valores obtenidos al ajustar los cambios observados a 300 nm y 390 nm al modelo Zn-Imi 4 de la Figura 22 D. Los valores de ϵ informados corresponden al promedio del valor ajustado en cada reacción. Los coeficientes de absorción fijados se detallan en la Sección 2.8.

4.2.1.ii. Hidrólisis de meropenem por bi-Zn(II)-NDM-1

Además de la hidrólisis de imipenem, se estudió la hidrólisis de meropenem con el fin de comprobar que los intermediarios de reacción observados sean generales para todos los carbapenemes. Si bien estos compuestos comparten su estructura general con anillo de pirrolidina, el meropenem posee sustituyentes más voluminosos que el imipenem y esto podría afectar en la generación de los intermediarios de reacción (Figura 2).

Al monitorear el proceso por cinética rápida, en condiciones de pre-estado estacionario, puede observarse la formación y consumo de dos especies, diferentes a E, S o P, con λ_{\max} a 375 nm y 336 nm (Figura 23). Por analogía a lo observado con imipenem, el primer máximo correspondería a EI¹ y el segundo a EI². En este caso el proceso de hidrólisis es más lento y puede observarse la formación y el consumo de ambos intermediarios de reacción. Las trazas a 300 nm, 336 nm y 375 nm en función del tiempo (Figura 23 B), indican que primero comienza a consumirse el sustrato, luego se llega al máximo de acumulación de EI¹ (375 nm) y, cuando esta especie comienza a decaer, comienza a formarse EI² (336 nm). La similitud de los intermediarios de reacción formados y de los perfiles de consumo de las especies en comparación con imipenem, sugieren que la hidrólisis de ambos compuestos cursa por el mismo mecanismo de reacción.

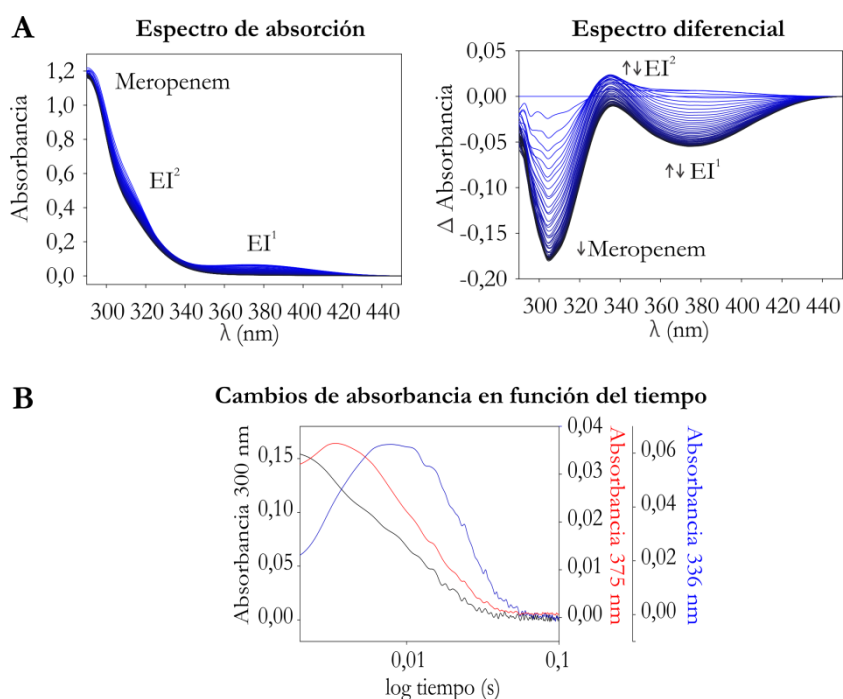


Figura 23: Hidrólisis de meropenem catalizada por bi-Zn(II)-NDM-1.

A: Espectros electrónicos de absorción registrados durante la hidrólisis de 100 μM de meropenem por 100 μM de bi-Zn(II)-NDM-1, utilizando un equipo de flujo detenido acoplado a un arreglo de fotodiodos. Se registraron 1000 espectros en 10 s con una base de tiempo logarítmica. La medida se realizó en HEPES 100 mM, pH 7.5, NaCl 200 mM y ZnSO₄ 300 μM , a 6 °C. Los espectros progresan de azul (2 ms) a negro (0,05 s). La secuencia de espectros diferenciales se obtuvo por la sustracción del espectro registrado a 2 ms a todos los siguientes. La acumulación de EI¹ se evidencia en etapas iniciales de la reacción por el cambio de absorbancia a 375 nm. EI² se acumula en una etapa posterior y su λ_{\max} en el espectro diferencial se observa a 336 nm. Las flechas indican la acumulación y el consumo de las especies. B: Progreso la absorbancia registrada a 300 nm (λ_{\max} meropenem), 375 nm (λ_{\max} EI¹) y 336 nm (λ_{\max} EI²) en función del tiempo.

4.2.2. Hidrólisis de Imipenem por bi-Co(II)-NDM-1

4.2.2.i. Análisis de los cambios observados durante la reacción de hidrólisis

Como se desarrolló anteriormente, los iones Zn(II) presentes en la forma nativa de las M β LS no generan señales distintivas al realizar espectros de absorción en el rango visible. Por lo tanto, los cambios de coordinación ocurridos durante la actividad enzimática no pueden ser monitoreados. La utilización de Co(II) como sonda espectroscópica (sección 3.2.4) podría permitir realizar estos análisis. La intensidad y forma de las bandas observadas de la proteína con Co(II) en el espectro UV-visible pueden ser analizadas como una huella dactilar de la geometría del sitio activo^(121, 126). Siendo que la proteína bi-Co(II)-NDM-1 presenta parámetros cinéticos similares a la enzima nativa cuando hidroliza imipenem, se decidió estudiar el mecanismo de acción de esta variante a fin de obtener mayor cantidad de información respecto a la naturaleza de los complejos formados durante el proceso.

La reacción de hidrólisis realizada en condiciones de estado pre-estacionario y a 6 °C, fue monitoreada en un equipo de flujo detenido acoplado a un arreglo de fotodiodos. En los espectros obtenidos se observa el aumento y la disminución de una banda intensa a 412 nm correspondiente a un complejo EI (Figura 24 A y D). La intensidad de la banda a 412 nm es notablemente mayor que las bandas de 343 nm y 390 nm observadas con la enzima con Zn(II). El corrimiento de esta banda al cambiar los iones metálicos indica que los metales estarían jugando un papel esencial en la estabilización de los intermediarios de reacción.

Durante la reacción se observa una distorsión en el patrón característico de cinco bandas de campo ligando, que vuelve a restablecerse finalizada la reacción (Figura 24 B, C, E y F). Esta deformación del espectro puede ocurrir, en parte, por solapamiento de la absorbancia con las otras especies. Sin embargo, no todo el patrón de bandas varía de la misma manera ya que algunas señales aumentan y otras disminuyen. Inclusive, pueden observarse tres puntos isobésticos a 627 nm, 653 nm y 686 nm que caracterizan la transición entre el espectro de la enzima libre y la enzima formando complejos. La banda de transferencia de carga ligando-metal a 321 nm se encuentra solapada con otras bandas y no es posible estudiarla con esta relación enzima:sustrato. Las bandas de campo ligando son muy poco intensas ($\epsilon < 550 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), por lo tanto se trabajó a alta concentración de enzima y paso óptico de 1 cm para poder estudiar los cambios en la región comprendida entre 450 y 720 nm.

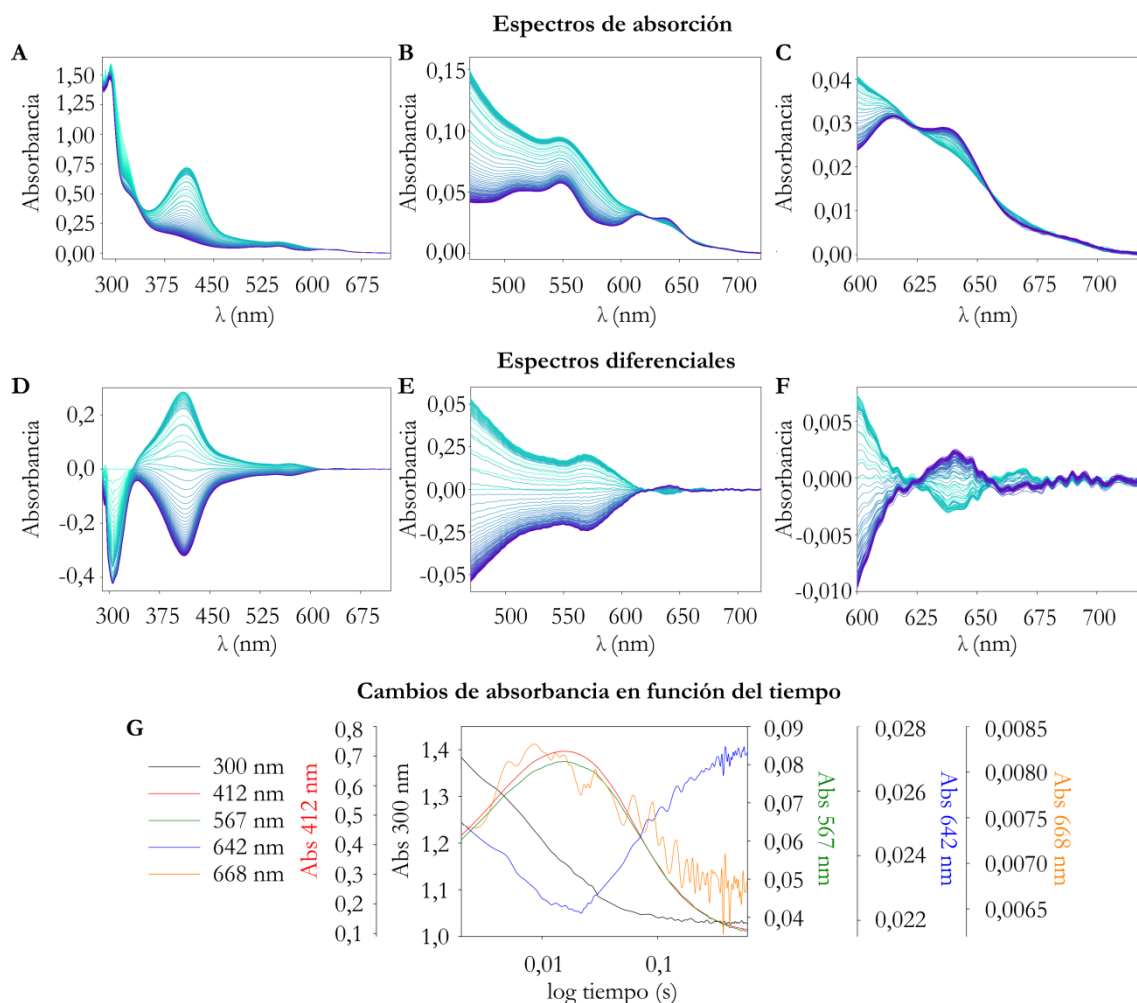


Figura 24: Hidrólisis de imipenem catalizada por bi-Co(II)-NDM-1.

Hidrólisis de 150 μM imipenem catalizada por 112,5 μM bi-Co(II)-NDM-1, registrada en un equipo de flujo detenido acoplado a un arreglo de fotodiodos. Se registraron 1000 espectros en 10 s con una base de tiempo logarítmica. La medida se realizó en HEPES 100 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM y 2 equivalentes de CoSO_4 , a 6 $^\circ\text{C}$. A-C: Espectros electrónicos de absorción registrados, graficados a diferentes escalas. Los espectros progresan de turquesa (2 ms) a violeta (0,05 s). D-F: Espectros diferenciales correspondientes a los espectros A-C. La secuencia de espectros diferenciales se obtuvo por la sustracción del espectro registrado a 2 ms. G: Progreso en función del tiempo de los valores de absorbancia a 300 nm (λ_{max} imipenem), 412 nm (λ_{max} EI) y 567 nm, 642 nm y 668 nm (bandas d-d en las que se observan cambios significativos en los espectros diferenciales).

En la Figura 24 G se muestra la variación de diferentes intensidades de absorbancia en función del tiempo: 300 nm es el máximo de absorción de imipenem, 412 nm es el máximo de la especie transiente y 567 nm, 642 nm y 668 nm corresponden a las zonas de los espectros diferenciales donde se observó un mayor cambio en el patrón de bandas d-d (Figura 24 E y F). Si bien los valores de absorbancia a 300 nm se encuentran saturados, puede observarse que el decaimiento de la absorbancia a 412 nm se produce en una etapa

posterior a la de la señal con máximo a 300 nm, descartando que esta banda pudiese corresponder a un complejo ES. Los cambios de absorbancia a 412 nm se corresponden con los observados a 567 nm y 668 nm, indicando que la variación de las bandas d-d se producen por la presencia de la especie EI. Aunque la banda a 567 nm pueda estar solapada con otras, el hecho de que varíe de la misma forma que la banda a 668 nm da indicios que también se producen cambios por variaciones en la coordinación del sitio metálico en la enzima. La absorbancia a 642 nm disminuye cuando las demás aumentan, sin embargo los cambios siguen los mismos patrones temporales, sugiriendo que las variaciones son parte del mismo proceso.

4.2.2.ii. Análisis de la formación de un complejo enzima:producto

En la bibliografía pueden encontrarse diversas estructuras cristalográficas donde se capturan complejos entre bi-Zn(II)-NDM-1 y carbapenemes hidrolizados (PDB: 4RBS, 4EYL, 4HKY)^(107, 112). A fin de estudiar la formación de un complejo EP estable entre bi-Co(II)-NDM-1 e imipenem hidrolizado, se realizó una titulación de la enzima libre con producto, y se monitorearon los cambios ocurridos en el espectro visible entre 450 nm y 750 nm. La reacción fue llevada a cabo en las mismas condiciones que los experimentos de flujo detenido.

Al aumentar la cantidad de P agregado comienzan a visualizarse cambios en el patrón de bandas d-d, Figura 25. Los cambios observados reflejan la formación del complejo propuesto e indican que la misma está acompañada por cambios estructurales en el sitio activo de la enzima. El agregado de imipenem hidrolizado produce una gran perturbación en el espectro; es por eso que se seleccionaron los cambios de absorbancia a 680 nm para analizar el proceso. Los datos fueron ajustados al mecanismo $E + P \leftrightarrow EP$ utilizando el programa DynaFit 4⁽¹⁴³⁾, obteniéndose la constante de equilibrio del proceso, $K_{eq} = 1,1 \pm 0,1 \text{ mM}^{-1}$ (Figura 25 C).

Puede observarse que al formarse el complejo EP se producen leves modificaciones en el patrón de bandas d-d. Sin embargo, es improbable que estos cambios puedan ser detectados durante los experimentos de flujo detenido debido a la baja concentración de EP formado.

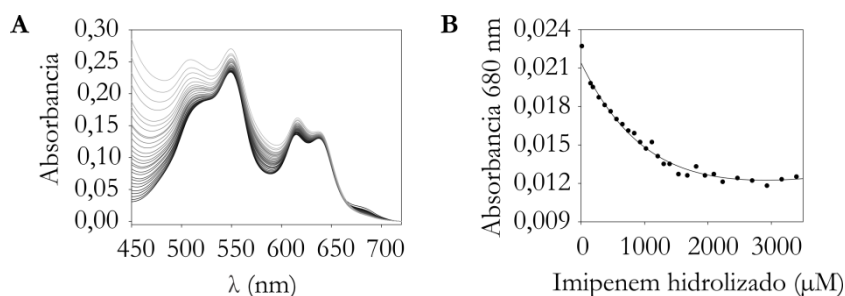


Figura 25: Titulación de bi-Co(II)-NDM-1 con imipenem hidrolizado.

Titulación de 705 μM de bi-Co(II)-NDM-1 con imipenem hidrolizado desde 93 μM a 3,9 mM. Cada mezcla se incubó durante 3 min antes de realizar las medidas. A: Espectros registrados durante la titulación progresando de negro a gris. B: Ajuste (línea continua) al modelo $E + P \leftrightarrow EP$ de los cambios producidos a 680 nm durante la titulación (puntos). La K_{eq} obtenida fue $1,1 \pm 0,1 \text{ mM}^{-1}$.

4.2.2.iii. Propuesta de un mecanismo de reacción mínimo

Con el fin de obtener el mecanismo de hidrólisis de imipenem por bi-Co(II)-NDM-1, se realizó un ajuste global de los cambios de absorbancia en función del tiempo a 412 nm, 567 nm y 642 nm, obtenidos en los experimentos de hidrólisis de 100 μM de sustrato y 75 μM enzima, 150 μM de sustrato y 112,5 μM de enzima y 450 μM de sustrato y 112,5 μM enzima. Los valores de respuesta correspondientes a E, S y P fueron fijados en los valores observados experimentalmente (Sección 2.8). Los valores de las constantes cinéticas de disociación de EP y asociación de E y P fueron fijados de forma tal que su relación sea igual a la K_{eq} calculada.

Al igual que se realizó para la enzima con Zn(II), los datos espectroscópicos obtenidos fueron ajustados a diferentes modelos de reacción. En la Figura 26 se muestran los ajustes para bi-Co(II)-NDM-1 equivalentes a los mostrados en la Figura 22 para bi-Zn(II)-NMD-1. En los modelos presentados se consideraron mecanismos lineales o ramificados, con o sin ES y con uno o dos intermediarios de reacción productivos o no. En todos los casos se incluyó la formación reversible de un complejo EP. Se encontró que el modelo mínimo que mejor ajusta los datos experimentales es el mismo modelo ramificado propuesto para bi-Zn(II)-NDM-1, donde se forman dos intermediarios de reacción productivos y no se diferencia la formación del complejo ES, Figura 26 D. Estos resultados comprueban, nuevamente, que el Co(II) es un buen sustituyente del Zn(II) y se reafirma el mecanismo de reacción propuestos en base a mayor cantidad de evidencia experimental.

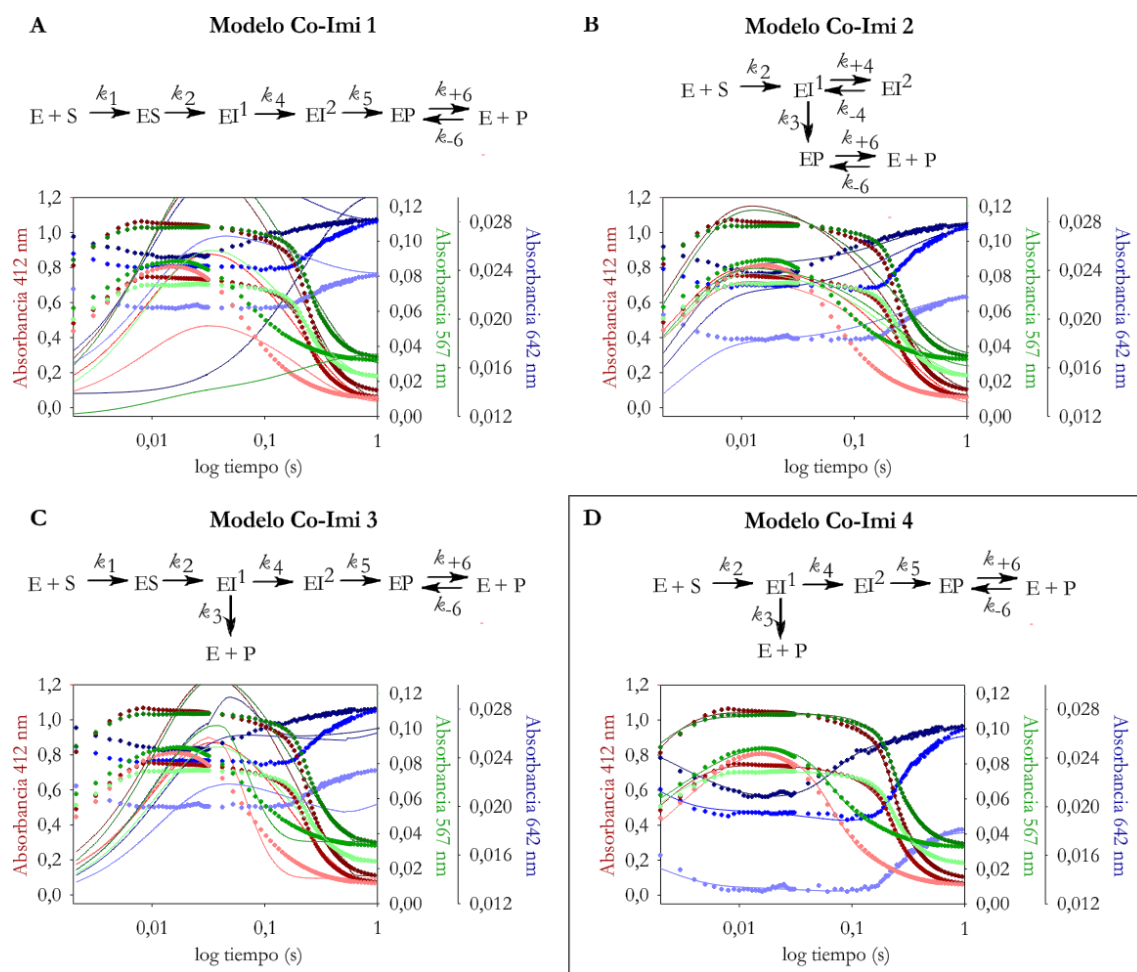


Figura 26: Mecanismo de reacción propuesto para la hidrólisis de imipenem por bi-Co(II)-NDM-1.

Los paneles A-D: Ajustes (líneas continuas) a cuatro mecanismos de reacción diferentes, de los cambios de absorbancia observados a 412 nm (puntos en tonos rojos), 567 nm (puntos en tonos verdes) y 642 nm (puntos en tonos azules), durante la hidrólisis de imipenem por bi-Co(II)-NDM-1. De tonos claros a oscuros las concentraciones iniciales de sustrato (S) y enzima (E) fueron: 100 μ M-75 μ M, 150 μ M-112,5 μ M y 450 μ M-112,5 μ M. Las medidas fueron realizadas en HEPES 100 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM y 2 equivalentes de CoSO₄, a 6 °C. El análisis se realizó con los datos obtenidos durante 1 s de reacción, utilizando el programa DynaFit 4⁽¹⁴³⁾. El panel D se encuentra recuadrado ya que muestra el mejor ajuste de los datos experimentales, los valores obtenidos de constantes cinéticas y ϵ se muestran en la Tabla 6.

La Tabla 6 muestra los valores de las constantes cinéticas y los ϵ obtenidos para el ajuste mostrado en la Figura 26 D. Como habría de esperarse, los valores de las constantes cinéticas obtenidas para la enzima con Co(II) son más pequeños que los correspondiente a la enzima con Zn(II), lo que indica que la enzima es menos eficiente al sustituirse con Co(II). La única excepción es el valor de k_5 , pasaje de EI² a EP, que es mayor para la enzima con Co(II). Esto sugiere que con este metal la protonación de EI² es más eficiente que con Zn(II), dando indicios que la banda observada a 412 nm corresponde al EI¹, ya

que el EI² debería acumularse menos en este caso. Los valores de $\epsilon_{624\text{nm}}$ obtenidos para EI¹ y EI² son similares, señalando una conservación en la geometría de coordinación de estas especies. Estos valores son menores que los observados para la enzima libre ($\epsilon_{\text{E642nm}} 240 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, fijado) demostrando que el número de coordinación del metal en el sitio 3H aumenta al formarse estas especies. El ϵ obtenido para el EP es igual al de la enzima libre, revelando que no hay cambios importantes en la coordinación de los iones metálicos, en concordancia con los datos espectroscópicos (Sección 4.2.2.ii).

Tabla 6: Constantes cinéticas y valores de ϵ correspondientes a la hidrólisis de imipenem por bi-Co(II)-NDM-1.

