



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

“Estudios de inhibición y flexibilidad en enzimas  
metalo- $\beta$ -lactamasas”

---

Presentada por Mariano Martín González

Rosario, Argentina

2016

# “Estudios de inhibición y flexibilidad en enzimas metalo- $\beta$ -lactamasas”

Mariano Martín González  
Licenciado en Biotecnología  
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, Departamento de Química Biológica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 5 de mayo de 2009 y el 30 de junio de 2015, bajo la dirección del Dr. Alejandro J. Vila.

*A Carina*

*Al Dr. Alejandro J. Vila por haberme dirigido durante este trabajo de Tesis, por su confianza, por su predisposición constante para hacerme superar mis propios límites y por preocuparse por mi formación científica. Gracias por la dedicación de todos los días.*

## Agradecimientos

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Formación Científica y Tecnológica (ANPCyT) por las becas y fondos para la realización de este trabajo.*

*A la facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, y al Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR) por facilitarme el lugar de trabajo y el uso de equipamiento.*

*A los Dres. James Spencer (Universidad de Bristol, Inglaterra), Robert Bonomo (Centro Medico Cleveland, USA) y Graciela Mahler (Universidad de la República, Uruguay) por sus sugerencias, aportes y discusión.*

*A mis compañeros de laboratorio: Rocío, Ogi, Luciano, Pablo, Lisandro, Liana, Jime, Jorgelina, Andrés, Marcos, Soraya, Antonela, Guille, Leticia, Bruno, Estefanía, Alcho, Agus, Fito, Paula e Irina. Gracias por acompañarme en estos años y por el muy buen ambiente de trabajo que crearon.*

*A Pablo, por haberme dado una mano en esos primeros y más difíciles años. Y por compartir la pasión rojinegra.*

*A Luciano, gracias por haber sido una guía en lo referente a "la RMN". Y por ser un ejemplo de vocación científica.*

*A Leticia, gracias por sus aportes y consejos, y por su predisposición para resolver las situaciones del día a día.*

*A Ogi y Rocío, gracias por las tardes y cursos compartidos.*

*A mi familia, Ma, Ita, Lela, Her, Leo, Sofi, Mati, Nico, Carla y Vero. Gracias por el aguante!!! Y a la memoria de los que ya no están, que siguen conmigo.*

*A la banda del Superior y los amigos de la Facu, por las salidas y los asados compartidos.*

## Indice General

<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. Antibióticos: hito de la medicina moderna.....	1
1.2. Los antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	2
1.2.1. El mecanismo antibacteriano de los $\beta$ -lactámicos.....	5
1.3. La resistencia bacteriana mediada por $\beta$ -lactamasas.....	7
1.3.1. Estructura de las MBLs.....	8
1.3.2. Coordinación de los iones Zn(II).....	10
1.3.3. Unión de sustratos.....	11
1.3.4. Mecanismo catalítico.....	12
1.3.5. Inhibición de MBLs.....	14
1.3.5.1. Bifeniltetrazoles.....	14
1.3.5.2. Derivados de pirrol.....	15
1.3.5.3. Derivados de ácido dicarboxílico.....	15
1.3.5.4. Derivados de rodaninas.....	17
1.3.5.5. Compuestos tiólicos.....	17
1.3.5.6. Inhibidores irreversibles.....	19
1.3.5.7. Compuestos quelantes.....	20
1.3.6. Evolución de las MBLs.....	21
1.3.6.1. Evolución natural.....	21
1.3.6.2. Emulando la evolución natural mediante evolución dirigida.....	22
1.4. Objetivos de esta Tesis.....	22
<b>Capítulo 2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>24</b>
2.1. Cepas bacterianas.....	24
2.2. Medios de cultivo.....	24
2.3. Plásmidos.....	25
2.4. Purificación de ADN plasmídico.....	26
2.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	26
2.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	27
2.7. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	27
2.8. Reacciones de ligación.....	27
2.9. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.10. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	28
2.11. Electroforesis SDS-PAGE.....	30

2.12. Concentración de proteínas.....	31
2.13. Estimación de la concentración de proteínas.....	31
2.14. Estimación del contenido metálico en muestras de proteína.....	31
2.15. Cinética de reacciones en estado estacionario.....	32
2.16. Determinación de las concentraciones de sustrato.....	33
2.17. Preparación de las células de <i>E. coli</i> para ensayos de inhibición <i>in bacteria</i> ....	33
2.18. Ensayos de viabilidad celular durante los experimentos de RMN.....	34
2.19. Ensayos de muerte celular en bacterias productoras de MBLs.....	34
2.20. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.....	34
2.20.1. Espectros de $^1\text{H}$ para el seguimiento de inhibición <i>in bacteria</i> .....	35
2.20.2. Medidas de $\text{IC}_{50}$ y análisis.....	35
2.20.3. Espectros HSQC de correlación $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ .....	36
2.20.4. Experimentos y análisis de datos para la asignación de las resonancias de $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ y $^{13}\text{C}$ en BcII N70S, BcII G262S y BcII G262S/N70S.....	37
2.20.5. Experimentos para medir parámetros de relajación de núcleos de $^{15}\text{N}$ peptídicos.....	38
2.20.5.1. Dinámica en la escala de picosegundos a nanosegundos.....	38
2.20.5.2. Dinámica en la escala de microsegundos a milisegundos.....	43
2.20.5.3. Dinámica en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos.....	44
2.21. Representación de estructuras moleculares.....	45
<b>Capítulo 3. Estudios de Inhibición de la MBL NDM-1.....</b>	<b>46</b>
3.1. Introducción.....	46
3.1.1. NDM-1: orígenes, diseminación y características.....	46
3.1.2. En búsqueda de un inhibidor de NDM-1.....	50
3.2. Resultados.....	52
3.2.1. Caracterización cinética de la interacción de las bistiazolidinas con NDM-1.....	52
3.2.2. Monitoreo de la inhibición de la actividad imipenemasa de células de <i>E. coli</i> que expresan NDM-1 por RMN.....	53
3.2.3. Ensayos de muerte celular demuestran la capacidad de las bistiazolidinas de restaurar la actividad de imipenem.....	58
3.2.4. Ensayos de selectividad y citotoxicidad.....	61
3.2.5. Caracterización estructural de la interacción de NDM-1 con L- CS319.....	62
3.3. Discusión.....	63

**Capítulo 4. Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs .68**

4.1. Introducción .....	68
4.2. Resultados .....	72
4.2.1. Caracterización cinética de la interacción de las bistiazolidinas con MBLs de distintas subclases .....	72
4.2.2. Titulación de BclI con el compuesto L-CS319 seguida por RMN .....	75
4.2.3. Ensayos de muerte celular demuestran la capacidad de las bistiazolidinas de restaurar la actividad de los $\beta$ -lactámicos .....	78
4.2.4. Estructuras cristalográficas de las MBLs con las bistiazolidinas .....	81
4.2.4.1. Diverso modo de unión de las bistiazolidinas de la serie L- en las MBLs.....	81
4.2.4.2. Unión de las bistiazolidinas de la serie D- a L1 .....	83
4.2.4.3. La unión de D-CS319 a las MBLs de subclase B1 involucra múltiples interacciones ligando-Zn(II).....	84
4.2. Discusión .....	86

**Capítulo 5. Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución .....93**

5.1. Introducción .....	93
5.1.1. La estructura proteica: una visión <i>avant-garde</i> .....	93
5.1.2. Diversidad conformacional y evolución proteica.....	96
5.1.3. Las MBLs como modelos de evolución: el caso de BclI .....	97
5.2. Resultados .....	99
5.2.1. Expresión de las MBLs .....	99
5.2.2. Asignación de los espectros $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC.....	100
5.2.3. Efecto de las mutaciones en residuos de la primera y segunda esfera de coordinación.....	101
5.2.4. Efecto de las mutaciones en la flexibilidad conformacional.....	103
5.2.4.1. Dinámica en la escala de picosegundos a nanosegundos (ps-ns)....	103
5.2.4.2. Dinámica en la escala de microsegundos a milisegundos ( $\mu\text{s}$ -ms) ..	106
5.2.4.3. Dinámica en la escala de milisegundos a segundos (ms-s).....	108
5.3. Discusión .....	109

**Resumen y Conclusiones ..... 113**

**Bibliografía ..... 117**

**Apéndice ..... 131**

## Abreviaturas

ADNasa	Desoxirribonucleasa
BBL	Numeración Consenso de las Lactamasas de clase B
BSA	Albúmina sérica bovina
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eq.	Equivalentes
GST	Glutación-S-transferasa
HEPES	N-[2-Hidroxietil]piperazine-N'-[2-ácido etanosulfónico]
$k_{cat}$	Número de recambio
$K_M$	Constante de Michaelis
MBLs	Metallo- $\beta$ -lactamasas
PAR	4-(2-piridilazo)-resorcinol
PBPs	Proteínas de unión a penicilina
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
RMN	Resonancia magnética nuclear
SBLs	Serín- $\beta$ -lactamasas
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
wt	silvestre

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Antibióticos: hito de la medicina moderna

Las muertes debidas a las infecciones bacterianas han diezariado a la especie humana desde que el *Homo sapiens* pisó la Tierra por primera vez. Durante el siglo XIX, la neumonía, la tuberculosis, la diarrea y la difteria eran consideradas la principal causa de muerte en niños y adultos. Sólo a fines del siglo XIX fue posible correlacionar la existencia de patógenos microscópicos con el desarrollo de diversas enfermedades. Louis Pasteur, el gran microbiólogo francés del siglo XIX, formuló la que fue llamada la Teoría de la Enfermedad debida a los Gérmenes, es decir, el concepto de que las enfermedades infecciosas eran causadas por microorganismos. Posteriormente, Robert Koch en la Oficina de Salud Imperial de Berlín aportó evidencia, con el *Bacillus anthracis* como ejemplo, de una relación causal definida entre un microorganismo particular y una determinada enfermedad. Los primeros compuestos descubiertos con el propósito de combatir infecciones microbianas fueron los compuestos derivados del arsénico tales como el Salvarsán reportado por Paul Ehrlich en 1911. Éstas eran moléculas altamente tóxicas que, sin embargo, resultaron las primeras drogas exitosas para el tratamiento de la sífilis, la cual en aquellos tiempos era considerada un flagelo mundial causada por el patógeno *Treponema pallidum*. El éxito de estos compuestos en el control de las infecciones inspiraron el desarrollo de las drogas sulfas 15 años más tarde, lo que marcó el comienzo de la “Era de los Antibióticos” que seguimos disfrutando en la actualidad. Hacia mediados del siglo XX se descubrieron la gran mayoría de los motivos químicos antimicrobianos que se encuentran hoy en uso clínico. Esta “Era de Descubrimiento”, a grandes rasgos desde 1940 a 1960, fue seguida por un período de gran innovación donde los químicos medicinales modificaron estos motivos estructurales para perfeccionar las propiedades farmacológicas de los antibióticos, haciéndolos mejores medicamentos [1]. Al mismo tiempo, la modificación química de las estructuras de estas moléculas fue un recurso para superar otro problema asociado con el uso de antibióticos: la resistencia.

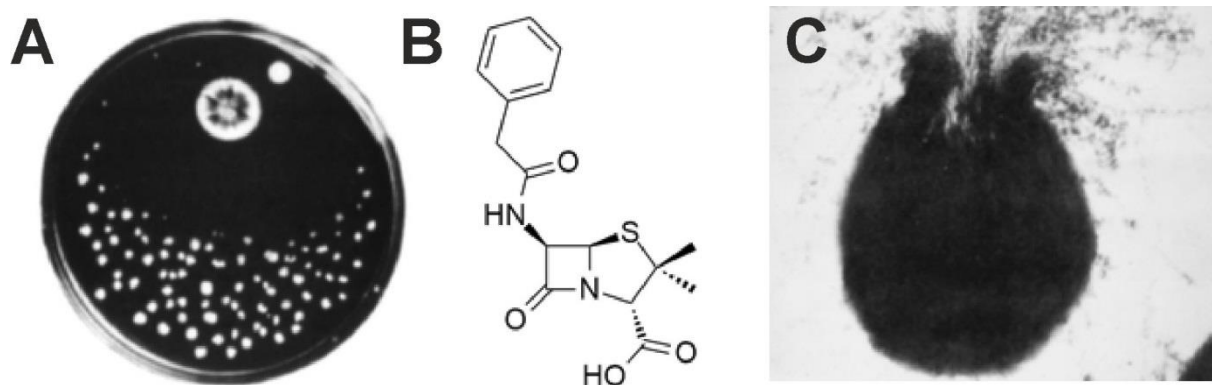
La resistencia a todas las clases de antibióticos aparece después del uso de los mismos en la clínica o en la agricultura. En el caso de la penicilina, la misma fue identificada incluso antes de su aplicación clínica [2]. La observación de este fenómeno estimuló el desarrollo de nuevos motivos químicos con propiedades antibióticas y su posterior modificación (siempre que fue posible), lo cual promovió el desarrollo de estructuras menos susceptibles a generar resistencia. Esto ha producido, en muchos casos, varias “generaciones” de antibióticos cada una con propiedades mejoradas incluyendo: aumento del espectro de acción antibacteriano, propiedades farmacológicas favorables y “resistencia a la resistencia” [3].

A pesar de estos ciclos de descubrimiento de nuevos antibióticos e innovación, la resistencia permanece como un creciente y significativo desafío para el tratamiento eficiente de las enfermedades infecciosas. Esto ha producido una creciente necesidad en la clínica de nuevos antimicrobianos que puedan paliar esta situación. Sin embargo, dado el creciente costo que involucra el desarrollo de nuevos compuestos antibacterianos, muchos jugadores de la industria farmacéutica han abandonado el descubrimiento de nuevas drogas. Esta tendencia alarmante ha ocurrido al mismo tiempo que la resistencia a todos los antibióticos continúa evolucionando y expandiéndose por todo el globo. En algunos casos, bacterias altamente exitosas resistentes a múltiples drogas (MDR, por sus siglas en inglés) están emergiendo como cepas epidémicas y pandémicas. La erosión resultante de la eficacia de los antimicrobianos es vista en la actualidad como un problema de salud global que necesita ser reconocido y solucionado con programas de descubrimiento de nuevos antibióticos [4].

## 1.2. Los antibióticos $\beta$ -lactámicos

Los  $\beta$ -lactámicos constituyen un gran grupo de antimicrobianos, entre los que se encuentran las penicilinas, las cefalosporinas, las monobactamas y los carbapenemes. La penicilina fue el primer antibiótico en un sentido estricto, es decir, proveniente de un organismo vivo. Fue descubierta en 1928 por Alexander Fleming pero, sin embargo, no pudo ser comercializada hasta comienzos de la década de 1940 (Figura 1.1A-B). Su uso clínico produjo inmediatamente un impacto espectacular en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas. El gran éxito de esta molécula indujo un marcado interés en la estructura química de la penicilina y en su efecto antibacteriano.

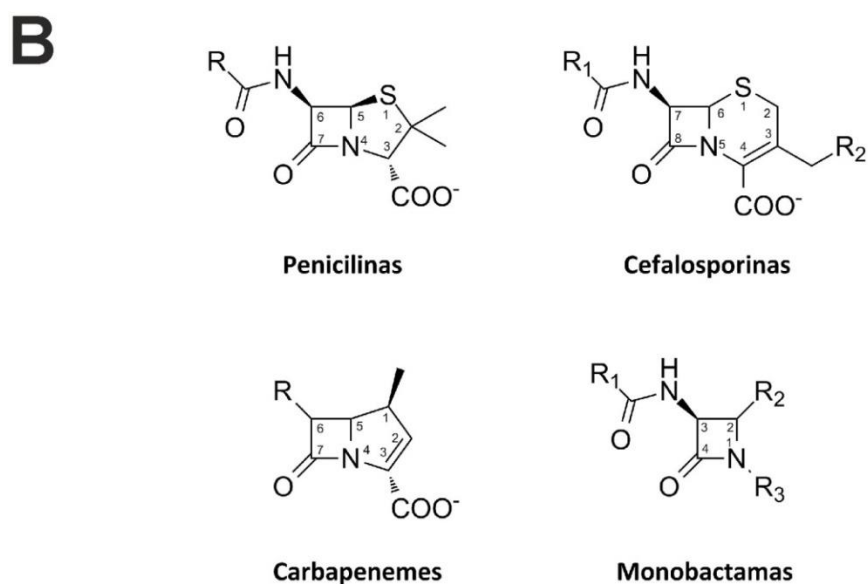
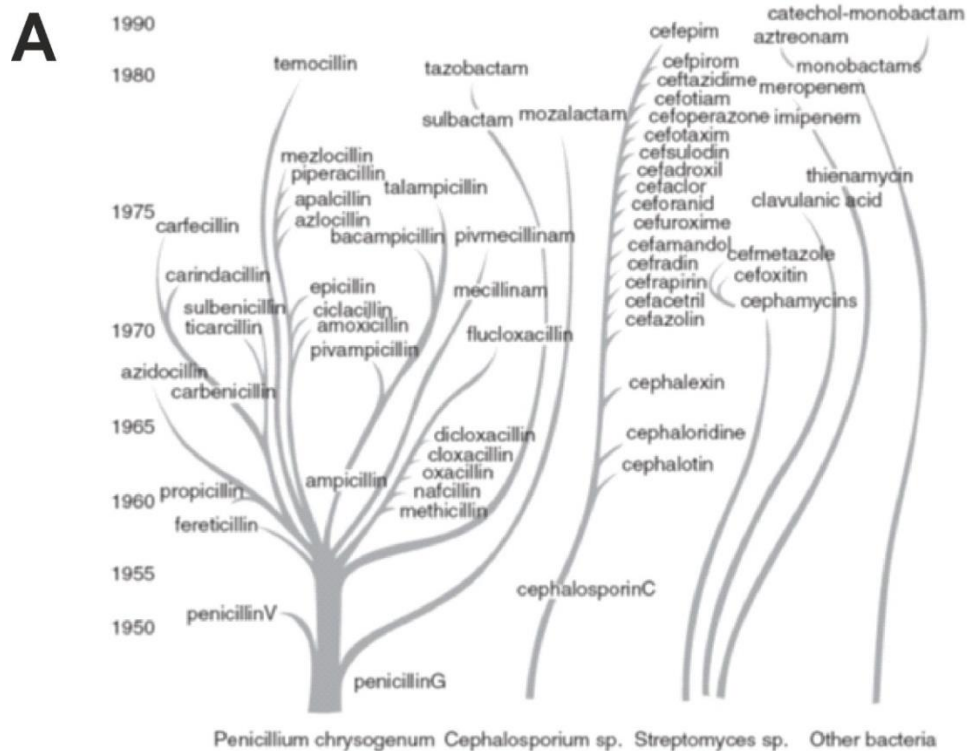
Los primeros estudios de microscopía acerca del efecto de la penicilina sobre estafilococos en crecimiento mostraron a las células bacterianas como hinchadas y a punto de estallar bajo el efecto de la droga (Figura 1.1C). Si, por otro lado, células que no estaban creciendo debido a la carencia de nutrientes eran expuestas a la penicilina, las mismas resultaban indemnes a la acción de la droga, dado que si la penicilina era removida por filtración o centrifugación y los nutrientes eran agregados al medio, el crecimiento bacteriano se reestablecía. La penicilina podía interferir solamente con las bacterias en crecimiento. Esto, a su vez, fue interpretado de manera que la penicilina interfería con la síntesis de la pared celular, la cual, por ejemplo, protege la integridad de la célula bacteriana de la presión osmótica interna en un medio externo hipotónico. Pronto resultó evidente que el grupo amida cíclico de cuatro miembros con su enlace  $\beta$ -lactámico era el componente activo de la molécula de penicilina (Figura 1.1B), como el de todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Si se elimina el enlace  $\beta$ -lactámico, el efecto antibacteriano se pierde.



**Figura 1.1.** (A) Una réplica de la placa original de Alexander Fleming en donde se muestra un pasto del moho *Penicillium* y colonias de *Staphylococcus* que parecen desaparecer alrededor del moho. (B) Estructura química de la penicilina. (C) Fotografía de microscopía de un estafilococo en crecimiento bajo la influencia de la penicilina.

La investigación intensiva y el rápido incremento en el conocimiento de la molécula de penicilina pronto llevaron al descubrimiento y producción de un gran número de  $\beta$ -lactámicos clínicamente útiles. Algunos de éstos fueron sintetizados en el laboratorio, mientras que otros fueron encontrados en diversos microorganismos. La Figura 1.2 muestra un árbol con varias ramificaciones que representan derivados de la penicilina, todos con su origen en el moho *Penicillium chrysogenum* (el cual es un mejor productor de penicilina que

el original *P. notatum* identificado por Fleming) y luego modificados por químicos medicinales a derivados que podrían ser considerados como penicilinas semisintéticas.

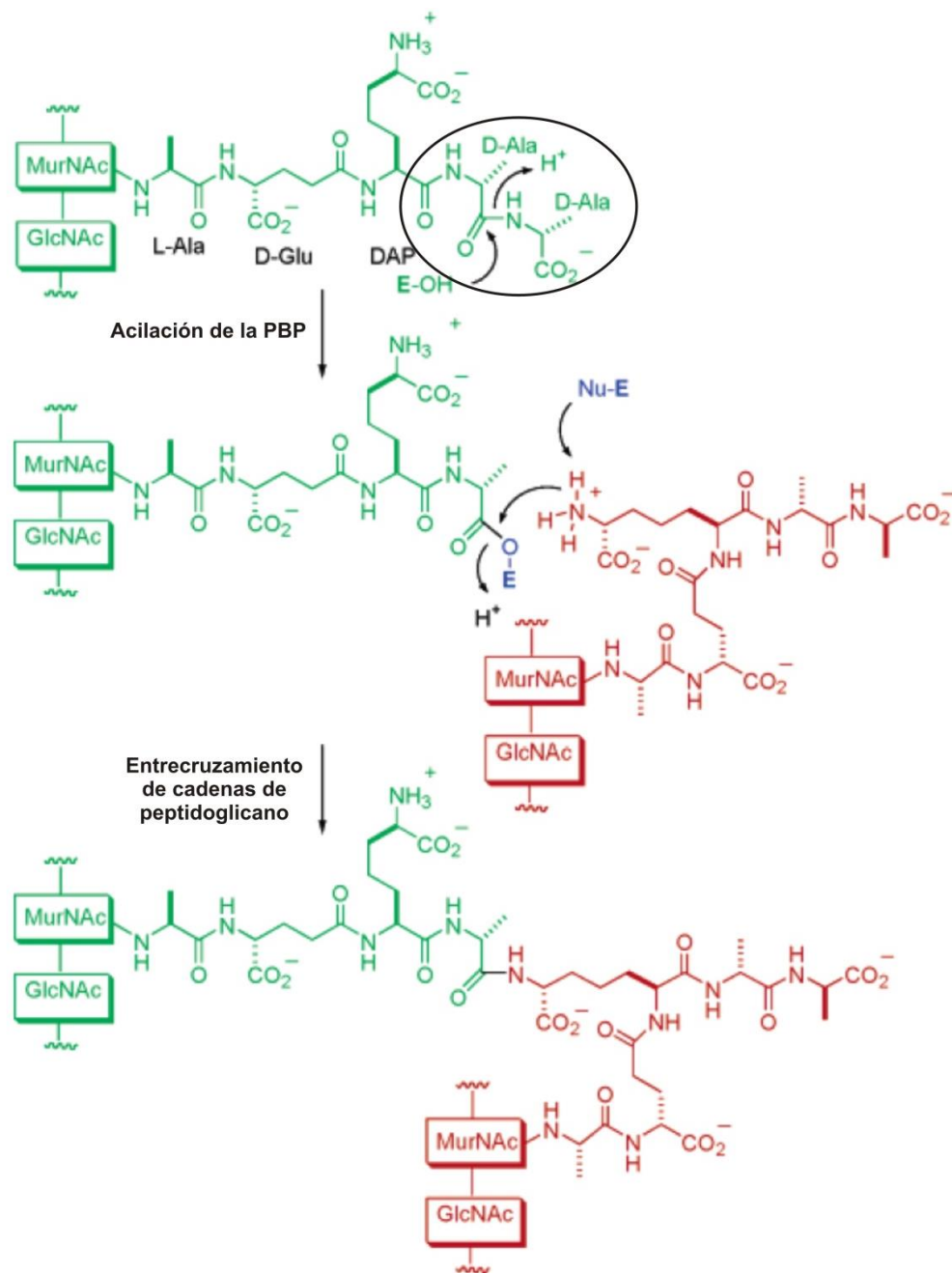


**Figura 1.2.** (A) Cronología de la aparición de los distintos  $\beta$ -lactámicos. La parte derecha de la figura muestra las relaciones entre  $\beta$ -lactámicos como un árbol con sus raíces en el productor de cada clase de  $\beta$ -lactámico. La introducción clínica de diversos derivados es dada aproximadamente por la escala de tiempo a la izquierda. (B) Estructura química general de los  $\beta$ -lactámicos.

La versatilidad de estos compuestos fue avanzando mediante el desarrollo de un método para la modificación de la molécula de penicilina. Se encontró que enzimas bacterianas podían ser agregadas secuencialmente en un biorreactor para remover la cadena lateral de bencilo de la penicilina G, liberando el ácido 6-aminopenicilánico, el cual podía ser aislado y luego acilado por medios químicos. Esto abrió la puerta a la producción de un casi ilimitado número de derivados de la penicilina. Posteriormente, se encontraron otros tres grupos de  $\beta$ -lactámicos: las cefalosporinas, las monobactamas y los carbapenemes, siendo sus orígenes mohos y bacterias del suelo (Figura 1.2).

### 1.2.1. El mecanismo antibacteriano de los $\beta$ -lactámicos

El anillo  $\beta$ -lactámico de cuatro miembros es una característica común de todos los  $\beta$ -lactámicos y una condición *sine qua non* para su efecto antibacteriano. Estos antibióticos actúan sobre la síntesis de la pared celular bacteriana, la cual es una entidad básica común de virtualmente todas las bacterias [5]. La pared celular bacteriana se compone de largas cadenas de polisacáridos que forman un esqueleto de N-acetilglucosamina y su derivado lactil alternados. Estos esqueletos de cadenas de polisacáridos están entrecruzados por péptidos para formar la estructura llamada péptidoglicano, la cual puede describirse como una molécula gigante estructurada como una armadura que envuelve a la bacteria y la protege, por ejemplo, de la lisis osmótica. La estabilidad de la pared celular depende de la integridad del entrecruzamiento peptídico. Este entrecruzamiento se forma por una secuencia de reacciones bioquímicas, donde un pentapéptido unido a un monosacárido y conteniendo un ácido diaminoamino (lisina o ácido diaminopimérico) con dos D-alaninas en el extremo, es transportado hacia el exterior a través de la membrana celular. El monosacárido es luego incorporado a una cadena polisacárida en crecimiento de la pared celular. Posteriormente, el grupo carboxilo al final del péptido puede formar un enlace peptídico con el ácido diaminoamino de un péptido de una cadena de polisacárido vecina, formando así una unión covalente entre dos cadenas de polisacárido (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Síntesis del peptidoglicano bacteriano. Se señala el dímero D-ala-D-ala. Adaptado de [5].

El enlace peptídico de entrecruzamiento se forma en un ambiente bajo en energía y es afectado por una reacción de transpeptidación, donde una de las dos D-alaninas en el extremo de la cadena peptídica entrante es escindida y transfiere su enlace peptídico al grupo amino libre del ácido diaminoamino de un péptido vecino de la pared celular en crecimiento. Esta reacción de transpeptidación es catalizada por una enzima transpeptidasa unida a membrana, llamada proteína de unión a penicilina (o PBP por sus siglas en inglés).

Los  $\beta$ -lactámicos inhiben esta reacción de transpeptidación por analogía estructural entre el anillo  $\beta$ -lactámico y el dipéptido D-alanil-D-alanina en el extremo del péptido de entrecruzamiento. La inhibición de la transpeptidación inhibe el entrecruzamiento durante la formación de la pared celular, volviéndola inestable. Se deduce a partir de este argumento que solamente las células bacterianas en crecimiento son afectadas por los  $\beta$ -lactámicos, dado que sólo interfieren con la reacción de entrecruzamiento.

### 1.3. La resistencia bacteriana mediada por $\beta$ -lactamasas

El principal mecanismo de resistencia bacteriana consiste en la expresión de enzimas capaces de inactivar a los  $\beta$ -lactámicos, denominadas  $\beta$ -lactamasas. Estas enzimas han sido clasificadas en clases A, B, C y D en base a similitud de secuencia [5]. Las enzimas de clase A, C y D utilizan una serina esencial en el sitio activo como nucleófilo y son llamadas así serín- $\beta$ -lactamasas (SBLs), mientras que las enzimas de clase B utilizan uno o dos iones zinc en el sitio activo para mediar la hidrólisis del  $\beta$ -lactámico y son llamadas por este motivo, metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs). Las MBLs fueron a su vez, divididas en subclases B1, B2 y B3 por similitud de secuencia [6]. Las enzimas de subclase B1 son en general encontradas en elementos genéticos móviles que facilitan una rápida diseminación y son consideradas por este motivo una gran amenaza para los sistemas de salud [7].

La primera enzima de clase B descubierta fue la MBL de *Bacillus cereus*, BcII, en 1965 por Sabath y Abraham, quienes demostraron la eliminación de actividad  $\beta$ -lactamasa en extractos de *B. cereus* luego del tratamiento con el quelante EDTA [8,9]. Durante las siguientes dos décadas, las MBLs permanecieron relativamente poco estudiadas y eran usualmente consideradas una anomalía evolutiva. Sin embargo, a finales de la década de 1980 el número de infecciones nosocomiales relacionadas con MBLs, particularmente en especies tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis* y *Aeromonas hydrophila* [10-12], comenzaron a aumentar el interés en una mejor caracterización de estas enzimas [13,14].

La naturaleza promiscua tanto en la transmisión como en la especificidad de sustrato de las MBLs ha llevado al surgimiento de cepas resistentes a un amplio espectro de  $\beta$ -lactámicos. En años recientes se ha visto una gran preocupación en la comunidad médica

con el advenimiento de MBLs como NDM-1, la cual permite conferir resistencia a casi todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. La única clase de  $\beta$ -lactámicos que no son reconocidos por las MBLs son las monobactamas [15]. En la actualidad, la única monobactama aprobada para uso clínico es el aztreonam, el cual posee limitada utilidad clínica debido a su relativamente baja biodisponibilidad y su pobre actividad contra patógenos Gram-positivos [16]. Además, las bacterias que producen SBLs junto con MBLs son capaces de hidrolizar aztreonam [17]. A pesar de que se disponen en la actualidad de inhibidores de uso clínico de SBLs (como ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam), no hay inhibidores de MBLs en desarrollo clínico [18].

La inhibición de las MBLs presenta un desafío único dado que un compuesto activo ideal debería ser efectivo contra las tres subclases (B1, B2 y B3), poseer capacidad de inhibir a la enzima dentro de la bacteria y, al mismo tiempo, exhibir limitado efecto citotóxico en células eucariotas. Por otro lado, la carencia de un intermediario covalentemente unido durante la catálisis (como ocurre en las SBLs) presenta un desafío adicional para el diseño de inhibidores basados en el mecanismo. Los primeros trabajos sobre el diseño de inhibidores de MBLs se centraron en agentes quelantes de metal [19]. Sin embargo, estos compuestos son proclives a presentar efectos inespecíficos y, a pesar de ser una herramienta de investigación importante, presentan importantes efectos adversos para su uso *in vivo* [20].

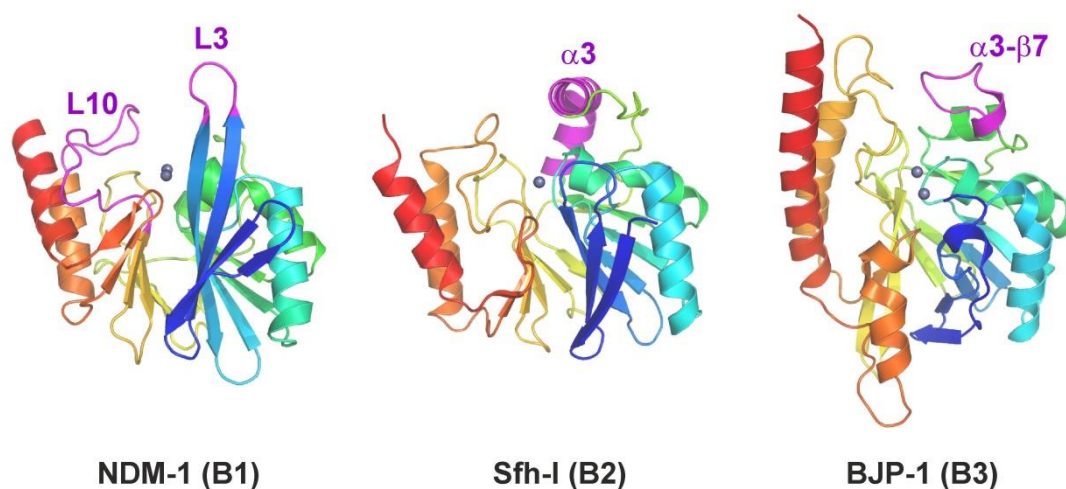
### 1.3.1. Estructura de las MBLs

Las diversas estructuras cristalográficas reportadas indican que las MBLs presentan una alta similitud estructural dada por un plegamiento del tipo  $\alpha\beta/\beta\alpha$  en donde el sitio activo se encuentra entre ambos dominios (Figura 1.4). Este plegamiento permite la coordinación de hasta seis residuos en el sitio activo que dan lugar a la unión de uno o dos iones  $Zn(II)$ , esenciales para el mecanismo catalítico. El plegamiento  $\alpha\beta/\beta\alpha$  de las MBLs abarca un grupo más grande de metaloproteínas con funciones biológicas diversas más allá de la hidrólisis de  $\beta$ -lactámicos. La mayor parte de los miembros de la superfamilia de  $\beta$ -lactamasas muestran un sitio metálico dinuclear para catalizar la hidrólisis de una amplia variedad de sustratos. La coordinación metálica entre miembros de la superfamilia de  $\beta$ -lactamasas es muy similar a las MBLs excepto por la presencia de un residuo de aspartato en las no-MBLs que queda a puente entre ambos iones metálicos. Los miembros de la superfamilia se conoce que unen también un grupo diverso de metales incluyendo zinc, hierro y manganeso. Las enzimas con

el plegamiento MBL incluye a la Glioxalasa II, la arilsulfatasa, la ciclasa/dihidrasa, entre otras [15].

El sitio activo en las MBLs de subclase B1 esta flanqueado por dos importantes bucles, el L3 y el L10, los cuales llevan a cabo contactos específicos con el sustrato (Figura 1.4) [21]. Luego de la unión del sustrato, el bucle L3 se cierra sobre el sitio activo, presentando en general una pared hidrofóbica para interactuar con el ligando unido. La eliminación de este bucle disminuye drásticamente la eficiencia catalítica para la hidrólisis de penicilinas y cefaloporinas, aunque presenta un efecto mucho menor en la unión e hidrólisis del carbapenem imipenem [22]. Esto ha sido atribuído a la carencia de un sustituyente hidrofóbico R1 en los carbapenemes, el cual se cree que es importante para la interacción con residuos apolares en el bucle L3.

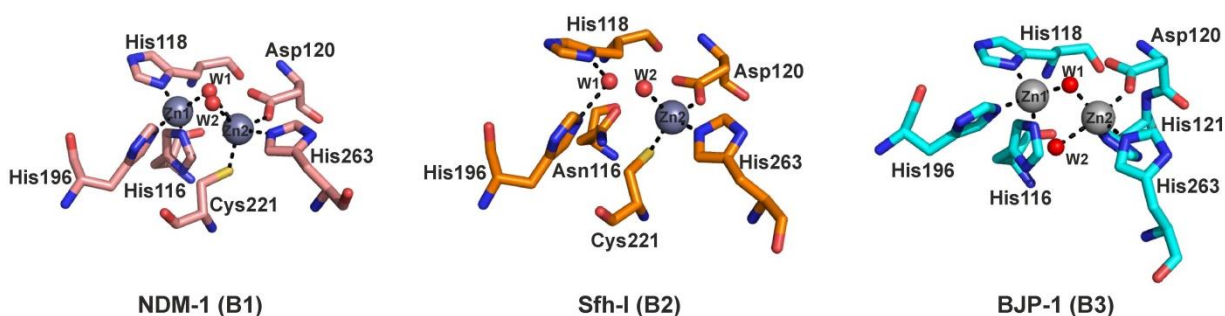
Por el contrario, las enzimas de subclases B2 y B3 carecen del bucle extendido L3. El sitio activo de las enzimas de subclase B2 está definido por una hélice  $\alpha 3$  retorcida, la cual se orienta directamente por arriba de la cavidad del sitio activo (Figura 1.4). La hélice  $\alpha 3$  forma una pared hidrofóbica, la cual presenta una interface de interacción para los ligandos unidos. En efecto, esta hélice ayuda a formar una cavidad en el sitio activo más estrecha y mejor definida, la cual resulta en una alta selectividad hacia los carbapenemes sobre otros  $\beta$ -lactámicos en enzimas de esta subclase [23]. Para las enzimas de subclase B3, un bucle móvil localizado en  $\alpha 3$  y  $\beta 7$  se extiende sobre el sitio activo y es responsable de interactuar específicamente con el sustrato (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Estructuras de MBLs representativas de las distintas subclases. Los iones Zn(II) se muestran como esferas grises.

### 1.3.2. Coordinación de los iones Zn(II)

Las MBLs son capaces de coordinar tanto uno como dos iones Zn(II) catalíticos, dependiendo de la MBL específica. En general, las MBLs de subclases B1 y B3 son enzimas dinucleares [24]. En la forma libre de sustrato, el Zn(II) en el sitio Zn1 (o 3H) está coordinado en forma tetraédrica por 3 residuos de histidina universalmente conservados (His116, His118 e His196) y por una molécula de agua/hidróxido a puente (W1). Enzimas de ambas subclases B1 y B3, coordinan al ion Zn(II) en el sitio Zn2 (o DCH/DHH) con geometría bipiramidal trigonal aunque difieren en los ligandos utilizados (Figura 1.5). Las MBLs de subclase B1 coordinan al Zn2 con Asp120, Cys221 e His263, mientras que las enzimas B3 coordinan al Zn2 utilizando Asp120, His121 e His263. En ambas, una molécula de agua axial (W2) completa la esfera de coordinación [6]. Típicamente, el sitio Zn1 ha sido refinado con una ocupancia promedio mayor que el sitio Zn2 para enzimas de ambas subclases [25], sugiriendo una posible unión más débil del segundo ion. Sin embargo, se ha demostrado que sólo la forma dinuclear en las MBLs de subclase B1 es la activa en el periplasma bacteriano[26].



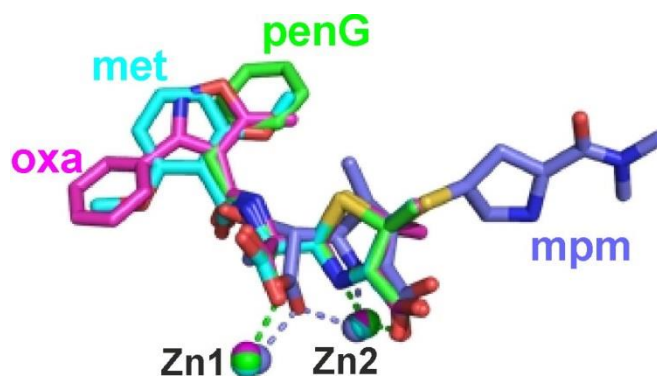
**Figura 1.5.** Sitios activos de MBLs representativas de las distintas subclases. Los iones Zn(II) y las moléculas de agua se muestran como esferas grises y rojas, respectivamente.

Por el contrario, las MBLs de subclase B2 son hidrolasas con un único ion Zn(II) en el sitio activo, siendo incluso inhibidas en presencia de un segundo equivalente del metal [27]. Las MBLs de esta subclase, tales como CphA, ImiS y Sfh-I, coordinan al ion Zn(II) con Asp120, Cys221, His263 y una molécula de agua axial (W2) (Figura 1.5), generando un sitio equivalente al Zn2 en las MBLs dinucleares de subclase B1 [23]. Sin embargo, en las enzimas B2 el Zn2 adopta una geometría de coordinación tetraédrica en vez de trigonal bipiramidal.

### 1.3.3. Unión de sustratos

Como se mencionó anteriormente, las MBLs catalizan la hidrólisis del enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico de 4 átomos. Debido a la diversidad estructural y funcional de las MBLs, muchos detalles mecanísticos incluyendo el rol exacto del ion en el sitio Zn2 y la estabilización del estado de transición, deben aún ser completamente entendidos y parecen diferir dependiendo del sustrato y MBL que se analice. Se espera que un detallado conocimiento del mecanismo catalítico de las MBLs, incluyendo detalles de los pasos limitantes de la velocidad y la naturaleza química de los intermediarios de reacción para las distintas subclases facilitarán el desarrollo racional de inhibidores.

La catálisis enzimática comienza con la unión del  $\beta$ -lactámico al centro metálico con el oxígeno carbonílico interactuando con el Zn1 y el grupo carboxílico del anillo de fusión de 5 o 6 miembros unido al Zn2. Estudios cristalográficos recientes en la enzima B1 NDM-1 con productos de reacción unidos han revelado detalles de la unión de sustrato e hidrólisis de las enzimas B1. El grupo de Strynadka [28] obtuvo la estructura de NDM-1 con los productos de hidrólisis de meticilina, bencilpenicilina, oxacilina y meropenem en el sitio activo (Figura 1.6). Las estructuras revelaron que el anillo  $\beta$ -lactámico y el anillo tiazolidínico de fusión



**Figura 1.6.** Se muestra la estructura de  $\beta$ -lactámicos unidos a NDM-1. Los carbonos de bencilpenicilina se muestran en verde, los de meticilina en celeste, los de oxacilina en magenta y los de meropenem en azul. Los iones Zn(II) se colorean de acuerdo al  $\beta$ -lactámico correspondiente. Las líneas punteadas muestran las interacciones de las penicilinas (verde) y del carbapenem (azul).

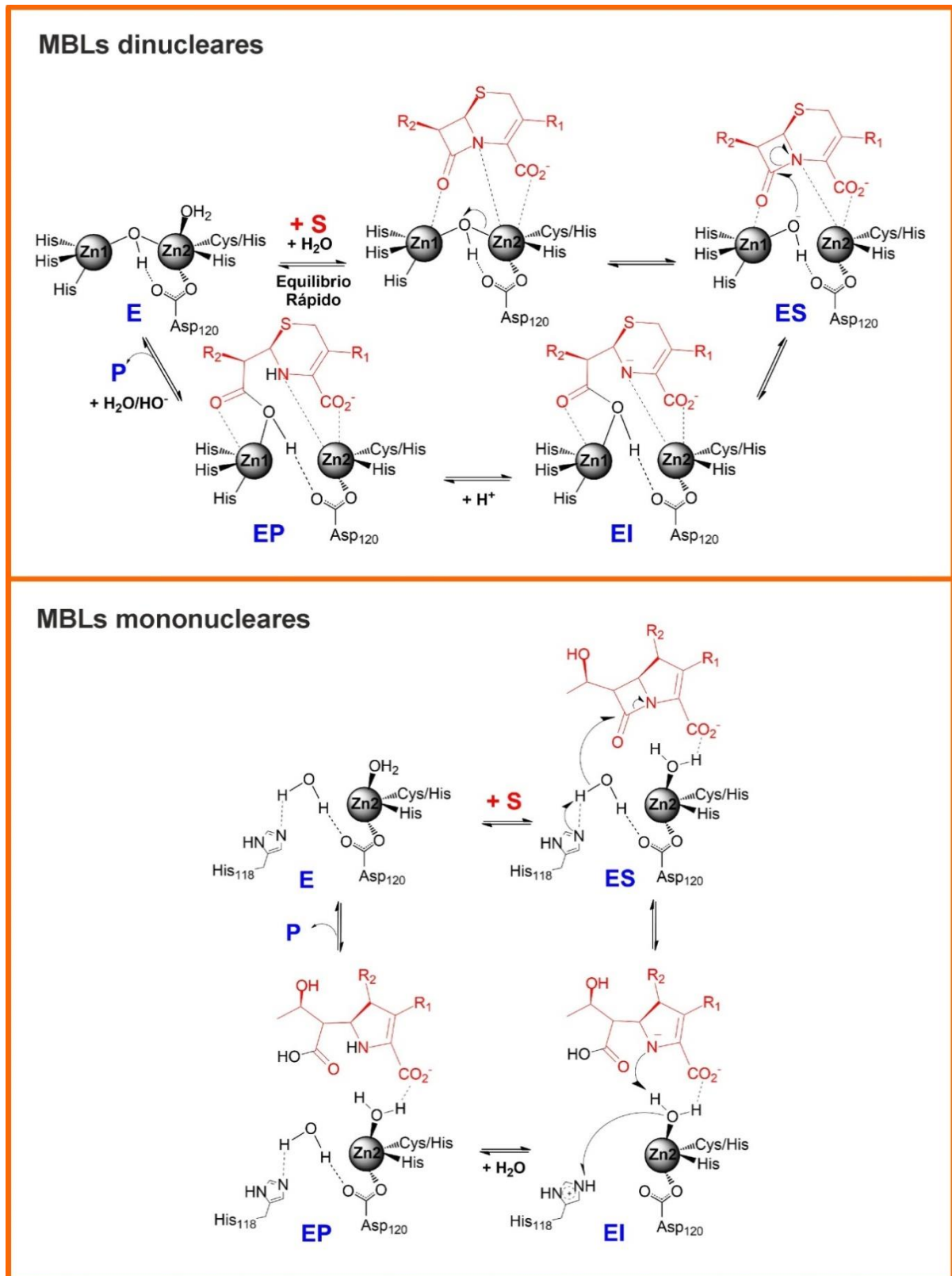
coordina en forma rígida y precisa al sitio activo con el carboxilato C7 que se forma durante la hidrólisis del enlace C-N unido al Zn1 y el N4 y los oxígenos del grupo carboxilato C3 unidos al Zn2. Sin embargo, los grupos funcionales R de las penicilinas mostraron

conformaciones variables y mayores factores cristalográficos de temperatura que el resto de la proteína. Por otro lado, este estudio indicó que el producto de hidrólisis de meropenem se une en una forma algo diferente a la observada para las penicilinas. El N4 y el carboxilato C3 interactúan en forma similar a la de las penicilinas, sin embargo, el carboxilato C7 resultante de la hidrólisis se intercala entre ambos iones zinc resultando en una tetracoordinación para el Zn1 y una hexacoordinación para el Zn2, al contrario del caso de las penicilinas en donde este carboxilato se aleja del Zn2 y queda coordinado únicamente al Zn1.

#### 1.3.4. Mecanismo catalítico

La hidrólisis de los  $\beta$ -lactámicos involucra un ataque nucleofílico al grupo carbonilo, la ruptura del enlace C-N y la protonación del nitrógeno. En la reacción catalizada por las MBLs dinucleares (enzimas de las subclases B1 y B3), la hidrólisis ocurre por ruptura del enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico debido al ataque nucleofílico de un ion hidróxido a puente entre ambos iones Zn(II) al carbono carbonílico del sustrato. La distancia Zn1-W1 (Figura 1.5) en las enzimas B1 es típicamente 1,9-2,0 Å, característica de un hidróxido unido a Zn(II); mientras que la distancia Zn2-W1 varía entre 2,5-3,0 Å [29]. Estos datos sugieren que sólo el Zn1 sería responsable de bajar el pKa. Sin embargo, el hecho de que la disociación del metal del sitio Zn2 da lugar a una enzima inactiva llevó al grupo de Page a proponer que este ion era esencial para la actividad [30,31]. Estos autores sugirieron que el Zn2 contribuye a bajar el pKa del nucleófilo. Sin embargo, un hidróxido unido a puente entre dos iones Zn(II) se espera que posea menor potencia nucleofílica que un hidróxido terminal. La estructura cristalográfica de una mutante de BclI que muestra que el corto enlace Zn1-W1 esta preservado en las formas mono y dinuclear [26], confirmó que el ion Zn2 no es requerido para proveer un nucleófilo activo a pH neutro, dando apoyo al mismo tiempo a la idea de un hidróxido terminal como nucleófilo.

La evidencia experimental indica que luego del ataque se produce la ruptura concertada del enlace C-N y la generación de un intermediario nitrógeno aniónico estabilizado por interacción directa con el ion Zn2 [32,33]. Finalmente, el intermediario es protonado, posiblemente por una molécula de agua cercana, y liberado al medio con lo cual se completa el ciclo catalítico.



**Figura 1.7.** Mecanismo catalítico propuesto para las MBLs dinucleares (A) o mononucleares (B).

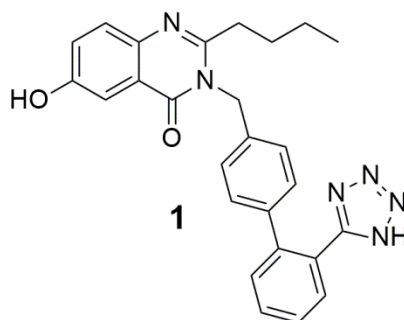
Las MBLs de subclase B2 difieren de las de subclase B1 y B3 en que contienen solo un ion Zn(II) localizado en el sitio Zn2 del sitio activo. A partir de la estructura de CphA con biapenem hidrolizado se propuso un mecanismo catalítico para la hidrólisis de carbapenemes. En este mecanismo, el nucleófilo correspondería a una molécula de agua coordinada por los residuos His118 y Asp120, siendo uno de ellos el responsable de activar a esta molécula de agua para llevar a cabo la catálisis. Luego del ataque, se produce la escisión concertada del enlace C-N y la acumulación del intermediario nitrógeno aniónico, para finalmente proceder al paso de protonación y liberación del producto [23].

### 1.3.5. Inhibición de MBLs

En las últimas décadas se han reportado varios inhibidores de MBLs con diferentes eficiencias y espectro de inhibición. Algunos de ellos son activos contra un blanco específico, siendo mucho menos eficientes en la inhibición de enzimas de otras subclases o, incluso, entre diferentes miembros de la misma subclase. Esto demuestra la gran dificultad que presenta el desarrollo de compuestos que sean capaces de mediar una inhibición amplia y eficaz. A continuación se describen brevemente algunos de los compuestos reportados, clasificados según su estructura.

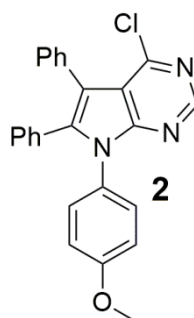
#### 1.3.5.1. Bifeniltetrazoles

Mediante búsqueda en la colección de compuestos de la empresa Merck y estudios de modelado molecular se identificaron varios bifeniltetrazoles como potentes inhibidores competitivos (valores de  $K_i$  e  $IC_{50}$  en el rango micromolar) de la MBL CcrA. La estructura de CcrA en complejo con el inhibidor (**1**) reveló que uno de los átomos de N del motivo tetrazol interactúa con el Zn2. Simulaciones de dinámica molecular mostraron que, en presencia del inhibidor, el Trp64 en el bucle móvil L3 bloquea la entrada al sitio activo, contribuyendo a la estabilización del complejo. Otras interacciones como el enlace de hidrógeno entre la Lys224 (un residuo conservado en las MBLs de subclase B1) y el carbonilo del inhibidor, así como también interacciones del tipo hidrofóbicas con cadenas laterales de residuos del bucle L3, contribuyen a la unión [34-36].



### 1.3.5.2. Derivados de pirrol

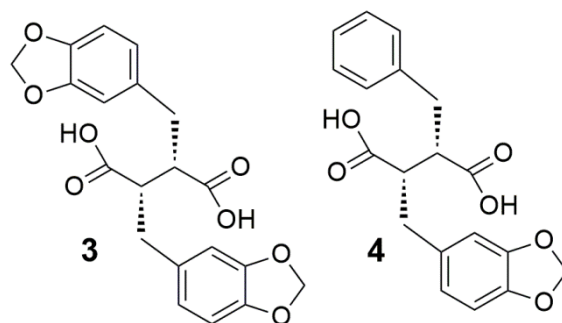
Con el objetivo de desarrollar nuevos inhibidores de MBLs, Mohammed y colaboradores sintetizaron y ensayaron compuestos basados en pirrol utilizando IMP-1 como blanco. Los seis compuestos más potentes mostraron valores de  $K_i$  entre 10 a 30  $\mu\text{M}$ . Estudios de modelado computacional sugieren que el compuesto **(2)** se une al sitio activo en forma paralela al bucle L3 con el átomo de oxígeno del grupo metóxi entre ambos iones Zn(II) [37].



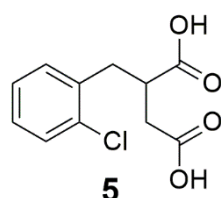
### 1.3.5.3. Derivados de ácido dicarboxílico

Una búsqueda en la colección de compuestos de la empresa Merck llevó al descubrimiento de varios ácidos succínicos disustituídos como potentes inhibidores de IMP-1, los cuales exhibían valores nanomolares de  $K_i$ . Se determinó que los isómeros (S,S) eran mucho más activos que los isómeros (R,R). Además, dos sustituyentes de significativa hidrofobicidad eran necesarios para la inhibición. La estructura del complejo entre IMP-1 y **(3)** reveló que este compuesto experimenta una cierta tensión debido a interacciones estéricas desfavorables con la cadena lateral de la Ser119. El complejo de IMP-1 con **(4)** mostró que el sustituyente bencilo más pequeño presente en este compuesto se une en una conformación más relajada, dando lugar a un inhibidor más potente. Por otro lado, un oxígeno de uno de los carboxilatos interactúa a puente entre ambos iones zinc, desplazando la molécula de agua apical, mientras que el segundo oxígeno del mismo carboxilato

interactúa con el N $\delta$ 2 de la Asn233 (otro de los residuos conservados en MBLs de subclase B1). A su vez, un oxígeno del otro carboxilato interactúa con el Zn $^{2+}$ , mientras que el otro oxígeno interactúa con el nitrógeno del esqueleto de la Asn233 así como también con el N $\epsilon$  de la Lys224 [38].

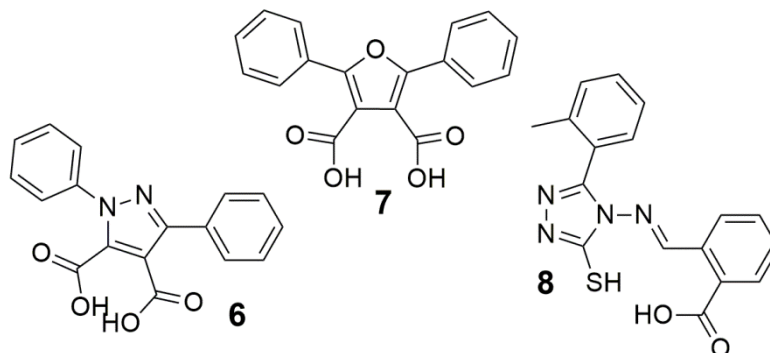


La búsqueda en la colección del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos identificó que varios derivados del ácido succínico eran inhibidores de la MBL IMP-1, teniendo el más potente de estos compuestos (**5**) un valor de  $K_i$  de 3,3  $\mu$ M debido en parte a la presencia de un átomo de cloro. Incluso, un análogo de este compuesto sin el mismo no presenta inhibición a una concentración de 40  $\mu$ M comparada con una inhibición de más del 80% para el compuesto (**5**). Este inhibidor presentó también actividad antibacteriana *in vitro* disminuyendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de meropenem contra una cepa de *E. coli* que expresa IMP-1 [39].



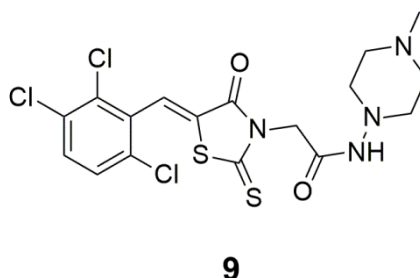
Un interesante trabajo demostró la utilidad de la generación de farmacóforo, búsqueda en base de datos, estudios de docking y cinética enzimática para la identificación de nuevos inhibidores de MBLs. A partir de la estructura de IMP-1 en complejo con ácido succínico y ácido mercaptocarboxilato, se generaron 3 estructuras como farmacóforo en 3D. Luego, se realizó una búsqueda en una base de datos para identificar compuestos que asemejaran su estructura a la de los farmacóforos diseñados y se obtuvieron 74 posibles candidatos. Finalmente, se seleccionaron 12 compuestos basados en un puntaje calculado mediante un conjunto de descriptores que definen posibles buenos candidatos para la determinación de

los valores de  $IC_{50}$ . Con este diseño experimental se identificaron tres compuestos (**6**), (**7**) y (**8**) con valores de  $IC_{50}$  menores a 15  $\mu$ M [40].



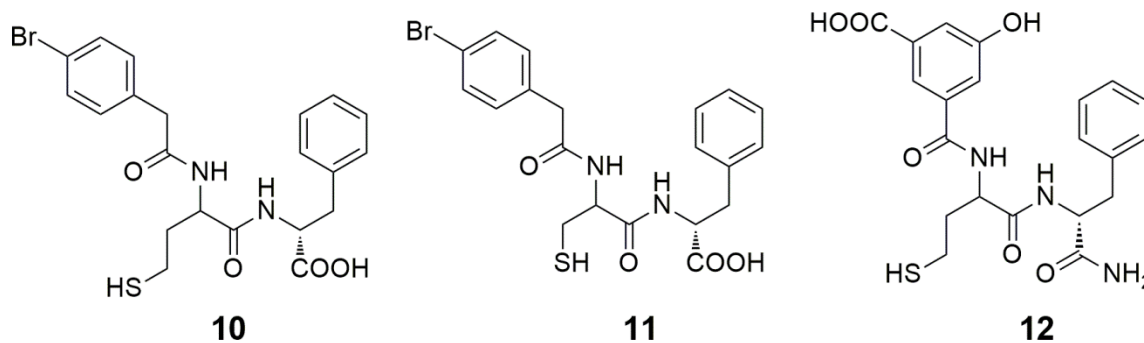
#### 1.3.5.4. Derivados de rodaninas

Diversos estudios demostraron la capacidad inhibitoria de rodaninas contra PBP<sub>s</sub>, SBL<sub>s</sub> y, más recientemente, MBL<sub>s</sub>. En un estudio reportado por el grupo de Schofield y colaboradores, se demostró que el anillo de rodanina de (**9**) se hidroliza para dar origen a un tienolato que se coordina a ambos iones Zn(II) para inhibir fuertemente a NDM-1 [41]. A partir de la estructura cristalográfica observaron además la formación de un complejo ternario entre la MBL, el tienolato y la rodanina, el cual se formaría también en solución.

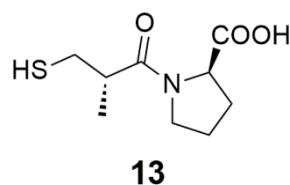


#### 1.3.5.5. Compuestos tiólicos

Sun y colaboradores describieron la síntesis de una biblioteca de análogos basados en la estructura de dipeptidilcisteína utilizando química combinatoria. Se sintetizaron análogos con diferentes motivos quelantes de zinc y se ensayaron como inhibidores de la enzima L1. Los valores de  $K_i$  demostraron que el homo-cisteinildipéptido (**10**) era un inhibidor más potente que el cisteinildipéptido (**11**). En base a esto, se llevó a cabo un proceso de optimización para obtener homocisteinil derivados con distintos grupos químicos y mayor potencia. Finalmente, fue posible hallar un inhibidor muy potente (**12**) para L1 con un valor de  $K_i$  de 2 nM [42].