Modelo Co-Imi			
k_2	$1,94 \pm 0,02 \text{ s}^{-1} \cdot \text{uM}^{-1}$	$\epsilon_{\text{EP } 412 \text{ nm}}$	$730 \pm 80 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
k_3	$23,9 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$	$\epsilon_{\text{EI1 } 567 \text{ nm}}$	$980 \pm 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
k_4	$4,06 \pm 0,07 \text{ s}^{-1}$	$\epsilon_{\text{EI2 } 567 \text{ nm}}$	$1.100 \pm 200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
k_5	$4,66 \pm 0,07 \text{ s}^{-1}$	$\epsilon_{\text{EP } 567 \text{ nm}}$	$270 \pm 70 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
k_{+6}	$0,1 \text{ s}^{-1}$ (fijo)	$\epsilon_{\text{EI1 } 642 \text{ nm}}$	$170 \pm 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
k_{-6}	$0,00011 \text{ uM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (fijo)	$\epsilon_{\text{EI2 } 642 \text{ nm}}$	$110 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (fijo)
$\epsilon_{\text{EI1 } 412 \text{ nm}}$	$9.720 \pm 60 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{EP } 642 \text{ nm}}$	$240 \pm 30 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$\epsilon_{\text{EI2 } 412 \text{ nm}}$	$10.000 \pm 300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$		

Se muestra los valores obtenidos al ajustar los cambios observados a 412 nm, 567 y 642 nm al modelo Co-Imi-4, que se muestra en la Figura 26 D. Los valores de ϵ informados corresponden al promedio del valor ajustado para cada reacción. Los coeficientes de absorción fijados se detallan en la Sección 2.8.

4.2.2.iv. Simulación de especies producidas durante la reacción

En base al mecanismo propuesto, se realizó una simulación de la concentración de las diferentes especies a lo largo de la reacción. Como se observa en la Figura 26, la primera especie que se forma es el EI¹ y su acumulación se corresponde con los cambios de absorbancia a 412 nm y 567 nm. Por lo tanto, se puede confirmar que la banda observada a 412 nm corresponde a esta especie. El EI² comienza a formarse cuando comienza a disminuir EI¹ y su acumulación es mucho menor. Con la caída de los intermediarios comienza a formarse P libre y complejo EP. Al final de la reacción se restablece la enzima libre, quedando una pequeña proporción de la misma formando EP. La absorbancia a 642 nm varía con la acumulación de los intermediarios, demostrando que las dos especies alteran la coordinación de los iones metálicos en el sitio activo.

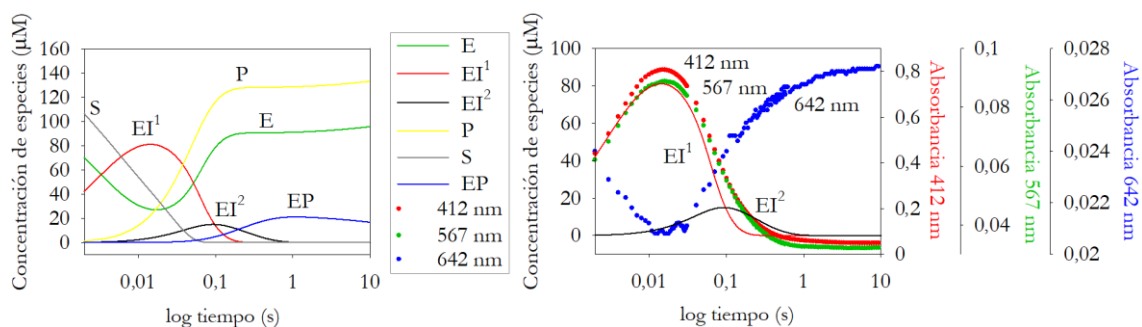


Figura 27: Simulación de especies formadas durante la hidrólisis de imipenem por bi-Co(II)-NDM-1.

Las gráficas muestran las variaciones en la concentración de cada especie al hidrolizar 150 μM de imipenem con 112,5 μM de bi-Co(II)-NDM-1 (simulaciones realizadas con DynaFit 3⁽¹⁴³⁾) y los cambios de absorbancia en función del tiempo observados a 412 nm, 567 nm y 642 nm.

En base a los resultados obtenidos, se propone que la hidrólisis de carbapenemes por NDM-1 cursa por el mecanismo de reacción mostrado en la Figura 28.

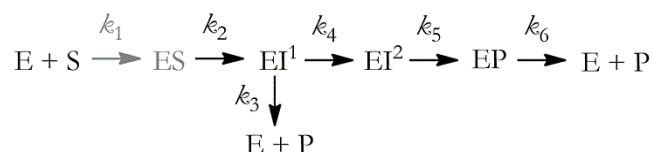


Figura 28: Mecanismo de reacción para la hidrólisis de carbapenemes por NDM-1

El complejo ES se muestra en gris ya que no se observó acumulación de esta especie durante los experimentos realizados.

4.2.3. Estudio de la identidad de los intermediarios de reacción

4.2.3.i. Análisis de los productos formados por RMN

Como se detalló en la introducción de este capítulo, el último paso durante la hidrólisis de imipenem en medio ácido o básico, luego de la ruptura del anillo- β -lactámico, es la protonación del N que da lugar al producto $\Delta 2$ (Figura 19)⁽⁹⁴⁾. En solución, esta especie se encuentra en equilibrio con su tautómero ($\Delta 1$) que está protonado en el C2 y posee un doble enlace N-C3. De acuerdo a la orientación del protón, se pueden obtener los diastereómeros $\Delta 1\alpha$ o $\Delta 1\beta$ (Figura 19 y Figura 29). Cuando se produce la hidrólisis de imipenem en solución, se forma igual cantidad de los tautómeros $\Delta 1$ y $\Delta 2$ y, como $\Delta 1$ es más estable que $\Delta 2$, cuando se llega al equilibrio sólo puede observarse la presencia del

producto $\Delta 1$ con una relación 1:1 de sus diasterómeros. La relación de las especies $\Delta 1\alpha:\Delta 1\beta$ puede estudiarse por ^1H -RMN. Como se muestra en la Figura 29 C, la hidrólisis de imipenem por HCl produce una relación 1:1 de diasterómeros, mientras que con bi-Zn(II)-NDM-1 esta relación cambia a 1:4,7, siendo mayoritario el producto $\Delta 1\beta$. Durante la hidrólisis de carbapenemes por BcII⁽¹²¹⁾, GOB-18 y Sfh-I⁽¹⁸⁸⁾ también se observó una mayor cantidad de producto $\Delta 1\beta$, respecto del $\Delta 1\alpha$, lo que sugiere que la protonación estereoselectiva no es única de NDM-1.

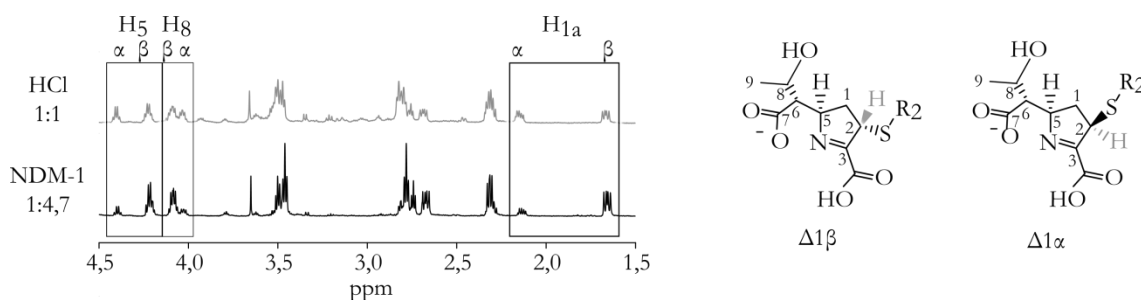


Figura 29: Análisis de la población de tautómeros producidos durante la hidrólisis de imipenem por bi-Zn(II)-NDM-1.

Espectro de ^1H -RMN de los productos de hidrólisis de imipenem (mostrados a la derecha) formados por acción de HCl (gris) o bi-Zn(II)-NDM-1 (negro). En todos los casos sólo puede detectarse el tautómero $\Delta 1$, α o β . La asignación de las señales se indica en la parte superior y fue tomada de Ratcliffe *et al*⁽¹⁴⁸⁾. La relación entre los diasterómeros $\alpha:\beta$ se indica a la izquierda.

Una relación de diasterómeros diferente a 1:1 sólo puede justificarse asumiendo que, además de la protonación en el N, dentro de la enzima se produce una protonación diastereoselectiva sobre el C2 que daría lugar a una mayor cantidad de $\Delta 1\beta$. Como los esquemas de hidrólisis incluyen dos especies intermediarias productivas, estos intermediarios deberían tener características químicas diferentes que favorezcan los diferentes tipos de protonación.

4.2.3.ii. Aplicación QM-MM al estudio de intermediarios de reacción

En el caso de que la protonación ocurriese por la molécula Wat2 que se encuentra a puente (como fue propuesto para la enzima BcII), el OH⁻ remanente quedaría a puente entre los iones metálicos, como se observa en las estructuras de enzima libre (Figura 15)⁽¹⁰²⁾. Sin embargo, no se evidencia la presencia de esta molécula en las estructuras de complejos

EP con meropenem (4RBS y 4EYL)⁽¹⁰⁷⁾. Esto podría explicarse si el dador de protones fuese otra molécula de H₂O que no esté coordinada al sitio metálico.

Para intentar esclarecer esta observación, se trabajó en colaboración con Diego Moreno (miembro del Instituto de Química de Rosario-IQIR) para realizar simulaciones computacionales híbridas de mecánica-cuántica y mecánica-molecular (QM-MM), que analizaran la estabilidad de diferentes intermediarios de reacción. Los iones Zn(II), las cadenas laterales de los residuos His116, His118, His196, Asp120, Cys221 e His263, y el ligando, fueron minimizados por medio de cálculos cuánticos; el resto de la proteína y las moléculas de agua se trataron de manera clásica. Para la realización de los cálculos se partió de las estructuras cristalográficas con meropenem hidrolizado 4RBS y 4EYL. Las estructuras iniciales de los intermediarios fueron generadas a partir de la deprotonación de los productos en ambas estructuras cristalográficas. Ambas simulaciones convergieron en una misma especie intermediaria⁽¹⁸⁸⁾: especie EI mostrada en la Figura 30.

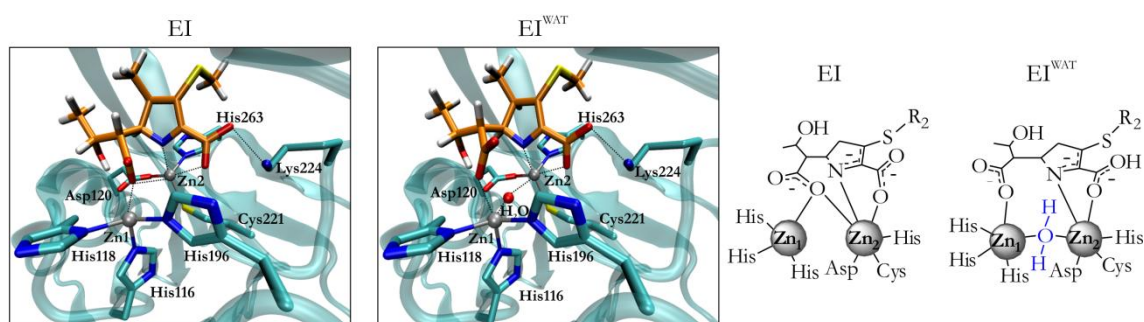


Figura 30: Estructuras obtenidas por QM-MM de los intermediarios de reacción formados durante la hidrólisis de meropenem.

Estructuras propuestas para los intermediarios de reacción formados durante la hidrólisis de meropenem por bi-Zn(II)-NDM-1 optimizadas por simulación computacional QM-MM. Los C se grafican en color cian, H blancos, O rojos, N azul, S amarillo, los iones Zn(II) en forma de esferas grises y la molécula de agua en forma de esfera roja. Los C del ligando se muestran en color anaranjado.

La Tabla 7 muestra las distancias observadas en la estructura original y el en complejo EI optimizado a partir de la estructura 4RBS. Los datos obtenidos para las simulaciones realizadas partiendo de 4EYL fueron muy similares⁽¹⁸⁸⁾. La distancia de coordinación N-Zn₂ en EI es más corta que la observada en los complejos EP originales, lo que es consistente con la naturaleza aniónica de los intermediarios. El carboxilato generado en el C7 queda a puente entre los iones metálicos. Las distancias C2-C3 y C3-N corresponden a longitudes intermedias entre simple y dobles enlaces, sugiriendo que la

estructura aniónica estaría deslocalizada entre esos enlaces. Este resultado concuerda con lo observado por medio de resonancia Raman en la caracterización del intermediario formado al hidrolizar imipenem con bi-Co(II)-BcII, debido a que estos experimentos revelaron una frecuencia de vibración intermedia entre en dobles y simples enlaces en el intermediario de reacción⁽¹²¹⁾.

Tabla 7: Distancias (Å), ángulos (°) y cargas de Mulliken relevantes de las estructuras optimizadas por QM-MM a partir de la estructura 4RBS.

Distancia	4RBS	EI	EI ^{WAT}	EP	EP ^{WAT}
Zn1...Zn2	4,00	4,35	3,66	3,91	4,10
Zn2...N	2,15	2,11	2,03	2,19	2,94
Zn2...O (C3-COO)	3,05	2,35	2,70	2,63	2,47
Zn1...O (C7-COO)	2,06	2,28	2,05	2,14	2,65
Zn2...O(C7-COO)	3,13	3,95	2,46	2,39	4,36
C7-N	2,48	2,73	2,66	2,65	2,71
N-C3	1,33	1,37	1,37	1,30	1,38
C2-C3	1,34	1,41	1,42	1,54	1,40
Zn1...O (H ₂ O)			2,36		2,11
Zn2...O (H ₂ O)			2,30		2,06
Ángulos					
Zn2- N- C3	113,2	113,2	124,3	125,9	105,4
Zn2- N- C5	111,6	132,5	126,5	123,1	138,4
N-C3-C2	110,1	115,0	114,6	112,9	111,6
C3-C2-C1	110,7	105,3	105,6	100,7	108,3
C3-C2-S	127,5	130,3	129,8	120,1	130,5
Zn1-Zn2-N	77,45	79,8	98,7	94,5	72,8
Cargas de Mulliken					
Zn1		0,796	0,778		
Zn2		0,830	0,834		
O (H ₂ O)		0,064	-0,054		
C1		0,222	0,212		
C2		0,006	0,012		
C3		-0,036	-0,048		
N		-0,172	-0,178		
C5		0,140	0,142		
S		-0,378	-0,326		

Las distancias y ángulos para 4RBS son un promedio de los observados en ambas cadenas de la estructura cristalográfica.

Las estructuras de enzima libre contienen una molécula de agua a puente entre los iones metálicos⁽¹⁰²⁾, en base a esa observación, se decidió explorar la estabilidad de los intermediarios de reacción manteniendo una molécula de agua en el sitio activo. Para esto se modificó el sistema cuántico agregando una molécula coordinada a ambos iones metálicos. La estructura minimizada para esta especie fue nombrada EI^{WAT} (Figura 30 y Tabla 7). Esta estructura también presenta un acortamiento en la distancia N-Zn2 y la deslocalización de los enlaces C2-C3 y C3-N, con respecto a la estructura del complejo EP. La presencia del agua produce un desplazamiento del carboxilato que se ubicaba a puente entre los metales, por ahora éste sólo queda coordinado al Zn1.

Tanto en la estructura de EI como de EI^{WAT}, la mayor parte de la carga negativa se localiza sobre el S y en menor medida se deslocaliza sobre el N y el C2 (Tabla 7). Por lo tanto, se deduce que la protonación específica sobre el N o el C2 estaría dada por la localización del dador de protones: coordinado o no a los iones metálicos del sitio activo. En EI^{WAT} la protonación está favorecida sobre el N por el agua que se encuentra a puente, generando el tautómero $\Delta 2$. Sin embargo, no se observaron dadores de protones evidentes para el intermediario EI. Con el fin de localizar moléculas de agua que no se encuentren coordinadas a los residuos del sitio activo y que pudiesen actuar como dadoras de protones al complejo EI, se realizaron simulaciones de dinámica molecular que permitiesen estudiar la distribución de aguas cercanas al sitio. Los resultados revelaron la posibilidad de que múltiples moléculas de agua se localicen entre el loop L10 y la cara β del ligando, Figura 31. Esto sugiere que, en ausencia de agua a puente, es probable que ocurra la protonación diastereoselectiva en el C2 por un agua del entorno, generando producto $\Delta 1\beta$.

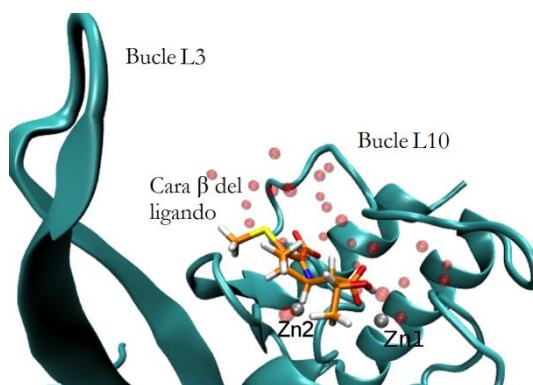


Figura 31: Distribución de aguas cercanas al sitio activo de bi-Zn(II)-NDM-1 durante el proceso de hidrólisis de meropenem.

Captura de la dinámica molecular del EI formado durante la hidrólisis de meropenem por bi-Zn(II)-NDM-1 donde se muestran las aguas (esferas rojas) localizadas a menos de 5 Å del C2.

Por lo tanto, se puede concluir que la alteración en la proporción de productos observada por RMN (Figura 29), es consecuencia de la existencia de dos rutas de protonación (en N o en C2) que originarían los productos $\Delta 2$ y $\Delta 1\beta$, y que las estructuras propuestas para EI y EI^{WAT} corresponderían a los intermediarios que iniciarían dichas vías.

Para poder asignar las estructuras de los intermediarios de reacción obtenidas por simulación computacional con los observados experimentalmente, se realizaron simulaciones QM-MM para estudiar las estructuras de los posibles complejos EP generados a partir de estos intermediarios (Figura 32). Para ello se adicionaron los protones correspondientes a las estructuras EI y EI^{WAT} y se removió un protón del agua a puente en esta última estructura. Se obtuvo que el EP que se generaría a partir del EI (intermediario que no tiene agua a puente) es estable y tendría geometrías de coordinación similares a las observadas en las estructuras cristalográficas, Tabla 7. Por otro lado, el EP^{WAT}, generado a partir de EI^{WAT}, fue inestable en los cálculos realizados debido a un alargamiento de las distancias Zn2-N y Zn1-COO⁻ que dieron lugar a la liberación del producto del sitio activo.

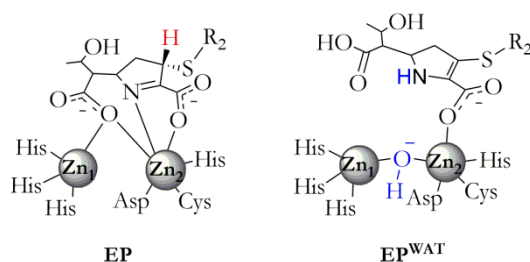


Figura 32: Estructuras de los posibles complejos EP

La imagen muestra los posibles complejos enzima:producto formados a partir de la protonación de los intermediarios de reacción propuestos (Figura 30).

Estos resultados son consistentes con los datos experimentales, ya que solo un intermediario de reacción, EI², da lugar a la formación de EP (Figura 28). En base a esto puede concluirse que la estructura propuesta para EI^{WAT} corresponde a EI¹, y EI a EI². Esta última especie es la que sería capaz de protonarse en el C2, dando lugar a la formación de un complejo EP estable y a la posterior liberación de producto $\Delta 1\beta$. Las estructuras de NDM-1 con carbapenemes hidrolizados no poseen la resolución suficiente para determinar la especie tautomérica presente⁽¹⁰⁷⁾. Sin embargo, la estructura de la M β L B3 SMB-1 con carbapenemes hidrolizados muestra la presencia del tautómero $\Delta 1\beta$ en el complejo EP, lo que soporta estos resultados, inclusive en enzimas de otras familias⁽¹⁸⁹⁾. Sumado a esta observación, es de esperar que la protonación en N por una molécula de agua activada por

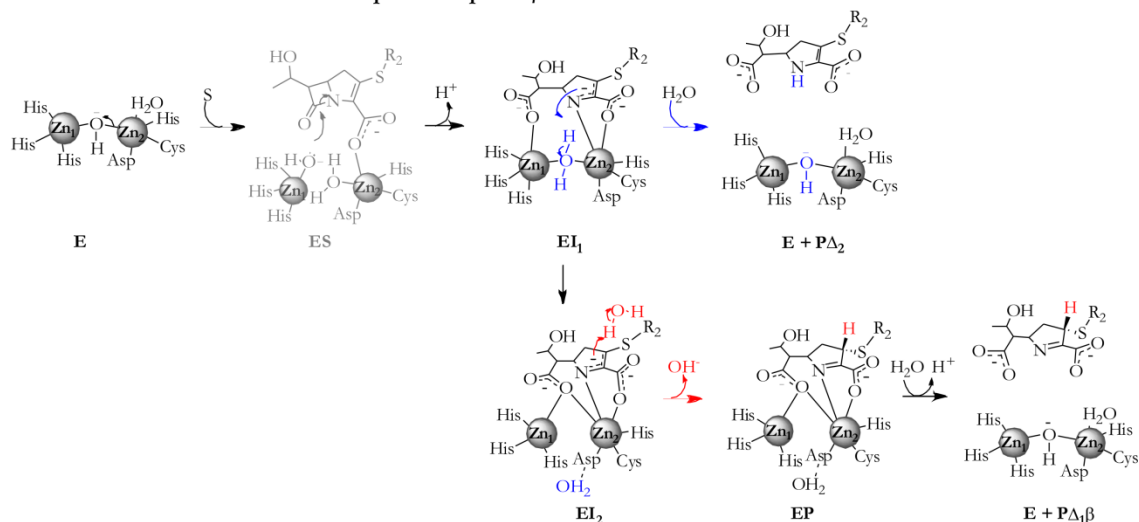
interacción con el Zn(II), sea más rápida que la protonación en C2 por un agua del entorno. Esto se refleja en los valores de constantes cinéticas obtenidos donde $k_3 > k_5$. La conversión de EI₁ a EI₂ estaría dada por la pérdida del agua coordinada al sitio activo y esto provocaría un cambio de coordinación en el intermediario de reacción.

4.3. Discusión: mecanismo de reacción común para MβLs

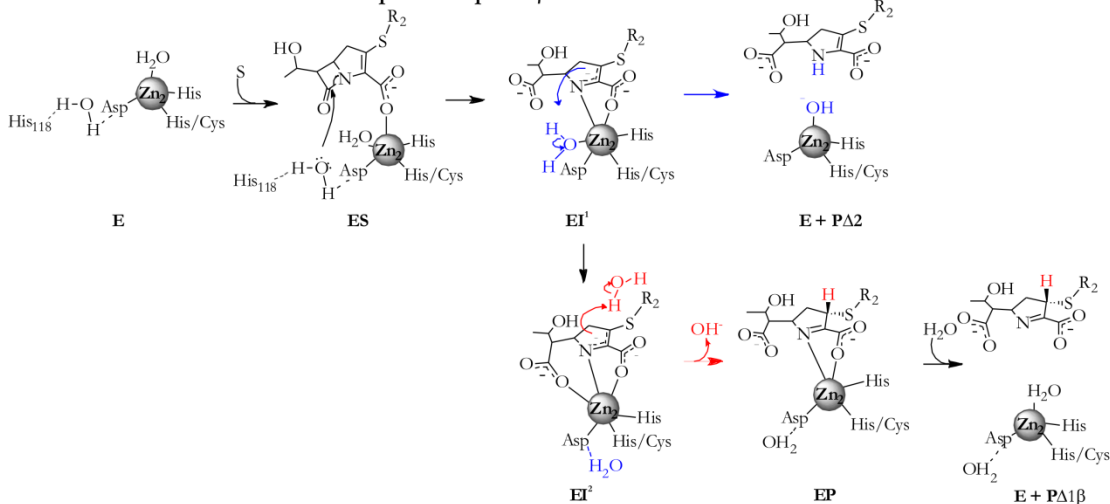
En base a los resultados expuestos y evidencia previa desarrollada a lo largo del presente capítulo, se propone que la hidrólisis de imipenem por NDM-1 cursa por el mecanismo de reacción que se muestra en la Figura 33 A. Este mecanismo es ramificado e incluye a dos intermediarios de reacción con características aniónicas, que pueden dar lugar a diferentes tipos de productos. El estudio de la hidrólisis de meropenem, demostró que el intermediario de reacción producido tiene características similares al de imipenem y las velocidades de acumulación y decaimiento presentan el mismo patrón (Figura 23). Estos resultados permiten generalizar las estructuras propuestas para todos los carbapenemes.