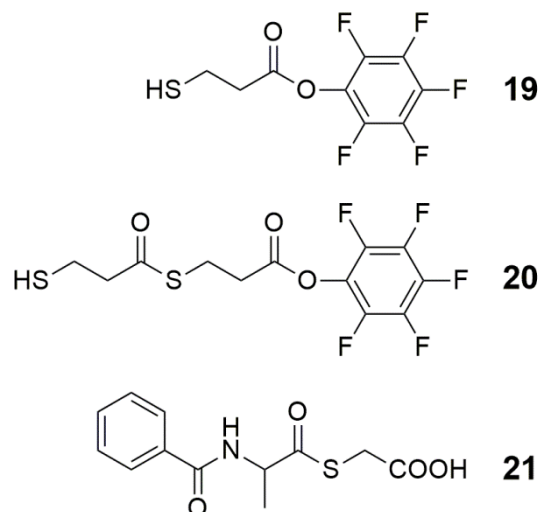
El captopril (**13**), un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), es una droga comercial utilizada en diversas patologías coronarias. Este compuesto fue ensayado como inhibidor de MBLs, siendo más efectivo contra enzimas de las subclases B1 y B3 que contra enzimas de subclase B2. Las estructuras cristalográficas de BlaB (B1), L1 (B3) y FEZ-1 (B3) en complejo con este inhibidor mostraron que el mismo se une al sitio activo con el tiol coordinando ambos iones Zn(II), desplazando a la molécula de hidróxido nucleofílica. Sin embargo, en la estructura de CphA (B2) en complejo con captopril se evidenció que es el grupo carboxilato en este caso quien coordina al Zn(II), así como también a las cadenas laterales de His196 y Asn233, mientras que el grupo sulfhidrilo forma interacciones con la cadena lateral de la Asn233 [43].



Vella y colaboradores reportaron el descubrimiento de 10 promisorios candidatos para el desarrollo de inhibidores de IMP-1 utilizando una biblioteca de Maybridge™ de 500 compuestos. A partir del compuesto (**14**), el cual presenta una  $K_i \sim 1$  mM, Faridoon y colaboradores sintetizaron varios análogos de este compuesto con el objetivo de mejorar su actividad. Aunque los análisis de estructura-actividad fueron instructivos no se consiguió incrementar su potencia. Sin embargo, algunos precursores tiosemicarbazidas que se obtuvieron durante la síntesis de los análogos fueron fortuitamente identificados como potentes inhibidores de IMP-1 con  $K_i \sim 10$   $\mu$ M. Los análisis de modelado molecular sugieren

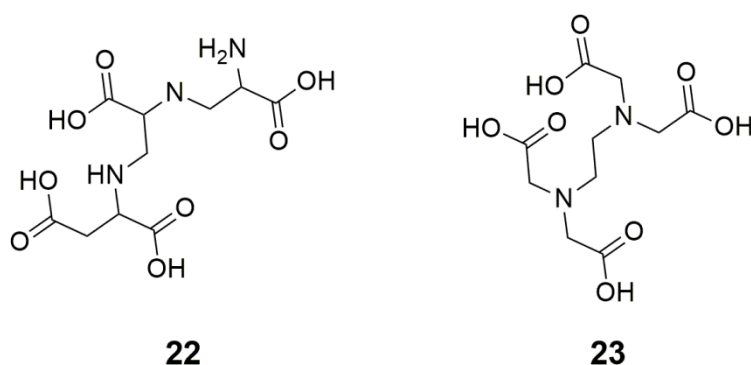


mercaptoacético que se une irreversiblemente a la enzima, formando un enlace disulfuro con la cadena lateral de la Cys221 del sitio activo [49].



### 1.3.5.7. Compuestos quelantes

Como se señaló anteriormente, diversos compuestos quelantes se han reportado como inhibidores de MBLs, debido a la capacidad de remover los metales esenciales del sitio activo. Recientemente, se reportó que el compuesto denominado Aspergillosmarasmina A (**22**), identificado en un extracto obtenido a partir de microorganismos ambientales [50] y con similitud estructural al EDTA (**23**), es capaz de inhibir a NDM-1 y VIM-2 y posee la capacidad de restaurar la actividad de meropenem en un modelo de infección en ratón. También se ha reportado que el EDTA-Ca(II) (**23**) presenta características de inhibición similares [51]. Sin embargo, estos compuestos no son efectivos para inhibir MBLs con alta afinidad por metal [52]. Por otro lado, en el laboratorio se demostró que las MBLs pueden evolucionar hacia variantes más eficientes a través del incremento en la afinidad por los iones metálicos por lo cual es de esperar que esta estrategia se vea limitada en un futuro.



### 1.3.6. Evolución de las MBLs

#### 1.3.6.1. Evolución natural

La amenaza a la salud pública que representan las MBLs se ve notablemente incrementada por su potencial para evolucionar en enzimas incluso más eficientes por medio de mutaciones. Esto se basa en el hecho de que estas enzimas son consideradas relativamente “jóvenes” y en el comienzo de su evolución natural. El desarrollo de este proceso de evolución se ha manifestado por el aislamiento de variantes enzimáticas mejoradas a partir de aislados clínicos, y a su vez variantes mejoradas han podido ser generadas bajo condiciones controladas en el laboratorio. Tales mutaciones pueden inducirse por la presión selectiva de los antibióticos, lo cual le permitiría a las bacterias patogénicas sobrevivir a mayores niveles de estas drogas, poniendo de esta manera en seria amenaza a la quimioterapia antimicrobiana. En este contexto, resultan de gran preocupación las MBLs de subclase B1 de las familias IMP y VIM, de las cuales se han identificado hasta la fecha 39 y 34 variantes alélicas, respectivamente [53]. Otro caso preocupante es el de la MBL NDM-1, la cual fue identificada en el año 2009 y a la fecha ya se han reportado 11 variantes, constituyendo uno de los más serios casos de diseminación global de resistencia mediada por MBLs [54]. Un caso bien documentado de una mutación natural que ha incrementado la actividad de la MBL IMP-6 contra cefalosporinas cargadas, penicilinas y el carbapenem imipenem es G262S, la cual da origen a la IMP-1 [55]. Los genes que codifican para las enzimas IMP, VIM y NDM se encuentran en elementos genéticos móviles, lo cual favorece la diseminación horizontal entre diferentes especies y géneros bacterianos.

#### 1.3.6.2. Emulando la evolución natural mediante evolución dirigida

La evolución natural puede simularse mediante la técnica de evolución dirigida, por medio de la cual se generan, mediante PCR, bibliotecas de genes mutados en forma aleatoria utilizando una polimerasa con tendencia a error [56]. Así, estos genes son luego expresados y aquellos productos génicos que confieren una propiedad ventajosa son seleccionados. En el laboratorio, durante el trabajo de tesis del Dr. Pablo Tomatis, se llevaron a cabo experimentos de evolución dirigida sobre la MBL BclI bajo selección con la cefalosporina cefalexina, la cual era pobremente hidrolizada por la enzima silvestre. De esta

forma, se obtuvo una variante optimizada de BcII la cual presentó un aumento de 32 veces en su capacidad de conferir resistencia a cefalexina [57]. Se observó que las mutaciones G262S, la cual como ya se señaló diferencia IMP-6 de IMP-1, y N70S tenían un impacto directo en la catálisis y en la flexibilidad de la enzima [58]. Por otro lado, en el trabajo de tesis de la Dra. Rocío Meini se caracterizaron los diversos caminos evolutivos desde la enzima silvestre hasta la mutante optimizada y se determinó que la actividad catalítica en periplasma y la afinidad por el ion Zn(II) modulan la aptitud en este sistema modelo. También se identificó la presencia de epistasis, es decir, del efecto diferencial de una mutación en la aptitud de acuerdo al contexto genético en el que es introducida.

La dinámica conformacional es crucial para la función de las proteínas, permitiendo la adaptación de las mismas a la unión de ligandos, al mismo tiempo que se mantiene el plegamiento nativo. De esta forma, la dinámica conformacional representa una posible característica biofísica que restrinja los caminos evolutivos en proteínas. El rol de la dinámica proteica en la evolución ha sido repetidamente invocado pero, sin embargo, la evidencia experimental directa es escasa. Muchos esfuerzos recientes en esta dirección fueron aportados por la observación de variabilidad en estructuras de rayos X, las cuales podrían perder de vista dinámica “verdadera” [59-61] o por simulaciones de dinámica molecular [62], las cuales abarcan una escala de tiempo mucho más corta que la relevante para unión de sustrato y reactividad. En este sentido, las variantes optimizadas encontradas durante los experimentos de EMD constituyen un sistema modelo ideal para el análisis de esta hipótesis, lo cual ayudará a comprender de qué manera surgen MBLs más eficientes y, por otro lado, cuáles son las propiedades moleculares que subyacen a la evolución de proteínas en general.

#### **1.4. Objetivos de esta Tesis**

La resistencia bacteriana a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se está convirtiendo en un problema serio que amenaza con convertirse en una de las principales causas de mortalidad en la clínica. Esto señala la importancia que reviste la obtención de moléculas que puedan inhibir la actividad de estas enzimas y constituye el fin último de los estudios de elucidación de los mecanismos moleculares responsables de la función enzimática en las MBLs. Por tal motivo, a partir de las estructuras de los  $\beta$ -lactámicos y de información mecanística y

estructural de aductos enzima-producto y enzima-intermediario en diferentes MBLs, se inició una colaboración con la Dra. Graciela Mahler de la Universidad de la República, Uruguay, en la que se sintetizaron diversos compuestos que simulan las características estructurales presentes en los  $\beta$ -lactámicos junto con la adición de diversos motivos químicos que proveen capacidad de unión a los iones Zn(II). Por otra parte, conocer cómo se modulan las propiedades biofísicas durante la evolución de estas enzimas permitiría aportar importante información acerca de la evolución de proteínas.

En virtud de esto nos propusimos para este trabajo de Tesis los siguientes objetivos específicos:

- 1) Ensayar diversos compuestos con características estructurales interesantes como inhibidores de la MBL de subclase B1 y de alto impacto clínico NDM-1. Esto incluye la determinación de actividad inhibitoria *in vitro* con la enzima pura, la obtención y estudio de aductos enzima:inhibidor tanto por métodos de cristalografía de rayos X como también mediante RMN y el análisis de la actividad de los inhibidores sobre distintas cepas bacterianas que expresen MBLs.
- 2) Expandir el análisis de estos compuestos, tanto sobre enzimas de la misma subclase como de enzimas de subclase B2 y B3, con el objetivo de determinar si los compuestos identificados en el punto anterior son capaces de ejercer una actividad inhibitoria de amplio espectro sobre las MBLs.
- 3) Estudiar cómo se afecta la heterogeneidad conformacional durante la evolución de la MBL BcII, mediante el análisis comparativo de la enzima silvestre y diversas variantes evolucionadas. Para ello utilizaremos la técnica de RMN la cual nos provee información acerca de la flexibilidad de la enzima de interés a nivel atómico, en solución y en distintas escalas de tiempos.

## Capítulo 2

# Materiales y Métodos

### 2.1. Cepas bacterianas

Para el mantenimiento de plásmidos y para la transformación del vector pMBLeNDM-1 se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ( $F^-$  *supE44*  $\Delta$ *lacV169* ( $\phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ *M15*) *hsdR17* ( $r_k m_k$ ) *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi1* *relA1* *deoR*  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169  $\lambda^-$ ).

Para la expresión de proteínas recombinantes se empleó la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) ( $F^-$ , *ompT*, ( $r_B^- m_B^+$ ), *dcm*, *gal*, ( $\lambda$ DE3)). La misma posee el gen de la enzima ARN polimerasa del fago T7 (lisógeno  $\lambda$ DE3), bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG 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.

### 2.2. Medios de cultivo

Para el cultivo de *Escherichia coli* se utilizó el medio líquido LB (peptona de caseína 1 % p/v, extracto de levadura 0,5 % p/v, NaCl 0,5 % p/v) y el medio sólido LB Agar (LB, agar 1,2 % p/v). Para la selección de bacterias resistentes, dichos medios fueron suplementados con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina. Para la recuperación de células transformadas se empleó el medio SOC (peptona de carne 2 % p/v, extracto de levadura 0,5 % p/v, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucosa). Para la expresión de proteínas en medio mínimo se utilizó 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl a pH 8,2, 4 g/L Glucosa (<sup>13</sup>C6U Glucosa (Cambridge Isotope Labs, USA) para la preparación de proteínas con marca isotópica para los experimentos de RMN), 1 g/L NH<sub>4</sub>Cl (<sup>15</sup>N NH<sub>4</sub>Cl (Cambridge Isotope Labs, USA) para la preparación de proteínas con marca isotópica para los experimentos de RMN), 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>.

### 2.3. Plásmidos

Durante este trabajo de tesis se utilizaron los siguientes plásmidos:

pET28-NDM-1: este vector se construyó insertando la región correspondiente a los residuos 32-294 del gen blaNDM-1 entre los sitios *NdeI* y *XhoI*. De esta forma se eliminó la Cys26 que es lipídada en la proteína precursora y que permite el anclado de la enzima en la membrana bacteriana. Por otra parte, en el vector pET28 utilizado se reemplazó el sitio de corte de la proteasa Trombina por el de la proteasa TEV [63,64].

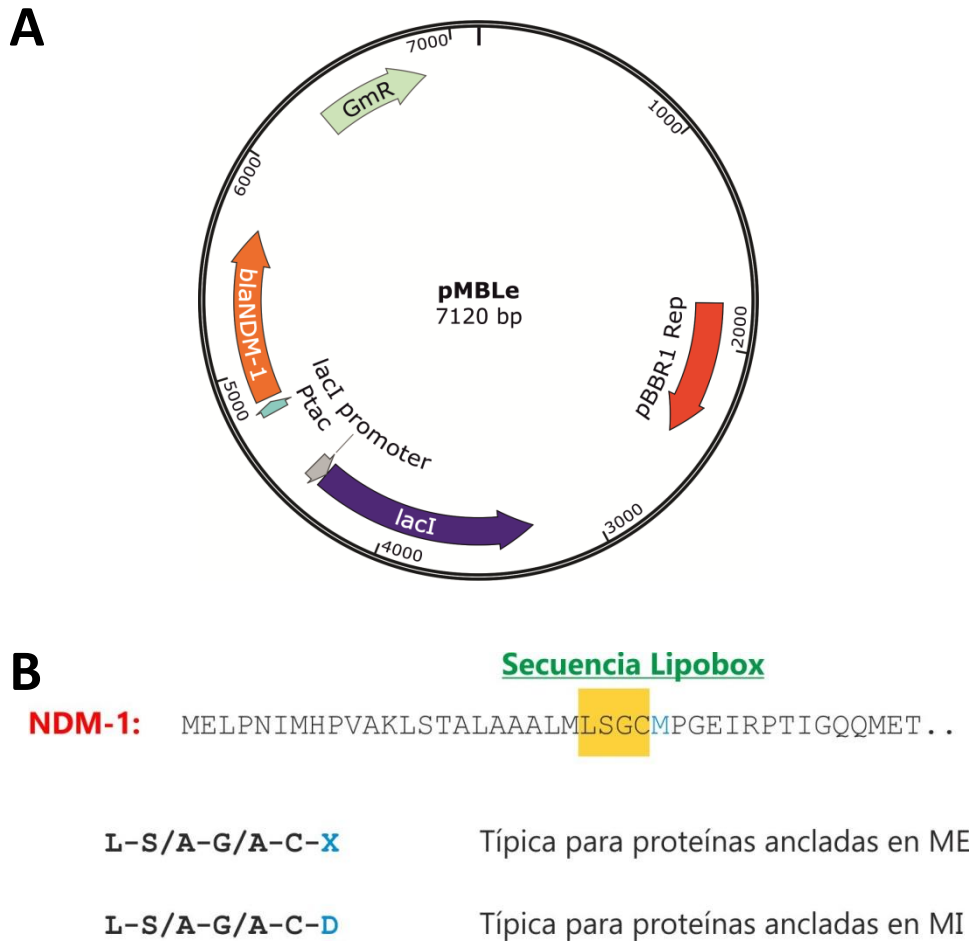
pET28-BclI y mutantes: este vector se construyó insertando la región correspondiente a los residuos 27-291 del gen de BclI (y las mutantes N70S, G262S y G262S/N70S) en el vector pET-28 entre los sitios *NdeI* y *Sall*.

pET-Term-GOB-18: este vector se encontraba disponible en el laboratorio al momento de comenzar el trabajo de Tesis. Consiste en la secuencia codificante para GOB-18 madura clonada en el vector pET-Term (Amp<sup>r</sup>) [52].

pET26-Sfh-I: este vector fue provisto por el Dr. James Spencer (Universidad de Bristol, Inglaterra) y se encontraba disponible en el laboratorio al momento de comenzar el trabajo de Tesis. Consiste en la secuencia codificante para Sfh-I madura clonada en el vector pET-26 [65].

pMBLe para la expresión periplasmática de NDM-1: este vector, construido en el laboratorio por el Dr. Lisandro González, permite la expresión periplasmática de NDM-1 inducida mediante agregado de IPTG al medio (Figura 2.1A). En el laboratorio se encontró que la Cys26 de NDM-1 es lipídada en *Escherichia coli* gracias a la presencia de una secuencia de lipidación conocida como LipoBox (Figura 2.1B). De esta forma, la variante de NDM-1 analizada en estos experimentos una vez expresada es direccionada hacia la membrana externa en *E. coli*.

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



**Figura 2.1.** (A) Representación esquemática del vector pMBLeNDM-1 usado en esta Tesis. (B) Se muestra la secuencia completa del gen de NDM-1 en donde se señala la región denominada LipoBox. Esta secuencia es reconocida y la Cys es lipidada por la maquinaria de lipidación celular. De esta forma la enzima es dirigida hacia la membrana externa una vez que atraviesa el espacio periplasmático.

## 2.4. Purificación de ADN plasmídico

Se utilizó el sistema comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega), siguiendo las indicaciones del proveedor.

## 2.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se emplearon geles con una concentración variable de agarosa (1-2 % p/v), dependiendo de la masa molecular de las moléculas de ADN a resolver. Los mismos fueron preparados en buffer TAE (40 mM Tris-acetato pH 8,0, 1 mM EDTA) y se suplementaron con

el colorante Gel Green (Biotium), que se une al ADN doble hebra, antes de su gelificación 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 ser sembradas, las muestras se mezclaron con 10 % v/v de solución de siembra (azul de bromofenol 0,25 % p/v, xilencianol 0,25 % p/v, glicerol 30 % v/v). Las electroforesis fueron realizadas empleando TAE como solución de corrida, a una intensidad constante de 50 mA. Como patrones de tamaño molecular se emplearon ADN del bacteriófago  $\lambda$  (Promega) digerido con *HindIII* y los marcadores comerciales *100 bp ladder* y *400 bp ladder* (Quilmes). Una vez finalizada la electroforesis, el ADN fue visualizado iluminando el gel con un transiluminador de luz ultravioleta.

## 2.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Se utilizó el sistema QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction (QIAGEN), basado en la adsorción del ADN a esferas de vidrio en presencia de alta concentración salina, o las columnas de centrifugación de agarosa GFX (Amersham Pharmacia). Ambos sistemas fueron utilizados siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.7. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las condiciones utilizadas fueron las recomendadas por los proveedores de las enzimas de restricción. En los casos de digestiones con dos enzimas requiriendo medios diferentes se prosiguió de la siguiente manera: luego de la primera reacción de restricción, se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa el fragmento de ADN de interés, el cual posteriormente se purificó y fue sometido a la digestión con la segunda enzima.

## 2.8. Reacciones de ligación

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando la enzima T4 ADN ligasa y siguiendo las indicaciones del proveedor de la misma (Promega). La mezcla de reacción se

incubó 1 hora a 37 °C y posteriormente 16 horas a 4 °C. Se empleó una concentración molar de inserto cinco veces mayor a la del vector.

## 2.9. Transformación de células de *Escherichia coli*

Para las transformaciones de las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y BL21 (DE3) se utilizó la técnica de inducción de la competencia con Ca(II) en frío. Las células fueron recuperadas en 1 mL de medio SOC e incubadas a 37 °C, con agitación y durante 1 hora, para favorecer la expresión fenotípica. Las muestras fueron esparcidas con esferas de vidrio en placas de LB Agar conteniendo los antibióticos adecuados. Las mismas fueron incubadas a 37 °C durante 16 horas, para obtener las colonias transformantes. En todos los casos, como control negativo, se realizó la transformación en ausencia de ADN.

## 2.10. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

La proteína NDM-1, como así también la enzima BclI y las mutantes N70S, G262S y G262S/N70S, estudiadas en este trabajo de tesis se expresaron en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3), conteniendo una cola de 6 residuos de histidina (6xHis) para permitir su purificación con resina de afinidad Ni-sefarosa (Sigma).

Los plásmidos pET28-NDM-1, pET28-BclI, pET28-BclIN70S, pET28-BclIG262S, pET28-BclIG262S/N70S, que contienen las secuencias codificantes para NDM-1 silvestre, BclI silvestre, BclI Asn70Ser, BclI Gly262Ser y BclI Asn70Ser/Gly262Ser, respectivamente, fueron inicialmente empleados para transformar células de *E. coli* BL21. Una colonia aislada de la cepa de expresión (Kn<sup>r</sup>) correspondiente fue crecida en 10 mL de medio LB líquido contenidos en un frasco de 100 mL y suplementados con kanamicina, hasta alcanzar saturación (16 horas a 37 °C, con agitación a 250 rpm). Al día siguiente el cultivo fue inoculado en un erlenmeyer de 6 L conteniendo 1 L de medio líquido LB o medio mínimo, ambos suplementados con kanamicina. El cultivo fue incubado a 37 °C, con agitación, hasta alcanzar aproximadamente 0,6 unidades de densidad óptica a 600 nm. Transcurrido este período, se procedió a la inducción de la sobreexpresión con el agregado de IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Al mismo tiempo de la inducción se agregó 0,5 mM de ZnSO<sub>4</sub> para asegurar el correcto plegamiento de la metalo- $\beta$ -lactamasa. Posteriormente, el cultivo se llevó a 18 °C con agitación durante 20 horas. En adelante todos los pasos de purificación

fueron realizados a 4 °C. El cultivo obtenido fue centrifugado 15 minutos a 6 000 g en una centrífuga Sorvall (Thermo Scientific), obteniéndose una pasta de células inducidas. La misma fue resuspendida en solución buffer (50 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, pH 8,0) y suplementada con 10 µg/mL ADNasa, 4 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 mM PMSF, en un volumen final de 30 mL. El resuspendido fue lisado por ruptura ultrasónica empleando un sonicador Sonifier 250 (Branson) a 40 % de potencia, aplicando 6-8 pulsos de 30 segundos cada uno, separados éstos entre sí por intervalos de espera de 60 segundos. Posteriormente se clarificó el lisado celular por centrifugación durante 1 hora a 15 000 g. El sobrenadante de esta centrifugación constituye el extracto crudo a partir del cual se obtuvieron las diferentes proteínas de fusión.

La proteína de fusión 6xHisNDM-1 se purificó utilizando 5 mL de la matriz de afinidad Ni-sefarosa. El extracto crudo se adicionó a una columna cromatográfica conteniendo la matriz antedicha previamente equilibrada con 5 volúmenes de solución buffer (50 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10 mM β-mercaptoetanol, pH 8,0). Luego se procedió al lavado de la columna con 5 volúmenes de la misma solución buffer, para remover las proteínas unidas no específicamente. Finalmente, se eluyó la proteína de fusión con una solución buffer (50 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 500 mM imidazol, 10 mM β-mercaptoetanol, pH 8,0) mediante un gradiente lineal de 0-100 % con un volumen total de 100 mL, recolectándose la fracción correspondiente al pico de absorción a 280 nm. A esta muestra conteniendo la proteína de fusión se le estimó la concentración midiendo la absorbancia a 280 nm empleando  $\epsilon_{280} = 28000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Posteriormente, y en caso de ser necesario, empleando filtros centrífugos se concentró la solución hasta alcanzar una concentración de 5 mg de proteína por mL. Luego, la fusión fue mezclada con la proteasa TEV (relación 1:50 TEV:fusión) y la mezcla se puso a dializar por 16 horas a 4 °C contra una solución de 100 volúmenes de solución buffer (50 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoetanol, pH 8,0). Finalmente, se volvió a adicionar la mezcla a la columna antedicha equilibrada en la misma solución y se recolectó la enzima purificada en el eluato. Esta preparación fue llevada a una concentración 100 µM y sometida a una diálisis con 100 volúmenes de solución buffer (10 mM HEPES, 200 mM NaCl, 200 µM ZnSO<sub>4</sub>, pH 7,5) y luego a 3 diálisis con 100 volúmenes de solución buffer (10 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,5). Las muestras de proteína así obtenidas se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

Las proteínas de fusión 6xHisBclII y mutantes de ésta última se purificaron utilizando 5 ml de la matriz de afinidad con Ni-sefarosa. En cada caso el extracto crudo se adicionó a una columna cromatográfica conteniendo la matriz antedicha previamente equilibrada con 5 volúmenes de solución buffer (50 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0). Luego se procedió al lavado de la columna con 5 volúmenes de la misma solución buffer para remover las proteínas unidas no específicamente. Finalmente, se eluyó la proteína de fusión con una solución buffer (50 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8,0) mediante un gradiente lineal de 0-100 % de Buffer B con un volumen total de 100 mL, recolectándose la fracción correspondiente al pico de absorción a 280 nm. A estas muestras conteniendo las proteínas de fusión se les estimó la concentración midiendo la absorbancia a 280 nm empleando  $\epsilon_{280} = 33000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [66]. Posteriormente, y en caso de ser necesario, empleando filtros centrífugos se concentró la solución hasta alcanzar una concentración de 5 mg de proteína por mL. Luego a las muestras se les adicionó la proteasa Trombina (relación 1:50 Trombina:fusión), 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  y la mezcla se incubó 3 horas a 26 °C. La mezcla de reacción se volvió a adicionar a la columna con la resina Ni-sefarosa y se recogió la enzima cortada en el eluato. Esta preparación se concentró a un volumen de 5-10 mL y se diluyó 1:5 en solución buffer (100 mM HEPES, 1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , pH 7,0). La proteína se adicionó a una columna con resina CM-sefarosa (Sigma) equilibrada con solución buffer (100 mM HEPES, 1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , pH 7,0), se lavó con 5 volúmenes de la misma solución buffer y se eluyó con 100 mM HEPES, 1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 400 mM NaCl. Finalmente, la enzima fue dializada en solución buffer (10 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,5). Las muestras de proteína así obtenidas se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

Las enzimas Sfh-I, L1 y GOB-18 fueron purificadas como se reportó previamente [52,65,67].

## 2.11. Electroforesis SDS-PAGE

Se realizaron análisis de muestras de proteína mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). Las muestras a analizar fueron suplementadas con 25 % v/v glicerol, 10 % p/v SDS, 0,5 % v/v  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,5 % p/v azul de bromofenol, y se sembraron en el gel luego de incubarlas a 100 °C durante 10 minutos. La concentración de acrilamida fue de 4,5 % p/v

para el gel de concentración y de 12 % p/v para el de separación. Las corridas electroforéticas fueron realizadas a una diferencia de potencial de 200 V, en buffer Laemmli (3,025 g/L Tris-Cl, 14,4 g/L glicina, 1 g/L SDS). Luego de la electroforesis, los geles fueron fijados durante 10 minutos con una solución de etanol:acético:agua (25:10:65) y teñidos durante 30 minutos con una solución 1 % p/v de azul de Coomassie R250 en etanol:acético:agua (50:10:40). La decoloración del gel se llevó a cabo mediante lavados sucesivos con etanol:acético:agua (25:10:65) o hirviendo el mismo en agua por unos minutos.

### 2.12. Concentración de proteínas

Las muestras de proteína fueron concentradas mediante filtros centrífugos (Amicon Ultra, Millipore) provistos de membranas con corte de 10 kDa, lo que resulta apropiado para retener a las MBLs utilizadas, cuya masa molecular promedio es de entre 25-30 kDa.

### 2.13. Estimación de la concentración de proteínas

La concentración de las MBLs estudiadas en esta Tesis fue determinada mediante espectroscopia de absorción electrónica, empleando los siguientes coeficientes de extinción molar a 280 nm:  $\epsilon_{280} = 28500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (NDM-1) [68],  $\epsilon_{280} = 30500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (BcII silvestre y sus mutantes) [58,69],  $\epsilon_{280} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Sfh-I) [65],  $\epsilon_{280} = 39500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (L1) [70] y  $\epsilon_{280} = 32200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (GOB-18) [52]. Los espectros correspondientes fueron registrados en un espectrofotómetro Jasco V-550.

### 2.14. Estimación del contenido metálico en muestras de proteína

La estimación de la concentración de Zn(II) en las MBLs se realizó mediante un método colorimétrico que hace uso del incremento en la absorción a 500 nm del compuesto 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) al formar el complejo  $(\text{PAR})_2\text{Zn}(\text{II})_2$ . Las mediciones se hicieron en condiciones desnaturizantes (50 mM HEPES, 4 M HCl de Guanidinio, pH 7,5), para determinar las concentraciones de zinc(II) total de las muestras de proteína. Antes de cada medición, se realizó una curva de calibración con soluciones patrón de Zn(II) entre 0 y 10

$\mu\text{M}$ . Las muestras de enzima se diluyeron en el medio de medición, se agregó PAR a una concentración final de  $100 \mu\text{M}$ , y se incubaron por 10 minutos en la mesada. Finalmente se registró un espectro de absorción entre 300 y 600 nm de las muestras para determinar el cambio de absorbancia a 500 nm. La concentración del ión metálico en la muestra proteica se determinó por interpolación en la curva patrón, lo cual es posible dada la linealidad existente entre la absorbancia a 500 nm y la concentración de Zn(II) en el rango de concentraciones de 0 a  $10 \mu\text{M}$ .

## 2.15. Cinética de reacciones en estado estacionario

Todas las caracterizaciones cinéticas se llevaron a cabo por el método de velocidades iniciales, el cual implica determinar la velocidad de reacción para cada valor de sustrato e inhibidor (a una dada concentración fija de enzima), en condiciones tales que aún no se haya consumido más del 5 % del sustrato ni tenga lugar la inhibición de la reacción por acumulación de producto. 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. Esta verificación permite asumir el modelo de catálisis enzimática de Michaelis-Menten, según el cual

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

donde [E] representa la concentración de enzima total y [S], la concentración de sustrato.

Las propiedades inhibitorias de los compuestos ensayados sobre las distintas MBLs se monitoreó siguiendo la variación de la absorbancia resultante de la hidrólisis del sustrato, usando para esto un espectrofotómetro Jasco V-550 termostatzado a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  con un circulador digital VWR. Para el cálculo de velocidades de reacción se empleó el antibiótico  $\beta$ -lactámico imipenem como sustrato indicador, cuyo coeficiente de absorción diferencial a 300 nm es  $\Delta\epsilon_{300} = -9\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los datos obtenidos se cargaron en un mismo gráfico y se realizó un ajuste global utilizando los modelos de inhibición competitivo, no competitivo y mixto implementados en el programa GraphPad 5.0. En todos los casos, el mecanismo de

inhibición competitivo fue el que presentó el mejor ajuste de los datos y a partir del mismo se obtuvieron las correspondientes constantes de inhibición ( $K_i$ ).