Resultados publicados recientemente por nuestro grupo⁽¹⁸⁸⁾, han demostrado que las MβLs GOB-18 (familia B3) y Sfh-I (familia B2), forman intermediarios de reacción con las mismas características espectroscópicas que los observados en NDM-1 (Figura 33 B). Ambas enzimas poseen un único Zn(II) en el sitio activo, ocupando el sitio 2, lo que demuestra la relevancia funcional de este ion metálico sobre el que se encuentra en el sitio 1. La hidrólisis de carbapenemes catalizada por estas enzimas monometálicas fue más lenta que la catalizada por NDM-1 y en ambos casos se pudo observar la acumulación del complejo ES. Se propuso que la unión de sustrato se produciría por la coordinación del COO⁻ en el C3, sin pérdida del agua a puente. Si bien, en nuestro caso la formación y consumo de ES ocurre en el tiempo muerto del equipo (2 ms), puede considerarse que este complejo tendría características similares al observado con enzimas monometálicas. La expansión de la esfera de coordinación del Zn2 y la conservación del agua a puente, generarían un potente nucleófilo que rápidamente daría lugar a la formación de EI. Esto marcaría una diferencia con las enzimas monometaladas donde se propuso que el nucleófilo estaría activado por la red de puentes hidrógeno que forman la esfera secundaria de coordinación^(118, 188). Para las enzimas B1 el nucleófilo es el hidroxilo unido al Zn1, que no está presente en las enzimas monometálicas^(118, 190). La diferencia en la activación de esta especie en ambos tipos de enzimas marcaría la diferencia en la velocidad de acumulación de ES y generación del EI.

A- Mecanismo de hidrólisis de carbapenemes por MβLs dimetálicas



B- Mecanismo de hidrólisis de carbapenemes por MβLs monometálicas



C - Sitios activos de las enzimas estudiadas

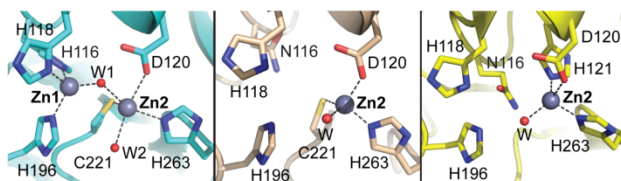


Figura 33: Mecanismos propuestos para la hidrólisis de carbapenemes por MβLs.

Imagen adaptada de Lisa, Palacios, *et al.*⁽¹⁸⁸⁾ En el mecanismo A, el complejo ES es mostrado de color gris, indicando que no se acumula. Su estructura está basada en evidencia experimental para enzimas monometaladas. El mecanismo B fue propuesto en base al estudio de la hidrólisis de imipenem por la MβL B3 GOB-18 en su forma monometalada y por la B2 Sfh-I. C: Sitio activo de la B1 NDM-1 (izquierda, PDB 3SPU), B2 SfhI (centro, PDB 3SD9) y B3 GOB-18 (derecha, modelo de la enzima mono-metalada en base a PDB 5K0W).

Los datos cinéticos junto a los cálculos de QM-MM, indican que los intermediarios EI¹ y EI² tendrían las estructuras propuestas para EI^{WAT} y EI, respectivamente (Figura 30).

La presencia de un agua en el sitio activo de EI¹ permite concluir que, en enzimas bimetaladas, la unión de sustrato tiene lugar sin reemplazar la molécula de solvente unida en la enzima libre. La acumulación de este intermediario es mayor en NDM-1 que en enzimas monometaladas, donde predomina la acumulación de EI². Esta observación está en concordancia con los cambios espectroscópicos que ocurren durante la hidrólisis de carbapenemes con las MβLs B1 SPM-1⁽¹⁸⁵⁾ e IMP-25⁽¹³⁴⁾ a 390 nm y 380 nm, respectivamente; en base a los resultados expuestos, estos cambios pueden asignarse a bandas correspondientes a EI¹. La estructura de intermediarios de reacción aniónicos que difieran por la presencia de un agua a puente para la hidrólisis de carbapenemes por NDM-1, había sido anteriormente sugerido por estudios computacionales; sin embargo en este caso solo se consideró un mecanismo de acción lineal y el dador de protones era activado por interacción con los iones metálicos (Figura 23)⁽¹³⁰⁾.

La formación del intermediarios de reacción en la enzima modelo BcII está acompañada por un alargamiento de la distancia Zn(II)-Zn(II) (3,42 Å a 3,82 Å), que se reestablece cuando se forma el aducto EP⁽¹⁸⁸⁾. Este comportamiento también fue observado para la hidrólisis de nitrocefina por la enzima B3 binuclear L1⁽¹⁹¹⁾, revelando similitudes en la forma en que MβLs con diferentes sitios activos estabilizan los intermediarios de reacción formados al hidrolizar diferentes sustratos. Durante la hidrólisis de imipenem por bi-Co(II)-NDM-1 se observó una disminución en el patrón de bandas d-d, lo que indica un incremento en la geometría de coordinación al formarse los intermediarios. Experimentos de EPR con congelamiento rápido realizados en bi-Co(II)-BcII y bi-Co(II)-L1, también revelaron cambios en la geometría de coordinación al formarse estas especies^(121, 136).

En EI¹, el carbapenem hidrolizado y deprotonado interacciona con el Zn₂ a través del C7 y con el Zn₁ a través del N y el carboxilato en la posición C3. En EI² el carboxilato en C7 se posiciona a puente entre los iones metálicos desplazando el agua (Figura 33). Las esferas de coordinación propuestas para los intermediarios de reacción son iguales que para las enzimas monometaladas, demostrando nuevamente la similitud mecanística.

La protonación del N de EI¹ da lugar a la formación de producto que rápidamente se libera de la enzima, restableciendo la coordinación original con la molécula de hidróxido a puente entre los iones metálicos. La inestabilidad del complejo EP formado por esta ruta fue demostrada por simulaciones QM-MM, que explican que no se haya atrapado un complejo EP con esas características en estructuras cristalográficas y que el mismo no se acumule en concentración suficiente como para ser observable al realizar ajustes de los

datos espectroscópicos. La protonación del EI² se produce en el C2, dando lugar a la acumulación de un EP cuya estructura concuerda con los datos espectroscópicos. El restablecimiento de la enzima libre tiene lugar luego de la disociación de este complejo. El dador de protones propuesto en este caso es una molécula de agua, no activada por coordinación a los iones metálicos, que forma parte del entorno cercano al sitio activo, sobre la cara β del sustrato. La presencia de múltiples moléculas con potencial para producir esta reacción fue corroborada por dinámica computacional, Figura 31.

Durante el proceso de escritura de este trabajo de Tesis, se publicaron estructuras cristalográficas de posibles intermediarios de reacción para la hidrólisis de carbapenemes por NDM-1⁽¹¹²⁾. Estas estructuras también corresponden a especies con carácter aniónico pero cuya carga negativa estaría localizada sobre el N o sobre el C2, de manera similar a los propuestos por Tioni *et al* (Figura 17)⁽¹²¹⁾. Esta propuesta no estaría en concordancia con los resultados mostrados para QM-MM donde los complejos EI sólo son estables cuando la carga negativa está deslocalizada en el anillo y situada preferentemente sobre el átomo de S. El grupo de Feng propone un mecanismo de acción lineal donde sólo el intermediario que posee carga negativa localizada sobre el C2 es productivo. No se considera la posibilidad de que exista un EI con dador de protones a puente y el único producto observado es el $\Delta 1$. En este punto, el grupo concuerda con que el producto formado corresponde predominantemente al $\Delta 1\beta$, que la protonación es llevada a cabo por un agua del entorno y que por esta vía se formaría un complejo EP estable. El modelo que se propone en base a los datos experimentales aquí detallados, Figura 33 A, es consistente con los resultados observados sumados a la evidencia experimental previa relacionada con la hidrólisis de carbapenemes detallada a lo largo del texto^(121, 129, 134, 136, 185, 190).

El mecanismo propuesto marca diferencias para la hidrólisis de carbapenemes frente a cefalosporinas y penicilinas. Se demostró por RMN que la hidrólisis de cefalosporinas con grupos salientes pobres da lugar a protonación por la cara α del compuesto⁽¹¹¹⁾. Esta propuesta también fue analizada por estudios computacionales y cristalografía de rayos X, que proponen que el dador de protones sería diferente en ambos casos^(112, 131). Sumadas a estas observaciones, en todas las estructuras cristalográficas de NDM-1 formando complejos EP con cefalosporinas o penicilinas puede observarse la molécula de agua a puente⁽¹¹⁸⁾.

La función y la esencialidad de los dos iones Zn(II) en el sitio activo de M β Ls han sido tema de gran debate^(35, 126, 190, 192-194). Los resultados presentados en este capítulo, junto a

los publicados recientemente para enzimas con diferente contenido metálico⁽¹⁸⁸⁾, identifican al Zn²⁺ como un componente central de la unión de sustratos, actuando por medio de la estabilización de la carga negativa de las especies aniónicas formadas durante la reacción. Estos resultados concuerdan con los reportados, que indican que un aumento en la afinidad del Zn²⁺ aumenta el rendimiento de las enzimas B1^(51, 195).

Se han encontrado compuestos quelantes que resultaron efectivos al inactivar MβLs⁽⁸⁰⁾, sin embargo la aplicación clínica de ellos se ve obstaculizada por la inespecificidad de los blancos de acción de los mismos^(20, 23, 196). El diseño de inhibidores de amplio espectro de la actividad en MβL debiera centrarse en aquellos elementos estructurales y mecánicos que resulten comunes a todos los miembros de la familia. En este sentido, el ion metálico en el sitio 2 constituye el único atributo distinguible simultáneamente en las tres subclases de MβLs, representando en consecuencia un blanco ideal para la acción terapéutica. Además, las características descritas del intermediario de reacción son independientes de la estructura del sitio activo de MβLs y de su contenido metálico. Resultados recientes del grupo demostraron que compuestos con estructura mínima similar a sustratos β-lactámicos pueden ser eficientes inhibidores de las tres subclases de enzimas⁽⁶³⁾. Sumado a esto, el diseño de inhibidores en base al mecanismo de acción ha sido exitoso para SβLs^(52, 177). Por lo tanto, sería de esperar que compuestos diseñados en base a la estructura de los intermediarios propuestos sean efectivos contra todas las MβLs.

Capítulo 5. Interacción entre la Estructura y la Función del Bucle L3 de NDM-1

5.1. Introducción: estudio del L3 en M β Ls

Las M β Ls de mayor relevancia clínica pertenecen a la subclase B1, ya que todas tienen espectro de sustrato extendido, y pueden estar codificadas por elementos genéticos móviles funcionales en bacterias patógenas y oportunistas⁽²¹⁾. Entre estas se destacan las familias NDM, VIM e IMP; siendo NDM-1, VIM-2 e IMP-1 las variantes alélicas mayormente distribuidas en cada grupo, respectivamente^(21, 94). A pesar de que las diferentes familias de M β Ls B1 tienen un plegamiento, sitio activo y características topológicas similares, la identidad de secuencia entre las variantes es menor al 30%⁽⁹⁴⁾. Esto hace que el estudio de las características comunes sea importante para encontrar blancos claves dentro de estas enzimas.

El sitio activo de las M β Ls B1 está localizado en un surco profundo y amplio definido por dos bucles conocidos como L10 y L3 (Sección 1.2.4.i y Figura 4). Se ha reportado que ambos bucles podrían regular el perfil de sustrato de las enzimas B1⁽⁵⁰⁾. En particular, se ha reportado que el L3 es más desestructurado que el resto de la proteína^(102, 197) y que actuaría como una solapa móvil, responsable de realizar una primera interacción con los sustratos por medio de contactos hidrofóbicos que los guiaría hacia el sitio activo^(42, 107, 198). Estructuras cristalográficas de enzimas B1 han identificado a este bucle en diversas conformaciones^(97, 101, 102, 107, 199, 200). Estudios de RMN han reportado una gran flexibilidad en esta estructura que estaría asociada a incrementar el espectro de sustrato a lo largo de la evolución⁽²⁰¹⁾ y que el ASL3 se cierra atrapando a compuestos inhibidores luego de la unión y sobre sustratos durante la catálisis⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾. La delección de este bucle en CcrA (M β L de subclase B1 de *Bacteroides fragilis*) reduce dramáticamente la actividad hidrolítica y la afinidad por todos los β -lactámicos⁽¹²⁸⁾. Sustituciones en residuos del L3 se han asociado con cambios en el espectro de sustrato de IMP-1^(42, 49, 50), IMP-12⁽²⁰²⁾, IMP-43, IMP-18⁽¹⁹⁸⁾, IMP-2⁽¹⁹⁹⁾, IMP-30⁽²⁰³⁾ y VIM-31⁽²⁰⁰⁾. En NDM-1, se demostró, mediante la realización de mutaciones puntuales en residuos del L3, que la hidrofobicidad aportada por los estos

residuos es importante para mantener la eficiencia catalítica frente a sustratos de las diferentes familias⁽¹¹³⁾. Estudios de espectroscopía de resonancia doble electrón-electrón realizados en NDM-1 y CcrA, demostraron que el bucle cambia su posición durante las etapas de la reacción de hidrólisis, acercándose al sitio activo durante la catálisis y retornando a su posición original al finalizar la reacción^(204, 205). Además, cálculos teóricos realizados en IMP-1 e IMP-6 predicen una correlación entre el movimiento del L3, la eficiencia catalítica de las enzimas, y la acumulación de complejos EI y ES⁽²⁰⁶⁾. Sin embargo, al no estar conservada la secuencia de aminoácidos de esta estructura, se han limitado las generalizaciones acerca de su rol específico.

Tanto NDM-1, VIM-2 e IMP-1 son enzimas de amplio espectro de sustrato, capaces de hidrolizar antibióticos de la familia de los carbapenemes, cefalosporinas y penicilinas. NDM-1 se caracteriza por su capacidad de hidrolizar todos los sustratos con igual eficiencia catalítica y valores altos de k_{cat} , Figura 34. Por su parte, VIM-2 posee mayor eficiencia al hidrolizar cefalosporinas respecto a los otros antibióticos. Además se observa un valor de K_M muy alto acompañado de muy baja k_{cat} para cefepime. Los valores de k_{cat}/K_M son más bajos para IMP-1 que para las otras dos enzimas, pero no se observan preferencias por ninguna familia de sustratos.

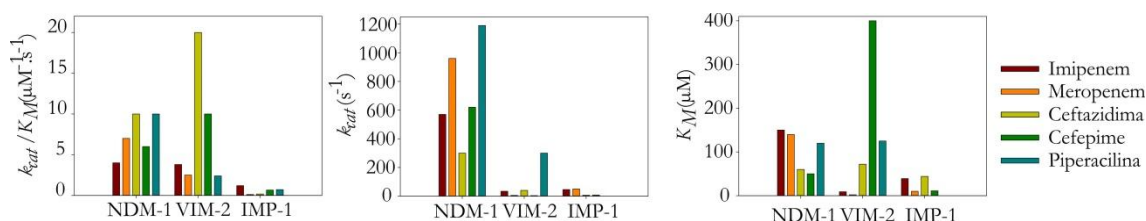


Figura 34: Parámetros cinéticos para NDM-1, VIM-2 e IMP-1.

Comparación de los valores de los parámetros cinéticos en estado estacionario para NDM-1 (obtenidos en el presente trabajo), VIM-2⁽²⁰⁷⁾ e IMP-1⁽¹⁴⁴⁾ para antibióticos β -lactámicos de las familias de los carbapenemes, cefalosporinas y penicilinas. Los valores de k_{cat} y K_M para la hidrólisis de piperacilina por IMP-1 no fueron reportados.

Aunque los sitios activos de las enzimas NDM-1, IMP-1 y VIM-2 están altamente conservados, se observan diferencias estructurales y de secuencia entre ellas. El bucle L3 de IMP-1 posee el mismo largo que el de NDM-1, pero contiene una mayor cantidad de residuos cargados, mientras que el de VIM-2 posee una distribución de carga similar pero es más corto e hidrofóbico que el de NDM-1, como se muestra en la Figura 35. En NDM-

1 los bucles L10 y L3 se encuentran más alejados del sitio metálico en comparación con VIM-2 e IMP-1, originando un sitio activo más amplio. En VIM-2, la presencia de residuos voluminosos en el L3 que se proyectan al interior del sitio activo, como Phe61, Asp62 y Tyr67, hacen que el sitio activo sea más cerrado. NDM-1 posee residuos menos voluminosos y más hidrofóbicos en esas posiciones (Met61, Pro62 y Val67). Además, como se observa en la Figura 35, en la posición 68 de IMP-1 y VIM-2 (al igual que en muchas otras M β Ls) se encuentra un residuo de prolina que está ausente en NDM-1 y que podría afectar la estructura secundaria del L3.

En este marco teórico, se propuso explorar el rol funcional del bucle L3 en NDM-1 y si las diferencias en la secuencia de aminoácidos en esta región podrían explicar las diferencias observadas en los parámetros cinéticos. Para ello se diseñaron dos proteínas quiméricas en las que se reemplazó el bucle nativo de NDM-1 por el de las enzimas IMP-1 o VIM-2 y una tercera variante donde se insertó la prolina ausente en la base del L3 de NDM-1 (Figura 35). Estas variantes fueron nombradas L3IMP, L3VIM y L3Pro. De ahora en más, los resultados correspondientes a cada variante se representan en distintos colores: verde (L3IMP), rojo (L3VIM) y anaranjado (L3Pro), mientras que se utiliza azul para la enzima salvaje, NDM-1.

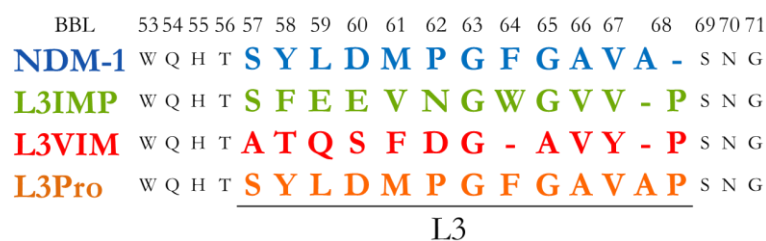


Figura 35: Alineamiento de secuencia del L3 de las variantes de NDM-1.

En color se muestra las variaciones introducidas en el L3, el resto de la secuencia proteica no resultó modificada. La variante L3IMP posee la secuencia del L3 de IMP-1 (mostrado en color verde) y la variante L3VIM la de VIM-2 (mostrado en color rojo). La variante L3Pro (anaranjada) posee un residuo de prolina insertado en la base del L3 de NDM-1. En la parte superior se indica la numeración BBL de los residuos.

5.2. Resultados: estudio de las variantes en el L3 de NDM-1

5.2.1. Análisis de los niveles de expresión y estabilidad

La construcción de los clones utilizados para la expresión de las proteínas quiméricas fue llevada a cabo por la Dra. María Fernanda Mojica del grupo de Robert Bonomo (Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, USA). Como un primer paso en el análisis de las variantes en el L3 de NDM-1, se estudió su expresión en sus formas ancladas a membrana y soluble. Por una parte, las secuencias codificantes de las proteínas quiméricas fueron clonadas en un plásmido diseñado por nuestro grupo, nombrado pMBLe⁽¹⁰⁶⁾. Este vector permite la expresión de MβLs en niveles controlados y similares a los fisiológicos, con una fusión a StrepTag en el extremo amino-terminal. Se realizó la expresión en células de *E. coli* DH5α y se midieron los niveles de expresión por inmunodetección en extractos de células totales y preparados de periplasma y esferoplastos, Figura 36. Todas las variantes fueron expresadas sin realizar deleciones, por lo que incluyeron la secuencia de lipidación LSGC que en NDM-1 es reconocida por la maquinaria de lipidación y ancla a la proteína a la membrana externa^(102, 106).

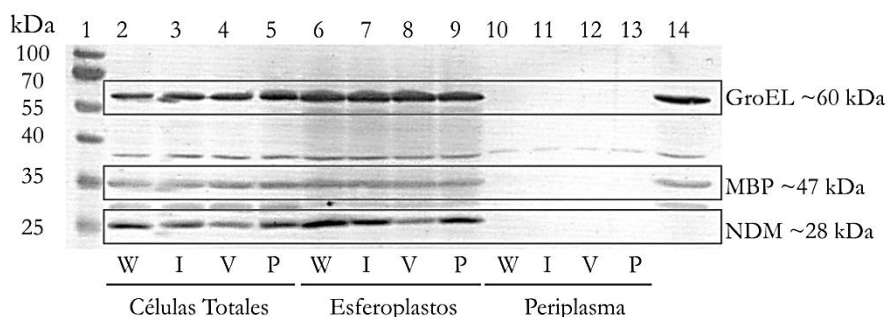


Figura 36: Inmunodetección de la expresión de las variantes en el L3 de NDM-1 ancladas a membrana en *E. coli* DH5α.

La inducción se realizó con 100 μM de IPTG y la detección de proteínas se realizó a partir de 10 μL de extractos de células totales (calles 2 a 5 y 14), 25 μL de esferoplastos (calles 6 a 9) y 25 μL de extractos periplasmáticos (calles 10 a 13). Como control de carga se utilizaron anticuerpos monoclonales de conejo anti-GroEL y anti-MBP. Las variantes fueron detectadas por anticuerpos monoclonales de ratón anti-StrepTag. Las preparaciones de células que expresan la proteína salvaje corresponden a las calles 2, 6 y 10 (W); L3IMP 3, 7 y 13 (I); L3VIM a 4, 8 y 14 (V); L3Pro a 5, 9 y 15 (P); y al plásmido vacío a la 14. En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular.

No se observa la expresión de ninguna de las variantes en los extractos periplasmáticos, revelando que las modificaciones no alteran el procesamiento del péptido líder. Tanto en células totales como en esferoplastos, la expresión de L3IMP y L3Pro fue levemente menor a la de la proteína salvaje, mientras que se observó una drástica reducción de la expresión de L3VIM. Esta observación sugiere que las variaciones podrían interferir con la expresión de las proteínas y su estabilidad en el periplasma bacteriano.

Las proteínas también fueron estudiadas en su forma soluble. Para ello se realizó una delección de los primeros 38 aminoácidos y las variantes fueron clonadas en el vector pET-TEV, como había sido puesto a punto para la proteína salvaje (Sección 3.2.1). Esto permitió la expresión inducible de las proteínas de interés fusionadas a una cola removible de poli-histidinas en el extremo amino-terminal. En un primer intento de purificación, el crecimiento de las células se realizó en medio mínimo M9 con exceso de $ZnSO_4$, al igual que había sido realizado anteriormente. Sin embargo, no se observó inducción de ninguna de las proteínas quiméricas. A fin de optimizar las condiciones de expresión, el medio fue reemplazado por medio rico LB suplementado con 1 mM de $ZnSO_4$. En esta condición, se logró la expresión de todas las variantes, en forma soluble, tras lo cual se procedió a su purificación siguiendo el protocolo utilizado anteriormente. Sin embargo, el rendimiento y el contenido de metal obtenido promedio fue menor que para NDM-1, como se muestra en la Tabla 8. En particular, el rendimiento para L3VIM fue 10 veces menor que para la enzima salvaje y la relación $Zn(II)$ /enzima medida es la más baja. Estos resultados sugieren que las modificaciones en el L3, además de alterar la estabilidad proteica, también modificarían la afinidad por metal.

Tabla 8: Rendimiento y contenido de $Zn(II)$ de las purificaciones de las variantes en el L3.

Variante	Expresión en M9	Expresión en LB	Relación $Zn(II)$ /enzima
NDM-1	80 mg/L	120 mg/L	1,8
L3VIM	Insoluble	18 mg/L	1,5
L3IMP	Insoluble	75 mg/L	1,7
L3Pro	Insoluble	75 mg/L	1,6

La relación $Zn(II)$ /enzima hace referencia a los valores promedios obtenidos al purificar proteínas expresadas en LB.

Para estudiar la estabilidad de las variantes, se midieron las temperaturas medias de desnaturalización (T_M) haciendo uso del compuesto fluorescente Sypro-Orange, el cual

cambia su $\epsilon_{\text{emisión}570\text{nm}}$ al unirse a los residuos hidrofóbicos expuestos de la proteína desplegada⁽¹⁴⁶⁾. Se realizaron preparaciones de las formas holo y apo de las distintas variantes, y las mismas fueron sometidas a un gradiente de temperatura entre 15 °C y 80°C. Los cambios de fluorescencia medidos fueron ajustados a una sigmoidea de donde se obtuvieron las T_M . En la Tabla 9 se muestran los valores correspondientes al promedio de tres determinaciones independientes. Se observa que todas las variaciones en el L3 desestabilizan a NDM-1 tanto en su forma holo como apo. A su vez, todas las proteínas apo fueron más inestables que sus correspondientes formas holo. En su forma metalada, las quimeras sólo presentaron leves disminuciones en sus T_M respecto a la proteína salvaje; en cambio, las formas no metaladas mostraron una mayor desestabilización. En particular, la T_M para L3VIM fue 15 °C más baja que la salvaje y la diferencia de T_M entre las formas holo y apo (ΔT_M) es la más grande entre las variantes, indicando que en este caso la presencia del metal en el sitio activo estabiliza particularmente a la proteína. El efecto estabilizador del metal en M β LS ya había sido reportado anteriormente en otros casos⁽²⁰⁸⁾. Este resultado se correlaciona con la baja expresión de la variante en sus formas anclada a membrana y soluble. Se concluye que la estabilidad de las formas no metaladas (apo) determina la expresión de las proteínas en estado estacionario y que la unión a metal de esta variante en el periplasma es esencial para evitar su degradación.

Tabla 9: Temperaturas medias de desnaturalización (T_M) de las variantes en el L3.

Variante		T_M (°C)	ΔT_M (°C)
NDM-1	Holo	56,6±0,1	18,3±0,1
	Apo	38,3±0,1	
L3VIM	Holo	55,2±0,1	31,5±0,1
	Apo	23,7±0,1	
L3IMP	Holo	55,3±0,1	24,4±0,4
	Apo	30,9±0,3	
L3Pro	Holo	52,5±0,1	19,0±0,2
	Apo	33,5±0,1	

5.2.2. Estudio del perfil de sustrato

Se estudió la susceptibilidad frente a diferentes antibióticos de células de *E. coli* crecidas en medio LB que expresaban las proteínas quiméricas en el plásmido pMBLe. Se obtuvieron los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM, concentración mínima de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano) para β -lactámicos de las tres

familias. Los datos mostrados en la Tabla 10 muestran que, en todos los casos, las variantes otorgan menor resistencia que la proteína salvaje. La variante L3Pro es la que confiere los menores niveles de resistencia, L3VIM posee un comportamiento intermedio y L3IMP mostró el mejor desempeño entre las mutantes.

Tabla 10: Concentración inhibitoria mínima de diferentes β -lactámicos para las variantes en el L3.

	Imipenem	Meropenem	Piperacilina	Cefotaxima	Ceftazidima	Cefepime
NDM-1	4	2	128	64	1024	16
L3VIM	1	1	64	32	256	2
L3IMP	2	1	64	16	256	16
L3Pro	1	1	16	64	256	0,5
DH5α pMBLe	0,25	0,03	2	0,03	0,25	0,016

La expresión de las variantes fue realizada en células de *E. coli* DH5 α inducidas con 100 μ M de IPTG para todos los casos, excepto para ceftazidima que se realizó con IPTG 20 μ M. Los valores de CIM están expresados en mg/L de antibiótico.

La actividad enzimática también fue estudiada en extractos proteicos puros. En los datos mostrados en la Tabla 11 se observa que todas las mutantes fueron activas contra los antibióticos ensayados, en concordancia con las CIMs obtenidas. Los valores de eficiencia catalítica k_{cat}/K_M para todas las variantes se encuentran en el mismo rango que los medidos para la proteína salvaje. Los parámetros cinéticos medidos para L3VIM estuvieron, en general, cercanos a los de la proteína salvaje. L3IMP fue la única variante catalíticamente más activa que NDM-1 frente a penicilina G y algunas cefalosporinas. Es notable destacar que el perfil de sustrato que resulta de los parámetros cinéticos obtenidos para las proteínas quiméricas no presenta la misma tendencia que para VIM-2⁽²⁰⁷⁾ o IMP-1⁽¹⁴⁴⁾ (Figura 34). Nuevamente se observa que L3Pro es la variante menos eficiente. Para esta variante se obtuvieron valores de K_M y k_{cat} muy altos, siendo los aumentos en los valores K_M mayores a los de k_{cat} , dando como resultado una disminución en la eficiencia catalítica. Más allá de estas leves diferencias, y contrario a lo esperado, no se observa un patrón claro en los cambios de perfil de sustrato debido al reemplazo del L3.

Tabla 11: Parámetros cinéticos en estado estacionario medidos para las variantes en el L3.

Sustrato	Variante	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Imipenem	NDM-1	150 ± 30	570 ± 30	4 ± 1
	L3VIM	136 ± 7	631 ± 9	4,6 ± 0,3
	L3IMP	60 ± 10	160 ± 6	2,7 ± 0,5
	L3Pro	780 ± 90	1200 ± 60	1,5 ± 0,2
Meropenem	NDM-1	140 ± 20	960 ± 40	7 ± 1
	L3VIM	540 ± 50	1810 ± 70	3,4 ± 0,4
	L3IMP	90 ± 10	39 ± 1	0,43 ± 0,06
	L3Pro	1100 ± 200	2500 ± 200	2,3 ± 0,6
Ertapenem	NDM-1	25 ± 2	420 ± 10	17 ± 2
	L3VIM	110 ± 20	750 ± 40	5 ± 1
	L3IMP	29 ± 6	29 ± 1	1,0 ± 0,2
	L3Pro	270 ± 20	710 ± 20	2,6 ± 0,3
Penicilina G	NDM-1	80 ± 10	690 ± 20	8 ± 1
	L3VIM	40 ± 5	323 ± 9	8 ± 1
	L3IMP	13 ± 1	272 ± 4	21 ± 2
	L3Pro	690 ± 99	755 ± 49	1,1 ± 0,1
Piperacilina	NDM-1	120 ± 10	1190 ± 40	10 ± 1
	L3VIM	410 ± 30	1820 ± 70	4,4 ± 0,5
	L3IMP	67 ± 8	232 ± 6	3,5 ± 0,5
	L3Pro	700 ± 100	630 ± 70	0,9 ± 0,2
Ceftazidima	NDM-1	60 ± 10	620 ± 20	10 ± 2
	L3VIM	58 ± 8	250 ± 8	4,1 ± 0,7
	L3IMP	60 ± 10	131 ± 5	2,2 ± 0,4
	L3Pro	90 ± 20	120 ± 10	1,3 ± 0,4
Cefepime	NDM-1	50 ± 10	300 ± 20	6 ± 2
	L3VIM	ND	ND	1,21 ± 0,01
	L3IMP	6,1 ± 0,6	178 ± 2	28 ± 3
	L3Pro	ND	ND	0,9 ± 0,5
Nitrocefina	NDM-1	1,3 ± 0,3	38 ± 2	29 ± 8
	L3VIM	4,0 ± 0,9	48 ± 3	12 ± 3
	L3IMP	2,9 ± 0,9	67 ± 7	23 ± 3
	L3Pro	2,6 ± 0,5	85 ± 4	32 ± 1

Medidas realizadas en base a la cinética de consumo de sustrato por espectroscopía de absorción, bajo condiciones de estado estacionario. Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten. El medio de reacción utilizado fue HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, ZnSO₄ 20 μM y BSA50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La temperatura se mantuvo en 30 °C

5.2.3. Análisis de la afinidad por Zn(II) y la coordinación de los iones metálicos

Las MβLs son exportadas al periplasma bacteriano como polipéptidos desnaturalizados. Tanto el plegamiento como la incorporación de metal ocurren en ese espacio, donde la disponibilidad de Zn(II) es limitada^(30, 209). Es por ello que las MβLs con capacidad de unir metal reducida proveen menor resistencia frente a los antibióticos⁽³⁵⁾. Ya se había observado que las purificaciones de las variantes en el L3 tenían menor cantidad de Zn(II) que las de la proteína salvaje y por ello que se propuso evaluar el efecto de un quelante de metal en la CIM de las variantes. Se seleccionó el antibiótico cefotaxima (que es el que mayor diferencia presenta entre el valor más alto medido y el del plásmido vacío) y midieron las CIMs frente a agregados crecientes de ácido dipicolínico (DPA). Los valores obtenidos fueron graficados en función a la concentración de DPA como porcentajes de disminución respecto a una medida realizada en exceso de metal, Figura 37. En la gráfica no se observan diferencias importantes entre la susceptibilidad de NDM-1 y L3IMP a la limitación de metal. El efecto es más grande para L3Pro y aún mayor para L3VIM, en la cual con solo agregar 100 μM de DPA se produce una reducción de la CIM cercana al 20%.

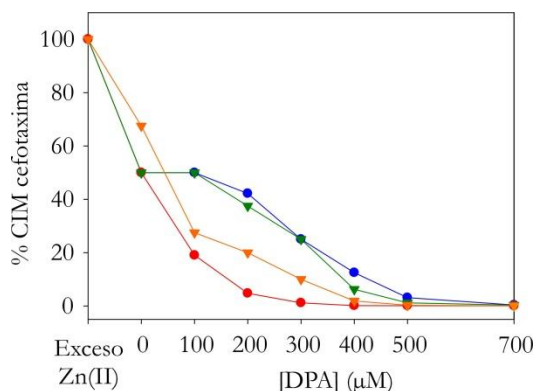


Figura 37: CIMs de cepas productoras de NDM-1 y variantes en el L3 frente a cefotaxima a concentraciones crecientes de DPA.

Se utilizaron cepas de *E. coli* DH5α que llevaban el plásmido productor de lactamasas pMBLe. El 100 % de la CIM se obtuvo al agregar al medio 500 μM de ZnSO₄. Los valores para NDM-1 se muestran en azul, L3VIM en rojo, L3IMP en verde y L3Pro en anaranjado.

El efecto del tratamiento con DPA sobre las proteínas estudiadas también se examinó en extractos de células totales. La expresión de los derivados de NDM-1 fue detectada por el *Western Blot* revelado con anticuerpo anti-StrepTag que se muestra en la

Figura 38. Se observa que la presencia de DPA afecta considerablemente la expresión de las variantes L3Pro y L3VIM, pero el impacto es moderado en L3IMP y NDM-1.

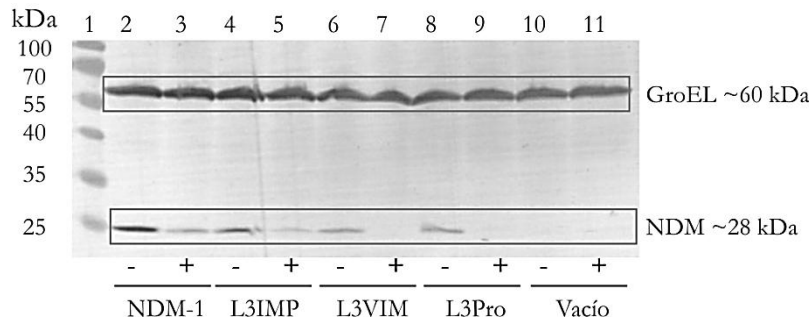


Figura 38: *Western blot* que muestra la expresión de NDM-1 y variantes en el L3 en células totales tratadas con DPA.

Luego de 1 h de inducción con 100 μ M de IPTG, células de *E. coli* DH5 α que expresaban las variantes de NDM-1, fueron (+) o no (-) tratadas durante 15 min con 250 μ M DPA; y la expresión proteica fue analizada a partir de 10 μ L de lisados de células totales por *Western Blot*. Las variantes fueron detectadas por anticuerpo monoclonal de ratón anti-StrepTag y se utilizó anticuerpo monoclonal de conejo anti-GroEL como control de carga. Sembrado primero las células sin tratar y luego las tratadas, las calles 2 y 3 corresponden a NDM-1, 4 y 5 a L3IMP, 6 y 7 a L3VIM, 8 y 9 a L3Pro y 10 y 11 al plásmido vacío. En la calle 1 se ubica el marcador de peso molecular.

Para determinar si las modificaciones en el L3 podrían tener impacto en la afinidad o modo de unión de la enzima por Zn(II), se midieron las constantes de afinidad por el metal de las enzimas purificadas haciendo uso del ensayo de competición con PAR (realizado anteriormente para NDM-1 en la sección 3.2.3)⁽³⁵⁾. Los cambios medidos en cada punto de la titulación fueron ajustados en con el programa DynaFit4⁽¹⁴³⁾ al modelo de equilibrio mostrado en la Figura 39 A. K_{d1} y K_{d2} corresponden a las constantes de disociación para el complejo EZn(II) (enzima mono metalada) y EZn(II)₂ (enzima di metalada), respectivamente.

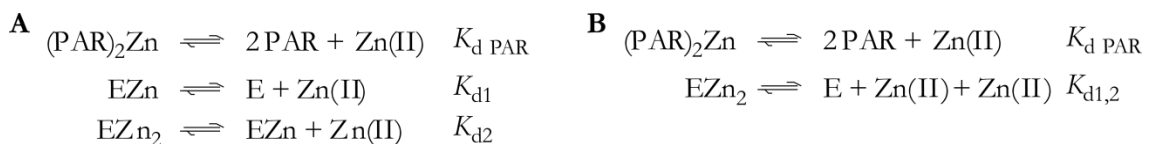


Figura 39: Modelos de competencia por Zn(II) entre PAR y las enzimas (E) derivadas de NDM-1.

A: Modelo que considera que la incorporación de Zn(II) en dos pasos con constantes cinéticas diferenciables.
 B: Modelo que considera que la incorporación de Zn(II) se da en un único evento donde no se pueden diferenciar dos constantes cinéticas independientes.

Los valores de constantes de disociación obtenidas se muestran en la Tabla 12. Para NDM-1, L3VIM y L3IMP pudieron obtenerse dos valores de constante de disociación de metal independientes. Este modelo de unión de metal está en concordancia con estudios previos que reportan diferentes afinidades por los sitios metálicos^(98, 173), y con el modo de unión de metal reportado para las enzimas BcII, IMP-1 y VIM-2^(38, 125, 135).

Para la variante L3Pro no fue posible ajustar los datos obtenidos al mismo modelo de incorporación de metal que para las otras enzimas. En este caso, la incorporación de metal pudo ajustarse al modelo mostrado en la Figura 39 B, donde ambos iones se incorporan en forma simultánea. Esto puede ocurrir porque la afinidad de la enzima por ambos equivalente es similar e indistinguible por este método. La constante de equilibrio obtenida fue nombrada $K_{d1,2}$, y es equivalente al producto de las constantes cinéticas de equilibrio correspondientes a la incorporación del primer y segundo Zn(II) obtenidas para las otras enzimas. La comparación de estos datos indica que todas las mutantes poseen afinidad por Zn(II) reducida en comparación con NDM-1 (siendo L3VIM la más afectada de las variantes), y permiten explicar la caída de los valores de CIM y de los niveles de expresión al limitar la disponibilidad del Zn(II).

Tabla 12: Constantes de disociación de Zn(II) obtenidas para NDM-1 y las variantes en el L3.

Variante	Constantes de disociación de Zn(II)		
	K_{d1} (nM)	K_{d2} (nM)	K_{d12} (nM ²)
NDM-1	6 ± 4	17 ± 6	102 ± 20 *
L3VIM	29 ± 6	120 ± 20	3.500 ± 100 *
L3IMP	2,9 ± 0,7	100 ± 10	290 ± 7 *
L3Pro			330 ± 90

K_{d1} y K_{d2} son las constantes macroscópicas de disociación de un ion Zn(II) para las enzimas mono y bi-metaladas, respectivamente. $K_{d1,2}$ es la constante de disociación de dos iones Zn(II) para la enzima bimetalada. Los valores indicados con (*) corresponden al producto $K_{d1} * K_{d2}$ que sería equivalente al valor de $K_{d1,2}$ obtenido para L3Pro.

Si bien el L3 no contiene residuos que interaccionen directamente con los iones metálicos, los resultados sugieren que el sitio activo de la enzima estaría siendo afectado por las variaciones en esta estructura. Por ello se decidió estudiar si existían cambios en la coordinación de los iones metálicos utilizando Co(II) como sonda espectroscópica⁽¹⁴⁵⁾. Este procedimiento se realizó de la misma forma que para la proteína salvaje, descrito en las Secciones 2.7.2 y 3.2.4. En los espectros diferenciales presentados en la Figura 40, puede

observarse que el patrón de bandas d-d se encuentra conservado entre las enzimas. Esto indica que no se producen grandes cambios en la coordinación del ion metálico del sitio tetracoordinado, 3H. En cambio, sí se observan algunas modificaciones en la banda de transferencia de carga, producto de la interacción del residuo Cys221 y el Co(II) ubicado en el sitio 2. L3Pro presenta la mayor perturbación, seguida de la variante L3VIM. La banda de L3IMP es la más cercana a la de NDM-1, indicando que el sitio activo de esta variante es el menos perturbado. Es interesante destacar que el sitio DCH está conectado por una red de puentes hidrógenos (que forman la segunda esfera de coordinación de los iones metálicos) a la base del L3. Resultados similares a los observados fueron reportados para variantes en la segunda esfera de coordinación obtenidas por evolución *in vitro* de la M β L BcII⁽⁴⁸⁾.

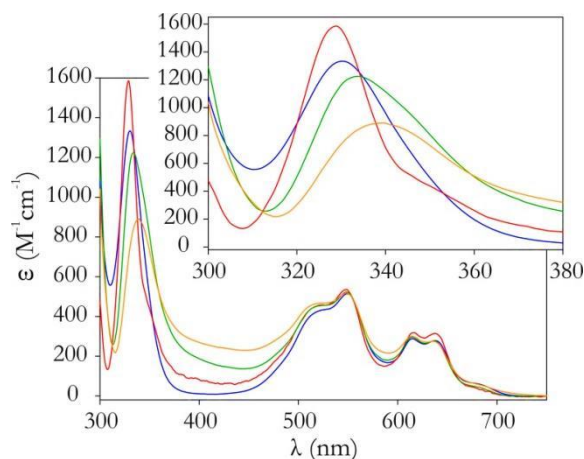


Figura 40: Espectros de las variantes en el L3 de NDM-1 sustituidas con Co(II).

Espectros diferenciales obtenidos restando el espectro de la apo-proteína al espectro de las proteínas sustituidas con Co(II). NDM-1 se muestra en azul, L3VIM en rojo, L3IMP en verde y L3Pro en anaranjado. La región 300-380 nm (donde se ubican las bandas de transferencia de carga) se muestra ampliada.

5.2.4. Estudio del mecanismo de acción de las variantes en el L3 de NDM-1

5.2.4.i. Hidrólisis de nitrocefina por variantes en el L3

Como ya se detalló anteriormente, la hidrólisis de compuestos β -lactámicos por M β Ls, cursa por medio de la formación de intermediarios de reacción aniónicos. Estos intermediarios fueron bien caracterizados en compuestos cromóforos derivados de las cefalosporinas como la nitrocefina y el cromacef (Sección 4.1.3.ii)^(124, 134, 135, 210). Mediante el

estudio de la hidrólisis de nitrocefina, Moali *et al.* observaron que modificaciones en el L3 disminuían la acumulación del intermediario de hidrólisis⁽⁴²⁾. En base a esto, se propuso estudiar el impacto del cambio en el bucle L3 en la acumulación de esta especie.

La nitrocefina posee un máximo de absorbancia a 390 nm cuando su anillo β -lactama se encuentra intacto y esta banda se corre a 485 nm al hidrolizarse (Sección 4.1.3.ii). La hidrólisis del compuesto por NDM-1 produce la formación transitoria de un intermediario de reacción con máximo a 665 nm, que puede ser observado por experimentos de flujo detenido⁽¹²⁴⁾. A fin de reproducir los resultados, se estudió la hidrólisis de 10 μ M de nitrocefina con 10 μ M de enzima durante 1 s. La temperatura de reacción se mantuvo a 6 °C para poder aumentar la acumulación de intermediarios de reacción. Como se observa en la Figura 41 A, en las cuatro reacciones de hidrólisis se observan las tres bandas a 390 nm, 485 nm y 605 nm, correspondientes al sustrato, producto e intermediario, respectivamente⁽¹²⁹⁾. La acumulación de la especie transiente es similar en NDM-1, L3IMP y L3VIM pero notablemente menor en L3Pro.

En la Figura 41 B se observa la variación de las λ_{\max} de las diferentes especies a lo largo del tiempo. Los datos indican que el consumo de sustrato es más rápido en las enzimas L3VIM y L3Pro, pero similar en las otras dos enzimas. La formación de producto ocurre primero con L3Pro, que es la enzima que produce menor acumulación de intermediario de reacción. La concentración máxima de intermediario acumulado por L3VIM es similar que para NDM-1 y L3IMP, pero la vida media de esta especie es más corta y decae rápidamente dando lugar a la formación de producto. Las trazas correspondientes a NDM-1 y L3IMP son similares, no obstante, puede observarse que el intermediario formado con L3IMP posee una vida media más larga, retrasando la formación de producto en esta variante.

Los cambios observados en los patrones temporales de reacción, revelan cambios en las constantes cinéticas. El análisis de los cambios de absorbancia a 485 nm en función del tiempo en L3Pro, demuestra que la generación del producto ocurre más rápidamente que en el resto de las enzimas. Por lo tanto, se puede suponer que el paso de protonación es más rápido, causando que la vida medio del intermediario de reacción sea corta. Con L3IMP y NDM-1, el intermediario estaría más estabilizado, dejando a la enzima transitoriamente atrapada en este complejo; sería de esperar que el paso de protonación sea más lento en estas enzimas. En L3VIM se observa un comportamiento intermedio entre estos grupos de variantes.

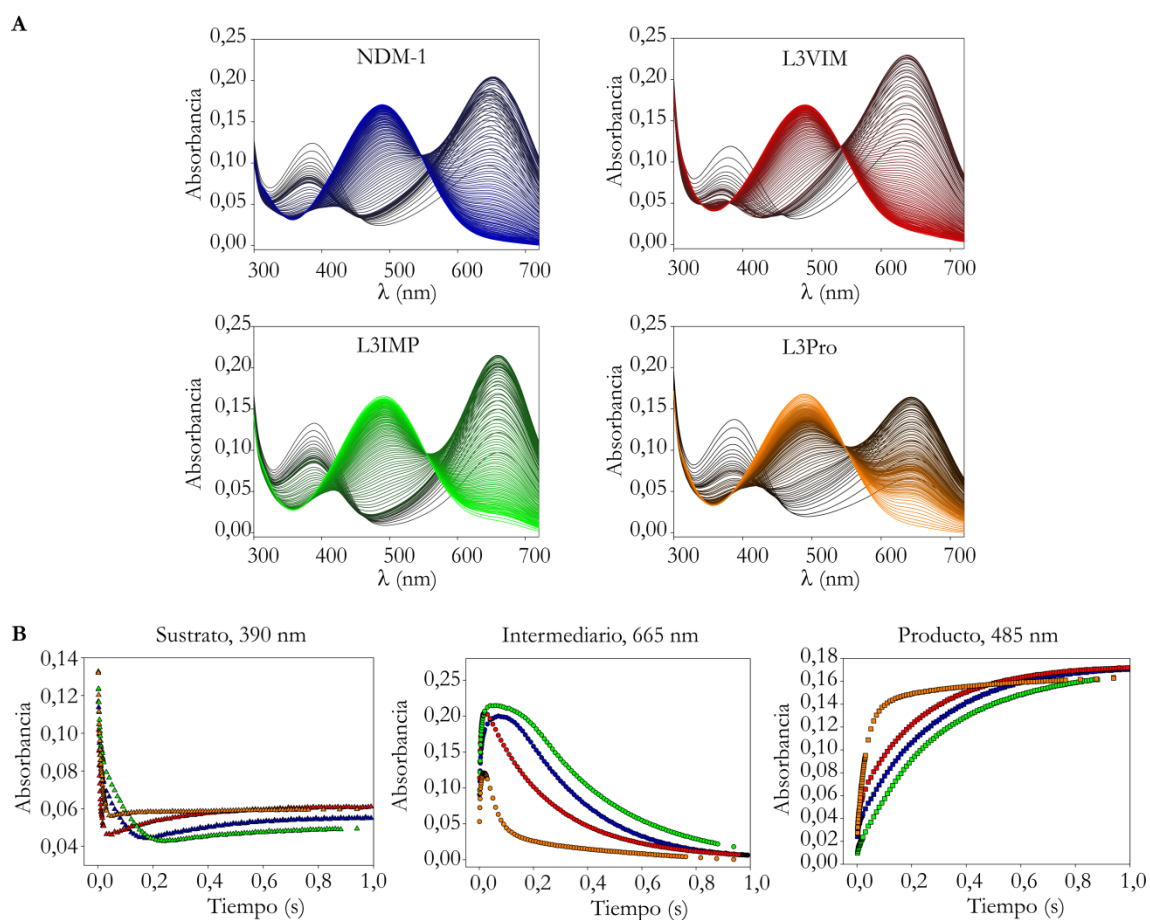


Figura 41: Hidrólisis de nitrocefina catalizada por las variantes en el L3 de NDM-1.