## 2.16. Determinación de las concentraciones de sustrato

Para determinar la concentración de soluciones de sustrato se empleó el método de consumo total, con cantidades catalíticas de BcII. La concentración de imipenem se estimó finalmente a partir del valor de absorptividad diferencial medido a 300 nm.

## 2.17. Preparación de las células de *E. coli* para ensayos de inhibición *in bacteria*

Las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  fueron transformadas con el vector pMBLe o pMBLeNDM-1 e inoculadas en 3 mL de medio LB en presencia de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina y se dejaron incubando ON a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se inocularon 500  $\mu\text{L}$  del cultivo saturado en 10 mL de LB y se procedió a incubar estas células bajo agitación a 37  $^{\circ}\text{C}$  por una hora hasta alcanzar una  $\text{OD}_{600} = 0,6$ . En ese momento, se agregaron 100  $\mu\text{M}$  IPTG para la inducción de NDM-1 y las células fueron incubadas 2 hora más a 37  $^{\circ}\text{C}$  bajo agitación. Los cultivos celulares fueron centrifugados a 1,000 g por 3 min a 4  $^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante fue descartado y el pellet celular fue lavado 3 veces mediante resuspensión en 1 mL de buffer (50 mM fosfato de potasio, pH 7,0). Finalmente las células fueron resuspendidas en este mismo buffer y llevadas a una  $\text{OD}_{600} = 0,1$  para los estudios de RMN. Para ello se tomaron 450  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  junto con 500  $\mu\text{M}$  final de imipenem y distintas concentraciones finales de cada inhibidor para estimar los valores de  $\text{IC}_{50}$ . Para el análisis de la presencia de proteína en el medio extracelular, las células fueron centrifugadas a 1,000 g por 3 min a 4  $^{\circ}\text{C}$  y luego el sobrenadante fue filtrado con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ .

## 2.18. Ensayos de viabilidad celular durante los experimentos de RMN

Se obtuvieron diluciones seriales  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  a partir de los stocks de células en suspensión preparadas para seguir inhibición *in bacteria*. Luego se inocularon

placas de LB agar conteniendo 25 µg/mL gentamicina con 10 µL de cada dilución. Una vez que las gotas se secaron las placas fueron incubadas a 37 °C durante la noche.

## 2.19. Ensayos de muerte celular en bacterias productoras de MBLs

En el laboratorio del Dr. Robert Bonomo en Cleveland, Estados Unidos, se llevaron a cabo experimentos de muerte celular en cepas clínicas que expresan MBLs para estimar la capacidad de las bistiazolidinas de restaurar la actividad antibacteriana de imipenem. Básicamente los ensayos consisten en obtener cultivos bacterianos en fase exponencial de crecimiento a una concentración de  $10^6$  UFC/mL. En ese momento se procede al agregado de una concentración subletal de imipenem (típicamente una dilución por debajo de la CIM) solo o junto con el agregado de una concentración fija de inhibidor, se lleva el cultivo a 37 °C bajo agitación y se realizan extracciones periódicas seguidas de diluciones seriales del cultivo para inocularlas (20 µL de cada dilución) en una placa de LB agar, con el objetivo de recuperar las células viables a cada intervalo (típicamente a 100, 300 y 500 min). Como control, se determinó que los inhibidores no poseen efecto antibacteriano por sí solos.

## 2.20. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se registraron en un equipo Bruker Avance II 600 (frecuencia de protón de 600,13 MHz) con una sonda TXI. Las muestras de proteína fueron preparadas en buffer 100 mM MES pH 6,4, con una concentración total de cloruro de sodio de hasta 200 mM y 10% de D<sub>2</sub>O. Las muestras de *E. coli* DH5α transformadas con el vector pMBLeNDM-1 fueron preparadas en buffer 50 mM fosfato de sodio pH 7,0 y 10% de D<sub>2</sub>O.

### 2.20.1. Espectros de <sup>1</sup>H para el seguimiento de inhibición *in bacteria*

Este tipo de experimento permite determinar las señales correspondientes a los protones en una muestra. Por su sencillez y rápida adquisición resulta ideal para el monitoreo de las señales de un compuesto que cambian lentamente con el tiempo. En

nuestro caso particular utilizamos este tipo de experimento para seguir el cambio de la señal del metilo presente en la molécula de imipenem durante su hidrólisis al ser agregada una suspensión de células bacterianas que expresan NDM-1. Todos los espectros fueron adquiridos mediante la secuencia *zgesgp* con 64 repeticiones a una temperatura constante de 25 °C. La supresión de agua fue llevada a cabo con el esquema de *excitation sculpting*, siendo el pulso selectivo de 180 ° de 2 ms. La FID fue recolectada con 32k puntos. Para la presentación de los espectros se aplicó una función exponencial de ensanchado de línea de 1 Hz previa a la transformada de Fourier, siendo escalados utilizando la misma escala relativa. Los espectros fueron procesados y analizados con TopSpin 3.0.

### 2.20.2. Medidas de IC<sub>50</sub> y análisis

Primero se confirmó que imipenem fuera suficientemente estable en buffer o en presencia de células de *E. coli* que carecen de lactamasas. Estos controles permitieron continuar con los estudios posteriores de inhibición de la actividad carbapenemasa mediada por células que expresan NDM-1. Se llevaron a cabo controles para confirmar que no hubiera pérdida de proteína desde el periplasma al medio extracelular.

Luego se realizaron las medidas de IC<sub>50</sub> de acuerdo al procedimiento reportado por Dalvit y colaboradores [71]. Evaluamos la potencia de los inhibidores calculando el porcentaje de inhibición observado 15 minutos luego de iniciada la reacción de hidrólisis (es decir, en el momento en que a concentración 0 de inhibidor se produce el consumo total de imipenem), utilizando la Ecuación 2.1:

$$\% \text{inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{[S_{TOT}] - [S_w]}{[S_{TOT}] - [S_{w/o}]} \right) \right] \quad \text{[Ecuación 2.1]}$$

donde  $[S_w]$  y  $[S_{w/o}]$  vienen dadas por las integrales de las señales del sustrato (entre 1.21 a 1.18 ppm del espectro de <sup>1</sup>H de imipenem) en presencia y ausencia del inhibidor, respectivamente.  $[S_{TOT}]$  es la suma de  $[S_{w/o}]$  y  $[P_{w/o}]$  o  $[S_w]$  y  $[P_w]$ , donde  $[P_w]$  y  $[P_{w/o}]$  son las integrales de las señales del producto hidrolizado (entre 1.17 a 1.12 ppm) en presencia y ausencia del inhibidor, respectivamente. Los valores de IC<sub>50</sub> se pueden obtener por ajuste de los datos de % inhibición vs. concentración del inhibidor a la Ecuación 2.2:

$$\% \text{inhibición} = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{1}{1 + \left( \frac{[I]}{IC_{50}} \right)^n} \right) \right] \quad [\text{Ecuación 2.2}]$$

donde [I] es la concentración de inhibidor y n el factor de cooperatividad.

### 2.20.3. Espectros HSQC de correlación $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$

El experimento HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) resulta en un espectro bidimensional con un eje para el desplazamiento químico de  $^1\text{H}$  y otro para el desplazamiento químico de un heteronúcleo, comúnmente  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ . El espectro presenta una *crosspeak* o señal de correlación para cada par de núcleos  $^1\text{H}$ -X que se encuentren unidos por un enlace. Básicamente, este experimento comienza con la excitación de las resonancias de  $^1\text{H}$ , luego la magnetización es transferida mediante un INEPT modulado por  $^1\text{J}$  al heteronúcleo, donde evoluciona generando la dimensión indirecta. Un segundo INEPT devuelve la magnetización a las coherencias detectables de  $^1\text{H}$  y la dimensión directa es adquirida [72,73].

En particular, el experimento HSQC donde el heteronúcleo es  $^{15}\text{N}$  y se ajusta los pasos de INEPT a un  $^1\text{J}$  de 90 Hz (igual a la constante de acoplamiento promedio entre H y N peptídicos) resulta en un experimento  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC que presenta una señal entre el núcleo de  $^1\text{H}$  y el de  $^{15}\text{N}$  de cada enlace peptídico en una proteína. Si las moléculas de proteína de la muestra están bien plegadas y la proteína no es excesivamente grande, estos *crosspeaks* resultan relativamente angostos y dispersos, de manera que se observa prácticamente uno por cada residuo de la proteína (exceptuando los residuos de prolina que carecen de H peptídico, y aquellos residuos de regiones flexibles). También suelen observarse los H amida de la cadena lateral de asparagina y glutamina, como así también los H unidos a N de los grupos indólicos de triptófano y otros.

La posibilidad de extraer información a nivel de residuos y la velocidad con que se pueden adquirir y procesar estos espectros, sumado al relativamente bajo costo de producir proteínas enriquecidas en  $^{15}\text{N}$ , hace de estos experimentos ideales para seguir titulaciones con ligandos pequeños e inclusive con otras proteínas, para estudiar el efecto del pH, temperatura o fuerza iónica sobre una proteína o sobre complejos de proteínas, para

controlar el estado de las muestras antes de otros estudios más complejos, costosos y largos, etc.

Para registrar estos espectros se empleó la secuencia *hsqcetf3gpsi* con un pulso de  $^1\text{H}$  de entre 11 y 13  $\mu\text{s}$ , una ventana espectral de 36 ppm centrada a 119 ppm en  $^{15}\text{N}$  y de 14 ppm centrada sobre la señal de agua en  $^1\text{H}$ , un tiempo de espera entre repeticiones de 1 segundo, 128 – 256 puntos de resolución en la dimensión indirecta, y 2k puntos en la dimensión directa. El número de acumulaciones varió entre 4 y 16 según la concentración de la muestra, típicamente entre 200 y 1000  $\mu\text{M}$ .

Para registrar y procesar estos espectros se utilizó el programa TopSpin de Bruker (versiones 2.1 y 3.0). El análisis de los espectros fue realizado mayormente con el programa Sparky [74].

#### **2.20.4. Experimentos y análisis de datos para la asignación de las resonancias de $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ y $^{13}\text{C}$ en BclI N70S, BclI G262S y BclI G262S/N70S**

Para obtener información a partir de los espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC es necesario contar con la asignación del mismo, es decir, se debe conocer a qué residuo le pertenece cada señal. Con el fin de asignar las señales de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  del esqueleto peptídico de BclI N70S, BclI G262S y BclI G262S/N70S se adquirieron los espectros tridimensionales HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, HNCACB y CBCA(CO)NH [75]. La temperatura de adquisición fue de 298 K. Se utilizaron parámetros de adquisición y procesado estandarizados; los más importantes se resumen en la tabla 2.1.

Para adquirir y procesar estos espectros se utilizó el programa TopSpin versión 2.1 de Bruker y para analizarlos se utilizó el programa CARI [76].

Experimento	Secuencia	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>13</sup> C	NS
HNCO	<i>hncogp3d</i>	14 ppm – 2k	119 / 36 ppm – 50	173 / 24 ppm – 50	8
HN(CA)CO	<i>hncacogp3d</i>	14 ppm – 2k	119 / 36 ppm – 50	173 / 24 ppm – 60	64
HN(CO)CA	<i>hncocogp3d</i>	14 ppm – 2k	119 / 36 ppm – 50	54 / 36 ppm – 70	16
HNCA	<i>hncagp3d</i>	14 ppm – 2k	119 / 36 ppm – 50	54 / 36 ppm – 80	16
CBCA(CO)NH	<i>cbcaconhgp3d</i>	14 ppm – 2k	119 / 36 ppm – 50	45 / 70 ppm – 100	16
HNCACB	<i>hncacbgp3d</i>	14 ppm – 2k	119 / 36 ppm – 50	45 / 70 ppm – 120	24

**Tabla 2.1.** Detalles técnicos de los experimentos de doble y triple resonancia realizados para conseguir la asignación de las resonancias de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N. En todos los casos la dimensión directa (tercera columna) corresponde a <sup>1</sup>H, con la frecuencia central del pulso sobre la señal del H<sub>2</sub>O a 4.69 ppm. En las cuarta y quinta columnas se indican en este orden: la posición central del espectro y la ventana espectral (ambas en ppm) y el número de puntos adquiridos en cada caso. Todos los experimentos se realizaron a 298 K sobre muestras de proteína preparadas en solución *buffer* de 100 mM MES, pH 6,4, 200 mM NaCl. Todas las secuencias de pulsos utilizadas se encuentran disponibles en la biblioteca estándar de Bruker. NS: número de scans (acumulaciones).

## 2.20.5. Experimentos para medir parámetros de relajación de núcleos de <sup>15</sup>N peptídicos

### 2.20.5.1. Dinámica en la escala de picosegundos a nanosegundos

*Marco Teórico*

Los movimientos más rápidos posibles para un vector colineal al enlace N–H de un dado residuo *i* ocurren en la escala de tiempo de picosegundos a nanosegundos, y representan un movimiento local específico para ese vector acoplado al movimiento global de la proteína [77]. Este movimiento es estocástico por naturaleza, por lo cual se describe mediante una función de autocorrelación, que mide la pérdida de correlación del movimiento a lo largo del tiempo. A tiempo cero esta correlación es máxima y luego disminuye hasta eventualmente anularse. Si se asume que los movimientos globales y locales son independientes, se puede definir una función de correlación total igual al producto de las funciones de correlación global y local:

$$C_i(t) = C_{global}(t) \cdot C_{local,i}(t)$$

$C_{global}(t)$  está modulada por el tiempo de correlación de la molécula ( $\tau_c$ ), que ronda la decena de nanosegundos. Este factor está íntimamente relacionado con el coeficiente de

difusión de la molécula, por lo que posee un significado físico directo. Respecto a  $C_{\text{local},i}(t)$ , la imposibilidad de determinar exactamente cómo ocurren los movimientos de cada vector N–H llevó a Lipari y Szabo a desarrollar un formalismo “libre de modelo” (*Model Free*) [78,79]. En este formalismo de análisis de datos los movimientos locales se describen mediante un parámetro de orden,  $S_i^2$ , que mide la amplitud del movimiento en cuestión (sin importar cómo ocurra este), y un tiempo de correlación efectivo  $\tau_i$ , que representa la constante de tiempo asociada a tal movimiento. El valor de  $S_i^2$  puede variar entre 0 (movimiento interno no restringido) y 1 (movimiento interno totalmente restringido).

La transformada de Fourier de la función de correlación total (cuyo dominio es el tiempo) conduce a la función de densidad espectral (en el dominio de la frecuencia), la cual describe la distribución de velocidades de pérdida de correlación en el proceso estocástico de movimiento del vector N–H. La función de densidad espectral,  $J$ , evaluada a las frecuencias  $\omega = 0$  Hz,  $\omega = \omega_H$  y  $\omega = \omega_N$  se relaciona con los parámetros  $R_1$ ,  $R_2$  y  $\text{NOE}^{1\text{H}-15\text{N}}$  mediante el siguiente sistema de ecuaciones:

$$R_{1,i} = 3(d^2 + c^2) \cdot J_i(\omega_N) + d^2 \cdot [3J_i(\omega_N) + J_i(\omega_H - \omega_N) + 6J_i(\omega_H + \omega_N)]$$

$$R_{2,i} = \frac{1}{2}(d^2 + c^2) \cdot [4J_i(0) + 3J_i(\omega_N)] + \frac{1}{2}d^2 \cdot [J_i(\omega_H - \omega_N) + 6J_i(\omega_H) + 6J_i(\omega_H + \omega_N)] + R_{\text{ex},i}$$

$$\text{NOE}_i = 1 - \frac{\left(\frac{\omega_H}{\omega_N}\right) \cdot d^2 \cdot [6J_i(\omega_H + \omega_N) - J_i(\omega_H - \omega_N)]}{R_{1,i}}$$

donde  $d = \frac{(-h\mu_0\gamma_g\gamma_N)}{(16\pi^2 r_{N-H}^3)}$  y  $c = \frac{-\omega_N \cdot \text{CSA}}{3}$  representan las contribuciones del acoplamiento

dipolar N–H y de la anisotropía del desplazamiento químico de  $^{15}\text{N}$  (CSA), respectivamente. Para cada núcleo para el que se hayan determinado experimentalmente los valores de  $R_{1,i}$ ,  $R_{2,i}$  y  $\text{NOE}_i$  se puede resolver el sistema de 3 ecuaciones para determinar las 3 incógnitas  $J_i(0)$ ,  $J_i(\omega_N)$  y  $J_i(\omega_H)$ , reconstruyéndose así el perfil de la función de densidad espectral en 3 puntos. En este punto pueden confeccionarse gráficos de  $J_i(0)$ ,  $J_i(\omega_N)$  y  $J_i(\omega_H)$  en función del número de residuo  $i$ . Una región con alto valor de  $J$  en alguno de estos gráficos indicará que la proteína es flexible en esa región, con los movimientos ocurriendo a la correspondiente frecuencia. En un análisis más profundo de los valores de  $J_i(0)$ ,  $J_i(\omega_N)$  y  $J_i(\omega_H)$ , se los ajusta a

modelos de movilidad derivados del formalismo *Model Free*, de manera de obtener los correspondientes parámetros de orden y constantes de tiempo.

En el modelo más simple, que asume movilidad interna rápida ( $\tau_i \ll \tau_c$ ) en una molécula con difusión rotacional isotrópica,  $C_i(t)$  decae como una exponencial simple y su transformada de Fourier,  $J_i(\omega)$ , viene dada por la ecuación 2.16:

$$J_i(\omega) = \frac{2S_i^2\tau_c}{5 + 5\omega^2\tau_c^2}$$

que indica que  $J_i$  depende principalmente del tiempo de correlación total  $\tau_c$  y del parámetro de orden  $S_i^2$ , mientras que  $\tau_i$  resulta despreciable (supuesto del modelo). Promediando valores de  $\tau_c$  determinados a partir de esa ecuación o directamente de las razones de  $R_2/R_1$  de residuos cuyo perfil de  $J$  ajusta estadísticamente bien, se puede obtener el valor de  $\tau_c$  con una precisión razonable. Modelos más complejos incorporan efectos de movilidad interna según  $\tau_i$  no despreciables, efectos de intercambio (medidos por una constante de intercambio  $R_{ex,i}$ ) y presencia de un movimiento adicional (resultando en dos parámetros de orden y dos tiempos de correlación interna tales que  $S^2 = S_{lento}^2 \cdot S_{rápido}^2$  y  $\tau_{rápido} < \tau_{lento} < \tau_c$ ) [77]. Para evitar el problema de obtener sistemas de ecuaciones indeterminados, para estos modelos se utiliza el valor de  $\tau_c$  obtenido mediante el ajuste de los perfiles de  $J$  más sencillos. Cada uno de estos modelos, a su vez, puede enmarcarse en un sistema con difusión rotacional isotrópica o anisotrópica. En este último caso, la función de correlación global no es una exponencial simple sino una función multiexponencial que depende de la orientación del tensor de difusión. Las componentes de esta función multiexponencial pueden calcularse a partir de valores de  $R_2/R_1$  selectos (de igual forma que los elegidos para calcular el tiempo de correlación global) y de la disposición espacial de los vectores N–H correspondientes (lo cual se obtiene a partir de la estructura tridimensional de la proteína). Generalmente, en la mayoría de las proteínas es necesario trabajar con modelos de difusión anisotrópica, por lo cual se necesita conocer la estructura de la proteína.

Los programas disponibles para el análisis de estos datos permiten determinar las componentes del tensor de difusión, evaluar la relevancia estadística de elegir modelos de difusión anisotrópica respecto a los modelos isotrópicos, y calcular el valor de  $\tau_c$ . Luego estos programas realizan ajustes sucesivos a modelos de complejidad creciente, evaluando

si el incremento en complejidad es estadísticamente significativo. El resultado de salida consiste en un modelo de movilidad para cada residuo junto con los correspondientes valores determinados para cada parámetro, según el caso. En la tabla 2.1 se presentan los cinco modelos isotrópicos evaluados con el formalismo *Model Free* por el programa Tensor 2.0, utilizado en esta Tesis. Los correspondientes modelos anisotrópicos se obtienen reemplazando  $\tau_c$  por  $\Sigma A_j \tau_j$  en el primer término de cada modelo, donde j itera por las tres componentes del tensor de difusión.

Modelo 1: movilidad interna muy rápida	$J = \frac{2}{5} \frac{S^2 \tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$
Modelo 2: movilidad interna no despreciable	$J = \frac{2}{5} \left[ \frac{S^2 \tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{(1 - S^2)(1/\tau_c + 1/\tau_i)^{-1}}{1 + \omega^2 (1/\tau_c + 1/\tau_i)^{-2}} \right]$
Modelo 3: igual que (1) pero con contribución de intercambio químico	$J = \frac{2}{5} \frac{S^2 \tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + R_{ex}$
Modelo 4: igual que (2) pero con contribución de intercambio químico	$J = \frac{2}{5} \left[ \frac{S^2 \tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{(1 - S^2)(1/\tau_c + 1/\tau_i)^{-1}}{1 + \omega^2 (1/\tau_c + 1/\tau_i)^{-2}} \right] + R_{ex}$
Modelo 5: modelo que incluye movilidad rápida y lenta	$J = \frac{2}{5} S_{lento}^2 \left[ \frac{S_{rápido}^2 \tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{(1 - S_{rápido}^2)(1/\tau_c + 1/\tau_i)^{-1}}{1 + \omega^2 (1/\tau_c + 1/\tau_i)^{-2}} \right]$

**Tabla 2.2.** Modelos de difusión rotacional isotrópica según las referencias [78,79].

### *Procedimiento experimental*

Las velocidades de relajación longitudinal ( $R_1$ ) y transversal ( $R_2$ ) fueron obtenidas mediante espectros basados en espectros bidimensionales  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC donde la intensidad de cada señal es modulada en función del correspondiente parámetro y un tiempo de relajación  $\tau$ . En cada uno de estos experimentos, se obtiene para cada *crosspeak* una intensidad que decae exponencialmente con  $\tau$ . Ajustando la intensidad del *crosspeak i* a lo largo del decaimiento exponencial a una ecuación de la forma  $I_i = I_i^0 \exp(-\tau / T_{1/2,i})$  se obtiene

un valor de  $T_{1/2,i}$  que corresponde a  $T_1$  o  $T_2$  para el residuo  $i$ , según cual de estos parámetros haya modulado la intensidad de la señal.

En este trabajo se utilizaron las secuencias *hsqct1etf3gpsi* y *hsqct2etf3gpsi* para medir  $T_1$  y  $T_2$ , respectivamente, implementadas a una frecuencia de  $^1\text{H}$  de 600,13 MHz y una sonda TXI con un pulso de  $^1\text{H}$  de entre 11 y 13  $\mu\text{s}$ , una ventana espectral de 36 ppm centrada a 119 ppm en  $^{15}\text{N}$  y de 14 ppm centrada sobre la señal de agua en  $^1\text{H}$ , un tiempo de espera entre repeticiones de 3 segundos, 128 – 256 puntos de resolución en la dimensión indirecta y 2k puntos en la dimensión directa. Para las medidas de  $T_1$  se utilizaron tiempos de relajación  $\tau$  de 5, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 y 2000 ms. Los valores de 100, 400 y 1200 ms se registraron por duplicado para el cálculo del error en la medición. Para las medidas de  $T_2$  se utilizaron tiempos de 16, 32, 48, 65, 81, 113, 145, 178, 210 y 242 ms. Los valores de 32, 65 y 113 ms se registraron por duplicado para el cálculo del error en la medición.

El conjunto mínimo de medidas de relajación se completa con el experimento de NOE heteronuclear entre  $^1\text{H}$  y  $^{15}\text{N}$  peptídico. Este experimento se registró en el mismo equipo de 600,13 MHz con igual ventana espectral y resolución que los descriptos anteriormente para efectuar las medidas de relajación, pero con 64 repeticiones para contrarrestar la baja relación señal:ruido inherente a este experimento donde el pulso de excitación inicial es sobre el núcleo de  $^{15}\text{N}$ , de baja sensibilidad. La saturación / no saturación se efectuó en forma alternada (secuencia *hsqcnoef3gpsi* de Bruker) para minimizar efectos debidos al tiempo de residencia de la muestra en el magneto.

Todos estos espectros fueron adquiridos con el programa TopSpin versión 2.1 de Bruker. Luego fueron procesados en este mismo programa cuidando de escalar las intensidades de manera de hacerlas comparables entre espectros con distintos tiempos de relajación o saturación (con el argumento  $\text{NC\_proc} = 0$  al efectuar la transformada de Fourier). El análisis de los espectros (localización exacta de cada *crosspeak*, medida de su intensidad, y ajuste de la misma en función del tiempo de relajación) fue realizado con el programa Sparky. Los valores de NOE heteronuclear fueron calculados como  $I_{\text{saturado},i}/I_{\text{no saturado},i}$  donde  $I_{x,i}$  es la intensidad del *crosspeak*  $i$  en estado saturado o no saturado.

### 2.20.5.2. Dinámica en la escala de microsegundos a milisegundos

Una de las estrategias de RMN más utilizadas en la actualidad para explorar la dinámica de proteínas y los procesos de intercambio conformacional en la escala de tiempo de microsegundos a segundos (más precisamente en el rango de  $50 \text{ s}^{-1}$  a  $50000 \text{ s}^{-1}$ ) incluye la aplicación de técnicas de dispersión de la relajación tipo CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), conocidas en inglés como Constant-time  $T_2$  Relaxation Dispersion [80]. En tales experimentos, la contribución del proceso de intercambio a la constante de relajación  $R_2$  es modulada por la variación del campo magnético efectivo, lo cual se consigue por alteración de la frecuencia de repetición de los pulsos de  $180^\circ$  en una secuencia spin-echo CPMG. De las curvas de decaimiento de  $R_2$  en función de la frecuencia del tren de pulsos ( $\nu_{\text{CPMG}}$ ) pueden determinarse varios parámetros relativos al equilibrio conformacional en cuestión, específicos, a su vez, para cada residuo.

En ausencia de intercambio conformacional en la escala  $\mu\text{s} - \text{ms}$ , la velocidad de relajación transversal efectiva de  $^{15}\text{N}$  resultante ( $R_2^{\text{eff}}$ ) es independiente de la velocidad de repetición del tren de pulsos de CPMG. En caso contrario, las intensidades de las señales en los distintos espectros  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC son moduladas por la contribución del intercambio químico a la relajación transversal. En la práctica, se registra una serie de espectros 2D en función de la fuerza de campo efectiva, variando el número de pulsos de  $180^\circ$  y el espaciado de tales pulsos de modo que el tiempo de relajación total sea el mismo entre los distintos experimentos de la serie. Las intensidades de las señales de los espectros 2D registrados a una dada frecuencia del tren de pulsos,  $\nu_{\text{CPMG}}$ , son convertidas en velocidades de relajación efectivas,  $R_2^{\text{eff}}$ , de acuerdo con la Ecuación 2.3:

$$R_2^{\text{eff}}(\nu_{\text{CPMG}}) = \frac{\ln\left(\frac{I_0}{I_{\text{CPMG}}}\right)}{T_{\text{CP}}} \quad \text{[Ecuación 2.3]}$$

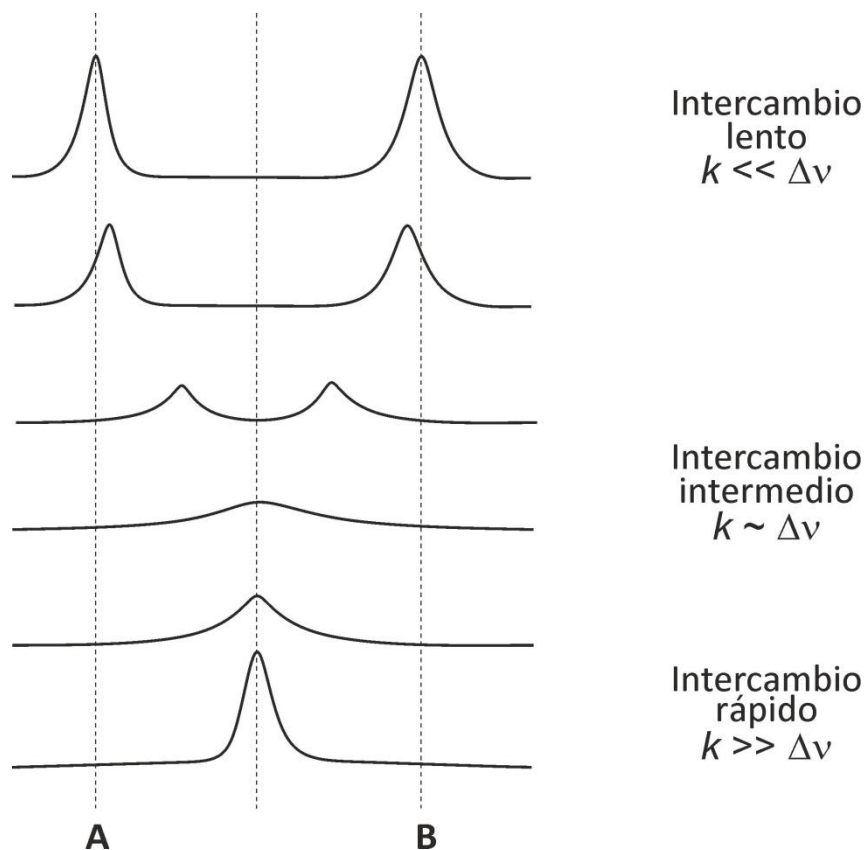
donde  $I_{\text{CPMG}}$  e  $I_0$  son las intensidades de una dada señal en un espectro obtenido con y sin aplicación del período CPMG, respectivamente y  $T_{\text{CP}}$  es la longitud del tren CPMG (constante). Un gráfico de  $R_2^{\text{eff}}$  en función de la fuerza de campo efectiva o frecuencia del tren de pulsos,  $\nu_{\text{CPMG}}$ , constituye el perfil de dispersión de la relajación para el residuo.

Como se mencionó anteriormente, el enfoque presentado utiliza un esquema de tiempo constante,  $T_{\text{CP}}$ , para todas las fuerzas de campo evaluadas. Esta estrategia permite

obtener un muestreo más completo del perfil de dispersión por unidad de tiempo de medida, aunque implica un aumento en el error aleatorio de cada punto de la curva de dispersión. Otra ventaja de usar intervalos constantes en los experimentos CPMG – Relaxation Dispersion es que la evolución de la magnetización de interés debida a efectos no relacionados con el intercambio químico no interfiere en el resultado, siempre que estos efectos sean independientes del espaciado en el tren de pulsos de CPMG [81].

### 2.20.5.3. Dinámica en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos

La dinámica proteica en escalas de tiempo más lentas (ms – s), como puede ser la resultante de movimientos de bucles u otros cambios conformacionales, puede dar lugar a intercambio químico en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos. Cuando el proceso de intercambio (asumido  $A \leftrightarrow B$ ) ocurre en un régimen de intercambio químico lento en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos, cada núcleo afectado podrá asociarse a dos resonancias en el espectro en cuestión, correspondientes al mismo en dos entornos químicos diferentes. En un régimen de intercambio químico intermedio en la escala de los desplazamientos químicos, se observará la coalescencia de ambas señales en una señal promedio demasiado ancha como para ser detectada en el espectro de RMN; es decir, que tal intercambio se evidenciará por la ausencia de las resonancias esperadas. Por último, cuando el proceso de intercambio ocurre en un régimen rápido en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos (el ejemplo más común, una interacción proteína – ligando de baja afinidad) no se ve afectada la intensidad de la señal resultante pero sí su posición en el espectro, la cual resultará ser un promedio de los valores de desplazamiento químico esperados en cada entorno químico, pesado según la población relativa de cada uno.



**Figura 2.2.** Representación esquemática de la evolución de una señal de RMN asociada a un dado núcleo susceptible a intercambio químico rápido, intermedio o lento en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos entre los estados A y B.  $k$  es la constante de velocidad de intercambio y  $\Delta\nu$  es la diferencia de frecuencias entre A y B.

## 2.21. Representación de estructuras moleculares

Para la preparación de figuras conteniendo estructuras moleculares se empleó el programa PyMOL (DeLano Scientific LLC).

## Capítulo 3

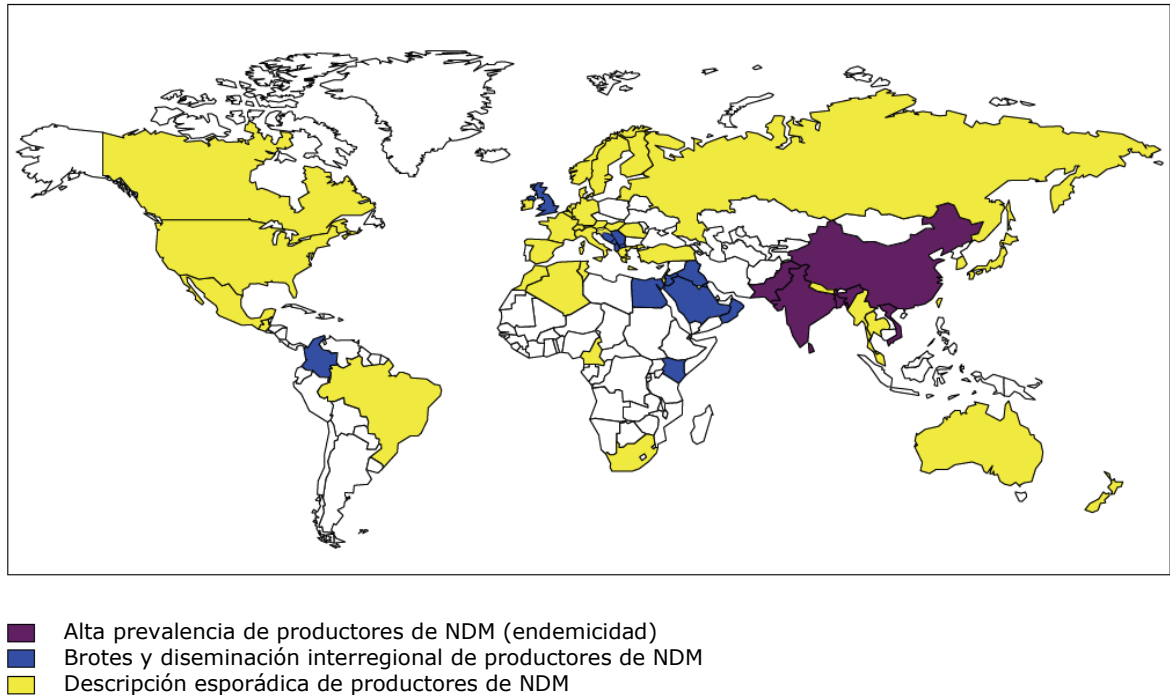
### Estudios de Inhibición de la MBL NDM-1

#### 3.1. Introducción

##### 3.1.1. NDM-1: orígenes, diseminación y características

La MBL New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamasa 1 (NDM-1) se identificó por primera vez en 2009 a partir de una cepa de *K. pneumoniae* recuperada de un paciente sueco quien había estado previamente hospitalizado en Nueva Delhi, India [82]. Desde entonces, las carbapenemasas del tipo NDM son un foco de atención mundial debido a la rápida diseminación de los genes correspondientes entre cepas de Enterobacterias y *Acinetobacter spp.* (Figura 3.1) [54]. A partir de estos primeros estudios, se identificó una relación entre Enterobacterias productoras de NDM y el subcontinente indio [83-85], y se encontró que las tasas de prevalencia de Enterobacterias productoras de NDM varían entre 5 a 19% en hospitales de India y Pakistán [86-89]. Además, el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> fue detectado no solamente en muestras de pacientes, sino también en agua para consumo y en muestras de agua de calles y riachuelos en Nueva Delhi [90]. La aparición de bacterias productoras de NDM-1 en muestras ambientales es perjudicial para la gente que vive en la ciudad, la cual a menudo se abastece del agua de red pública y depende de establecimientos sanitarios deficientes. Posteriormente se identificó a los estados Balcánicos como un reservorio secundario de productores de NDM-1, dado diversos estudios que reportaron pacientes colonizados o infectados con este tipo de cepas [84,91-94]. Investigaciones recientes sugieren que estados del Oriente Medio podrían ser en su mayor parte otro reservorio secundario de productores de NDM, lo cual podría estar ligado al intercambio poblacional entre esta región y el subcontinente indio. Sin embargo, bacterias productoras de NDM-1 han sido reportadas en la actualidad en gran parte del globo [54]. Como se observó con la diseminación de Enterobacterias productoras de NDM-1, cepas de *Acinetobacter* productoras de NDM también han sido recuperadas de muestras ambientales en China [95]. Actualmente, la mayoría de las cepas de *Acinetobacter* productoras de NDM se han reportado en China [96-99] y en Oriente Medio [100-104]. En sudamerica, específicamente en Uruguay, Brasil y

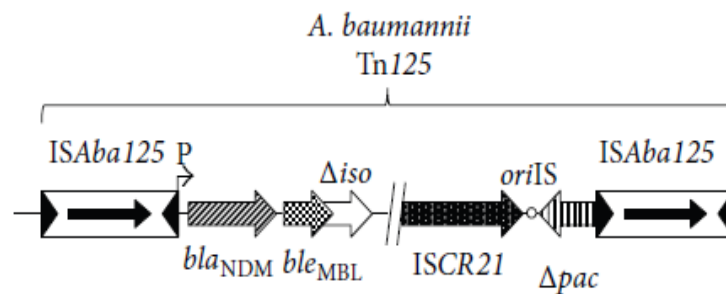
Argentina se han reportado cepas de *Providencia rettgeri* y *Acinetobacter baumannii* productoras de NDM-1 [105-107].



**Figura 3.1.** Distribución geográfica de productores de NDM. Adaptado de [54].

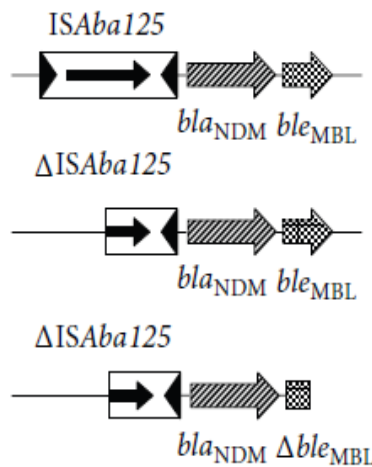
En Enterobacterias, el gen  $bla_{NDM-1}$  está localizado mayoritariamente en plásmidos conjugativos pertenecientes a varios grupos de incompatibilidad [98,108,109]. Sin embargo, una investigación de una colección mundial de aislados de Enterobacterias productoras de NDM-1 mostró que la diseminación actual del gen  $bla_{NDM-1}$  no está relacionada con la diseminación de clones específicos, plásmidos específicos o de una única estructura genética [109]. En *Acinetobacter spp.* los genes del tipo  $bla_{NDM}$  se han encontrado localizados tanto en plásmidos como en cromosomas, y en el raro aislamiento de *P. aeruginosa* productora de NDM-1, el gen  $bla_{NDM-1}$  se encontró localizado cromosomalmente [110,111]. Investigaciones sobre la estructura genética circundante de los genes  $bla_{NDM}$  revelaron la presencia de una secuencia conservada que siempre está asociada a la secuencia de inserción completa o trunca *ISAb<sub>125</sub>* en el extremo 5' y al gen *ble<sub>MBL</sub>* (codificante del factor de resistencia a la droga antitumoral bleomicina) en el extremo 3' de los genes  $bla_{NDM}$  [112] (Figura 3.2). Además, en diversos estudios enfocados en la cepa *A. baumannii* productora de NDM, el gen  $bla_{NDM}$  está localizado entre dos copias del elemento *ISAb<sub>125</sub>*, formando un transposón compuesto llamado Tn125 [100,113-115] (Figura 3.2).

La identificación sistemática de una forma truncada de este transposón compuesto en Enterobacterias, el cual fue identificado en su forma completa en *A. baumannii*, sugirió fuertemente que *Acinetobacter spp.* han sido un reservorio de los genes  $bla_{NDM}$  antes de establecerse en las especies de Enterobacterias. Estos descubrimientos remarcan que incluso aunque *A. baumannii* es usualmente reconocida como el receptor final para los genes de resistencia, podría adquirir varios determinantes de resistencia y luego transferirlos a Enterobacterias y *Pseudomonas spp.*



(a)

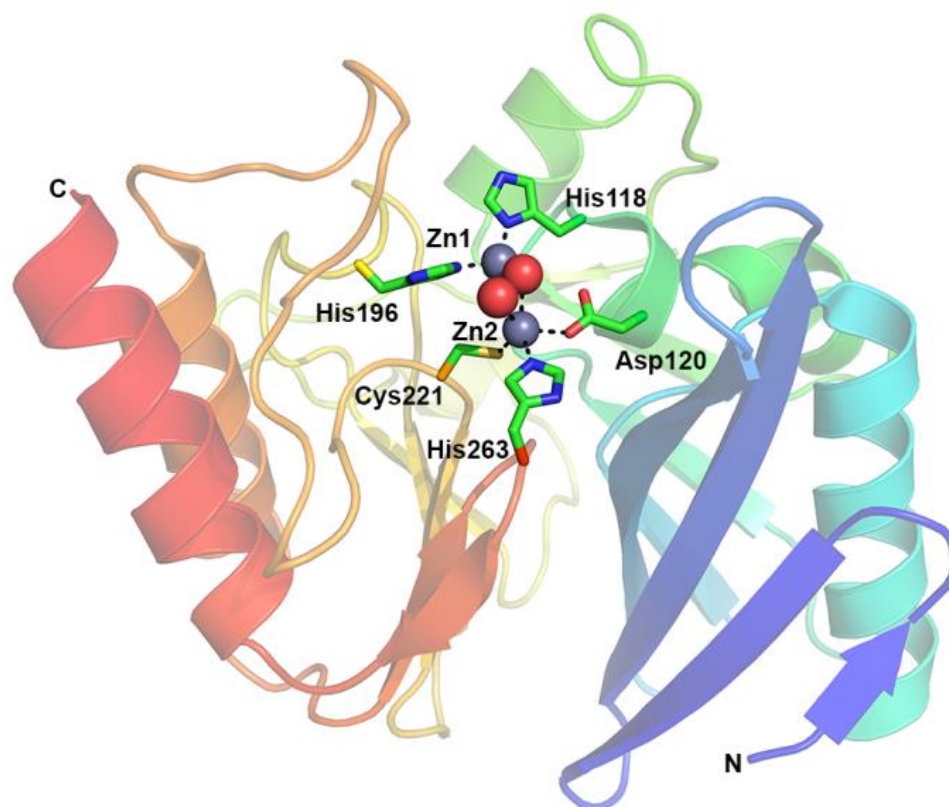
Enterobacterias y *P. aeruginosa*



(b)

**Figura 3.2.** Representación esquemática de las estructuras genéticas asociadas al gen  $bla_{NDM}$  identificadas entre aislados clínicos de Gram-negativos. (a) Estructura encontrada en *A. baumannii*, donde el gen  $bla_{NDM}$  es parte del transposón compuesto Tn125. (b) Estructuras encontradas en Enterobacterias y *P. aeruginosa* donde ISAbal25 se presenta como un elemento completo o truncado junto con el gen (también completo o truncado)  $ble_{MBL}$ . Los genes y sus correspondientes orientaciones de transcripción se representan como flechas horizontales. El *oriIS* de ISCR21 se indica por un círculo. P, promotor de  $bla_{NDM}$ ; IS, secuencia de inserción. Los nombres de los genes se abrevian de acuerdo a las proteínas correspondientes:  $ble_{MBL}$ , gen de resistencia a bleomicina;  $\Delta iso$ , fosforibosilantranilato isomerasa truncada;  $\Delta pac$ , fosfolipidoacetil transferasa truncada. Adaptado de [54].

La MBL NDM-1 pertenece a la subclase B1 y se caracteriza por poseer un sitio activo compuesto por 2 iones Zn(II) (Figura 3.3). Uno de ellos se encuentra coordinado por 3 residuos de histidinas, formando el sitio Zn1, mientras que el otro ion Zn(II) se coordina a un residuo de aspártico, otro de cisteína y un tercero de histidina, formando el sitio Zn2. La estructura cristalográfica de la enzima muestra además una molécula de agua/hidróxido a puente entre ambos iones, la cual se acepta como el nucleófilo durante la catálisis, y una segunda molécula de agua unida al metal en el sitio Zn2. Es una enzima de amplio espectro de sustrato, capaz de hidrolizar igualmente bien penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes, pero no así la monobactama aztreonam [82].



**Figura 3.3.** Estructura de NDM-1 (pdb 3SPU). La enzima presenta un sitio activo dimetálico compuesto de dos iones Zn(II). Uno con una esfera de coordinación tetrahédrica (Zn1, coordinado por His116, His118, His196 y una molécula puente de agua/hidróxido) y otro con una esfera de coordinación bipirámide trigonal (Zn2, coordinado por Asp120, Cys221, His263, una molécula de agua y a la molécula de agua/hidróxido a puente). Los iones Zn(II) y las moléculas de agua se muestran como esferas grises y rojas, respectivamente.

### 3.1.2. En búsqueda de un inhibidor de NDM-1

El desarrollo de inhibidores para las MBLs presenta como uno de los principales inconvenientes el hecho de que, al contrario del caso de las SBLs las cuales exhiben un intermediario de reacción covalentemente unido a la enzima, estas enzimas no presentan intermediarios covalentes durante el mecanismo catalítico [6]. De esta manera, la estrategia usada para el desarrollo de inhibidores irreversibles para las SBLs que se unen de manera covalente a la enzima no puede aplicarse a las MBLs. Por otro lado, las MBLs carecen de interacciones extensas entre el sustrato y las regiones proteicas circundantes en el sitio activo, dando como resultado un mecanismo de hidrólisis eficiente contra una amplia gama de  $\beta$ -lactámicos dependiente de la interacción con los iones  $Zn(II)$ , en donde el ion en el sitio  $Zn_2$  se encarga de estabilizar un intermediario de reacción nitrógeno aniónico durante la catálisis [116].

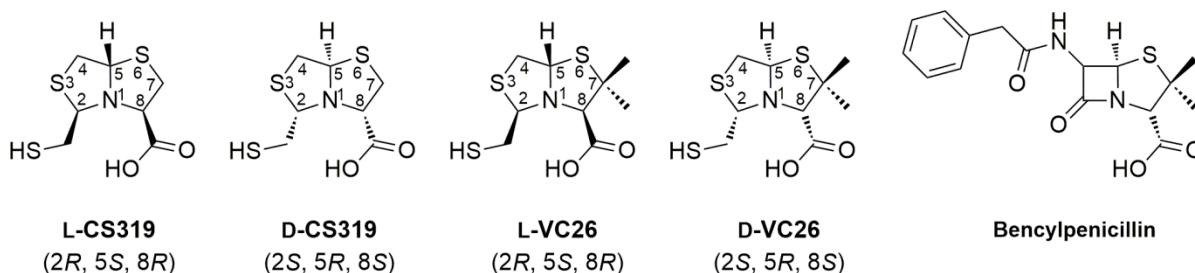
Sin embargo, como se comentó en el Capítulo 1, diversos compuestos han sido informados como inhibidores de distintas MBLs los cuales presentan grupos químicos capaces de coordinar a los iones metálicos. Como ejemplos, diversos compuestos con grupos tioles, como el D- y L-captopril [28] o el ácido tiomandélico [46], entre otros, han mostrado capacidades inhibitorias interesantes. En otros casos, compuestos con grupos carboxilatos derivados de ácido maleico [117] o tioenolatos derivados de rodaninas [41] han mostrado ser inhibidores de NDM-1. Además, también se ha reportado el caso de compuestos quelantes que actúan “secuestrando” a los iones esenciales [50,51].

En virtud de lo expuesto decidimos diseñar inhibidores de NDM-1 explorando una estructura química que simule las características estructurales presentes en los sustratos  $\beta$ -lactámicos y que permita replicar las interacciones identificadas en aductos enzima-producto o enzima-intermediario en donde se ha visto que el carboxilato invariante de los  $\beta$ -lactámicos es capaz de unirse tanto al ion en el sitio  $Zn_2$  como a la Lys224 conservada en las MBLs de subclase B1 [28,118,119]. En primer lugar, consideramos el hecho de que los sustratos bicíclicos eran bien reconocidos por las MBLs. Al contrario, los compuestos monocíclicos como el aztreonam no son reconocidos por estas enzimas debido a una interacción no productiva en donde la unión del grupo sulfonato al sitio metálico orienta al carbonilo amídico muy lejos del nucleófilo para la catálisis [120]. Por otro lado, el átomo de

nitrógeno fusionado tetraédrico en los  $\beta$ -lactámicos bicíclicos es importante en la unión de sustrato, dado que los análogos  $\gamma$ -lactámicos de las penicilinas, los cuales tienen un nitrógeno fusionado planar, son sustratos pobres de las  $\beta$ -lactamasas [121].

En base a esta información, imaginamos una estructura para el inhibidor: (1) que emule un compuesto  $\beta$ -lactámico bicíclico pero carente de la funcionalidad  $\beta$ -lactámica, (2) que retenga el nitrógeno de fusión y un carboxilato capaz de interactuar con el Zn<sup>2+</sup> y (3) que posea grupos de unión a metal adicionales para reforzar la interacción con el centro metálico.

La familia de las bistiazolidinas mostradas en la Figura 3.4 reúne estos requerimientos. Estos compuestos poseen un grupo funcional acetálico capaz de comportarse como un enlace reversible y por lo tanto capaz de estabilizar un posible intermediario aniónico. También contienen un grupo tiol, el cual es un fuerte ligando de iones Zn(II), y un grupo carboxilato apropiadamente posicionado. Estos compuestos fueron sintetizados por el grupo de la Dra. Graciela Mahler de la Universidad de la República, Uruguay.



**Figura 3.4.** Estructuras químicas de las bistiazolidinas a ensayar como inhibidores de NDM-1.

## 3.2. Resultados

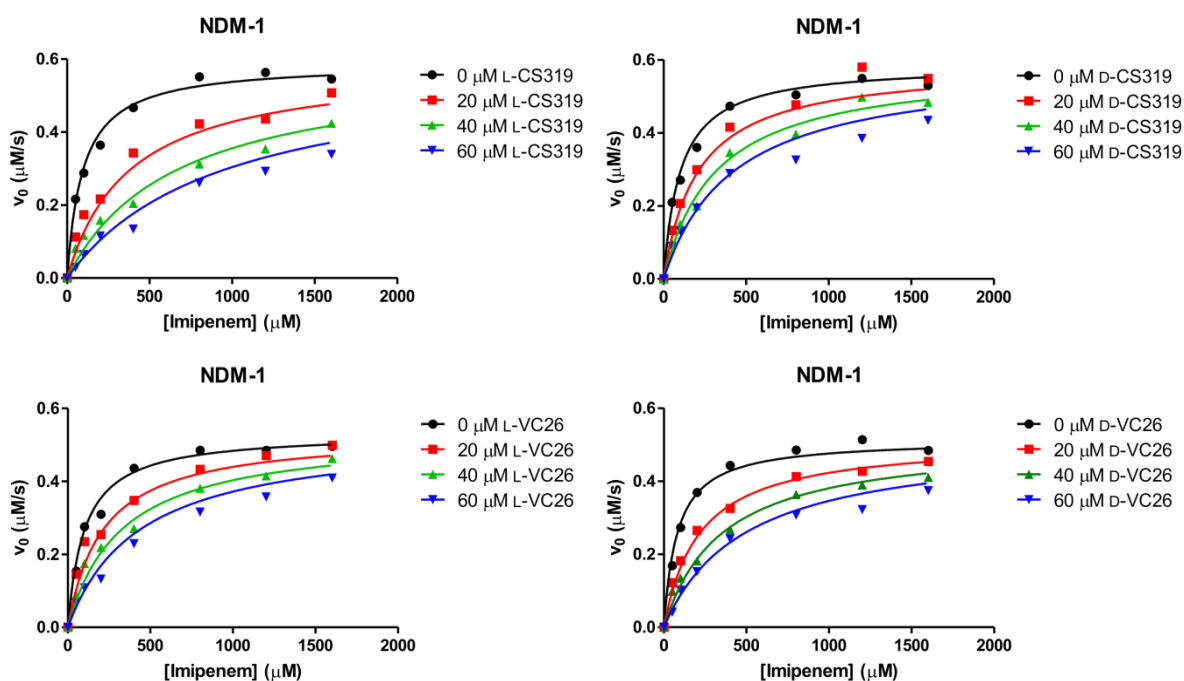
### 3.2.1. Caracterización cinética de la interacción de las bistiazolidinas con NDM-1

Con el objetivo de identificar inhibidores de NDM-1 se procedió a estudiar el efecto de estos compuestos en la actividad imipenemasa de la enzima. Todos los estudios cinéticos fueron llevados a cabo según el método de las velocidades iniciales utilizando el carbapenem de uso clínico imipenem como sustrato indicador. Las bistiazolidinas fueron disueltas en DMSO hasta concentraciones entre 50-100 mM y luego se diluyeron en el buffer de reacción a concentraciones finales alrededor de 20 mM. La concentración de DMSO durante la reacción en la cubeta para cada compuesto nunca superó el 0,5% y el agregado de esta cantidad a la mezcla enzima-sustrato no afectó la actividad de la misma.

El protocolo seguido consistió entonces en el agregado del sustrato y el compuesto a analizar al buffer de reacción termoestabilizado a 30 °C y el posterior agregado de una cantidad fija de enzima para dar comienzo a la reacción. Se siguió la disminución de la absorbancia a 300 nm en función del tiempo durante al menos 300 segundos y se determinó la velocidad inicial de reacción para cada conjunto de concentraciones de sustrato e inhibidor. De esta forma se construyeron las gráficas correspondientes a cada compuesto y los datos obtenidos fueron ajustados utilizando las ecuaciones para los modelos de inhibición competitivo, no competitivo o mixto implementados en el programa GraphPad 5.0. Este análisis determinó que el modelo de inhibición competitivo era el que proporcionaba el mejor ajuste global de los datos en todos los casos con constantes de inhibición ( $K_i$ ) entre 7 y 19  $\mu\text{M}$ . En la Figura 3.5 se muestran las gráficas obtenidas para cada compuesto junto con los correspondientes ajustes y en la Tabla 3.1 se detallan las  $K_i$  calculadas.

**Tabla 3.1.** Inhibición de NDM-1 por las bistiazolidinas.

	L-CS319	D-CS319	L-VC26	D-VC26
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$7 \pm 1$	$19 \pm 3$	$18 \pm 3$	$12 \pm 1$



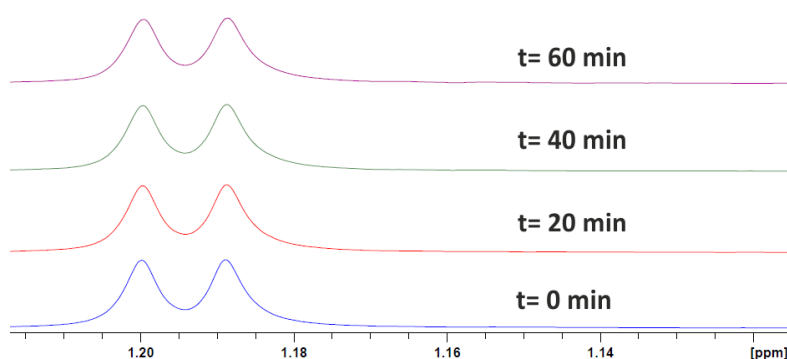
**Figura 3.5.** Inhibición *in vitro* de la actividad imipenemasa de NDM-1 por las bistiazolidinas. La velocidad inicial de la hidrólisis de imipenem (0-1700  $\mu\text{M}$ ) por 1 nM NDM-1 se evaluó en ausencia y en presencia de distintas concentraciones (0-60  $\mu\text{M}$ ) de cada bistiazolidina. Las líneas muestran el ajuste al modelo de inhibición competitiva de acuerdo a los parámetros ( $K_i$ ) mostrados en la Tabla 3.1.

### 3.2.2. Monitoreo de la inhibición de la actividad imipenemasa de células de *E. coli* que expresan NDM-1 por RMN

En el laboratorio se construyó un vector, denominado pMBLeNDM-1, para la expresión periplasmática de NDM-1 bajo el control del promotor pTac (Figura 2.1A), el cual se introdujo en células de *E. coli*. Este vector se construyó insertando la secuencia del gen blaNDM-1 completa en dicho vector. Utilizando esta cepa se generó un cultivo como se detalla en la sección 2.17, el cual se utilizó para monitorear la hidrólisis de imipenem por  $^1\text{H}$  RMN. La señal correspondiente al grupo metilo del imipenem aparece como un doblete en la región entre 1.21-1.18 ppm, la cual se desplaza a valores entre 1.17-1.13 ppm luego de la hidrólisis del antibiótico. Por lo tanto, es posible seguir el proceso de hidrólisis y estimar cuál es la relación sustrato vs. producto en un dado momento en base a la integración de dichas señales en el espectro de  $^1\text{H}$ . De esta forma, se procedió a estudiar si la adición de los

inhibidores a una suspensión de estas células era capaz de inhibir dicho proceso, lo que al mismo tiempo indicaría que los mismos son capaces de alcanzar el espacio periplasmático bacteriano e inhibir a la enzima *in situ*.

Antes de comenzar con estos experimentos se constató que el imipenem fuera estable en las condiciones de medición. Para ello se obtuvieron espectros de  $^1\text{H}$  de una solución 500  $\mu\text{M}$  de imipenem a distintos tiempos y se confirmó que las señales permanecían inalteradas hasta al menos 6 horas después del primer espectro. Por otro lado se realizó la misma prueba utilizando una suspensión de células bacterianas a las cuales se les había introducido el vector pMBLe vacío, es decir, sin la presencia del gen  $bla_{\text{NDM-1}}$  y se confirmó que aún a una  $\text{OD}_{600} = 10$ , las mismas no eran capaces de hidrolizar al antibiótico (Figura 3.6).

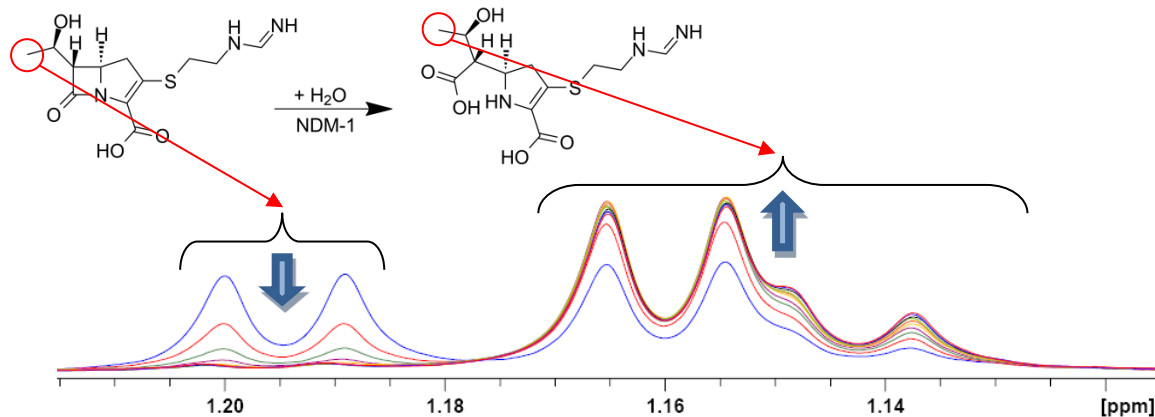


**Figura 3.6.** Una solución 500  $\mu\text{M}$  de imipenem es estable a la presencia de células de *E. coli* transformadas con el vector vacío pMBLe a una  $\text{OD}_{600} = 10$  durante al menos 60 minutos de comenzar el experimento.

Una vez hechos estos controles se procedió a tomar 500  $\mu\text{L}$  de una suspensión de células que contenían el vector pMBLeNDM-1 a una  $\text{OD}_{600} = 0,1$  junto con 10% de  $\text{D}_2\text{O}$  final y se les agregó 500  $\mu\text{M}$  final de imipenem. Como se observa en la Figura 3.7, los espectros de  $^1\text{H}$  tomados en tándem van mostrando el consumo del antibiótico y la aparición de las señales correspondientes al producto hidrolizado, proceso que en estas condiciones se completa alrededor de los 12-15 minutos a partir del comienzo del experimento.