Hidrólisis de 10 μM de nitrocefina por 10 μM de enzima, en HEPES 100 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM y ZnSO_4 0,3 mM, a 6 $^\circ\text{C}$, monitoreado en un equipo de flujo detenido acoplado a un arreglo de fotodiodos. A: Espectros electrónicos de absorción obtenidos durante la reacción. Las reacciones progresan de negro (0,002 s) a color (1 s). B: Cambios de absorbancia en función del tiempo a 390 nm (λ_{max} sustrato), 665 nm (λ_{max} intermediario) y 485 nm (λ_{max} producto). Los datos de NDM-1 se muestran en azul, L3VIM rojo, L3IMP verde y L3Pro anaranjado.

5.2.4.ii. Hidrólisis de carbapenemes por variantes en el L3

Como se presentó en el Capítulo 4, la hidrólisis de carbapenemes por NDM-1 cursa por medio de un mecanismo de reacción ramificado con dos intermediarios de reacción productivos⁽¹⁸⁸⁾. Estos intermediarios, nombrados EI¹ y EI², tienen carácter aniónico y presentan máximos de absorbancia entre 320 y 400 nm. En la Figura 42 se observan los espectros diferenciales registrados durante las reacciones de hidrólisis de imipenem por las variantes en el L3 de NDM-1. Puede observarse que en la reacción catalizada por L3IMP se acumula mayor cantidad de ambos intermediarios de reacción que la correspondiente a

NDM-1. Además puede observarse la formación y consumo de ambas especies, a diferencia de lo que ocurre en la enzima salvaje donde la acumulación es menor y no llega a ser observada para el caso del EI^1 . Esto indica que con L3IMP la protonación se produce de manera más lenta. Esto también se evidencia por el valor más bajo de k_{cat} . Por el contrario, no se observa la formación de intermediario con L3VIM ni con L3Pro, sugiriendo que el paso de protonación es más rápido en estas enzimas.

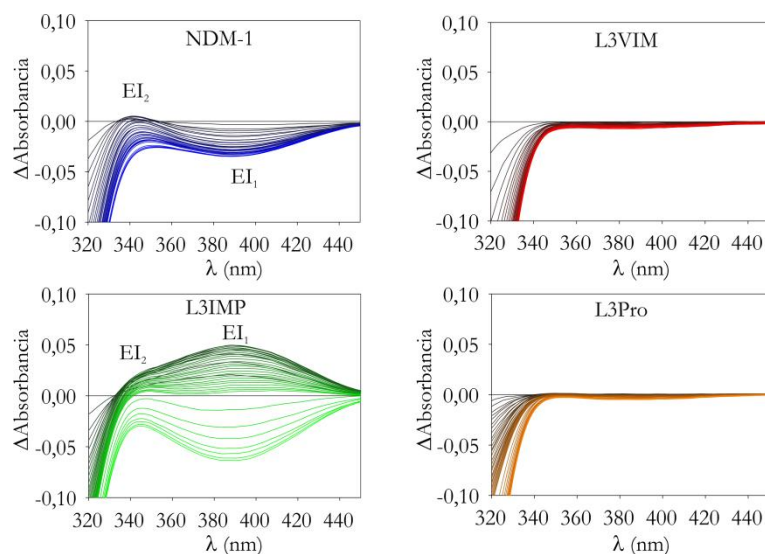


Figura 42: Hidrólisis de imipenem catalizada por las variantes en el L3 de NDM-1.

Secuencia de espectros diferenciales registrados durante la hidrólisis de 100 μ M de imipenem por 100 μ M de enzima. Las reacciones progresan de negro (0,002 s) a color (0,2 s): NDM-1 azul, L3VIM rojo, L3IMP verde y L3Pro anaranjado. Los espectros diferenciales fueron obtenidos por sustracción del espectro registrado a 0,002 s. Se indican las bandas correspondientes a los intermediarios de reacción EI_1 y EI_2 con λ_{max} a 390 y 343 nm, respectivamente. La reacción fue realizada en HEPES 100 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM y $ZnSO_4$ 0,3 mM, a 6 $^{\circ}$ C.

La formación de dos intermediarios aniónicos durante la hidrólisis de carbapenemes también se observó con meropenem. Al estudiar la hidrólisis de este compuesto con las variantes en el L3 se observa un comportamiento similar al de imipenem, Figura 43. La formación y consumo de ambos intermediarios es más lenta al hidrolizar con L3IMP en comparación con NDM-1, por lo que se observa una mayor acumulación de los mismos. Para L3VIM y L3Pro, sólo se observa una pequeña acumulación de una de las dos especies EI_1 o EI_2 , respectivamente.

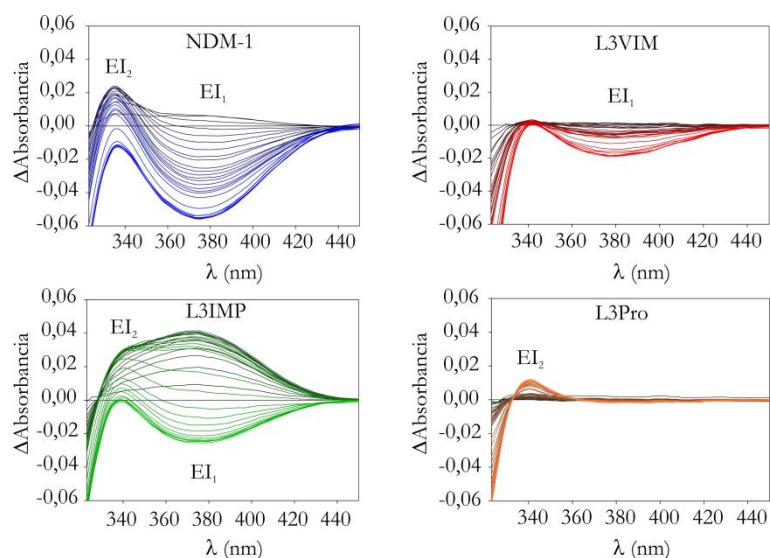


Figura 43: Hidrólisis de meropenem catalizada por las variantes en el L3 de NDM-1

Secuencia de espectros diferenciales registrados durante la hidrólisis de 100 μM de meropenem por 100 μM de enzima. Las reacciones progresan de negro (0,002 s) a color (0,2 s): NDM-1 azul, L3VIM rojo, L3IMP verde y L3Pro anaranjado. Los espectros diferenciales fueron obtenidos por sustracción del espectro registrado a 0,002 s a los siguientes espectros. Se indican las bandas correspondientes a los intermediarios de reacción EI_1 y EI_2 con λ_{max} a 375 y 336 nm respectivamente. La reacción fue realizada en HEPES 100 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM y ZnSO_4 0,3 mM, a 6 °C.

El mecanismo de reacción propuesto en el Capítulo 4 sugiere que los intermediarios de reacción aniónicos son estabilizados por interacciones con el ion metálico que ocupa el sitio DCH^(121, 124, 188). Los cambios observados en la acumulación de estas especies podrían indicar que ocurren alteraciones en el sitio activo de las enzimas (como efecto secundario de las modificaciones en el L3) o que el bucle podría estar interviniendo directamente en el mecanismo de reacción de NDM-1.

5.2.5. Estructuras cristalográficas de las variantes en el L3 de NDM-1

Con el fin de racionalizar el impacto que tienen los cambios en el bucle L3 dentro del esqueleto proteico de NDM-1, se realizó una caracterización estructural de las variantes por cristalografía de rayos X. Las proteínas quiméricas fueron cristalizadas por Estefanía Giannini en nuestro laboratorio, y difractadas en colaboración con Sebastián Klinke y Lisandro Otero de PLABEM y Pedro Alzari del Instituto Pasteur de Paris. Pudieron obtenerse las estructuras de las variantes L3IMP (PDB 6C6I) y L3Pro (PDB 6CAC) con una resolución de 1,65 Å y 1,80 Å, respectivamente. Se realizaron varios intentos de

cristalización de la variante L3VIM sin obtenerse resultados satisfactorios, lo cual se atribuye a la baja estabilidad de esta proteína con respecto a las otras variantes.

En la celda unidad de L3IMP se observaron dos moléculas enfrentadas cuyas estructuras estaban altamente conservadas. Para L3Pro se obtuvieron 4 moléculas en la celda unidad y la posición del bucle fue levemente variable. Sin embargo, como se observa en la Figura 44, la estructura global de las enzimas se encuentra conservada respecto a la estructura de NDM-1 código de PDB 3SPU⁽¹⁰²⁾. Los valores de RMSD respecto a los C α en todos los casos fueron menores a 0,15 Å. En la enzima L3Pro, el sitio 2 está ocupado por Cd(II) en lugar de Zn(II). Se han reportado otras estructuras de NDM-1 que poseen Cd(II) ocupando el mismo sitio (PDB 3ZR9, 4T'Z9)⁽¹⁰¹⁾ o ambos (PDB 6EX7, 3SRX, 4RAW), en las que se observa que dichas sustituciones no alteran la estructura del sitio activo.

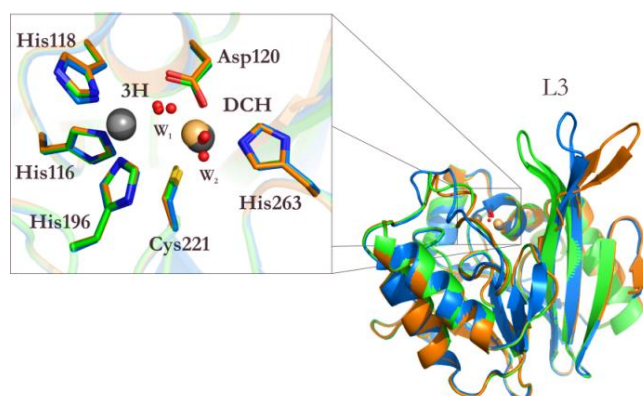


Figura 44: Alineamiento de las estructuras cristalográficas de NDM-1, L3IMP y L3Pro.

Alineamiento de las estructuras cristalográficas de NDM-1 (azul, PDB 3SPU), L3IMP (verde, PDB 6C6I) y L3Pro (anaranjado, PDB 6CAC) donde se muestra el esqueleto proteico y una magnificación del sitio activo. La posición y la orientación de los ligando del sitio activo están conservadas, al igual que las distancias entre los iones metálicos (3,8 Å). Todas las estructuras poseen dos moléculas de agua coordinadas a los metales (esferas rojas), aunque su posición es variable. Los iones Zn(II) se representan como esferas grises y los Cd(II) como anaranjadas claras. Las imágenes fueron generadas en PyMol⁽⁴⁷⁾.

Las posiciones de los residuos que forman el sitio activo y la del ion Zn(II) que se encuentra en el sitio 3H, se encuentran conservadas entre las enzimas. Se observaron leves variaciones, cercanas a 0,5 Å, en la posición del ion metálico del sitio DCH. Esto puede correlacionarse con los datos espectroscópicos de las proteínas sustituidas con Co(II), donde se identificaron leves perturbaciones en el sitio DCH pero una geometría conservada en el sitio 3H. No se identificaron variaciones en los residuos que forman la red de puentes hidrógenos de la segunda esfera de coordinación.

Por su parte, la conformación del L3 es considerablemente diferente entre las variantes, como se muestra en la Figura 45. Los factores B de los L3 son más grandes que en el resto del esqueleto proteico (cerca de 20 \AA^2 en L3IMP y 30 \AA^2 en L3Pro), indicando una mayor flexibilidad de esa región. Sin embargo, la densidad electrónica está bien definida a lo largo de toda la proteína, incluyendo los L3, y esto permite definir de forma certera la posición del bucle en cada variante.

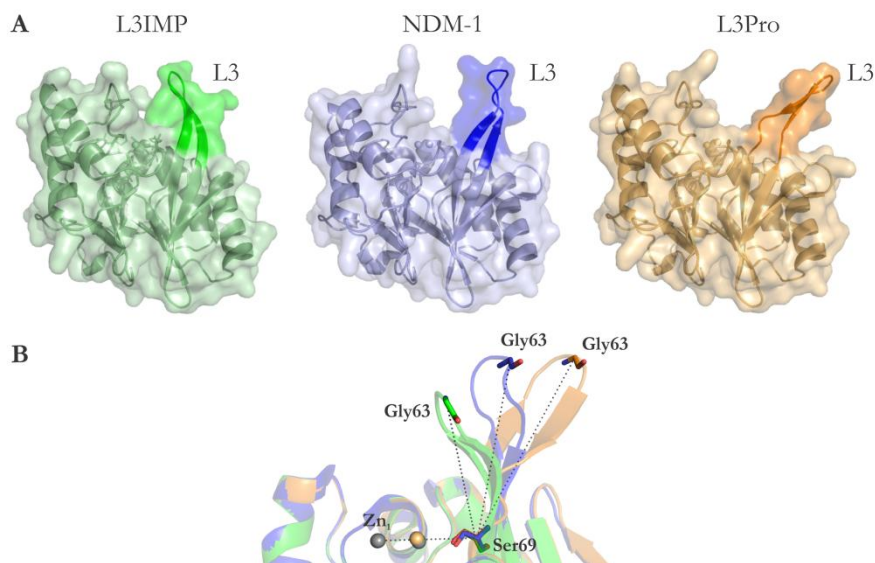


Figura 45: Análisis de la variación en la posición del L3 de NDM-1, L3IMP y L3Pro

A: Estructuras cristalográficas de L3IMP (verde, 6C6I, cadena B), NDM-1 (azul, 3SPU, cadena D) y L3Pro (anaranjado, 6CAC, cadena D). Las imágenes fueron generadas luego del alineamiento de las tres estructuras. B: Alineamiento de las estructuras y medida del ángulo formado entre el Zn1, el C α de la Ser69 y el C α de la Gly63. Los valores obtenidos fueron 68° para L3IMP, 88° para NDM-1 y 110° para L3Pro. Las imágenes fueron generadas en PyMol⁽⁴⁷⁾

En la variante L3Pro, la inserción de la prolina en la base del bucle desplaza las interacciones entre los residuos que forman la lámina β , desorganizando al L3 de NDM-1. Esta falta de estructura secundaria genera que el bucle se abra y de lugar a un sitio activo más accesible. El hecho de que el bucle sea un residuo más largo que el de la enzima salvaje también estaría afectando los contactos entre los residuos.

El L3 en L3IMP está estabilizado en una conformación cerrada. Esta disposición no está reportada en ninguna de las estructuras de NDM-1 libre (3SPU), unida a ligandos (4EYL, 4RBS, 4HKY) o a compuestos inhibidores (4EXS, 4U4L). En su lugar, se asemeja a la posición del L3 en IMP-1 libre (5EV6) o unida a producto (5EV8)⁽⁷⁹⁾, no obstante, en

el caso de L3IMP la posición del L3 es aún más cerrada que en las estructuras nombradas. Esta disposición del bucle está estabilizada por interacciones hidrofóbicas del Trp64 con la His263, la Val67 y la Val61, que atraen al residuo hacia el sitio activo, Figura 46.

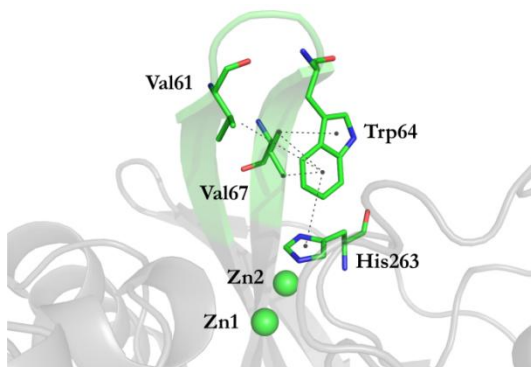


Figura 46: Interacciones hidrofóbicas del residuo Trp64 en L3IMP.

Estructura cristalográfica de L3IMP que muestra las interacciones hidrofóbicas del Trp64 con la His263 (interacción del tipo π - π en forma de T), Val67 (interacción π - σ) y Val61 (interacción π -alquil). Las interacciones fueron identificadas con el programa Discovery Studio⁽²¹¹⁾ y la imagen fue realizada en PyMol⁽⁴⁷⁾.

En comparación con NDM-1, el bucle de L3IMP adopta una conformación más cerrada hacia el sitio activo, mientras que en L3Pro el L3 se encuentra alejado del sitio activo. Esto marca una clara tendencia en el tamaño de la cavidad del sitio activo que es pequeña en L3IMP pero grande y accesible en el caso de L3Pro (Figura 45 A). La amplitud del bucle puede definirse por el ángulo formado entre el Zn1, el C α de la Ser75 (localizada en la base del L3) y el C α de la Gly69 (localizado en la punta de los L3 en las tres enzimas), como se muestra en la Figura 45 B. Mientras más grande es el ángulo formado por esos átomos, más alejado se encuentra el bucle del sitio activo. Estos ángulos fueron 68° para L3IMP, 88° para NDM-1 y 110° para L3Pro.

5.3. Discusión: impacto del bucle L3 en el mecanismo de reacción de NDM-1

En este capítulo se evaluó la hipótesis de que modificaciones en el L3 de NDM-1 podrían alterar la eficiencia catalítica por ciertos sustratos. Para ello se reemplazó el bucle L3 nativo de NDM-1 por el correspondiente a las enzimas IMP-1 y VIM-2, y se diseñó una

tercera variante donde se insertó un residuo de prolina en la base del bucle (este residuo se encuentra conservado en muchas M β LS).

Estudios del L3 por diversas metodologías como RMN, cristalografía de rayos X y espectroscopía de resonancia doble electrón-electrón, han demostrado que el bucle estaría implicado en la unión y reconocimiento de sustratos y compuestos inhibidores^(50, 97, 101, 102, 107, 115-117, 199-201, 204, 205). En favor de esta hipótesis, se cuenta con numerosos ejemplos de cómo modificaciones en el L3 de M β LS (dentro de las que se encuentran mutaciones puntuales, deleciones y reemplazo del bucle) afectan el perfil de sustrato^(42, 113, 198-200, 206). Sin embargo, los parámetros cinéticos obtenidos para las variantes en el L3 de NDM-1 no presentan alteraciones significativas con respecto a la proteína salvaje. Resultados similares fueron obtenidos por Borgianni *et al.* quienes no evidenciaron grandes diferencias en el perfil de sustrato al sustituir los residuos Phe61, Ala64 y Tyr67 localizados en el L3 de VIM-2⁽²¹²⁾. Esto marca una gran diferencia con los experimentos realizados en IMP-1, donde sustituciones puntuales de residuos y reemplazos del bucle modificaron la eficiencia catalítica de la enzima frente a diversos sustratos^(42, 49, 50).

Las modificaciones en el L3 alteran notoriamente la estabilidad de NDM-1. Los mayores efectos de desestabilización ocurren cuando las proteínas se encuentran sin metal, especialmente en L3VIM (efecto que se evidenció tanto *in bacteria* como *in vitro*). La desestabilización en esta variante se suma a una baja afinidad por Zn(II) que lleva a una mayor sensibilidad a la deprivación de metal y un menor nivel de expresión que disminuye el rendimiento durante las purificaciones. Recientemente se ha reportado que, en condiciones de baja disponibilidad de Zn(II), se produce la degradación de las M β LS que se encuentren en su forma apo y solubles en el periplasma bacteriano⁽¹⁰⁶⁾. Los resultados presentados dan crédito a esos hallazgos y resaltan el papel crucial de los iones metálicos en la estabilización de M β LS durante los procesos infecciosos y al intentar purificar estas proteínas.

Las estructuras cristalográficas y los datos espectroscópicos obtenidos con las proteínas con Co(II), indican que el sitio activo de las variantes se encuentra conservado, con una leve perturbación en el sitio DCH. Esta perturbación es mayor en la variante L3Pro, donde la intensidad de la banda de transferencia de carga de la variante con Co(II) se encuentra disminuida y presenta un corrimiento a la derecha. Además, en las estructuras cristalográficas se observa una leve perturbación en la posición del ion metálico en el sitio 2. Los cambios en el sitio activo debido a modificaciones en el L3 se transmiten a través de la red de puentes hidrógenos que forman la esfera de coordinación secundaria. Esta red

conecta el sitio activo con el esqueleto proteico. En particular el L3 está vinculado por interacciones de la Ser69 y la Asn70 (ubicados en la base del bucle) con la Gly262, que interacciona con el ligando metálico Asp120. Perturbaciones similares en el sitio activo fueron reportadas para mutantes de segunda esfera obtenidas por evolución *in vitro* en BcII⁽⁴⁸⁾.

Luego de numerosos intentos de cristalización, no fue posible obtener cristales de la variante L3VIM. Esta dificultad podría estar relacionada a la baja estabilidad de la enzima. Sin embargo, la buena correlación observada entre los datos espectroscópicos obtenidos con las proteínas con Co(II) y las estructuras cristalográficas de las variantes con Zn(II), permitirían extrapolar los resultados espectroscópicos de L3VIM con la enzima nativa con Zn(II). Debido a la gran similitud del espectro de bi-Co(II)-L3VIM con el de bi-Co(II)-NDM-1, se espera que el sitio activo de la variante esté conservado y que las diferencias observadas entre estas enzimas se deban a un cambio en la estructura del L3.

Las estructuras cristalográficas muestran grandes diferencias en la posición del L3 entre las variantes. Puede observarse que diferentes bucles pueden adoptar diferentes conformaciones dentro del mismo esqueleto proteico, y estos cambios son productos de alteraciones en su secuencia de aminoácidos. En comparación con otras M β Ls, el sitio activo de NDM-1 es muy amplio debido a la posición abierta de los bucles L3 y L10, y la carencia de residuos voluminosos que apunten hacia el sitio activo. Tanto las estructuras cristalográficas de NDM-1 libre como formando complejos EP, muestran al L3 en una conformación extendida y abierta^(102, 107, 111). La presencia de una Pro en la base del bucle rompe la estructura de lámina beta propia de NDM-1, originando a que el L3 se aleje aún más del sitio activo en comparación con la enzima salvaje. La mayor accesibilidad al sitio activo podría facilitar la entrada de sustratos. Esta observación podría explicar los altos valores de K_M obtenidos para esta variante. Los resultados observados se respaldan en estudios realizados en IMP-18, donde la sustitución Thr68Pro produce cambios en la eficiencia catalítica de la enzima⁽¹⁹⁸⁾.

El reemplazo del L3 en L3IMP produce el efecto contrario a la inserción de Pro: el bucle se cierra sobre el sitio activo, dando lugar a un surco catalítico estrecho. Esta posición es similar a la observada en la enzima salvaje IMP-1, donde el bucle está estabilizado en una conformación cerrada por interacciones hidrofóbicas⁽¹⁹⁷⁾. El Trp64 que se encuentra en el vértice del L3, se encuentra apuntando al sitio activo de la enzima (Figura 46). Esta orientación está favorecida por interacciones hidrofóbicas con la Val67, la Val61 (residuos que forman parte del L3) y la His263 (ligando del Zn(II) en sitio DCH).

Tanto en IMP-1 como en BcII, se ha propuesto se requiere de la presencia de un aminoácido grande e hidrofóbico en la posición 64 para el correcto funcionamiento de las enzimas, y que este residuo tendría una función esencial en la unión de sustrato y catálisis^(50, 213). Este resultado afirma la función del Trp64 de unir ligandos diversos proveyendo una superficie hidrofóbica que puede adoptar múltiples conformaciones⁽⁴²⁾. NDM-1 posee un residuo de Phe en la posición 64, que también se cree que podría estabilizar a los sustratos por interacciones hidrofóbicas⁽⁹⁷⁾. Por lo tanto, el reemplazo del bucle de NDM-1 por el de IMP-1 no modificaría este aspecto esencial para la interacción con sustratos.

A pesar de los cambios menores en los parámetros cinéticos en estado estacionario de las variantes estudiadas, se observó un impacto significativo en el mecanismo catalítico de las enzimas al hidrolizar nitrocefina y carbapenemes. Estas alteraciones se evidenciaron por cambios en la acumulación de los intermediarios aniónicos para la hidrólisis de esos compuestos, y por cambios en los perfiles temporales de reacción al hidrolizar nitrocefina. La estabilidad de las especies intermediarias está dada por interacciones con los iones metálicos^(130, 173, 188), y se ha identificado que cambios sutiles en el sitio activo de M β Ls pueden afectar la estabilidad de estas especies⁽¹⁷³⁾. Sin embargo, no se encontraron alteraciones en la conformación del sitio activo de las variantes que pudieran dar cuenta de las diferencias observadas en la acumulación los intermediarios de reacción. En su lugar se encontró una tendencia de gran relevancia entre la posición del bucle y la acumulación de especies. Siguiendo la tendencia L3Pro, NDM-1, L3IMP, mientras más cerrado es el sitio activo, mayor cantidad de intermediarios de reacción se acumula.

La vida media de los intermediarios de reacción depende de la velocidad de protonación de estas especies^(121, 130, 188). Esta velocidad puede estar modulada por múltiples factores, como la accesibilidad al solvente. No puede descartarse que la conformación cerrada del L3 en L3IMP desfavorezca la accesibilidad del solvente, volviendo menos efectivo el paso de protonación. Este efecto se refleja también en los bajos valores de k_{cat} para carbapenemes (Tabla 11). En el esqueleto de BcII, el reemplazo del L3 por el de IMP-1 favorece las interacciones hidrofóbicas entre el Trp64 y el intermediario de reacción formado durante la hidrólisis de nitrocefina, dando lugar a una mayor acumulación de esta especie por un aumento en la velocidad de formación de la misma⁽⁴²⁾. En el caso de L3IMP no se observa una gran variación en la traza de consumo de sustrato (Figura 41 B), la mayor acumulación de intermediario debería estar dada por una desventaja en la protonación.

En L3Pro el sitio activo abierto y accesible, aumenta la velocidad de reacción (valores altos de k_{cat}) haciendo que la velocidad de formación de producto sea rápida (como se observa para nitrocefina) y disminuyendo la vida media de los intermediarios de reacción. Esto hace que los intermediarios no lleguen a acumularse en concentración suficiente como para ser detectados en el caso de los carbapenemes. Sería de esperar que el L3 menos hidrofóbico de L3VIM también favorezca la protonación de los intermediarios de reacción y que esto disminuya la vida media de los mismos y aumente el valor de k_{cat} para los carbapenemes (aunque en medida mucho menor de lo que ocurre en L3Pro).

En base a estos resultados, NDM-1 sería una enzima optimizada que posee un balance al contar con un sitio activo abierto que permite la entrada de solvente y sustratos voluminosos, pero rodeado de residuos hidrofóbicos que favorecen las interacciones necesarias para posicionar a los sustratos y dar lugar a una catálisis productiva. La optimización de la secuencia del L3 de NDM-1 podría explicar la escasez de mutaciones naturales en los bucles o la segunda esfera de coordinación. Esto marca una diferencia con las familias IMP y VIM donde se encontraron muchas mutaciones que estarían modulando la especificidad de sustrato⁽¹⁹⁸⁻²⁰⁰⁾. De todas formas, el bajo número de variantes de NDM también estaría relacionado al poco tiempo que esta familia ha sido reconocida y estudiada.

Los residuos que componen el L3 juegan un rol fundamental en la hidrólisis de antibióticos por M β Ls a través de una conexión indirecta con los ligandos metálicos (transmitido por puentes hidrógenos de la esfera de coordinación secundaria) que controlan la conformación y flexibilidad de este bucle. Los descubrimientos presentados acentúan la posibilidad de utilizar al L3 como blanco para el diseño de inhibidores, haciendo hincapié en el rol funcional en lugar de en su secuencia de aminoácidos.

Es importante destacar que la flexibilidad del L3 también contribuiría al amplio perfil de sustrato de NDM-1, ya que la reorientación de esta estructura podría facilitar la unión de sustratos estructuralmente diferentes y permitiría formar complejos ES productivos⁽¹⁰¹⁾. Se observó una correlación entre la movilidad del L3 en mutantes de BcII y un aumento en el perfil de sustrato⁽²⁰¹⁾, y que el movimiento de esta estructura es fundamental para la catálisis^(115, 116, 204-206). Ya que la flexibilidad del L3 no ha sido considerada para el diseño de inhibidores, como perspectiva sería interesante evaluar los cambios en la flexibilidad del L3 de las variantes por medio del uso de RMN y ver si, sumado al efecto de la apertura del bucle, existe una correlación entre el mecanismo de reacción y la flexibilidad de esta estructura.

Conclusiones Generales

A lo largo de este trabajo de Tesis, se estudiaron las características biofísicas y bioquímicas de NDM-1, el mecanismo de hidrólisis de carbapenemes catalizado por esta enzima, y la relación entre la estructura y la función mediada por el bucle L3. El conjunto de los resultados presentados aporta información al conocimiento de una de las principales enzimas responsables de la resistencia bacteriana a antibióticos β -lactámicos. Las conclusiones del presente trabajo se detallan a continuación.

1. Mediante la delección de los primeros 38 aminoácidos de la secuencia de NDM-1, fue posible obtener esta proteína en su forma soluble, con buen rendimiento y contenido metálico. NDM-1 es una enzima de amplio espectro, siendo activa contra antibióticos β -lactámicos de diferentes familias en medidas de actividad en estado estacionario. El estudio de la afinidad por Zn(II), reveló que la incorporación de los iones metálicos se produce en forma secuencial y con constantes de afinidad muy similares, en el rango nM. Utilizando espectroscopía UV-visible y RMN de $^{113}\text{Cd(II)}$, se comprobó que NDM-1 puede incorporar en forma eficiente Co(II) y Cd(II) en reemplazo de los Zn(II) nativos. Por medidas de actividad en estado estacionario, se verificó que estos metales pueden emplearse como sondas espectroscópicas funcionales en NDM-1, ya que en ambos casos la alteración en la eficiencia catalítica de las enzimas metalo-sustituidas fue baja. El empleo de estas enzimas permite analizar la coordinación de los iones metálicos en el sitio activo. Estos resultados demuestran el potencial de las variantes metalo-sustituidas en el estudio de cambios en la coordinación de los metales en el sitio activo durante procesos catalíticos o de unión de ligandos.

2. La combinación de técnicas de mezclado rápido, RMN de protones y simulaciones computacionales QM-MM, aplicadas al estudio de la hidrólisis de carbapenemes por NDM-1, permitieron obtener el mecanismo por el cual esta enzima cataliza la reacción. Este mecanismo incluye dos especies intermediarias (EI^1 y EI^2), con características aniónicas, que son estabilizadas por interacción con los iones metálicos en el sitio activo, y que pueden dar lugar a diferentes tipos de productos de hidrólisis. La protonación de estas

especies puede ocurrir por un agua activada por interacción con los iones metálicos o por un agua del entorno cercano al sitio activo, localizada en la cara β del compuesto. Sólo uno de los dos intermediarios de reacción podría dar lugar a la formación de un complejo EP estable. La suma de los resultados expuestos con los publicados recientemente para la hidrólisis de imipenem por la M β L B3 GOB-18 y la B2 Sfh-I, permiten concluir que la hidrólisis de carbapenemes por todas las subclases de M β Ls cursa por intermediarios de reacción con las mismas características y que el metal que ocupa el sitio 2 sería el principal encargado de dirigir el proceso de hidrólisis. Sumado a esto, la activación del agua que realiza el ataque nucleofílico sería diferente en las enzimas mono y bi-metaladas, marcando diferencias en las velocidades de formación y consumo del complejo ES. Este complejo no sería estable en enzimas bimetálicas, lo cual se puede explicar por la mayor reactividad del nucleófilo atacante, activado por el Zn(II). El hecho de que, sin importar las diferencias estructurales, durante la hidrólisis de carbapenemes en todas las M β Ls se acumulen los mismos intermediarios de reacción, establece al mecanismo catalítico como un punto de partida para el diseño racional de inhibidores activos frente a las tres subclases.

3. Se generaron variantes en el L3 de NDM-1, en dos de las cuales se insertó el bucle de VIM-2 o el de IMP-1, y una tercer mutante en la que se insertó un residuo de prolina en la base del bucle. Estas variaciones alteraron notoriamente la estabilidad de la enzima y su afinidad por metal (tanto *in bacteria* como *in vitro*), mientras que la coordinación de los iones metálicos en el sitio activo no presentó grandes alteraciones. En contraste a los resultados esperados, no se observaron grandes alteraciones en el perfil de sustrato de las variantes. El estudio del mecanismo de hidrólisis de nitrocefina y carbapenemes, junto con las estructuras cristalográficas de las variantes, revelaron que el L3 podría modelar el mecanismo catalítico de la enzima mediante la alteración de la vida media de los intermediarios de reacción. Se observó que diferentes bucles pueden adoptar diferentes conformaciones dentro del mismo esqueleto proteico y estos cambios alteran el tamaño del surco del sitio activo. Se encontró una correlación entre la magnitud de este surco y la acumulación de intermediarios de reacción, de modo que un sitio activo más abierto desfavoreció la acumulación de intermediarios generados durante la hidrólisis de todos los compuestos ensayados. Este resultado indica que la secuencia de aminoácidos del L3 puede modular la vida media de los intermediarios, afectando el proceso de catálisis enzimática y estableciendo una correlación entre la estructura y la función en NDM-1.

Resumen

Los antibióticos β -lactámicos son la clase de antibiótico más utilizada. Sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos propulsó la generación de mecanismos de resistencia bacterianos. La diseminación global de esas estrategias entre bacterias de diferentes especies hace que los antibióticos conocidos se tornen ineficientes. Para restablecer la efectividad de los compuestos conocidos, se propone incorporar a los tratamientos inhibidores de los mecanismos de resistencia. El mecanismo más potente y mayormente empleado por las bacterias para hacer frente a la acción de antibióticos β -lactámicos es la producción de β -lactamasas. Estas enzimas hidrolizan el anillo β -lactama, dejando al compuesto inefectivo. Dentro de estas enzimas se encuentran las metalo- β -lactamasas (M β Ls), que son enzimas dependientes de Zn(II), cuya relevancia clínica se debe a su capacidad para hidrolizar eficientemente los antibióticos β -lactámicos utilizados como último recurso, los carbapenemes. Al momento, no se cuenta con inhibidores de uso clínico para estas enzimas. Dentro de las M β Ls, las enzimas de subclase B1 son las de mayor relevancia clínica. La enzima B1 *New Delhi Metallo- β -Lactamase-1* (NDM-1), es una de M β Ls de mayor relevancia clínica debido a su rápida diseminación y eficiente actividad carbapenemasa. Esta enzima posee dos iones metálicos en su sitio activo, ocupando los sitios conocidos como sitios 3H o 1 y DCH o 2. En el presente trabajo se propuso estudiar las características bioquímicas y biofísicas de esta enzima, el mecanismo por el cual cataliza la hidrólisis de carbapenemes y la relación entre la estructura su mecanismo catalítico.

Se logró purificar a NDM-1 en forma soluble con buen rendimiento y contenido metálico. Esta enzima mostró ser eficiente al hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. La capacidad de unir Zn(II) fue medida por ensayos de competencia frente al quelante colorimétrico PAR. Estos ensayos mostraron que la incorporación de metal ocurre de manera secuencial, siendo mayor la afinidad por el primer ion metálico que por el segundo. Luego de la remoción del metal nativo, la enzima pudo incorporar Co(II) y Cd(II) en ambos sitios metálicos. Ambas proteínas metalo-sustituídas fueron activas, demostrando que estos metales pueden utilizarse como sondas espectroscópicas funcionales en esta enzima. El espectro de absorbancia de la proteína bi-Co(II)-NDM-1 mostró un patrón de 5 bandas de campo ligando (bandas d-d), propias de la coordinación de los iones metálicos

en el sitio 3H, y una banda de transferencia de carga metal-ligando, producto de la interacción del Co(II) en el sitio DCH con la cisteína. La incorporación de Cd(II) a NDM-1 fue examinada por RMN de $^{113}\text{Cd(II)}$. En el espectro se visualizaron dos bandas principales y cada una fue asignada a un sitio metálico. Estas señales fueron alteradas al incubarse la enzima con el inhibidor de M β Ls diseñado por el grupo, L-CS319, denotando que el compuesto interactúa con ambos metales al momento de su unión. Por lo tanto, estas enzimas pueden ser empleadas para estudiar cambios en la coordinación de los metales en el sitio activo durante procesos catalíticos o de unión de ligandos.

En una segunda etapa, se estudió el mecanismo de hidrólisis de carbapenemes por NDM-1, utilizando técnicas de cinética rápida y diversas espectroscopias. Los datos obtenidos al estudiar el proceso de hidrólisis catalizado por bi-Zn(II)-NDM- y bi-Co(II)-NDM-1, revelaron que ambas enzimas emplean el mismo mecanismo de reacción. Este mecanismo es ramificado e incluye dos intermediarios de reacción productivos (EI^1 y EI^2). Sólo EI^2 puede dar origen a un complejo EP estable. La formación de este complejo fue estudiada por titulación con sustrato hidrolizado en la enzima sustituida con Co(II).

Los productos generados durante la hidrólisis de imipenem se estudiaron por RMN de ^1H . En estos ensayos, se evidenció que la protonación era estereoselectiva y se concluyó que cada intermediario de reacción tendría que dar lugar a productos diferentes. La identidad de estas especies fue estudiada por cálculos computacionales. Por esta técnica, se comprobó que podría producirse la acumulación de especies intermediarias con carga negativa, cuya estabilidad dependería de la deslocalización de la carga y de interacciones con los iones metálicos. El pasaje de un intermediario a otro estaría marcado por la pérdida del agua coordinada a puente.

Estudios recientes de nuestro grupo con las M β Ls B2 Sfh-I y B3 GOB-18 (en su forma mono-metalada), revelaron que la hidrólisis de carbapenemes por estas enzimas cursa por medio del mismo mecanismo de reacción y que durante el proceso se acumulan intermediarios con características espectroscópicas similares a los observados en NDM-1. Estos resultados establecen al mecanismo catalítico como un punto de partida para el diseño racional de inhibidores activos frente a las tres subclases.

El sitio activo de las M β Ls B1 se encuentra rodeado por dos bucles, nombrados L3 y L10. Se ha reportado que el L3 tendría un papel fundamental en la primera interacción de la enzima con los sustratos y que ayudaría al posicionamiento de los mismos por medio de interacciones hidrofóbicas. Para evaluar la función de esta estructura en NDM-1, se

generaron dos variantes en las que se intercambi6 el bucle nativo por el de enzimas de relevancia cl6nica de la misma subclase VIM-2 e IMP-1 (nombradas L3VIM y L3IMP), y una tercera variante en la que se insert6 un residuo de prolina en la base del bucle (L3Pro). Las propiedades de estas variantes fueron evaluadas *in bacteria* e *in vitro*. Las variantes mostraron una disminuci6n en su estabilidad y alteraciones en su afinidad por metal, siendo la variante L3VIM la que m6s se diferenci6 de la enzima salvaje. A diferencia de lo esperado, no se observaron grandes cambios en el perfil de sustrato de las variantes, pero si se evidenci6 una alteraci6n en la acumulaci6n de intermediarios de reacci6n durante la hidr6lisis de nitrocefina y carbapenemes, indicando cambios en el mecanismo de reacci6n de las variantes. La vida media de los intermediarios fue mayor en L3IMP y menor en L3VIM y L3Pro.

Fue posible resolver las estructuras de las enzimas L3IMP y L3Pro por cristalograf6a de rayos X. La mayor diferencia entre estas variantes fue la posici6n del L3 que, con respecto a la estructura de NDM-1, se encontraba m6s cerca del sitio activo en L3IMP y m6s alejado en L3Pro. Se encontr6 una correlaci6n directa entre el tama6o del surco catal6tico (modulado por la posici6n del bucle L3) y la acumulaci6n de intermediarios de reacci6n: mientras m6s alejado del sitio activo se encontraba el L3, menor era la acumulaci6n de los intermediarios. Este resultado indica que la secuencia de amino6cidos del L3 puede modular la vida media de los intermediarios, afectando el proceso de cat6lisis enzim6tica y estableciendo una correlaci6n entre la estructura y la funci6n en NDM-1.

Bibliografía

- 1- Fleming, A. (1929), "On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*.", Br J Exp Pathol, vol. 10, p. 226-236.
- 2- Chain, E., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J. y Sanders, A.G. (1940), "Penicillin as a Chemotherapeutic Agent", The Lancet, vol. 236, p. 226-228.
- 3- Demain, A.L. y Elander, R.P. (1999), "The beta-lactam antibiotics: past, present, and future", Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 75, p. 5-19.
- 4- Niccolai, D., Tarsi, L. y Thomas, R.J. (1997), "The renewed challenge of antibacterial chemotherapy", Chemical Communications, vol. p. 2333-2342.
- 5- Abraham, E.P., Chain, E., Baker, W. y Robinson, R. (1943), "Penicillamine, a Characteristic Degradation Product of Penicillin", Nature, vol. 151, p. 107-107.
- 6- Ventola, C.L. (2015), "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats", P T, vol. 40, p. 277-83.
- 7- Medeiros, A.A. (1997), "Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics", Clin Infect Dis, vol. 24 Suppl 1, p. S19-45.
- 8- Page, M.I. (1999), "The reactivity of beta-lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of beta-lactamases", Curr Pharm Des, vol. 5, p. 895-913.
- 9- Livermore, D.M. y Woodford, N. (2006), "The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter", Trends Microbiol, vol. 14, p. 413-20.
- 10- Speck, P. (2013), "Antibiotics: avert an impending crisis", Nature, vol. 496, p. 169.
- 11- Spellberg, B. y Gilbert, D.N. (2014), "The Future of Antibiotics and Resistance: A Tribute to a Career of Leadership by John Bartlett", Clinical Infectious Diseases, vol. 59, p. S71-S75.
- 12- Wright, G. (2015), "Antibiotics: An irresistible newcomer", Nature, vol. 517, p. 442-4.
- 13- Davies, J. (2006), "Where have All the Antibiotics Gone?", Can J Infect Dis Med Microbiol, vol. 17, p. 287-90.
- 14- Rotondo, C.M. y Wright, G.D. (2017), "Inhibitors of metallo-beta-lactamases", Curr Opin Microbiol, vol. 39, p. 96-105.
- 15- Page, M.G. (2004), "Cephalosporins in clinical development", Expert Opin Investig Drugs, vol. 13, p. 973-85.
- 16- Singh, G.S. (2004), "Beta-lactams in the new millennium. Part-I: monobactams and carbapenems", Mini Rev Med Chem, vol. 4, p. 69-92.
- 17- Fisher, J.F., Meroueh, S.O. y Mobashery, S. (2005), "Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity", Chem Rev, vol. 105, p. 395-424.

- 18- Walsh, C. (2000), "*Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance*", Nature, vol. 406, p. 775-81.
- 19- Llarrull, L.I., Testero, S.A., Fisher, J.F. y Mobashery, S. (2010), "*The future of the beta-lactams*", Curr Opin Microbiol, vol. 13, p. 551-7.
- 20- Bebrone, C. (2007), "*Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily*", Biochem Pharmacol, vol. 74, p. 1686-701.
- 21- Bonomo, R.A. (2017), "*Beta-Lactamases: A Focus on Current Challenges*", Cold Spring Harb Perspect Med, vol. 7.
- 22- Frere, J.M. (1995), "*Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics*", Mol Microbiol, vol. 16, p. 385-95.
- 23- Crowder, M.W., Spencer, J. y Vila, A.J. (2006), "*Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria*", Acc Chem Res, vol. 39, p. 721-8.
- 24- Sabath, L.D. y Abraham, E.P. (1965), "*Cephalosporinase and penicillinase activity of Bacillus cereus*", Antimicrob Agents Chemother (Bethesda), vol. 5, p. 392-7.
- 25- Knott-Hunziker, V., Petursson, S., Jayatilake, G.S., Waley, S.G., Jaurin, B. y Grundstrom, T. (1982), "*Active sites of beta-lactamases. The chromosomal beta-lactamases of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli*", Biochem J, vol. 201, p. 621-7.
- 26- Cuchural, G.J., Jr., Malamy, M.H. y Tally, F.P. (1986), "*Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in Bacteroides fragilis*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 30, p. 645-8.
- 27- Ajiki, Y., Koga, T., Ohya, S., Takenouchi, T., Yasuda, H., Watanabe, K. y Ueno, K. (1991), "*beta-Lactamase produced by a highly beta-lactam-resistant strain of Bacteroides fragilis: an obstacle to the chemotherapy of experimental mixed infections*", J Antimicrob Chemother, vol. 28, p. 537-46.
- 28- Cricco, J.A. y Vila, A.J. (1999), "*Class B beta-lactamases: the importance of being metallic*", Curr Pharm Des, vol. 5, p. 915-27.
- 29- Wang, Z., Fast, W., Valentine, A.M. y Benkovic, S.J. (1999), "*Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism*", Curr Opin Chem Biol, vol. 3, p. 614-22.
- 30- Moran-Barrio, J., Limansky, A.S. y Viale, A.M. (2009), "*Secretion of GOB metallo-beta-lactamase in Escherichia coli depends strictly on the cooperation between the cytoplasmic DnaK chaperone system and the Sec machinery: completion of folding and Zn(II) ion acquisition occur in the bacterial periplasm*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 53, p. 2908-17.
- 31- Meini, M.R., Gonzalez, L.J. y Vila, A.J. (2013), "*Antibiotic resistance in Zn(II)-deficient environments: metallo-beta-lactamase activation in the periplasm*", Future Microbiol, vol. 8, p. 947-79.
- 32- Cerasi, M., Ammendola, S. y Battistoni, A. (2013), "*Competition for zinc binding in the host-pathogen interaction*", Front Cell Infect Microbiol, vol. 3, p. 108.
- 33- Hood, M.I. y Skaar, E.P. (2012), "*Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface*", Nat Rev Microbiol, vol. 10, p. 525-37.
- 34- Brophy, M.B., Hayden, J.A. y Nolan, E.M. (2012), "*Calcium ion gradients modulate the zinc affinity and antibacterial activity of human calprotectin*", J Am Chem Soc, vol. 134, p. 18089-100.