En este momento se procedió a ensayar el efecto de cada bistiazolidina en la velocidad de hidrólisis de imipenem mediante el agregado de una cantidad fija de inhibidor a la suspensión de células. Nuevamente los compuestos se prepararon de forma análoga a la detallada en el apartado anterior y se corroboró que el DMSO puro no afectara la velocidad de hidrólisis mediada por las células bacterianas. Como se dijo anteriormente, dado que la integración de las señales de protón en RMN son proporcionales a la concentración del

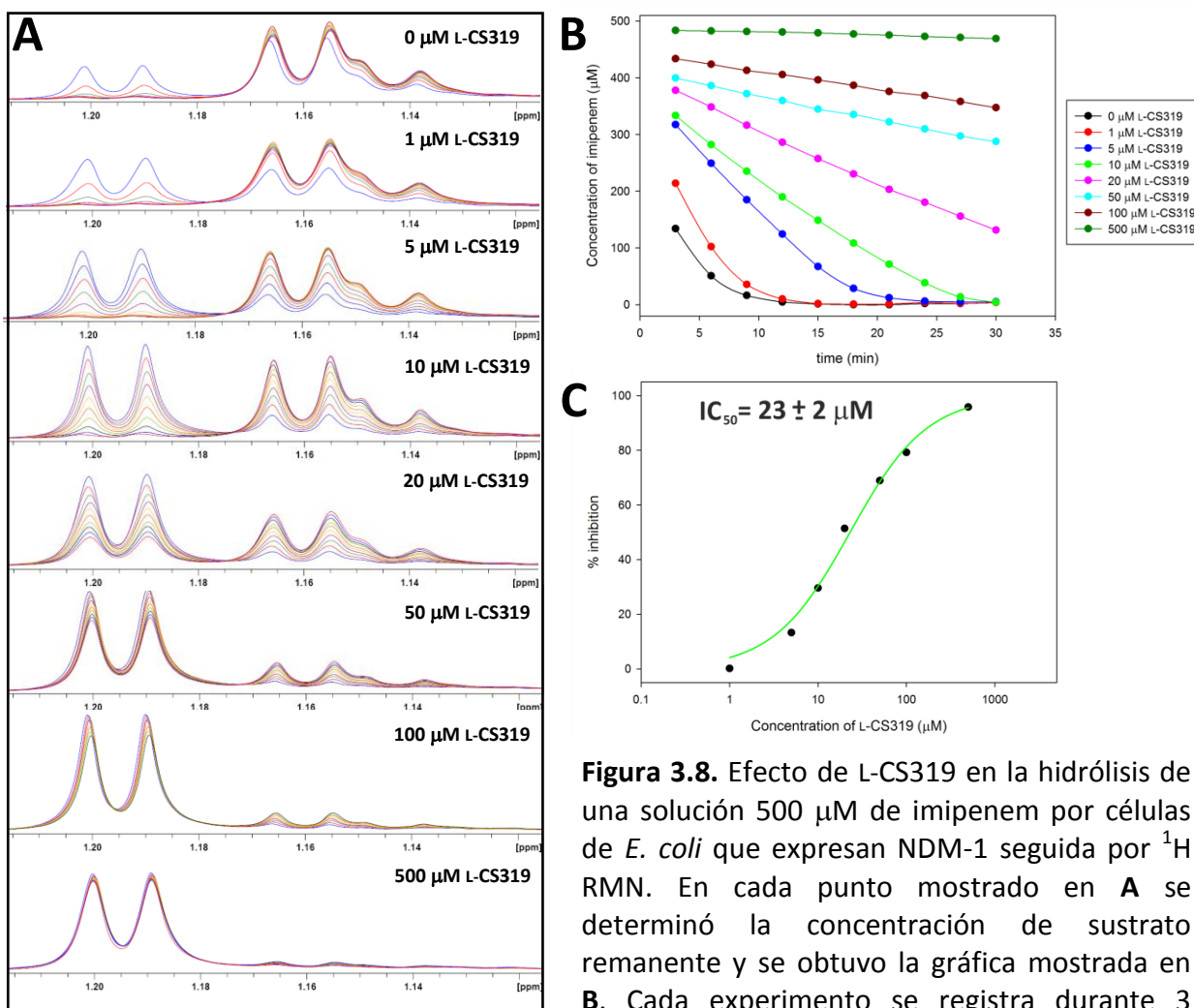
compuesto analizado, es posible determinar la relación entre sustrato y producto en cada espectro, es decir, a un tiempo dado luego del inicio de la reacción. La Figura 3.8 (A y B) muestra el efecto sobre la velocidad de hidrólisis de la bistiazolidina L-CS319 en función de la concentración de compuesto a lo largo del tiempo experimental. Luego seguimos el protocolo reportado por Dalvit y colaboradores [71] mediante el cual calculamos un valor de  $IC_{50}$  como se detalla en la sección 2.20.2. Utilizando esta metodología se construyó la Figura 3.8C, en la cual se grafica el % de inhibición calculado mediante la Ecuación 2.1 a los 15 minutos de iniciado el experimento en función de la concentración de L-CS319. Luego, utilizando la Ecuación 2.2 es posible ajustar los datos de esta gráfica para obtener el valor correspondiente de  $IC_{50}$ . En la Tabla 3.2 se muestran los valores obtenidos de  $IC_{50}$  para cada bistiazolidina.



**Figura 3.7.** Hidrólisis de una solución 500  $\mu\text{M}$  de imipenem por células de *E. coli* que expresan NDM-1 seguida por  $^1\text{H}$  RMN. La señal del metilo del sustrato (entre 1.21-1.18 ppm) desaparece durante los sucesivos experimentos, mientras que las señales correspondientes al producto hidrolizado se incrementan (entre 1.17-1.13 ppm). Cada experimento de  $^1\text{H}$  acumula señal durante 3 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Se realizaron 10 experimentos en tándem.

Como controles adicionales a estos experimentos se constató que la hidrólisis monitoreada fuera debido a la presencia de la enzima en el espacio periplasmático bacteriano. Para ello, se tomó una muestra 500  $\mu\text{M}$  de imipenem hidrolizado por las células y se lo centrifugó a 3000 g por 4 minutos. Luego, al sobrenadante obtenido se lo filtró con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y se le agregó 500  $\mu\text{M}$  final de imipenem fresco. Finalmente, se

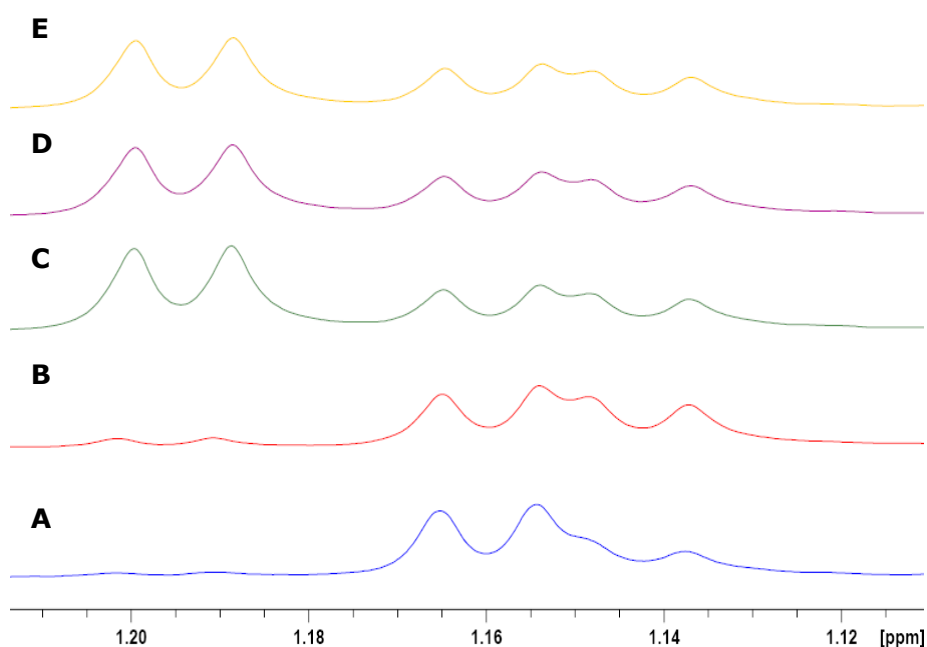
obtuvieron espectros de  $^1\text{H}$  durante las siguientes 4 horas, durante las cuales no se observaron cambios en la intensidad de las señales correspondientes al sustrato (Figura 3.9).



**Figura 3.8.** Efecto de L-CS319 en la hidrólisis de una solución 500  $\mu\text{M}$  de imipenem por células de *E. coli* que expresan NDM-1 seguida por  $^1\text{H}$  RMN. En cada punto mostrado en **A** se determinó la concentración de sustrato remanente y se obtuvo la gráfica mostrada en **B**. Cada experimento se registra durante 3 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$ . El tiempo total monitoreado a cada concentración de inhibidor fue de 30 minutos. En **C** se muestra el % de inhibición a cada concentración de L-CS319. La línea muestra el ajuste mediante la Ecuación 2.2.

**Tabla 3.2.** Inhibición de NDM-1 en células por las bistiazolidinas.

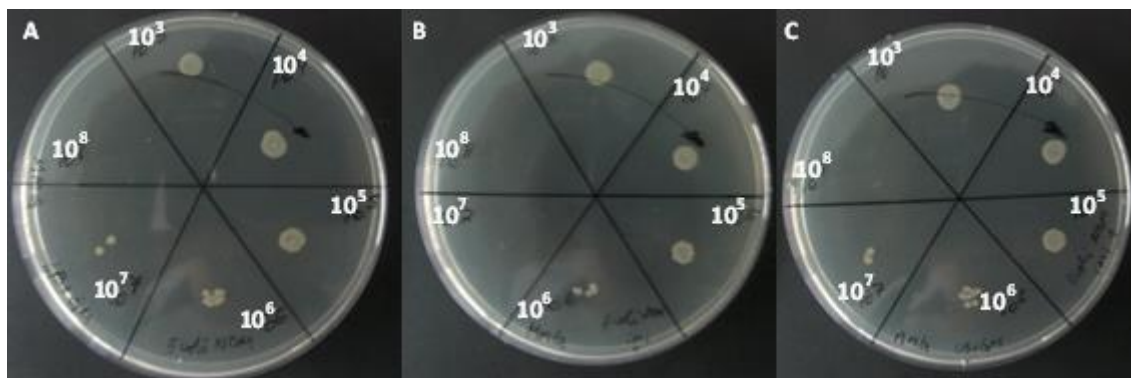
	L-CS319	D-CS319	L-VC26	D-VC26
IC <sub>50</sub> (μM)	23 ± 2	109 ± 9	200 ± 10	180 ± 10



**Figura 3.9.** La hidrólisis de imipenem catalizada por NDM-1 ocurre dentro de las células de *E. coli*. A. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de células de *E. coli* expresantes de NDM-1 (OD<sub>600</sub>= 0,1) con la adición de 500 μM de imipenem luego de 30 minutos de incubación en el equipo. B. Espectro de <sup>1</sup>H RMN del sobrenadante de la muestra A luego de 1 hora de incubación en el equipo. C, D y E. Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la muestra B luego de la adición de 500 μM final de imipenem fresco a tiempo 0, 120 y 240 minutos, respectivamente.

Por otro lado, también se determinó la viabilidad celular de las células durante el experimento. Para ello se obtuvieron 3 soluciones stocks a una OD<sub>600</sub>= 10 de las células y a 2 de ellas se les adicionó 500 μM de imipenem. La diferencia entre estas dos muestras

consistió en que a una de ellas se la incubó durante una hora con el antibiótico, previo a la inoculación de la placa. Finalmente se realizaron diluciones seriadas de las mismas y se inocularon 3 placas de LB-agar-gentamicina con 10  $\mu$ L de cada dilución (Figura 3.10). Estos controles demostraron que las células eran viables durante los 30 minutos en que se monitoreó la hidrólisis de imipenem por RMN.

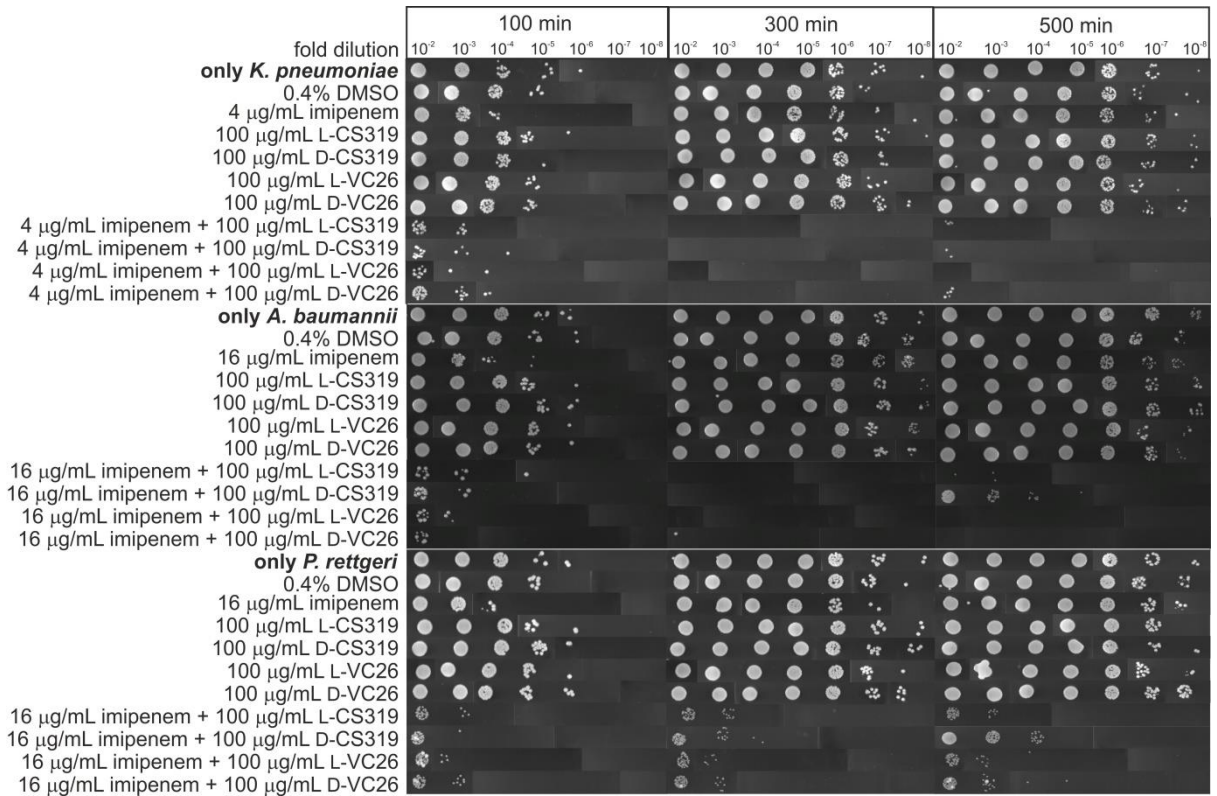


**Figura 3.10.** Chequeo de viabilidad celular antes y después de los experimento de RMN. Todas las células en estos experimentos provienen del mismo lote. La dilución de la muestra previa al plaqueo se indica en cada sección de la placa. Las células de *E. coli* NDM-1 que no fueron sujetas al tratamiento con imipenem se plaquearon en la placa A. Las células que fueron tratadas con 500  $\mu$ M de imipenem sin incubación fueron plaqueadas en B, mientras las que se incubaron 1 hora con imipenem se plaquearon en C. La sección marcada con la dilución  $10^6$  se usó para evaluar la viabilidad celular. Se encontraron entre 6 a 8 colonias en cada placa en esta dilución. Estos datos demuestran que las células estuvieron vivas y viables durante los experimentos de RMN.

### 3.2.3. Ensayos de muerte celular demuestran la capacidad de las bistiazolidinas de restaurar la actividad de imipenem

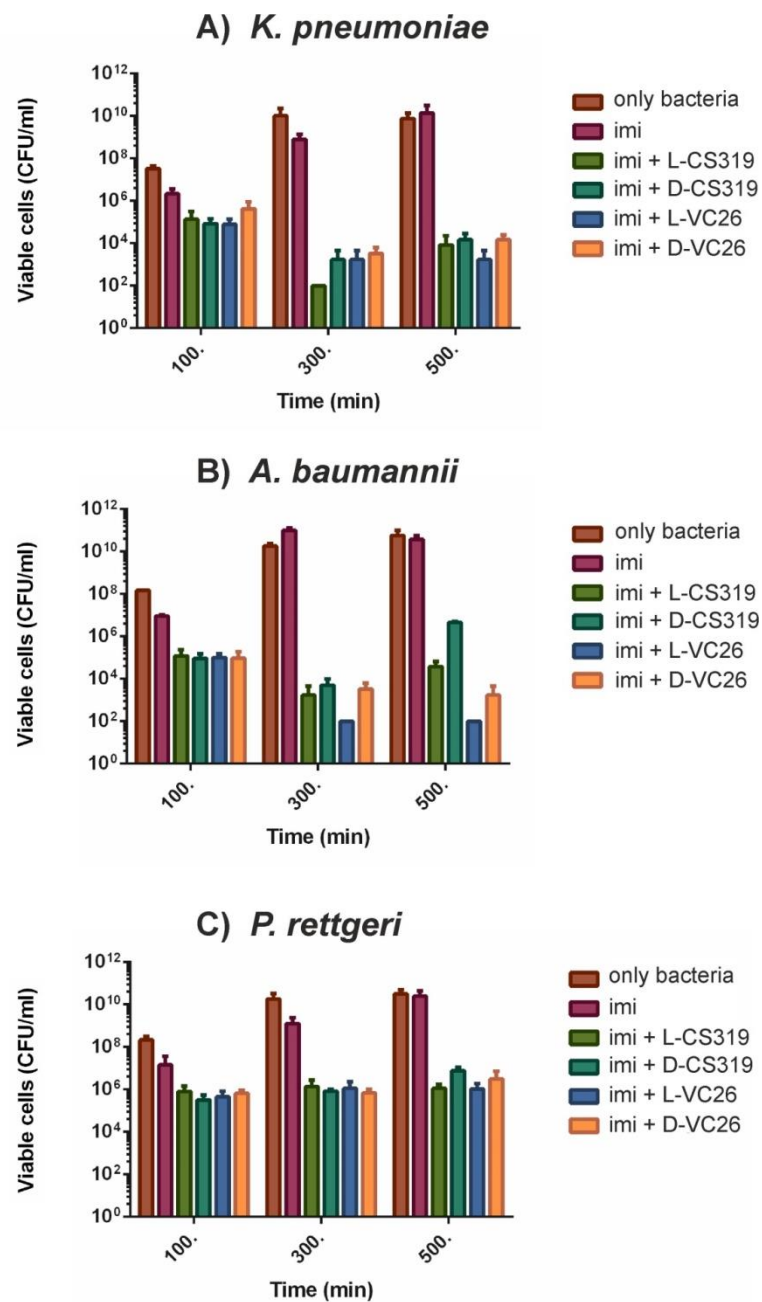
Posteriormente realizamos ensayos de muerte celular utilizando cepas clínicas que producen NDM-1, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Providencia rettgeri*. Estos experimentos fueron realizados por la Lic. María Mojica, integrante del grupo del Dr. Robert Bonomo, del Servicio de Veteranos en Cleveland, Estados Unidos. Para ello se utilizaron cultivos líquidos de cada cepa con un inóculo inicial correspondiente a  $10^6$  UFC/mL, se agregó imipenem a una concentración subletal (una dilución por debajo de la

CIM) y se realizaron ensayos agregando las bistiazolidinas a una concentración de 100 µg/mL. En la Figura 3.11 se muestran las placas que se obtuvieron mediante estos ensayos.



**Figura 3.11.** Experimentos de muerte celular que muestran la capacidad de las bistiazolidinas de restaurar la susceptibilidad de cepas clínicas que expresan NDM-1 hacia imipenem. Las bacterias fueron crecidas a concentraciones subletales de imipenem solo (4 µg/mL para *K. pneumoniae* y 16 µg/mL para *A. baumannii* y *P. rettgeri*) o en combinación con 100 µg/mL de cada bistiazolidina. Se plaquearon distintas diluciones de las células a 100, 300 y 500 minutos de comenzar el experimento. La figura muestra uno de tres replicados realizados.

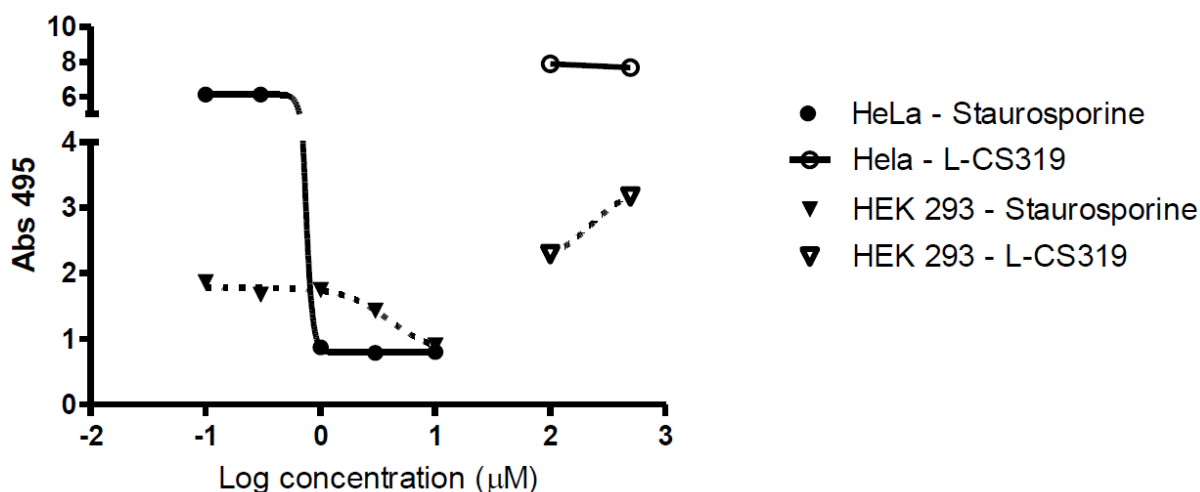
Estos ensayos fueron repetidos en triplicados y se calculó en cada caso las UFC/mL que fueron recuperadas a cada tiempo; estos resultados se muestran en la Figura 3.12. De esta forma, es posible demostrar la capacidad de las bistiazolidinas de reestablecer el efecto antibacteriano del carbapenem imipenem sobre cepas clínicas que expresan NDM-1.



**Figura 3.12.** Experimentos de muerte celular que muestran la capacidad de las bistiazolidinas de restaurar la susceptibilidad de cepas clínicas que expresan NDM-1 hacia imipenem. Las bacterias fueron crecidas a concentraciones subletales de imipenem solo (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *K. pneumoniae* y 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *A. baumannii* y *P. rettgeri*) o en combinación con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada bistiazolidina. Se plaquearon distintas diluciones de las células a 100, 300 y 500 minutos de comenzar el experimento. La figura muestra el promedio de tres replicados  $\pm$  SD.

### 3.2.4. Ensayos de selectividad y citotoxicidad

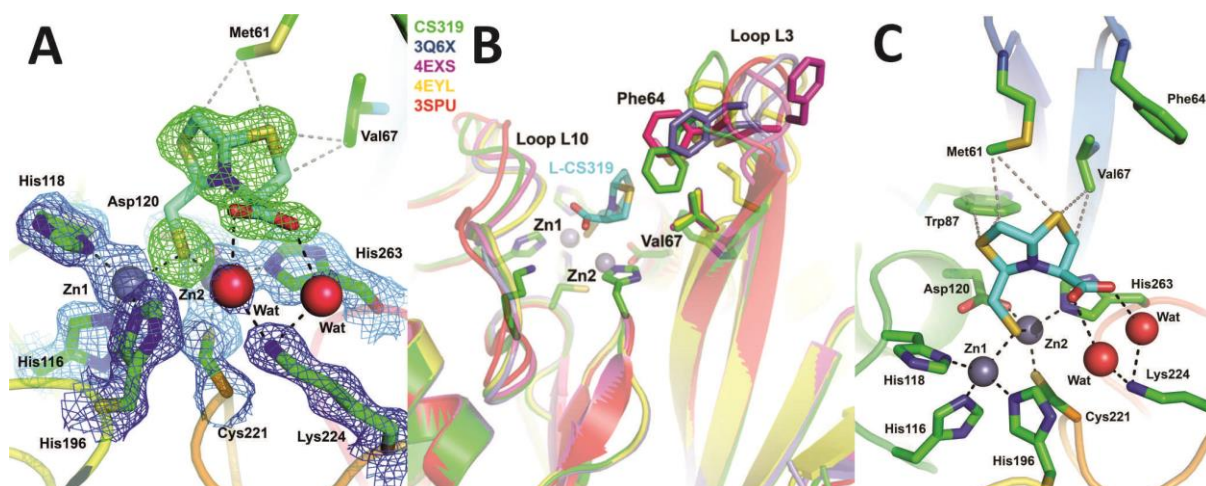
A continuación, se evaluó la selectividad del compuesto L-CS319, el más potente de los inhibidores identificados, por medio de ensayos de inhibición utilizando la enzima glicoxalasa II humana (hGlx2). Los resultados obtenidos permitieron determinar que el mismo es inactivo hasta una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, se procedió a ensayar la citotoxicidad de este compuesto sobre líneas celulares HeLa y Hek 293 en donde se determinó la ausencia de efecto citotóxico de este compuesto hasta una concentración de 500  $\mu\text{M}$  (Figura 3.13). Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Christopher Schofield (Universidad de Oxford, Inglaterra).



**Figura 3.13.** Efecto del L-CS319 y Staurosporine (control +) en líneas celulares HeLa y Hek 293.

### 3.2.5. Caracterización estructural de la interacción de NDM-1 con L-CS319

Para caracterizar la interacción y modo unión de L-CS319 con NDM-1 se obtuvo la estructura cristalográfica del compuesto en complejo con la enzima. Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. James Spencer (Universidad de Bristol, Inglaterra). Los cristales de NDM-1 fueron obtenidos como grupo espacial P1 con 4 moléculas en la unidad asimétrica, a los cuales se les adicionó una solución 5 mM del compuesto disuelto en DMSO, lo que dio lugar a una estructura para el complejo a una resolución de 1,9 Å. Al inspeccionar los mapas diferenciales se observó clara evidencia para la presencia del ligando unido en las 4 moléculas de NDM-1 (Figura 3.14A), aunque los factores cristalográficos B variaban entre las diferentes cadenas (Anexo A). La unión del inhibidor tiene poco efecto sobre la estructura global de NDM-1 (rmsd 0,647 Å con respecto al pdb 3SPU para la enzima libre).



**Figura 3.14.** **A.** Sitio activo del complejo NDM-1:L-CS319 en donde se muestra la densidad electrónica experimental. El compuesto L-CS319 (carbonos en celeste) es superpuesto con la densidad  $|F_o| - |F_c| \cdot \phi_{calc}$  (en verde, contorneado a  $3\sigma$ ) calculado a partir del refinamiento del modelo final, del cual el ligando fue removido, contra los datos de difracción experimental. La densidad azul es  $2|F_o| - |F_c| \cdot \phi_{calc}$ , contorneada a  $1\sigma$ , superpuesta sobre las cadenas laterales del sitio activo. **B.** Superposición de la estructura del complejo L-CS319:NDM-1 con distintas estructuras de NDM-1: (i) complejo con ampicilina hidrolizada (azul, pdb 3Q6X); (ii) complejo con L-captopril (violeta, pdb 4EXS); (iii) complejo con meropenem hidrolizado (amarillo, pdb 4EYL); (iv) NDM-1 libre (rojo, pdb 3SPU). **C.** Modo de interacción de L-CS319 con NDM-1. El inhibidor se une a ambos iones Zn(II) por medio del sulfhidrilo. El grupo carboxilato interacciona con Lys224 por medio de dos moléculas de agua. Los iones Zn(II) y las moléculas de agua están representados mediante esferas grises y rojas, respectivamente. Los enlaces de hidrógeno y los enlaces de coordinación se muestran como líneas discontinuas negras, y las interacciones hidrofóbicas como líneas discontinuas grises. Los carbonos del inhibidor se muestran en celeste mientras que los de la proteína en verde, el resto en forma estándar.

Las diferencias principales se ubican en la conformación del bucle L3 (residuos 61 a 65). El bucle L3 está pobremente definido en el complejo (como se evidencia debido a una densidad electrónica más débil y elevados factores B cristalográficos) y pudo ser modelado en forma completa para una sola de las moléculas, en donde adopta una conformación más “cerrada” sobre el sitio activo en comparación con la enzima libre (Figura 3.14B).

El inhibidor se une al sitio activo de NDM-1 mediante la intercalación del grupo tiol entre ambos iones Zn(II) en forma casi equidistante (Figura 3.14C), desplazando a la molécula de hidróxido que se propone como el nucleófilo de la reacción de hidrólisis, pero sin afectar la distancia Zn1-Zn2 (3,7 vs. 3,8 Å en la forma libre). La geometría de coordinación de ambos iones Zn(II) es tetraédrica, al contrario de la estructura de la forma libre de NDM-1 la cual muestra un sitio Zn2 pentacoordinado, indicando que el inhibidor es capaz de desplazar a la segunda molécula de agua apical unida al Zn2, la cual es una característica presente en varias estructuras de MBLs libres. El grupo carboxilato no se une al Zn2 (al contrario de la estructura del complejo EP de NDM-1 con meropenem hidrolizado, pdb 4EYL), sino que interacciona mediante puente hidrógeno con moléculas de agua que están conectadas a su vez al Nε de la Lys224. Además de las interacciones mediante enlaces de hidrógeno y de la coordinación al sitio metálico, el inhibidor presenta contactos hidrofóbicos con los residuos Met61 y Val67 en la base del bucle L3 y con el Trp87 del bucle L5 (Figura 3.14C).

### 3.3. Discusión

Durante la última década el surgimiento de cepas productoras de carbapenemasas entre Enterobacterias, *Pseudomonas spp.*, y *Acinetobacter baumannii* ha llevado a una situación preocupante. Una gran variedad de carbapenemasas han sido reportadas tales como las β-lactamasas de clase A del tipo KPC (la mayoría identificadas en Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*) y las del tipo GES (la mayoría en *Acinetobacter baumannii*), las metalo-β-lactamasas de clase B del tipo VIM, IMP, GIM y NDM, y las carbapenemasas de clase D del tipo OXA-48 en Enterobacterias y del tipo OXA-23, OXA-24/-40, OXA-58, y OXA-143 en *Acinetobacter spp* [122].