- 35- Gonzalez, J.M., Meini, M.R., Tomatis, P.E., Medrano Martin, F.J., Cricco, J.A. y Vila, A.J. (2012), "*Metallo-beta-lactamases withstand low Zn(II) conditions by tuning metal-ligand interactions*", *Nat Chem Biol*, vol. 8, p. 698-700.
- 36- Rasmussen, B.A. y Bush, K. (1997), "*Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases*", *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 41, p. 223-32.
- 37- Hall, B.G., Salipante, S.J. y Barlow, M. (2003), "*The metallo-beta-lactamases fall into two distinct phylogenetic groups*", *J Mol Evol*, vol. 57, p. 249-54.
- 38- Jacquin, O., Balbeur, D., Damblon, C., Marchot, P., De Pauw, E., Roberts, G.C., Frere, J.M. y Matagne, A. (2009), "*Positively cooperative binding of zinc ions to Bacillus cereus 569/H/9 beta-lactamase II suggests that the binuclear enzyme is the only relevant form for catalysis*", *J Mol Biol*, vol. 392, p. 1278-91.
- 39- Garau, G., Garcia-Saez, I., Bebrone, C., Anne, C., Mercuri, P., Galleni, M., Frere, J.M. y Dideberg, O. (2004), "*Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases*", *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 48, p. 2347-9.
- 40- Fonseca, F., Bromley, E.H., Saavedra, M.J., Correia, A. y Spencer, J. (2011), "*Crystal structure of Serratia fonticola Sfb-I: activation of the nucleophile in mono-zinc metallo-beta-lactamases*", *J Mol Biol*, vol. 411, p. 951-9.
- 41- Ullah, J.H., Walsh, T.R., Taylor, I.A., Emery, D.C., Verma, C.S., Gamblin, S.J. y Spencer, J. (1998), "*The crystal structure of the L1 metallo-beta-lactamase from Stenotrophomonas maltophilia at 1.7 Å resolution*", *J Mol Biol*, vol. 284, p. 125-36.
- 42- Moali, C., Anne, C., Lamotte-Brasseur, J., Gros Lambert, S., Devreese, B., Van Beeumen, J., Galleni, M. y Frere, J.M. (2003), "*Analysis of the importance of the metallo-beta-lactamase active site loop in substrate binding and catalysis*", *Chem Biol*, vol. 10, p. 319-29.
- 43- Gonzalez, L.J., Stival, V.C., Puzzolo, J.L., Moreno, D.M. y Vila, A.J. (2018), "*Shaping substrate selectivity in a broad spectrum metallo-beta-lactamase*", *Antimicrob Agents Chemother*.
- 44- Moran-Barrio, J., Gonzalez, J.M., Lisa, M.N., Costello, A.L., Peraro, M.D., Carloni, P., Bennett, B., Tierney, D.L., Limansky, A.S., Viale, A.M. y Vila, A.J. (2007), "*The metallo-beta-lactamase GOB is a mono-Zn(II) enzyme with a novel active site*", *J Biol Chem*, vol. 282, p. 18286-93.
- 45- Garau, G., Bebrone, C., Anne, C., Galleni, M., Frère, J.-M. y Dideberg, O. (2005), "*A Metallo-β-lactamase Enzyme in Action: Crystal Structures of the Mono-zinc Carbapenemase CphA and its Complex with Biapenem*", *Journal of Molecular Biology*, vol. 345, p. 785-795.
- 46- Lancaster, K.M. (2011), "*Biological Outer-Sphere Coordination*", vol. 142, p. 119-153.
- 47- DeLano, W.L. (2002), "*The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific*", Palo Alto, CA, USA.
- 48- Tomatis, P.E., Fabiane, S.M., Simona, F., Carloni, P., Sutton, B.J. y Vila, A.J. (2008), "*Adaptive protein evolution grants organismal fitness by improving catalysis and flexibility*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, p. 20605-10.
- 49- Materon, I.C. y Palzkill, T. (2001), "*Identification of residues critical for metallo-beta-lactamase function by codon randomization and selection*", *Protein Sci*, vol. 10, p. 2556-65.
- 50- Materon, I.C., Beharry, Z., Huang, W., Perez, C. y Palzkill, T. (2004), "*Analysis of the context dependent sequence requirements of active site residues in the metallo-beta-lactamase IMP-1*", *J Mol Biol*, vol. 344, p. 653-63.

- 51- Gonzalez, L.J., Moreno, D.M., Bonomo, R.A. y Vila, A.J. (2014), "*Host-specific enzyme-substrate interactions in SPM-1 metallo-beta-lactamase are modulated by second sphere residues*", PLoS Pathog, vol. 10, p. e1003817.
- 52- Sulton, D., Pagan-Rodriguez, D., Zhou, X., Liu, Y., Hujer, A.M., Bethel, C.R., Helfand, M.S., Thomson, J.M., Anderson, V.E., Buynak, J.D., Ng, L.M. y Bonomo, R.A. (2005), "*Clavulanic acid inactivation of SHV-1 and the inhibitor-resistant S130G SHV-1 beta-lactamase. Insights into the mechanism of inhibition*", J Biol Chem, vol. 280, p. 35528-36.
- 53- McGeary, R.P., Tan, D.T. y Schenk, G. (2017), "*Progress toward inhibitors of metallo-beta-lactamases*", Future Med Chem, vol. 9, p. 673-691.
- 54- Thomas, P.W., Cammarata, M., Brodbelt, J.S. y Fast, W. (2014), "*Covalent inhibition of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) by cefactor*", Chembiochem, vol. 15, p. 2541-8.
- 55- Bush, K., Macalintal, C., Rasmussen, B.A., Lee, V.J. y Yang, Y. (1993), "*Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 37, p. 851-8.
- 56- Payne, D.J., Bateson, J.H., Gasson, B.C., Khushi, T., Proctor, D., Pearson, S.C. y Reid, R. (1997), "*Inhibition of metallo-beta-lactamases by a series of thiol ester derivatives of mercaptophenylacetic acid*", FEMS Microbiol Lett, vol. 157, p. 171-5.
- 57- Payne, D.J., Bateson, J.H., Gasson, B.C., Proctor, D., Khushi, T., Farmer, T.H., Tolson, D.A., Bell, D., Skett, P.W., Marshall, A.C., Reid, R., Ghosez, L., Combret, Y. y Marchand-Brynaert, J. (1997), "*Inhibition of metallo-beta-lactamases by a series of mercaptoacetic acid thiol ester derivatives*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 41, p. 135-40.
- 58- Kurosaki, H., Yamaguchi, Y., Higashi, T., Soga, K., Matsueda, S., Yumoto, H., Misumi, S., Yamagata, Y., Arakawa, Y. y Goto, M. (2005), "*Irreversible inhibition of metallo-beta-lactamase (IMP-1) by 3-(3-mercaptopropionylsulfanyl)propionic acid pentafluorophenyl ester*", Angew Chem Int Ed Engl, vol. 44, p. 3861-4.
- 59- Li, G.B., Abboud, M.I., Brem, J., Someya, H., Lohans, C.T., Yang, S.Y., Spencer, J., Wareham, D.W., McDonough, M.A. y Schofield, C.J. (2017), "*NMR-filtered virtual screening leads to non-metal chelating metallo-beta-lactamase inhibitors*", Chem Sci, vol. 8, p. 928-937.
- 60- Singh, J., Petter, R.C., Baillie, T.A. y Whitty, A. (2011), "*The resurgence of covalent drugs*", Nat Rev Drug Discov, vol. 10, p. 307-17.
- 61- Toney, J.H., Hammond, G.G., Fitzgerald, P.M., Sharma, N., Balkovec, J.M., Rouen, G.P., Olson, S.H., Hammond, M.L., Greenlee, M.L. y Gao, Y.D. (2001), "*Succinic acids as potent inhibitors of plasmid-borne IMP-1 metallo-beta-lactamase*", J Biol Chem, vol. 276, p. 31913-8.
- 62- Siemann, S., Brewer, D., Clarke, A.J., Dmitrienko, G.I., Lajoie, G. y Viswanatha, T. (2002), "*IMP-1 metallo-beta-lactamase: effect of chelators and assessment of metal requirement by electrospray mass spectrometry*", Biochim Biophys Acta, vol. 1571, p. 190-200.
- 63- Gonzalez, M.M., Kosmopoulou, M., Mojica, M.F., Castillo, V., Hinchliffe, P., Pettinati, I., Brem, J., Schofield, C.J., Mahler, G., Bonomo, R.A., Llarrull, L.I., Spencer, J. y Vila, A.J. (2015), "*Bisthiazolidines: A Substrate-Mimicking Scaffold as an Inhibitor of the NDM-1 Carbapenemase*", ACS Infect Dis, vol. 1, p. 544-54.
- 64- Garcia-Saez, I., Hopkins, J., Papamichael, C., Franceschini, N., Amicosante, G., Rossolini, G.M., Galleni, M., Frere, J.M. y Dideberg, O. (2003), "*The 1.5-Å structure of Chryseobacterium*

- meningosepticum* zinc beta-lactamase in complex with the inhibitor, D-captopril", J Biol Chem, vol. 278, p. 23868-73.
- 65- Sun, Q., Law, A., Crowder, M.W. y Geysen, H.M. (2006), "Homo-cysteinyl peptide inhibitors of the L1 metallo-beta-lactamase, and SAR as determined by combinatorial library synthesis", Bioorg Med Chem Lett, vol. 16, p. 5169-75.
- 66- Lienard, B.M., Garau, G., Horsfall, L., Karsisiotis, A.I., Damblon, C., Lassaux, P., Papamichael, C., Roberts, G.C., Galleni, M., Dideberg, O., Frere, J.M. y Schofield, C.J. (2008), "Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo-beta-lactamases by thiols", Org Biomol Chem, vol. 6, p. 2282-94.
- 67- Vella, P., Hussein, W.M., Leung, E.W., Clayton, D., Ollis, D.L., Mitic, N., Schenk, G. y McGeary, R.P. (2011), "The identification of new metallo-beta-lactamase inhibitor leads from fragment-based screening", Bioorg Med Chem Lett, vol. 21, p. 3282-5.
- 68- Faridoon, Hussein, W.M., Vella, P., Islam, N.U., Ollis, D.L., Schenk, G. y McGeary, R.P. (2012), "3-mercapto-1,2,4-triazoles and N-acylated thiosemicarbazides as metallo-beta-lactamase inhibitors", Bioorg Med Chem Lett, vol. 22, p. 380-6.
- 69- Lassaux, P., Hamel, M., Gulea, M., Delbruck, H., Mercuri, P.S., Horsfall, L., Dehareng, D., Kupper, M., Frere, J.M., Hoffmann, K., Galleni, M. y Bebrone, C. (2010), "Mercaptophosphonate compounds as broad-spectrum inhibitors of the metallo-beta-lactamases", J Med Chem, vol. 53, p. 4862-76.
- 70- Xiang, Y., Chang, Y.N., Ge, Y., Kang, J.S., Zhang, Y.L., Liu, X.L., Oelschlaeger, P. y Yang, K.W. (2017), "Azobylthioacetamides as a potent scaffold for the development of metallo-beta-lactamase inhibitors", Bioorg Med Chem Lett, vol. 27, p. 5225-5229.
- 71- Klingler, F.M., Wichelhaus, T.A., Frank, D., Cuesta-Bernal, J., El-Delik, J., Muller, H.F., Sjuts, H., Gottig, S., Koenigs, A., Pos, K.M., Pogoryelov, D. y Proschak, E. (2015), "Approved Drugs Containing Thiols as Inhibitors of Metallo-beta-lactamases: Strategy To Combat Multidrug-Resistant Bacteria", J Med Chem, vol. 58, p. 3626-30.
- 72- Mohamed, M.S., Hussein, W.M., McGeary, R.P., Vella, P., Schenk, G. y Abd El-Hameed, R.H. (2011), "Synthesis and kinetic testing of new inhibitors for a metallo-beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*", Eur J Med Chem, vol. 46, p. 6075-82.
- 73- Moloughney, J.G., J, D.T. y Toney, J.H. (2005), "Novel IMP-1 metallo-beta-lactamase inhibitors can reverse meropenem resistance in *Escherichia coli* expressing IMP-1", FEMS Microbiol Lett, vol. 243, p. 65-71.
- 74- Olsen, L., Jost, S., Adolph, H.W., Pettersson, I., Hemmingsen, L. y Jorgensen, F.S. (2006), "New leads of metallo-beta-lactamase inhibitors from structure-based pharmacophore design", Bioorg Med Chem, vol. 14, p. 2627-35.
- 75- Skagseth, S., Akhter, S., Paulsen, M.H., Muhammad, Z., Lauksund, S., Samuelson, O., Leiros, H.S. y Bayer, A. (2017), "Metallo-beta-lactamase inhibitors by bioisosteric replacement: Preparation, activity and binding", Eur J Med Chem, vol. 135, p. 159-173.
- 76- Brem, J., Cain, R., Cahill, S., McDonough, M.A., Clifton, I.J., Jimenez-Castellanos, J.C., Avison, M.B., Spencer, J., Fishwick, C.W. y Schofield, C.J. (2016), "Structural basis of metallo-beta-lactamase, serine-beta-lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates", Nat Commun, vol. 7, p. 12406.

- 77- Brem, J., van Berkel, S.S., Aik, W., Rydzik, A.M., Avison, M.B., Pettinati, I., Umland, K.D., Kawamura, A., Spencer, J., Claridge, T.D., McDonough, M.A. y Schofield, C.J. (2014), "*Rhodanine hydrolysis leads to potent thioenolate mediated metallo-beta-lactamase inhibition*", Nat Chem, vol. 6, p. 1084-90.
- 78- Brem, J., van Berkel, S.S., Zollman, D., Lee, S.Y., Gileadi, O., McHugh, P.J., Walsh, T.R., McDonough, M.A. y Schofield, C.J. (2015), "*Structural Basis of Metallo-beta-Lactamase Inhibition by Captopril Stereoisomers*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 60, p. 142-50.
- 79- Hinchliffe, P., González, M.M., Mojica, M.F., González, J.M., Castillo, V., Saiz, C., Kosmopoulou, M., Tooke, C.L., Llarull, L.I., Mahler, G., Bonomo, R.A., Vila, A.J. y Spencer, J. (2016), "*Cross-class metallo- β -lactamase inhibition by bisthiazolidines reveals multiple binding modes*", Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 113, p. E3745-E3754.
- 80- King, A.M., Reid-Yu, S.A., Wang, W., King, D.T., De Pascale, G., Strynadka, N.C., Walsh, T.R., Coombes, B.K. y Wright, G.D. (2014), "*Aspergillomarasmine A overcomes metallo-beta-lactamase antibiotic resistance*", Nature, vol. 510, p. 503-6.
- 81- Yoshizumi, A., Ishii, Y., Livermore, D.M., Woodford, N., Kimura, S., Saga, T., Harada, S., Yamaguchi, K. y Tateda, K. (2013), "*Efficacies of calcium-EDTA in combination with imipenem in a murine model of sepsis caused by Escherichia coli with NDM-1 beta-lactamase*", J Infect Chemother, vol. 19, p. 992-5.
- 82- Makena, A., van Berkel, S.S., Lejeune, C., Owens, R.J., Verma, A., Salimraj, R., Spencer, J., Brem, J. y Schofield, C.J. (2013), "*Chromophore-linked substrate (CLS405): probing metallo-beta-lactamase activity and inhibition*", ChemMedChem, vol. 8, p. 1923-9.
- 83- Sohier, J.S., Laurent, C., Chevigne, A., Pardon, E., Srinivasan, V., Wernery, U., Lassaux, P., Steyaert, J. y Galleni, M. (2013), "*Allosteric inhibition of VIM metallo-beta-lactamases by a camelid nanobody*", Biochem J, vol. 450, p. 477-86.
- 84- Spicer, T., Minond, D., Enogieru, I., Saldanha, S.A., Allais, C., Liu, Q., Mercer, B.A., Roush, W.R. y Hodder, P. (2010), "*ML302, a Novel Beta-lactamase (BLA) Inhibitor*, in Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program". Bethesda (MD).
- 85- Kim, S.K., Sims, C.L., Wozniak, S.E., Drude, S.H., Whitson, D. y Shaw, R.W. (2009), "*Antibiotic resistance in bacteria: novel metalloenzyme inhibitors*", Chem Biol Drug Des, vol. 74, p. 343-8.
- 86- Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K. y Walsh, T.R. (2009), "*Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 53, p. 5046-54.
- 87- Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C.G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A.V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D.L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J.B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M.A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D.M. y Woodford, N. (2010), "*Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study*", Lancet Infect Dis, vol. 10, p. 597-602.
- 88- Johnson, A.P. y Woodford, N. (2013), "*Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance*", J Med Microbiol, vol. 62, p. 499-513.

- 89- Bonomo, R.A. (2011), "New Delhi metallo-beta-lactamase and multidrug resistance: a global SOS?", *Clin Infect Dis*, vol. 52, p. 485-7.
- 90- McKenna, M. (2013), "Antibiotic resistance: the last resort", *Nature*, vol. 499, p. 394-6.
- 91- Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R. y Livermore, D.M. (2011), "The emerging NDM carbapenemases", *Trends Microbiol*, vol. 19, p. 588-95.
- 92- Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D.M. y Toleman, M.A. (2011), "Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study", *Lancet Infect Dis*, vol. 11, p. 355-62.
- 93- Szmolka, A. y Nagy, B. (2013), "Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health", *Front Microbiol*, vol. 4, p. 258.
- 94- Mojica, M.F., Bonomo, R.A. y Fast, W. (2016), "B1-Metallo-beta-Lactamases: Where Do We Stand?", *Curr Drug Targets*, vol. 17, p. 1029-50.
- 95- Zhong, L.L., Zhang, Y.F., Doi, Y., Huang, X., Zhang, X.F., Zeng, K.J., Shen, C., Patil, S., Xing, Y., Zou, Y. y Tian, G.B. (2017), "Coproducting of MCR-1 and NDM-1 by Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated from a Healthy Individual", *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 61.
- 96- Yao, X., Doi, Y., Zeng, L., Lv, L. y Liu, J.H. (2016), "Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1", *Lancet Infect Dis*, vol. 16, p. 288-9.
- 97- Guo, Y., Wang, J., Niu, G., Shui, W., Sun, Y., Zhou, H., Zhang, Y., Yang, C., Lou, Z. y Rao, Z. (2011), "A structural view of the antibiotic degradation enzyme NDM-1 from a superbug", *Protein Cell*, vol. 2, p. 384-94.
- 98- Thomas, P.W., Zheng, M., Wu, S., Guo, H., Liu, D., Xu, D. y Fast, W. (2011), "Characterization of purified New Delhi metallo-beta-lactamase-1", *Biochemistry*, vol. 50, p. 10102-13.
- 99- Zhang, H. y Hao, Q. (2011), "Crystal structure of NDM-1 reveals a common beta-lactam hydrolysis mechanism", *FASEB J*, vol. 25, p. 2574-82.
- 100- Kim, Y., Tesar, C., Mire, J., Jedrzejczak, R., Binkowski, A., Babnigg, G., Sacchettini, J. y Joachimiak, A. (2011), "Structure of apo- and monometalated forms of NDM-1--a highly potent carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase", *PLoS One*, vol. 6, p. e24621.
- 101- Green, V.L., Verma, A., Owens, R.J., Phillips, S.E. y Carr, S.B. (2011), "Structure of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1)", *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, vol. 67, p. 1160-4.
- 102- King, D. y Strynadka, N. (2011), "Crystal structure of New Delhi metallo-beta-lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance", *Protein Sci*, vol. 20, p. 1484-91.
- 103- Bahr, G., Vitor-Horen, L., Bethel, C.R., Bonomo, R.A., Gonzalez, L.J. y Vila, A.J. (2017), "Clinical evolution of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM) optimizes resistance under Zn(II) deprivation", *Antimicrob Agents Chemother*.
- 104- Meini, M.R., Llarrull, L.I. y Vila, A.J. (2014), "Evolution of Metallo-beta-lactamases: Trends Revealed by Natural Diversity and in vitro Evolution", *Antibiotics (Basel)*, vol. 3, p. 285-316.
- 105- Liu, Z., Wang, Y., Walsh, T.R., Liu, D., Shen, Z., Zhang, R., Yin, W., Yao, H., Li, J. y Shen, J. (2017), "Plasmid-Mediated Novel blaNDM-17 Gene Encoding a Carbapenemase with Enhanced Activity in a Sequence Type 48 *Escherichia coli* Strain", *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 61.

- 106- Gonzalez, L.J., Bahr, G., Nakashige, T.G., Nolan, E.M., Bonomo, R.A. y Vila, A.J. (2016), "*Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo-beta-lactamase*", Nat Chem Biol, vol. 12, p. 516-22.
- 107- King, D.T., Worrall, L.J., Gruninger, R. y Strynadka, N.C. (2012), "*New Delhi metallo-beta-lactamase: structural insights into beta-lactam recognition and inhibition*", J Am Chem Soc, vol. 134, p. 11362-5.
- 108- Tokuda, H. y Matsuyama, S. (2004), "*Sorting of lipoproteins to the outer membrane in E. coli*", Biochim Biophys Acta, vol. 1693, p. 5-13.
- 109- Spencer, J., Read, J., Sessions, R.B., Howell, S., Blackburn, G.M. y Gamblin, S.J. (2005), "*Antibiotic recognition by binuclear metallo-beta-lactamases revealed by X-ray crystallography*", J Am Chem Soc, vol. 127, p. 14439-44.
- 110- Kim, Y., Cunningham, M.A., Mire, J., Tesar, C., Sacchettini, J. y Joachimiak, A. (2013), "*NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism*", The FASEB Journal, vol. 27, p. 1917-1927.
- 111- Feng, H., Ding, J., Zhu, D., Liu, X., Xu, X., Zhang, Y., Zang, S., Wang, D.-C. y Liu, W. (2014), "*Structural and Mechanistic Insights into NDM-1 Catalyzed Hydrolysis of Cephalosporins*", Journal of the American Chemical Society, vol. 136, p. 14694-14697.
- 112- Feng, H., Liu, X., Wang, S., Fleming, J., Wang, D.C. y Liu, W. (2017), "*The mechanism of NDM-1-catalyzed carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillin or cephalosporin hydrolysis*", Nat Commun, vol. 8, p. 2242.
- 113- Chiou, J., Leung, T.Y. y Chen, S. (2014), "*Molecular mechanisms of substrate recognition and specificity of New Delhi metallo-beta-lactamase*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 58, p. 5372-8.
- 114- Bush, K. y Jacoby, G.A. (2010), "*Updated functional classification of beta-lactamases*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 54, p. 969-76.
- 115- Scrofani, S.D., Chung, J., Huntley, J.J., Benkovic, S.J., Wright, P.E. y Dyson, H.J. (1999), "*NMR characterization of the metallo-beta-lactamase from Bacteroides fragilis and its interaction with a tight-binding inhibitor: role of an active-site loop*", Biochemistry, vol. 38, p. 14507-14.
- 116- Rydzik, A.M., Brem, J., van Berkel, S.S., Pfeffer, I., Makena, A., Claridge, T.D. y Schofield, C.J. (2014), "*Monitoring conformational changes in the NDM-1 metallo-beta-lactamase by 19F NMR spectroscopy*", Angew Chem Int Ed Engl, vol. 53, p. 3129-33.
- 117- Fitzgerald, P.M., Wu, J.K. y Toney, J.H. (1998), "*Unanticipated inhibition of the metallo-beta-lactamase from Bacteroides fragilis by 4-morpholineethanesulfonic acid (MES): a crystallographic study at 1.85-Å resolution*", Biochemistry, vol. 37, p. 6791-800.
- 118- Meini, M.R., Llarrull, L.I. y Vila, A.J. (2015), "*Overcoming differences: The catalytic mechanism of metallo-beta-lactamases*", FEBS Lett, vol. 589, p. 3419-32.
- 119- Bounaga, S., Laws, A.P., Galleni, M. y Page, M.I. (1998), "*The mechanism of catalysis and the inhibition of the Bacillus cereus zinc-dependent beta-lactamase*", Biochem J, vol. 331 (Pt 3), p. 703-11.
- 120- Drawz, S.M. y Bonomo, R.A. (2010), "*Three decades of beta-lactamase inhibitors*", Clin Microbiol Rev, vol. 23, p. 160-201.
- 121- Tioni, M.F., Llarrull, L.I., Poeylout-Palena, A.A., Marti, M.A., Saggi, M., Periyannan, G.R., Mata, E.G., Bennett, B., Murgida, D.H. y Vila, A.J. (2008), "*Trapping and characterization of a*

- reaction intermediate in carbapenem hydrolysis by B. cereus metallo-beta-lactamase*", J Am Chem Soc, vol. 130, p. 15852-63.
- 122- Spencer, J., Clarke, A.R. y Walsh, T.R. (2001), "*Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic beta-lactams by Stenotrophomonas maltophilia L1 metallo-beta-lactamase*", J Biol Chem, vol. 276, p. 33638-44.
- 123- Sharma, N.P., Hajdin, C., Chandrasekar, S., Bennett, B., Yang, K.W. y Crowder, M.W. (2006), "*Mechanistic studies on the mononuclear ZnII-containing metallo-beta-lactamase ImiS from Aeromonas sobria*", Biochemistry, vol. 45, p. 10729-38.
- 124- Yang, H., Aitha, M., Hetrick, A.M., Richmond, T.K., Tierney, D.L. y Crowder, M.W. (2012), "*Mechanistic and spectroscopic studies of metallo-beta-lactamase NDM-1*", Biochemistry, vol. 51, p. 3839-47.
- 125- Griffin, D.H., Richmond, T.K., Sanchez, C., Moller, A.J., Breece, R.M., Tierney, D.L., Bennett, B. y Crowder, M.W. (2011), "*Structural and kinetic studies on metallo-beta-lactamase IMP-1*", Biochemistry, vol. 50, p. 9125-34.
- 126- Llarrull, L.I., Tioni, M.F. y Vila, A.J. (2008), "*Metal content and localization during turnover in B. cereus metallo-beta-lactamase*", J Am Chem Soc, vol. 130, p. 15842-51.
- 127- Tomatis, P.E., Rasia, R.M., Segovia, L. y Vila, A.J. (2005), "*Mimicking natural evolution in metallo-beta-lactamases through second-shell ligand mutations*", Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 102, p. 13761-6.
- 128- Yang, Y., Keeney, D., Tang, X., Canfield, N. y Rasmussen, B.A. (1999), "*Kinetic properties and metal content of the metallo-beta-lactamase CcrA harboring selective amino acid substitutions*", J Biol Chem, vol. 274, p. 15706-11.
- 129- Wang, Z., Fast, W. y Benkovic, S.J. (1998), "*Direct Observation of an Enzyme-Bound Intermediate in the Catalytic Cycle of the Metallo-β-Lactamase from Bacteroides fragilis*", Journal of the American Chemical Society, vol. 120, p. 10788-10789.
- 130- Tripathi, R. y Nair, N.N. (2015), "*Mechanism of Meropenem Hydrolysis by New Delhi Metallo β-Lactamase*", ACS Catalysis, vol. 5, p. 2577-2586.
- 131- Das, C.K. y Nair, N.N. (2017), "*Hydrolysis of cephalexin and meropenem by New Delhi metallo-beta-lactamase: the substrate protonation mechanism is drug dependent*", Phys Chem Chem Phys, vol. 19, p. 13111-13121.
- 132- Wang, Z., Fast, W. y Benkovic, S.J. (1999), "*On the mechanism of the metallo-beta-lactamase from Bacteroides fragilis*", Biochemistry, vol. 38, p. 10013-23.
- 133- McManus-Munoz, S. y Crowder, M.W. (1999), "*Kinetic mechanism of metallo-beta-lactamase L1 from Stenotrophomonas maltophilia*", Biochemistry, vol. 38, p. 1547-53.
- 134- Oelschlaeger, P., Aitha, M., Yang, H., Kang, J.S., Zhang, A.L., Liu, E.M., Buynak, J.D. y Crowder, M.W. (2015), "*Meropenem and chromacef intermediates observed in IMP-25 metallo-beta-lactamase-catalyzed hydrolysis*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 59, p. 4326-30.
- 135- Aitha, M., Marts, A.R., Bergstrom, A., Moller, A.J., Moritz, L., Turner, L., Nix, J.C., Bonomo, R.A., Page, R.C., Tierney, D.L. y Crowder, M.W. (2014), "*Biochemical, mechanistic, and spectroscopic characterization of metallo-beta-lactamase VIM-2*", Biochemistry, vol. 53, p. 7321-31.
- 136- Garrity, J.D., Bennett, B. y Crowder, M.W. (2005), "*Direct evidence that the reaction intermediate of metallo-beta-lactamase L1 is metal bound*", Biochemistry, vol. 44, p. 1078-87.