El surgimiento de la carbapenemasa más recientemente descrita, llamada New Delhi Metalo-β-lactamasa (NDM-1) constituye un problema clínico de importancia. Ciertamente,

esta enzima compromete la eficacia de casi todos los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo los carbapenemes que son considerados antibióticos de último recurso dado su mayor estabilidad química a la degradación y amplio espectro de actividad antibacteriana. Aunque la mayoría de las cepas productoras de NDM identificadas son Enterobacterias, esta carbapenemasa ha sido también reportada en *Acinetobacter spp.* y más raramente en *P. aeruginosa*. Ambas especies causan severas infecciones nosocomiales, incluyendo infecciones del tracto urinario, peritonitis, septicemia e infecciones pulmonares. El subcontinente indio, las regiones de los países Balcánicos y los de Oriente Medio se consideran como los principales reservorios de productores de NDM. Dado que las opciones terapéuticas son limitadas a unos muy pocos antibióticos tales como colistina, tigeciclina y fosfomicina, que presentan efectos secundarios, las infecciones adquiridas en hospitales o en la comunidad causadas por productores de NDM son difíciles de erradicar. El aislamiento de los pacientes infectados y de aquellos que transportan la infección y las técnicas de diagnóstico rápidas son los factores principales que contribuyen a contener este brote que amenazan la eficacia de los modernos sistemas de salud en la actualidad. Por todos estos motivos, la búsqueda de compuestos que puedan inhibir la actividad de estas enzimas constituye una problemática que ha sido ampliamente reconocida y numerosos esfuerzos se han llevado a cabo, no siempre con resultados satisfactorios.

Durante el presente trabajo de Tesis se reconoció la importancia de desarrollar moléculas con similitud estructural a la de los sustratos naturales de las MBLs, así como también tratar de replicar las interacciones identificadas en complejos enzima-intermediario o enzima-producto entre NDM-1 y diversos  $\beta$ -lactámicos, con el objetivo de desarrollar moléculas que puedan unirse al sitio activo con alta afinidad e inhibir su actividad. Particularmente importante es la introducción de funcionalidades químicas que sean estables y que contengan grupos de unión a Zn(II) para optimizar la interacción en el sitio activo.

Tomando en consideración estos preceptos diseñamos y sintetizamos 4 bistiazolidinas que contienen dos anillos fusionados mediante un átomo de nitrógeno, así como un grupo carboxilato situado en forma similar al carboxilato invariante de los  $\beta$ -lactámicos y un grupo tiol para generar un punto de unión a metal. Como se observa en la Figura 3.4, estos

compuestos constituyen dos pares de enantiómeros que difieren en la presencia de un grupo gem dimetilo en posición 7, similar al encontrado en las penicilinas.

Realizamos estudios de inhibición *in vitro* con la forma purificada de NDM-1 y determinamos las constantes de inhibición competitivas para los 4 compuestos. El compuesto más potente resultó ser el L-CS319, 2,7 veces más potente que su enantiómero D-CS319. Los derivados penicilamina L- y D-VC26, los que poseen el grupo gem dimetilo, fueron casi dos veces menos activos que el L-CS319. Esto confirma que los compuestos diseñados son capaces de inhibir en ensayos *in vitro* a la MBL NDM-1 con una buena potencia en el rango bajo micromolar.

Siguiendo con el análisis de las bistiazolidinas realizamos un ensayo por  $^1\text{H}$  RMN mediante el cual pudimos determinar el perfil de inhibición de las mismas sobre células de *E. coli* que expresan NDM-1. En este método se monitorea la disminución y aumento de las señales correspondiente a sustrato y producto, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que las 4 bistiazolidinas son capaces de penetrar el espacio periplasmático bacteriano e inhibir la actividad  $\beta$ -lactamasa. El compuesto L-CS319 es el más potente inhibidor *in bacteria* con una  $\text{IC}_{50}$  de 23  $\mu\text{M}$ , mientras que su enantiómero es 4,7 veces menos potente, una diferencia del mismo orden de magnitud que la observada en los experimentos *in vitro* con la enzima purificada. La principal diferencia en la potencia inhibitoria medidas *in vitro* y en células bacterianas fueron observadas para los compuestos con el grupo gem dimetilo, los cuales mostraron valores de  $\text{IC}_{50}$  entre 180-200  $\mu\text{M}$ , un orden de magnitud menos potente que el L-CS319. Los valores relativamente altos de  $\text{IC}_{50}$  para estos compuestos podrían deberse a diferencias en cuanto a la permeabilidad celular.

Estos resultados nos llevaron a evaluar la capacidad de los compuestos de reestablecer la capacidad antibacteriana de imipenem en ensayos de muerte celular utilizando cepas clínicas productoras de NDM-1, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Providencia rettgeri*. De esta forma pudimos establecer que estos compuestos presentan la capacidad no solo de inhibir a la enzima *in situ*, sino también determinar que este efecto inhibitorio se traduce en el restablecimiento de la capacidad antibacteriana sobre cepas patógenas del carbapenem imipenem, una droga comercial utilizada actualmente para el tratamiento de infecciones severas en hospitales. Asimismo se pudo comprobar que estos

compuestos no actúan como antibacterianos por sí solos, ya que son incapaces de disminuir el número de células viables comparando con el ensayo control.

El desarrollo de inhibidores promisorios de enzimas bacterianas debe tener en consideración la actividad inhibitoria de los mismos sobre proteínas presentes en seres humanos. En otras palabras, las moléculas identificadas deben mostrar una adecuada selectividad orientada hacia las MBLs. Por tal motivo, se ensayó la actividad del compuesto L-CS319 sobre la enzima glioxalasa II humana (hGlx2), en donde no se observó inhibición hasta una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, se realizaron ensayos de citotoxicidad de este compuesto sobre líneas celulares HeLa y Hek 293, no observándose efectos citotóxicos hasta una concentración de 500  $\mu\text{M}$ , indicando la ausencia de actividad inhibitoria significativa de este compuesto sobre otras enzimas humanas esenciales. Esto sugiere que el esqueleto estructural de las bistiazolidinas representa un motivo químico promisorio para el desarrollo de agentes capaces de ser coadministrados con antibióticos  $\beta$ -lactámicos para el tratamiento de infecciones causadas por cepas clínicas productoras de NDM-1.

Finalmente, obtuvimos la estructura del aducto entre el compuesto más potente (L-CS319) y NDM-1. La estructura cristalográfica confirmó que el grupo tiol es un determinante clave en la interacción del compuesto con el sitio activo, al intercalarse entre ambos iones zinc. El grupo carboxilato a su vez interacciona con la Lys224 por intermedio de 2 moléculas de agua. Por lo tanto, como en el caso del aducto de meropenem unido a NDM-1, la Lys224 orienta al inhibidor para la unión al sitio activo dinuclear. Consideramos que la replicación de la interacción de los  $\beta$ -lactámicos con los iones Zn(II) y/o con Lys224 es crucial para el desarrollo de inhibidores específicos de las MBLs. Asimismo, los residuos hidrofóbicos presentes en distintos bucles que rodean al sitio activo yacen a distancias cercanas al inhibidor. Estudios de mutagénesis en NDM-1 han sugerido que el bucle L3 es importante en el reconocimiento de sustratos [123]. Por otro lado, el mejoramiento de la potencia inhibitoria en la MBL IMP-1 por una serie de derivados del ácido succínico se alcanzó mediante la optimización de interacciones hidrofóbicas en el sitio activo [38]. A partir de estas evidencias esperamos que la estructura bistiazolidínica, particularmente el L-CS319, podría ser decorado con motivos hidrofóbicos para incrementar el reconocimiento de los bucles L3 y L5. En particular, la Phe64 en la cúspide del bucle L3 representa un blanco para

interacciones hidrofóbicas, pero en el presente complejo yace a una distancia demasiado grande como para hacer contacto con el inhibidor unido.

## Capítulo 4

# Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

### 4.1. Introducción

Como se señaló en el Capítulo 1, las MBLs están divididas en tres subclases (B1, B2 y B3) de acuerdo a homología de secuencia. La Tabla 4.1 detalla miembros representativos de todas las subclases. Estas enzimas difieren además en el perfil de sustrato, ya que las enzimas de subclase B1 y B3 son de amplio espectro (capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes), mientras que las enzimas de subclase B2 son carbapenemasas exclusivas [15]. Las MBLs exhiben un diverso rango de secuencias con una identidad entre enzimas de diferentes subclases de tan sólo el 25%. Las estructuras de rayos X de múltiples MBLs indican, sin embargo, que el grupo es estructuralmente similar y posee un plegamiento conservado del tipo sándwich  $\alpha\beta/\beta\alpha$ , con el sitio activo localizado en la interface entre dos dominios (Figura 1.4). Este plegamiento soporta hasta seis residuos en el sitio activo que coordinan tanto uno como dos iones Zn(II) que son esenciales para el mecanismo catalítico (Figura 1.5).

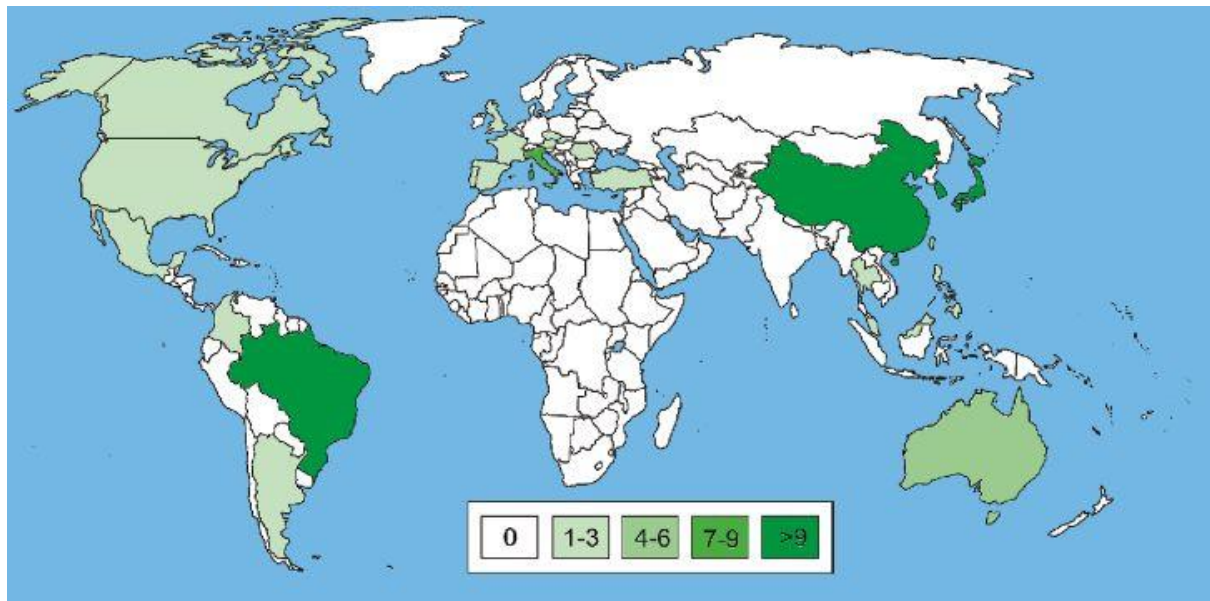
La MBL IMP-1 es un miembro de la subclase B1 encontrada originalmente en 1991 de un paciente con una infección de *Serratia marcescens* en Japón y caracterizada como una proteína de 246 aminoácidos y un peso molecular de 30 kDa, codificada por el gen cromosomal  $bla_{IMP}$  conteniendo un 39% de GC [124]. Este contenido de GC es mucho menor que el contenido usual de GC de los genes de *Serratia marcescens* (56,2-58,4%) [125], por lo que se ha sugerido un origen externo para el gen  $bla_{IMP}$  [124]. IMP-1 también ha sido aislada a partir de diferentes cepas, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Acinetobacter junii*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacter aerogenes*, usualmente en elementos genéticos móviles insertados en integrones, tanto en cromosomas como en plásmidos [126]. Luego de

## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

ser aislada primero en Japón, IMP-1 fue reportada en varios otros países de Asia, en Europa y en Sudamérica. La diseminación global de IMP-1 y otras enzimas IMP se muestra en la Figura 4.1.

Subclase	Enzima	Organismo de origen	Número de Acceso en Genbank	Código PDB
B1	BclI	<i>Bacillus cereus</i>	M11189	1BMC
	CcrA	<i>Bacteroides fragilis</i>	M63556	1ZNB
	IMP-1	<i>Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa</i>	S71932	1DD6
	VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii</i>	AF191564	2YZ3, 1K02
	VIM-4	<i>Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii</i>	AY135661	2WHG
	VIM-7	<i>Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii</i>	AM778842	2Y87
	BlaB	<i>Chryseobacterium meningoseptica</i>	AF189298	1M2X
	SPM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AY341249	2FHX
	NDM-1	<i>Klebsiella pneumonia, Escherichia coli</i>	JN420336	3Q6X, 3SPU, 3RKJ
	VIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii</i>	T18050	
	GIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AJ620678	
	SIM-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	AY887066	
	DIM-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	GU323019	
	TMB-1	<i>Achromobacter xyloabacter</i>	FR771847	
	Bla2	<i>Bacillus anthracis</i>	CP001598	
	KHM-1	<i>Citrobacter freundii</i>	AB364006	
B2	CphA	<i>Aeromonas hydrophila</i>	X57102	1X8G, 3F90
	Sfh-I	<i>Serratia fonticola</i>	AF197943	3SD9
	ImiS	<i>Aeromonas veronii</i>	Y01415	
B3	L1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AB294542	1SML
	FEZ-1	<i>Legionella gormannii</i>	Y17896	1K07
	BJP-1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	NP772870	3LVZ
	AIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AM998375	4AWY
	THIN-B	<i>Janthinobacterium lividum</i>	CAC33832	
	GOB-18	<i>Elisabethkingia meningosepticum</i>	DQ004496	

**Tabla 4.1.** Diversas MBLs clasificadas por subclases, organismos de origen, código de Genbank y código de PDB.



**Figura 4.1.** Mapa mundial ilustrando la diseminación global de las enzimas IMP. El mapa fue coloreado en base a la cantidad de artículos encontrados en PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en donde se halla descrito el surgimiento de cepas productoras de IMP. Adaptado de [126].

Hasta la fecha se han identificado 39 variantes de IMP [53]. IMP-2 se aisló por primera vez a partir de una cepa de *Acinetobacter baumannii* en Italia en 1997 [127]. La relativamente baja identidad de secuencia (85%) con IMP-1, la diferencia entre los entornos genéticos que codifican para IMP-1 e IMP-2 y los diferentes orígenes geográficos sugieren orígenes filogenéticos distintos de estas dos enzimas. El espectro de sustrato de IMP-2 es en general similar al de IMP-1 (cefalosporinas, penicilinas y carbapenemes, pero no aztreonam), sin embargo, con eficiencias catalíticas significativamente menores para ampicilina y cefaloridina y eficiencias catalíticas significativamente mayores contra carbenicilina y meropenem [127] en relación con IMP-1 [128]. IMP-4 fue la primer MBL descubierta en Australia [129]. La primer enzima IMP descubierta en América fue IMP-7, la cual fue aislada de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en Canadá en 1995 y 1996 [130]. IMP-15 e IMP-18 son variantes aisladas en los Estados Unidos. En resumen, el grupo de las enzimas IMP exhibe una gran diversidad, y el proceso de descubrimiento de nuevas variantes sigue aún en la actualidad. Este grupo de enzimas es ciertamente una de las amenazas más preocupantes para la terapia antimicrobiana. Se han incluso llevado a cabo algunos intentos de predecir nuevas variantes de IMP que podrían evolucionar en el futuro.

**Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs**

Por ejemplo, mutantes puntuales de IMP-1 que contienen las mutaciones N233A [131] y F218Y [132], se encontró que muestran eficiencias catalíticas mayores ante cefalosporinas comparadas con IMP-1.

La enzima Sfh-I fue encontrada en un aislado ambiental de *Serratia fonticola* resistente a carbapenemes en 2003 [133], siendo el primer ejemplo de una MBL originaria de Enterobacterias. Esta enzima es una MBL de subclase B2 la cual presenta una identidad de secuencia de 53 y 52% con relación a CphA e ImiS, respectivamente, mientras que la identidad de secuencia para con enzimas de las otras subclases es menor al 25% [133]. Las enzimas de esta subclase se caracterizan por poseer un único ion Zn(II) en el sitio canónico Zn<sup>2+</sup>.

La enzima L1 fue originalmente identificada en 1994 en una cepa de *Xanthomonas maltophilia* [134]. La enzima GOB-1 fue caracterizada a partir de una cepa de *Elizabethkingia meningoseptica* en 2000 [135]. Esta enzima presenta la identidad de secuencia más elevada (18%) con la enzima L1, ambas agrupadas en la subclase B3. GOB-18 es una variante identificada en el laboratorio, la cual difiere de GOB-1 debido a las siguientes mutaciones: L94F, A137V y D282N. Las enzimas GOB se han identificado usualmente en cepas que contienen otras MBLs, especialmente BlaB [136].

Diversos trabajos han mostrado que inhibidores que son eficientes contra una enzima particular, no son tan activos frente a enzimas de diferentes subclases o incluso entre diferentes enzimas de la misma subclase [137]. Estos resultados confirmaron la gran variabilidad estructural que presentan las MBLs y demuestran el grado de dificultad que atañe al desarrollo de inhibidores de amplio espectro que puedan ser útiles frente a una amplia gama de enzimas. Por este motivo, nos propusimos llevar a cabo estudios de inhibición tanto en diferentes enzimas de subclase B1, como así también en enzimas de subclases B2 y B3.

## 4.2. Resultados

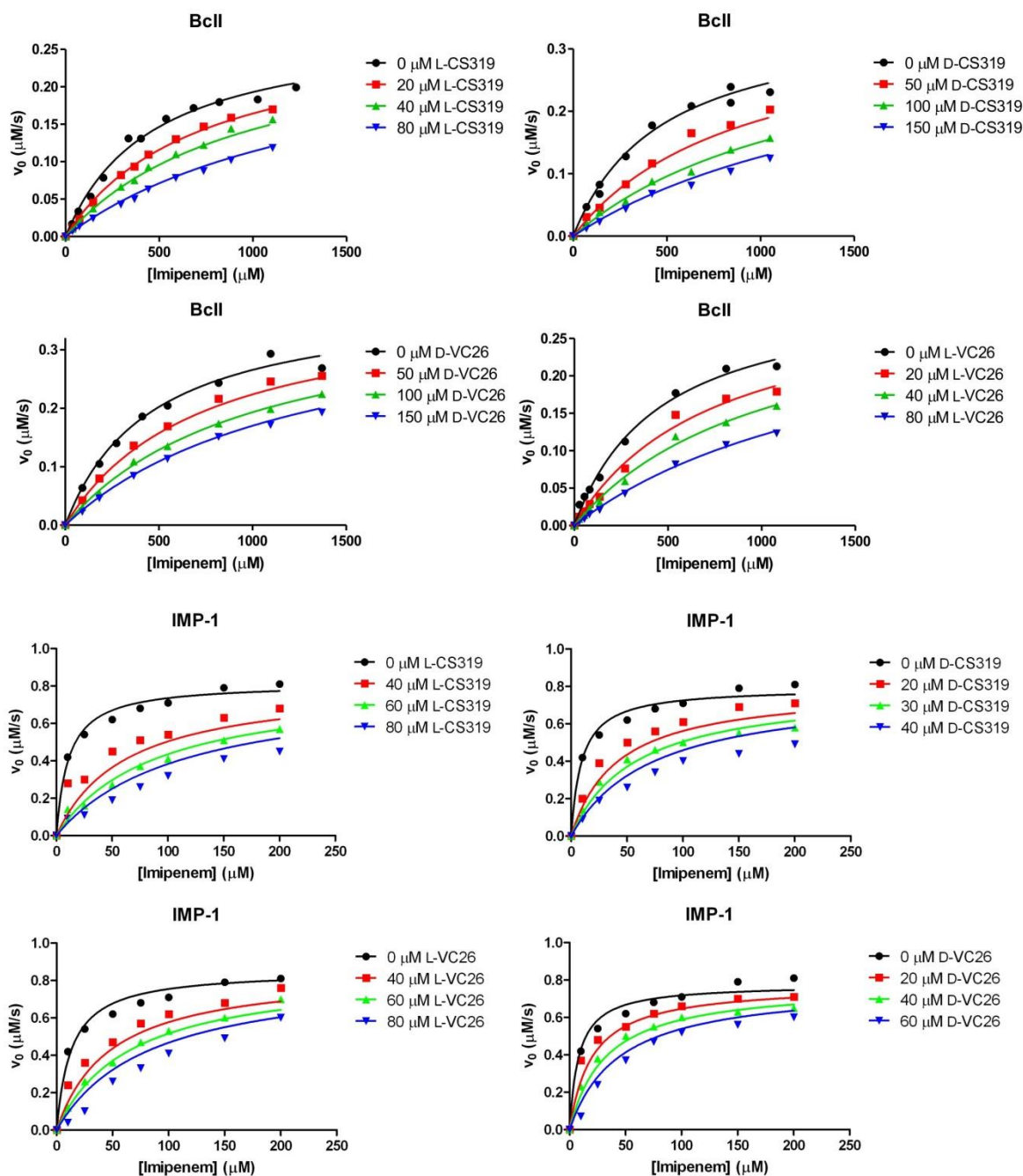
### 4.2.1. Caracterización cinética de la interacción de las bistiazolidinas con MBLs de distintas subclases

Dado los resultados obtenidos en el Capítulo anterior, se procedió a ensayar la actividad inhibitoria de estas bistiazolidinas en distintas MBLs para confirmar o descartar una actividad inhibitoria de amplio espectro. La metodología experimental utilizada resultó idéntica para el caso de NDM-1. Como enzimas de subclase B1 elegimos a *BclI* (la cual ha sido ampliamente utilizada en el laboratorio como modelo del mecanismo y evolución de las MBLs) e *IMP-1*, una enzima encontrada en diversas cepas patógenas. Asimismo, como representante de la subclase B2 utilizamos la enzima *Sfh-I*. Finalmente, utilizamos a las enzimas *L1* y *GOB-18* como representantes de la subclase B3. Brevemente, llevamos a cabo los ensayos de actividad por el método de medición de velocidades iniciales a distintas concentraciones de sustrato (imipenem) e inhibidor. Posteriormente los resultados obtenidos fueron ajustados al modelo de inhibición competitiva implementado en el programa GraphPad 5.0. Como muestran las Figuras 4.2 y 4.3, las 4 bistiazolidinas fueron capaces de inhibir la actividad enzimática de todas las MBLs analizadas con constantes de inhibición ( $K_i$ ) entre 0,24 a 84  $\mu\text{M}$  (Tabla 4.2).

Subclase	Enzima	L-CS319	D-CS319	L-VC26	D-VC26
B1	<i>IMP-1</i>	(8 ± 2)	(6 ± 1)	(15 ± 3)	(14 ± 3)
	<i>BclI</i>	(36 ± 2)	(53 ± 2)	(32 ± 3)	(84 ± 6)
B2	<i>Sfh-I</i>	(0,26 ± 0,03)	(26 ± 3)	(0,36 ± 0,04)	(29 ± 3)
B3	<i>L1</i>	(12 ± 1)	(10 ± 1)	(11 ± 2)	(10 ± 1)
	<i>GOB-18</i>	(41 ± 4)	(30 ± 2)	(31 ± 2)	(10 ± 1)

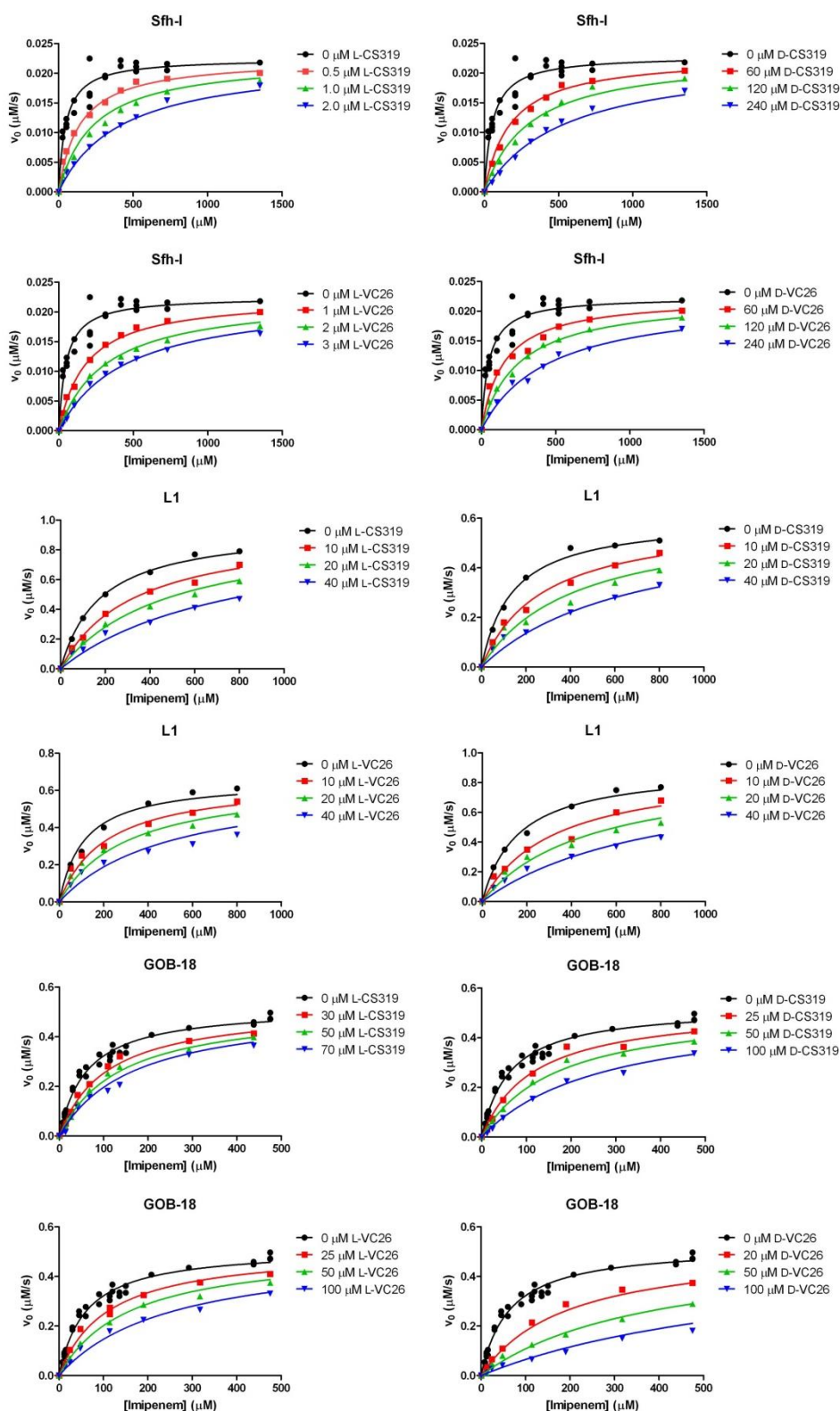
**Tabla 4.2.** Constantes de inhibición ( $K_i$  en  $\mu\text{M}$ ) de MBLs por las bistiazolidinas.

**Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs**



**Figura 4.2.** Inhibición *in vitro* de la actividad imipenemasa de enzimas de subclase B1 (BclI e IMP-1) por las bistiazolidinas. Las líneas muestran el ajuste al modelo de inhibición competitiva de acuerdo a los parámetros ( $K_i$ ) mostrados en la Tabla 4.2.

## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs



**Figura 4.3.** Inhibición *in vitro* de la actividad imipenemasa de enzimas de subclase B2 (Sfh-I) y B3 (L1 y GOB-18) por las bistiazolidinas. Las líneas muestran el ajuste al modelo de inhibición competitiva de acuerdo a los parámetros ( $K_i$ ) mostrados en la Tabla 4.2.

#### 4.2.2. Titulación de BclI con el compuesto L-CS319 seguida por RMN

Con el objetivo de obtener un mayor detalle con respecto a los residuos involucrados en la interacción entre L-CS319 y BclI decidimos realizar una titulación de la enzima con la bistiazolidina monitoreada por RMN, dado que en el laboratorio contábamos con la asignación completa del espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de BclI. Este espectro es considerado la “huella dactilar” de una proteína, ya que cada señal en el mismo corresponde a los protones unidos a nitrógenos del esqueleto polipeptídico y de las cadenas laterales de asparaginas y glutaminas. De esta forma, cambios en el ambiente químico-magnético en un dado residuo se traduce en un cambio, ya sea en la posición o en la intensidad, de su correspondiente señal en el espectro.