- 137- Houben, K., Marion, D., Tarbouriech, N., Ruigrok, R.W. y Blanchard, L. (2007), "*Interaction of the C-terminal domains of sendai virus N and P proteins: comparison of polymerase-nucleocapsid interactions within the paramyxovirus family*", J Virol, vol. 81, p. 6807-16.
- 138- Kapust, R.B., Tozser, J., Fox, J.D., Anderson, D.E., Cherry, S., Copeland, T.D. y Waugh, D.S. (2001), "*Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency*", Protein Eng, vol. 14, p. 993-1000.
- 139- Sambrook, J. y Russel, D.W. (2001), "*Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 3^{era} ed.*", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- 140- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. y Bairoch, A. (2005), "*Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*", en "The Proteomics Protocols Handbook", John M. W. Humana Press., Nueva York.
- 141- Gallagher, S.R. (2001), "*One-Dimensional Electrophoresis Using Nondenaturing Conditions*", p. 10.3.1-10.3.11.
- 142- McCall, K.A. y Fierke, C.A. (2000), "*Colorimetric and fluorimetric assays to quantitate micromolar concentrations of transition metals*", Anal Biochem, vol. 284, p. 307-15.
- 143- Kuzmic, P. (1996), "*Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase*", Anal Biochem, vol. 237, p. 260-73.
- 144- Laraki, N., Franceschini, N., Rossolini, G.M., Santucci, P., Meunier, C., de Pauw, E., Amicosante, G., Frere, J.M. y Galleni, M. (1999), "*Biochemical characterization of the Pseudomonas aeruginosa 101/1477 metallo-beta-lactamase IMP-1 produced by Escherichia coli*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 43, p. 902-6.
- 145- Llarrull, L.I., Tioni, M.F., Kowalski, J., Bennett, B. y Vila, A.J. (2007), "*Evidence for a dinuclear active site in the metallo-beta-lactamase BcII with substoichiometric Co(II). A new model for metal uptake*", J Biol Chem, vol. 282, p. 30586-95.
- 146- Huynh, K. y Partch, C.L. (2015), "*Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay*", Curr Protoc Protein Sci, vol. 79, p. 28 9 1-14.
- 147- Damblon, C., Jensen, M., Ababou, A., Barsukov, I., Papamicael, C., Schofield, C.J., Olsen, L., Bauer, R. y Roberts, G.C. (2003), "*The inhibitor thiomandelic acid binds to both metal ions in metallo-beta-lactamase and induces positive cooperativity in metal binding*", J Biol Chem, vol. 278, p. 29240-51.
- 148- Ratcliffe, R.W., Wildonger, K.J., Di Michele, L., Douglas, A.W., Hajdu, R., Goegelman, R.T., Springer, J.P. y Hirshfield, J. (1989), "*Studies on the structures of imipenem, dehydropeptidase I-hydrolyzed imipenem, and related analogs*", The Journal of Organic Chemistry, vol. 54, p. 653-660.
- 149- Rahuel-Clermont, S. y Dunn, M.F. (1998), "*The biological chemistry of zinc*", Copper and Zinc in Inflammatory and Degenerative Diseases, Springer, Dordrecht.
- 150- Penner-Hahn, J.E. (2005), "*Characterization of "spectroscopically quiet" metals in biology*", Coordination Chemistry Reviews, vol. 249, p. 161-177.
- 151- Bicknell, R., Hanson, G.R., Holmquist, B. y Little, C. (1986), "*A spectral study of cobalt(II)-substituted Bacillus cereus phospholipase C*", Biochemistry, vol. 25, p. 4219-23.
- 152- Bicknell, R. y Waley, S.G. (1985), "*Single-turnover and steady-state kinetics of hydrolysis of cephalosporins by beta-lactamase I from Bacillus cereus*", Biochem J, vol. 231, p. 83-8.

- 153- Davies, R.B. y Abraham, E.P. (1974), "*Metal cofactor requirements of beta-lactamase II*", *Biochem J*, vol. 143, p. 129-35.
- 154- Orellano, E.G., Girardini, J.E., Cricco, J.A., Ceccarelli, E.A. y Vila, A.J. (1998), "*Spectroscopic characterization of a binuclear metal site in Bacillus cereus beta-lactamase II*", *Biochemistry*, vol. 37, p. 10173-80.
- 155- Periyannan, G.R., Costello, A.L., Tierney, D.L., Yang, K.W., Bennett, B. y Crowder, M.W. (2006), "*Sequential binding of cobalt(II) to metallo-beta-lactamase CcrA*", *Biochemistry*, vol. 45, p. 1313-20.
- 156- Lisa, M.N., Hemmingsen, L. y Vila, A.J. (2010), "*Catalytic role of the metal ion in the metallo-beta-lactamase GOB*", *J Biol Chem*, vol. 285, p. 4570-7.
- 157- Coleman, J.E. (1993), "*Cadmium-113 nuclear magnetic resonance applied to metalloproteins*", *Methods Enzymol*, vol. 227, p. 16-43.
- 158- Badarau, A. y Page, M.I. (2006), "*The variation of catalytic efficiency of Bacillus cereus metallo-beta-lactamase with different active site metal ions*", *Biochemistry*, vol. 45, p. 10654-66.
- 159- Thomas, N.C., Pringle, K. y Deacon, G.B. (1989), "*Cobalt(II) and cobalt(III) coordination compounds*", *Journal of Chemical Education*, vol. 66, p. 516.
- 160- Holleman, A.F., Wiberg, E. y Wiberg, N. (1985), "*Cadmium*", de Gruyter, W., *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Berlin.
- 161- Armitage, I.M., Otvos, J.D., Briggs, R.W. y Boulanger, Y. (1982), "*Structure elucidation of the metal-binding sites in metallothionein by ¹¹³Cd NMR*", *Fed Proc*, vol. 41, p. 2974-80.
- 162- Alterio, V., Langella, E., De Simone, G. y Monti, S.M. (2015), "*Cadmium-containing carbonic anhydrase CDCA1 in marine diatom Thalassiosira weissflogii*", *Mar Drugs*, vol. 13, p. 1688-97.
- 163- de Seny, D., Heinz, U., Wommer, S., Kiefer, M., Meyer-Klaucke, W., Galleni, M., Frere, J.M., Bauer, R. y Adolph, H.W. (2001), "*Metal ion binding and coordination geometry for wild type and mutants of metallo-beta-lactamase from Bacillus cereus 569/H/9 (BcII): a combined thermodynamic, kinetic, and spectroscopic approach*", *J Biol Chem*, vol. 276, p. 45065-78.
- 164- Hemmingsen, L., Damblon, C., Antony, J., Jensen, M., Adolph, H.W., Wommer, S., Roberts, G.C. y Bauer, R. (2001), "*Dynamics of mononuclear cadmium beta-lactamase revealed by the combination of NMR and PAC spectroscopy*", *J Am Chem Soc*, vol. 123, p. 10329-35.
- 165- Liang, Z., Li, L., Wang, Y., Chen, L., Kong, X., Hong, Y., Lan, L., Zheng, M., Guang-Yang, C., Liu, H., Shen, X., Luo, C., Li, K.K., Chen, K. y Jiang, H. (2011), "*Molecular basis of NDM-1, a new antibiotic resistance determinant*", *PLoS One*, vol. 6, p. e23606.
- 166- Shen, B., Yu, Y., Chen, H., Cao, X., Lao, X., Fang, Y., Shi, Y., Chen, J. y Zheng, H. (2013), "*Inhibitor discovery of full-length New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1)*", *PLoS One*, vol. 8, p. e62955.
- 167- Li, T., Wang, Q., Chen, F., Li, X., Luo, S., Fang, H., Wang, D., Li, Z., Hou, X. y Wang, H. (2013), "*Biochemical characteristics of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 show unexpected difference to other MBLs*", *PLoS One*, vol. 8, p. e61914.
- 168- Cohen, S.R. y Wilson, I.B. (1966), "*Measurement of the Zinc Dissociation Constants of Alkaline Phosphatase from Escherichia coli by Equilibration with Zinc Ion Buffers**", *Biochemistry*, vol. 5, p. 904-909.

- 169- Hunt, J.B., Neece, S.H. y Ginsburg, A. (1985), "*The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from Escherichia coli aspartate transcarbamoylase*", Anal Biochem, vol. 146, p. 150-7.
- 170- Zimmermann, M., Clarke, O., Gulbis, J.M., Keizer, D.W., Jarvis, R.S., Cobbett, C.S., Hinds, M.G., Xiao, Z. y Wedd, A.G. (2009), "*Metal binding affinities of Arabidopsis zinc and copper transporters: selectivities match the relative, but not the absolute, affinities of their amino-terminal domains*", Biochemistry, vol. 48, p. 11640-54.
- 171- Heer, A., Alonso, L.G. y de Prat-Gay, G. (2011), "*E6*, the 50 amino acid product of the most abundant spliced transcript of the e6 oncoprotein in high-risk human papillomavirus, is a promiscuous folder and binder*", Biochemistry, vol. 50, p. 1376-83.
- 172- Rasia, R.M. y Vila, A.J. (2002), "*Exploring the role and the binding affinity of a second zinc equivalent in B. cereus metallo-beta-lactamase*", Biochemistry, vol. 41, p. 1853-60.
- 173- Yang, H., Aitha, M., Marts, A.R., Hetrick, A., Bennett, B., Crowder, M.W. y Tierney, D.L. (2014), "*Spectroscopic and mechanistic studies of heterodimetallic forms of metallo-beta-lactamase NDM-1*", J Am Chem Soc, vol. 136, p. 7273-85.
- 174- Badarau, A., Damblon, C. y Page, M.I. (2007), "*The activity of the dinuclear cobalt-beta-lactamase from Bacillus cereus in catalysing the hydrolysis of beta-lactams*", Biochem J, vol. 401, p. 197-203.
- 175- Page, M.I. (1992), "*Chemistry of Beta-Lactams*", 1era edición, Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- 176- Frau, J., Coll, M., Donoso, J., Muñoz, F., Vilanova, B. y García-Blanco, F. (1997), "*Alkaline and acidic hydrolysis of the beta-lactam ring*", Electronic Journal of Theoretical Chemistry, vol. 2, p. 56-65.
- 177- Bush, K. (1988), "*Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic*", Clin Microbiol Rev, vol. 1, p. 109-23.
- 178- Imtiaz, U., Billings, E.M., Knox, J.R. y Mobashery, S. (1994), "*A structure-based analysis of the inhibition of class A beta-lactamases by sulbactam*", Biochemistry, vol. 33, p. 5728-38.
- 179- Yamaguchi, Y., Kuroki, T., Yasuzawa, H., Higashi, T., Jin, W., Kawanami, A., Yamagata, Y., Arakawa, Y., Goto, M. y Kurosaki, H. (2005), "*Probing the role of Asp-120(81) of metallo-beta-lactamase (IMP-1) by site-directed mutagenesis, kinetic studies, and X-ray crystallography*", J Biol Chem, vol. 280, p. 20824-32.
- 180- Llarrull, L.I., Fabiane, S.M., Kowalski, J.M., Bennett, B., Sutton, B.J. y Vila, A.J. (2007), "*Asp-120 locates Zn2 for optimal metallo-beta-lactamase activity*", J Biol Chem, vol. 282, p. 18276-85.
- 181- Crisp, J., Conners, R., Garrity, J.D., Carenbauer, A.L., Crowder, M.W. y Spencer, J. (2007), "*Structural basis for the role of Asp-120 in metallo-beta-lactamases*", Biochemistry, vol. 46, p. 10664-74.
- 182- Rasia, R.M. y Vila, A.J. (2003), "*Mechanistic study of the hydrolysis of nitrocefin mediated by B. cereus metallo-beta-lactamase*", Arkivoc, vol. 3, p. 507-516.
- 183- Yang, H., Young, H., Yu, S., Sutton, L. y Crowder, Michael W. (2014), "*Targeting metallo-carbapenemases via modulation of electronic properties of cephalosporins*", Biochemical Journal, vol. 464, p. 271-279.
- 184- Dal Peraro, M., Vila, A.J., Carloni, P. y Klein, M.L. (2007), "*Role of zinc content on the catalytic efficiency of B1 metallo beta-lactamases*", J Am Chem Soc, vol. 129, p. 2808-16.

- 185- Brem, J., Struwe, W.B., Rydzik, A.M., Tarhonskaya, H., Pfeffer, I., Flashman, E., van Berkel, S.S., Spencer, J., Claridge, T.D., McDonough, M.A., Benesch, J.L. y Schofield, C.J. (2015), "*Studying the active-site loop movement of the Sao Paulo metallo-beta-lactamase-1*", Chem Sci, vol. 6, p. 956-963.
- 186- Simona, F., Magistrato, A., Dal Peraro, M., Cavalli, A., Vila, A.J. y Carloni, P. (2009), "*Common mechanistic features among metallo-beta-lactamases: a computational study of Aeromonas hydrophila CphA enzyme*", J Biol Chem, vol. 284, p. 28164-71.
- 187- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L. y Nordmann, P. (2005), "*Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?*", Clin Microbiol Rev, vol. 18, p. 306-25.
- 188- Lisa, M.N., Palacios, A.R., Aitha, M., Gonzalez, M.M., Moreno, D.M., Crowder, M.W., Bonomo, R.A., Spencer, J., Tierney, D.L., Llarrull, L.I. y Vila, A.J. (2017), "*A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo-beta-lactamases*", Nat Commun, vol. 8, p. 538.
- 189- Wachino, J., Yamaguchi, Y., Mori, S., Jin, W., Kimura, K., Kurosaki, H. y Arakawa, Y. (2016), "*Structural Insights into Recognition of Hydrolyzed Carbapenems and Inhibitors by Subclass B3 Metallo-beta-Lactamase SMB-1*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 60, p. 4274-82.
- 190- Badarau, A. y Page, M.I. (2006), "*Enzyme deactivation due to metal-ion dissociation during turnover of the cobalt-beta-lactamase catalyzed hydrolysis of beta-lactams*", Biochemistry, vol. 45, p. 11012-20.
- 191- Breece, R.M., Hu, Z., Bennett, B., Crowder, M.W. y Tierney, D.L. (2009), "*Motion of the zinc ions in catalysis by a dizinc metallo-beta-lactamase*", J Am Chem Soc, vol. 131, p. 11642-3.
- 192- Hawk, M.J., Breece, R.M., Hajdin, C.E., Bender, K.M., Hu, Z., Costello, A.L., Bennett, B., Tierney, D.L. y Crowder, M.W. (2009), "*Differential binding of Co(II) and Zn(II) to metallo-beta-lactamase Bla2 from Bacillus anthracis*", J Am Chem Soc, vol. 131, p. 10753-62.
- 193- Hu, Z., Periyannan, G., Bennett, B. y Crowder, M.W. (2008), "*Role of the Zn1 and Zn2 sites in metallo-beta-lactamase L1*", J Am Chem Soc, vol. 130, p. 14207-16.
- 194- Gonzalez, J.M., Medrano Martin, F.J., Costello, A.L., Tierney, D.L. y Vila, A.J. (2007), "*The Zn2 position in metallo-beta-lactamases is critical for activity: a study on chimeric metal sites on a conserved protein scaffold*", J Mol Biol, vol. 373, p. 1141-56.
- 195- Meini, M.R., Tomatis, P.E., Weinreich, D.M. y Vila, A.J. (2015), "*Quantitative Description of a Protein Fitness Landscape Based on Molecular Features*", Mol Biol Evol, vol. 32, p. 1774-87.
- 196- Cornaglia, G., Giamarellou, H. y Rossolini, G.M. (2011), "*Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams?*", Lancet Infect Dis, vol. 11, p. 381-93.
- 197- Concha, N.O., Janson, C.A., Rowling, P., Pearson, S., Cheever, C.A., Clarke, B.P., Lewis, C., Galleni, M., Frere, J.M., Payne, D.J., Bateson, J.H. y Abdel-Meguid, S.S. (2000), "*Crystal structure of the IMP-1 metallo beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor*", Biochemistry, vol. 39, p. 4288-98.
- 198- Furuyama, T., Nonomura, H., Ishii, Y., Hanson, N.D. y Shimizu-Ibuka, A. (2016), "*Structural and Mutagenic Analysis of Metallo-beta-Lactamase IMP-18*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 60, p. 5521-6.
- 199- Yamaguchi, Y., Matsueda, S., Matsunaga, K., Takashio, N., Toma-Fukai, S., Yamagata, Y., Shibata, N., Wachino, J., Shibayama, K., Arakawa, Y. y Kurosaki, H. (2015), "*Crystal structure of*

- IMP-2 metallo-beta-lactamase from Acinetobacter spp.: comparison of active-site loop structures between IMP-1 and IMP-2*", Biol Pharm Bull, vol. 38, p. 96-101.
- 200- Kupper, M.B., Herzog, K., Bennink, S., Schlomer, P., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., Fischer, R., Bebrone, C. y Hoffmann, K.M. (2015), "*The three-dimensional structure of VIM-31--a metallo-beta-lactamase from Enterobacter cloacae in its native and oxidized form*", FEBS J, vol. 282, p. 2352-60.
- 201- Gonzalez, M.M., Abriata, L.A., Tomatis, P.E. y Vila, A.J. (2016), "*Optimization of Conformational Dynamics in an Epistatic Evolutionary Trajectory*", Mol Biol Evol, vol. 33, p. 1768-76.
- 202- Docquier, J.D., Riccio, M.L., Mugnaioli, C., Luzzaro, F., Endimiani, A., Toniolo, A., Amicosante, G. y Rossolini, G.M. (2003), "*IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a Pseudomonas putida clinical isolate*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 47, p. 1522-8.
- 203- Pegg, K.M., Liu, E.M., Lacuran, A.E. y Oelschlaeger, P. (2013), "*Biochemical characterization of IMP-30, a metallo-beta-lactamase with enhanced activity toward ceftazidime*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 57, p. 5122-6.
- 204- Aitha, M., Moritz, L., Sahu, I.D., Sanyurah, O., Roche, Z., McCarrick, R., Lorigan, G.A., Bennett, B. y Crowder, M.W. (2015), "*Conformational dynamics of metallo-beta-lactamase CcrA during catalysis investigated by using DEER spectroscopy*", J Biol Inorg Chem, vol. 20, p. 585-94.
- 205- Aitha, M., Moller, A.J., Sahu, I.D., Horitani, M., Tierney, D.L. y Crowder, M.W. (2016), "*Investigating the position of the hairpin loop in New Delhi metallo-beta-lactamase, NDM-1, during catalysis and inhibitor binding*", J Inorg Biochem, vol. 156, p. 35-9.
- 206- Oelschlaeger, P., Schmid, R.D. y Pleiss, J. (2003), "*Modeling domino effects in enzymes: molecular basis of the substrate specificity of the bacterial metallo-beta-lactamases IMP-1 and IMP-6*", Biochemistry, vol. 42, p. 8945-56.
- 207- Docquier, J.D., Lamotte-Brasseur, J., Galleni, M., Amicosante, G., Frere, J.M. y Rossolini, G.M. (2003), "*On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases*", J Antimicrob Chemother, vol. 51, p. 257-66.
- 208- Selevsek, N., Rival, S., Tholey, A., Heinzle, E., Heinz, U., Hemmingsen, L. y Adolph, H.W. (2009), "*Zinc ion-induced domain organization in metallo-beta-lactamases: a flexible "zinc arm" for rapid metal ion transfer?*", J Biol Chem, vol. 284, p. 16419-31.
- 209- Neumann, W., Gulati, A. y Nolan, E.M. (2017), "*Metal homeostasis in infectious disease: recent advances in bacterial metallophores and the human metal-withholding response*", Curr Opin Chem Biol, vol. 37, p. 10-18.
- 210- Aitha, M., Al-Adbul-Wahid, S., Tierney, D.L. y Crowder, M.W. (2016), "*Probing substrate binding to the metal binding sites in metallo-beta-lactamase L1 during catalysis*", Medchemcomm, vol. 7, p. 194-201.
- 211- BIOVIA, D.S. (2017), "*Discovery Studio Modeling Environment*", Dassault Systèmes, San Diego.
- 212- Borgianni, L., Vandenameele, J., Matagne, A., Bini, L., Bonomo, R.A., Frere, J.M., Rossolini, G.M. y Docquier, J.D. (2010), "*Mutational analysis of VIM-2 reveals an essential determinant for metallo-beta-lactamase stability and folding*", Antimicrob Agents Chemother, vol. 54, p. 3197-204.
- 213- Huntley, J.J., Fast, W., Benkovic, S.J., Wright, P.E. y Dyson, H.J. (2003), "*Role of a solvent-exposed tryptophan in the recognition and binding of antibiotic substrates for a metallo-beta-lactamase*", Protein Sci, vol. 12, p. 1368-75.