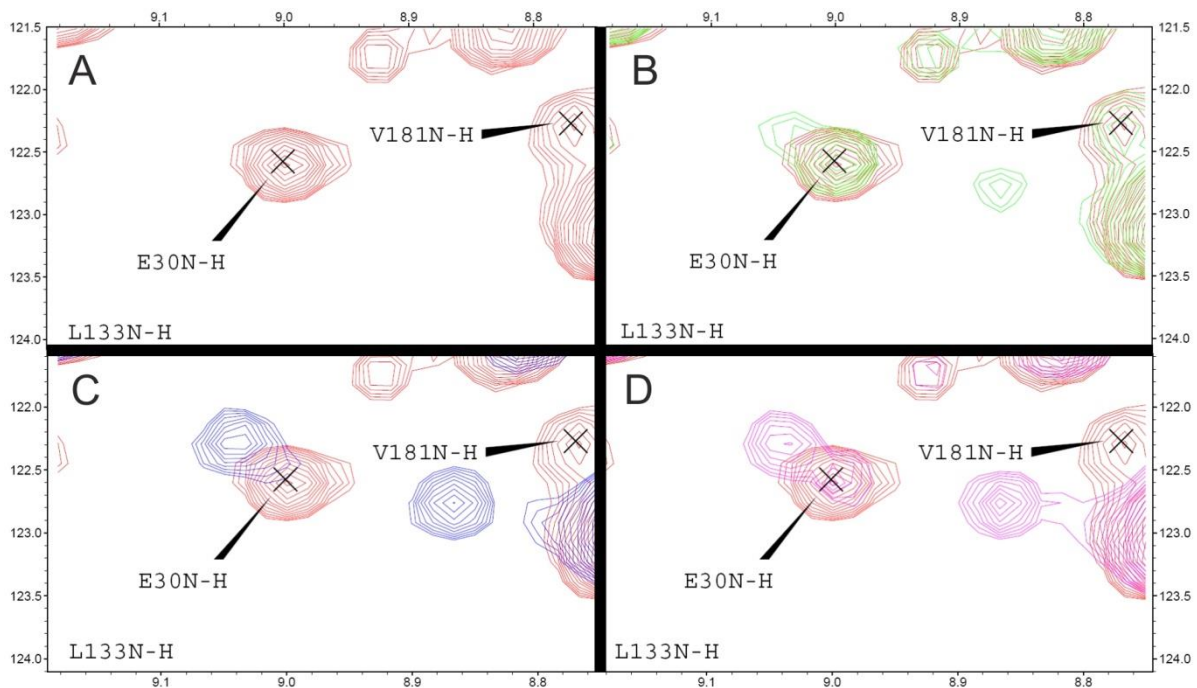
Para ello debimos proceder a diseñar un vector y poner a punto las condiciones de expresión que nos permitiera obtener la enzima en alta cantidad y con un correcto contenido de metal en medio mínimo suplementado con  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . En el laboratorio se disponía del vector de expresión pET-Term-BclI, el cual codifica para la enzima BclI fusionada a la proteína Glutation-S-Transferasa y con resistencia a ampicilina. Esto presentaba dos inconvenientes: por un lado la fusión a la proteína GST implicaba un coste energético para la bacteria que podría ser disminuido reemplazando a esta proteína de fusión por una colita de 6 histidinas las cuales se unen fuerte y selectivamente a resinas de níquel. Por otro lado, la resistencia a ampicilina (un antibiótico  $\beta$ -lactámico) podría perderse durante el período de sobreexpresión de BclI, obligando a mantener un control estricto de los niveles del antibiótico de selección. Estos factores influían en el rendimiento de la enzima, de la cual era posible obtener 2-3 mg de BclI por litro de medio mínimo.

De esta forma, resolvimos clonar al gen de BclI en el vector de sobreexpresión pET-28, el cual presenta una fusión N-terminal a una cola de 6xHis y resistencia a kanamicina, un antibiótico del grupo de los aminoglicósidos que actúa a nivel de la traducción de proteínas, como se indica en el Capítulo 2. Una vez obtenido este vector, realizamos distintos ensayos de sobreexpresión en cultivos pequeños variando cepas de *E. coli*, temperatura y tiempo de inducción y concentración del inductor IPTG. Finalmente, una vez obtenidas las condiciones óptimas de sobreexpresión, se procedió a purificar la enzima utilizando una resina de níquel

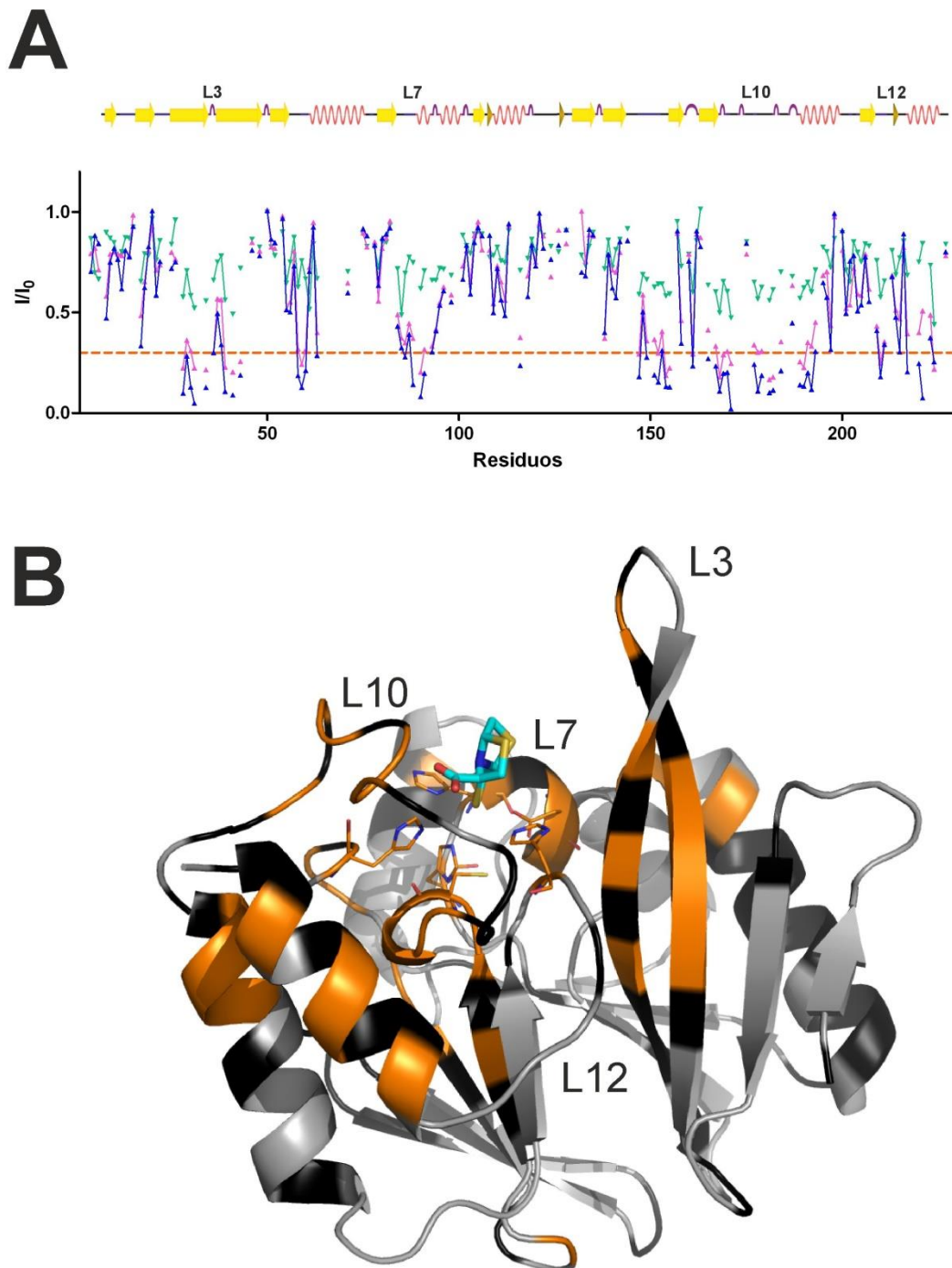
**Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs**

(según se detalla en la sección 2.10). El rendimiento obtenido en diversas purificaciones fue de alrededor de 10-20 mg por litro de medio mínimo, tanto para la enzima silvestre como para las variantes estudiadas en el Capítulo 5.

De este modo se obtuvo una muestra 700  $\mu\text{M}$  de BclI y se procedió a titularla con una solución de L-CS319. Se realizaron agregados de 0,1, 0,3, 0,7 y 1,0 eq de L-CS319. Se pudo observar que las señales no son desplazadas de su posición ante cada agregado, sino que se produce la disminución y aumento sincronizado de las mismas, indicando que la interacción se encuentra en un régimen de intercambio químico lento en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Efecto del agregado de L-CS319 al espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de BclI. A. Se muestra como ejemplo la señal correspondiente al residuo Glu30 (Glu57 en BBL) cercano al bucle L3 de BclI en la enzima libre. B, C y D. Se muestra el espectro superpuesto al que se ve en A luego de agregar 0,3, 0,7 y 1,0 equivalentes de L-CS319, respectivamente. Se observa una disminución de la señal de A y un aumento de la señal hasta llegar al estado final mostrado en D, característico de una interacción de intercambio químico lento en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos.



**Figura 4.5. A.** Efecto del agregado de L-CS319 a BclI libre en función de la secuencia. Se muestra el cociente entre la intensidad ( $I$ ) de la señal al agregar 0,3 (verde), 0,7 (rosa) y 1,0 (azul) equivalentes de L-CS319 y la intensidad de la señal de la enzima libre ( $I_0$ ) para cada residuo de la proteína. **B.** Mapeo de los residuos cuya señal disminuye al menos un 70% con respecto a la intensidad inicial en la estructura de BclI libre. El compuesto L-CS319 se muestra con los carbonos en celeste, luego de alinear la estructura cristalográfica del aducto BclI-L-CS319 a la de la enzima libre. Los ligandos de metal se muestran como líneas.

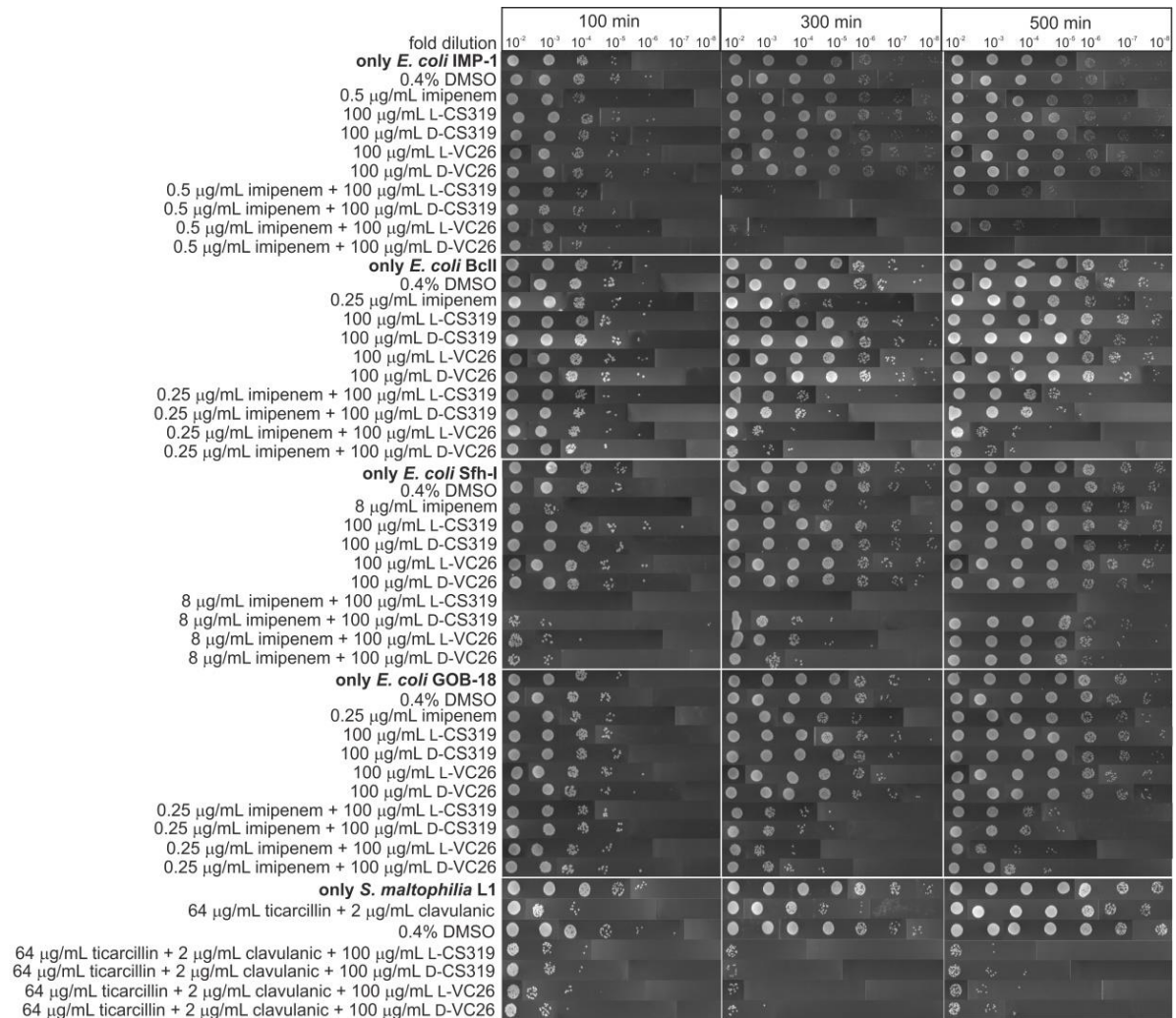
## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

Este experimento permitió conocer cuáles son los residuos perturbados por la presencia del inhibidor. Como se observa en la Figura 4.5, aquellos residuos altamente perturbados luego del agregado de 1 eq de compuesto a la enzima libre, se encuentran en su mayoría cercanos al sitio de unión, como es esperable, mientras que otros se encuentran levemente alejados del mismo, sugiriendo la presencia de redes de residuos interactuantes en la proteína en solución.

### 4.2.3. Ensayos de muerte celular demuestran la capacidad de las bistiazolidinas de restaurar la actividad de los $\beta$ -lactámicos

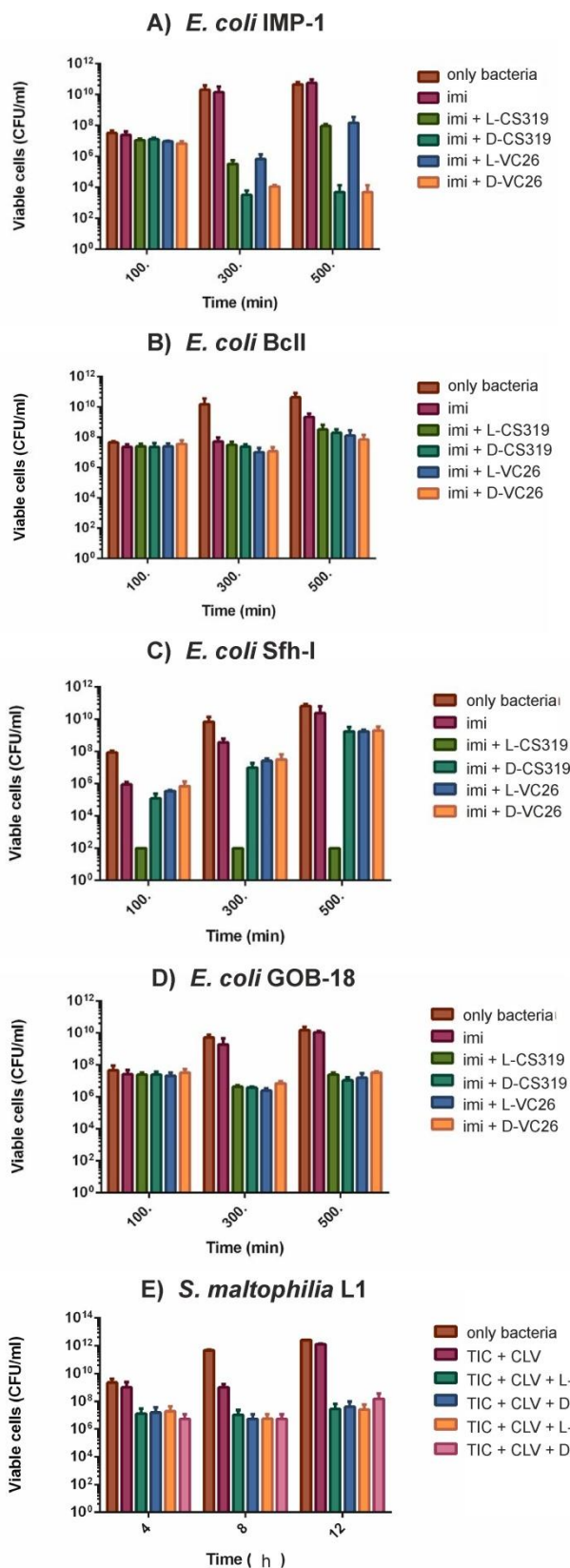
Posteriormente se realizaron ensayos de muerte celular utilizando cepas de *Escherichia coli* transformadas con los vectores pMBLe que producen IMP-1, BclI, Sfh-I y GOB-18, así como también con cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* productora de L1. Al igual que en el Capítulo anterior, se utilizaron cultivos líquidos de cada cepa con un inóculo inicial correspondiente a  $10^6$  UFC/mL, se agregó imipenem (o una mezcla de ticarcilina y clavulanato en el caso de *S. maltophilia*) a una concentración subletal (una dilución por debajo de la CIM) y se realizaron ensayos de crecimiento celular agregando las bistiazolidinas a una concentración de 100  $\mu$ g/mL. Por último, se calculó en cada caso las UFC/mL que fueron recuperadas a cada tiempo. En la Figura 4.6 se muestran las placas que se obtuvieron mediante estos ensayos. Estos experimentos fueron repetidos en triplicados y los análisis de estos resultados se muestran en la Figura 4.7. De esta forma, es posible demostrar la capacidad de las bistiazolidinas de reestablecer la capacidad antibacteriana de los  $\beta$ -lactámicos sobre cepas de *E. coli* y de *S. maltophilia* que expresan MBLs.

**Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs**



**Figura 4.6.** Experimentos de muerte celular que muestran la capacidad de las bistiazolidinas de restaurar la susceptibilidad de cepas de *E. coli* que expresan IMP-1, BclI, Sfh-I y GOB-18 hacia imipenem, así como también de cepas de *S. maltophilia* que expresan L1 hacia ticarcilina y clavulanato. Las bacterias fueron crecidas a concentraciones subletales de imipenem solo (0,5 µg/mL para IMP-1, 0,25 µg/mL para BclI y GOB-18 y 8 µg/mL para Sfh-I) o en combinación con 100 µg/mL de cada bistiazolidina. Para el caso de *S. maltophilia* se usaron 64 µg/mL de ticarcilina y 2 µg/mL de clavulanato. Se plaquearon distintas diluciones de las células a 100, 300 y 500 minutos de comenzar el experimento (4, 8 y 12 h para el caso de *S. maltophilia*). La figura muestra uno de tres replicados realizados para cada cepa.

**Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs**



**Figura 4.7.** Experimentos de muerte celular que muestran la capacidad de las bistiazolidinas de restaurar la susceptibilidad de cepas de *E. coli* que expresan (A) IMP-1, (B) BclI, (C) Sfh-I y (D) GOB-18 hacia imipenem, como así también cepas de *S. maltophilia* que expresan (E) L1 hacia ticarcilina y clavulánico. Las bacterias fueron crecidas a concentraciones subletales de imipenem solo (0,5 µg/mL para IMP-1, 0,25 µg/mL para BclI y GOB-18 y 8 µg/mL para Sfh-I) o en combinación con 100 µg/mL de cada bistiazolidina. Para *S. maltophilia* se utilizaron 62 µg/mL de ticarcilina y 2 µg/mL de clavulánico. Se plaquearon distintas diluciones de las células a 100, 300 y 500 minutos de comenzar el experimento. La figura muestra el promedio de tres replicados ± SD.

#### 4.2.4. Estructuras cristalográficas de las MBLs con las bistiazolidinas

En el laboratorio ya se contaba con experiencia previa en la cristalización y en la resolución de estructuras por rayos X gracias al trabajo de tesis del Dr. Javier González, quien al momento de realizar estos ensayos se encontraba en estadía posdoctoral en la Universidad de Maryland, Estados Unidos. En dicho lugar, le fue posible obtener cristales de la enzima BclI en complejo con la bistiazolidina D-CS319 (resolución 1,80 Å). Así mismo, en el laboratorio del Dr. James Spencer (Universidad de Bristol, Inglaterra), se obtuvieron las estructuras cristalográficas de IMP-1 con D-CS319 (resolución 2,30 Å) y L-VC26 (resolución 2,30 Å), Sfh-I con L-CS319 (resolución 1,30 Å) y L1 con L-CS319 (resolución 1,63 Å), D-CS319 (resolución 1,84 Å) y D-VC26 (resolución 1,80 Å). Para el caso de Sfh-I no pudo ser posible obtener la estructura del complejo entre la enzima y las bistiazolidinas de la serie D-, consistente con la observación de que estos estereoisómeros son 100 veces menos potentes *in vitro* que sus enantiómeros de la serie L-. A partir de este momento, realizamos el análisis desde el punto de vista químico-estructural de los aductos enzima:inhibidor obtenidos.

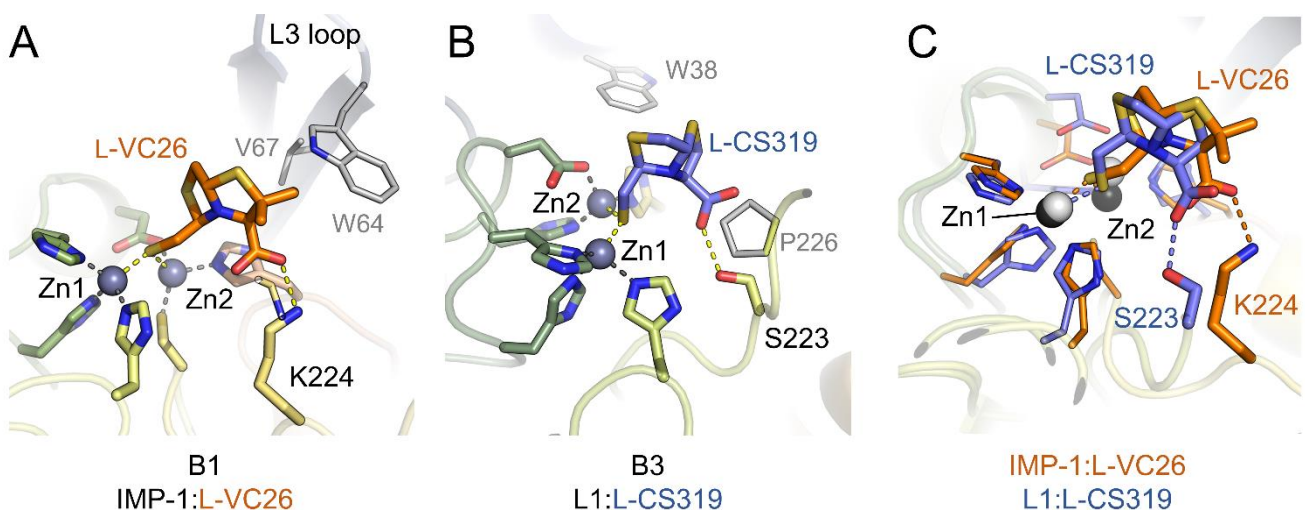
##### 4.2.4.1. Diverso modo de unión de las bistiazolidinas de la serie L- en las MBLs

Las estructuras de IMP-1:L-VC26 (Figura 4.8A) y L1:L-CS319 (Figura 4.8B) revelan modos de unión similares para las bistiazolidinas de la serie L- a las MBLs (Figura 4.8C). Este modo de unión también recuerda al descrito en el Capítulo 3 de L-CS319 a NDM-1. En todas estas estructuras, el tiol del grupo mercaptometilo se posiciona en forma equidistante entre ambos iones Zn(II) (entre 2,2 y 2,4 Å). La unión del inhibidor desplaza a la molécula de agua/hidróxido nucleofílica que se observa en las formas libres de estas enzimas, con un concomitante aumento de la distancia Zn1-Zn2 de 0,3-0,4 Å en comparación con las enzimas libres. La unión de las bistiazolidinas de la serie L- es estabilizada además por interacción directa del carboxilato con cadenas laterales estructuralmente equivalentes que están implicadas en la unión de sustrato, Lys224 en IMP-1 y Ser223 en L1. L-CS319 también lleva a cabo interacciones hidrofóbicas importantes con dos residuos en L1 (Trp38 y Pro226), y L-

## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

VC26 interactúa con dos residuos de IMP-1 (Trp64 y Val67), localizados en el bucle flexible L3 el cual se posiciona rodeando el sitio activo.

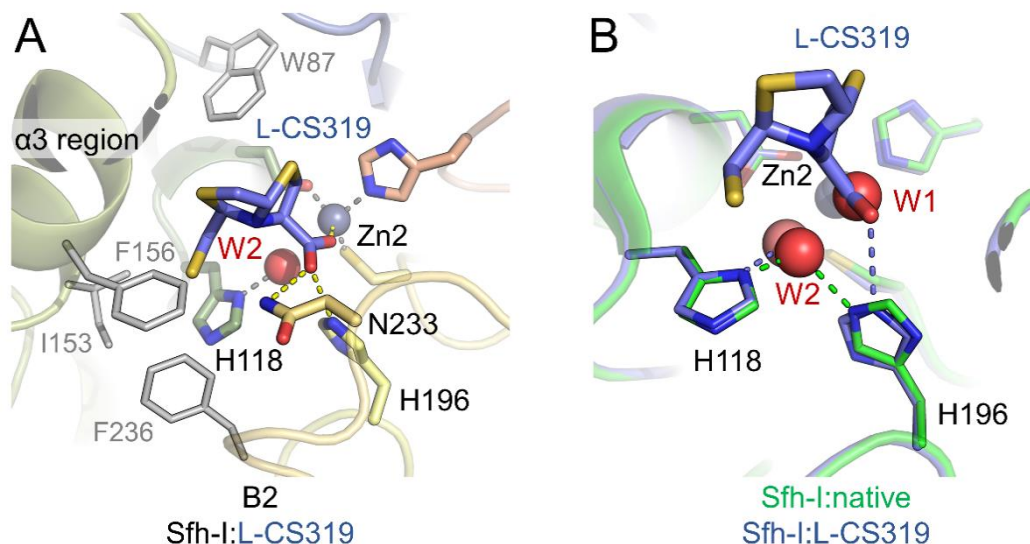
Por el contrario, la unión de L-CS319 a la enzima monozinc Sfh-I de subclase B2 difiere sustancialmente de lo observado para las enzimas de subclase B1 y B3. En el complejo, el carboxilato de L-CS319 interactúa fuertemente con el ion Zn(II) del sitio activo (1,8 Å), y está a distancia de puente de hidrógeno con dos protones de cadenas laterales, Asn233 y His196 (en ambos casos a 3,0 Å) (Figura 4.9A). La unión del compuesto es estabilizada por interacciones del tipo hidrofóbico con los residuos (Trp87, Phe156, Ile153, Phe236, en gris, Figura 4.9A). Además, aunque la unión de la bistiazolidina ejerce un efecto pequeño en la estructura general de la enzima (RMSD de 0,33 Å sobre los C $\alpha$  comparada con la estructura libre, PDB 3SD9) hay reacomodamientos significativos en el sitio activo (Figura 4.9B). El carboxilato de la bistiazolidina desplaza a la molécula de agua apical (W1), manteniendo la geometría tetraédrica del ion Zn(II) y causando un giro de 0,6 Å de la cadena lateral de la His196. Esto resulta en una pérdida de interacción del N $\epsilon$ 2 de la His196 con la molécula de agua/hidróxido nucleofílica (W2), la cual se desplaza 0,9 Å dentro del sitio activo y más cerca del Zn2 (3,0 Å comparado con 3,5 Å en la enzima libre). Es de notar que, en contraste directo a lo observado para el resto de las estructuras obtenidas, el grupo tiol no está



**Figura 4.8.** Vista de los sitios activos de (A) IMP-1 y (B) L1 unidas a las L-BTZs, en donde se destacan las interacciones entre el tiol y los iones metálicos y la del carboxilato con las cadenas laterales de Lys224 (IMP-1) y Ser223 (L1). En (C) se muestra una superposición de ambas estructuras.

## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

involucrado en interacciones con el ion  $Zn(II)$ , sino que en este caso queda inmerso en una cavidad rodeada por la larga región hidrofóbica  $\alpha 3$  que rodea el sitio activo en las enzimas B2.



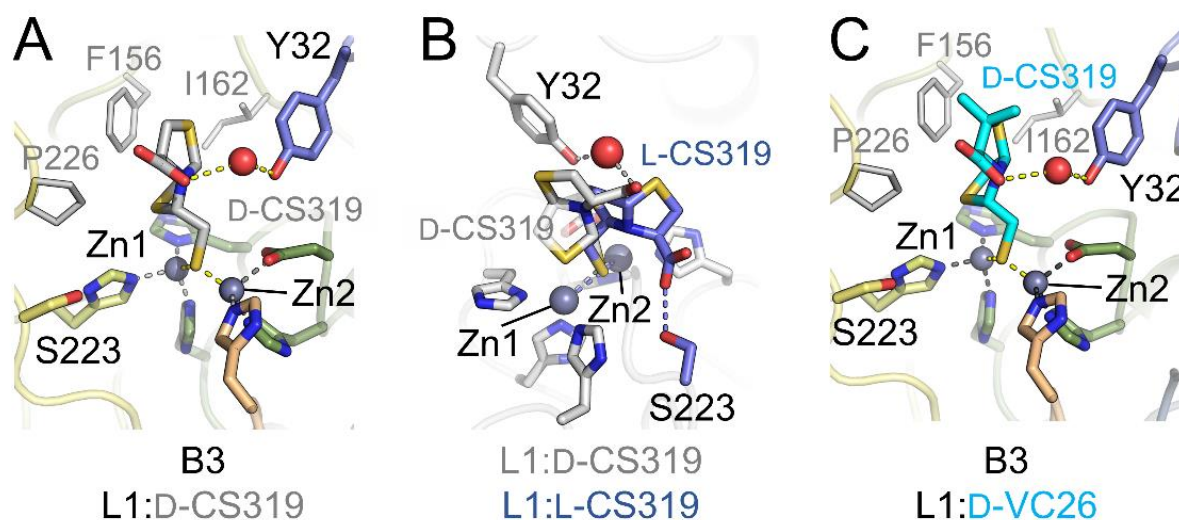
**Figura 4.9.** Vista del sitio activo de (A) Sfh-I unida a L-CS319 en donde se destaca la unión del carboxilato al  $Zn2$  mientras que el tiol se ubica rodeado por la región hidrofóbica  $\alpha 3$ . En (B) se muestra una superposición del complejo con el de la enzima libre.

### 4.2.4.2. Unión de las bistiazolidinas de la serie D- a L1

Luego procedimos a analizar la unión de las bistiazolidinas de la serie D- a la enzima L1 (B3). En forma sorprendente, el análisis estructural reveló un tercer modo de unión. En forma similar al complejo entre L1 y L-CS319, el grupo tiol del D-CS319 domina la interacción con el sitio activo (Figura 4.10A), al intercalarse entre ambos iones  $Zn(II)$ , nuevamente produciendo un leve aumento en la distancia  $Zn1-Zn2$  (0,4 Å). Sin embargo, el grupo carboxilato no se encuentra unido a la Ser223, sino que interactúa por intermedio de una molécula de agua con la Tyr32 de la región no conservada N-terminal de L1. Esto ocasiona una rotación aproximada de 90 ° de las D-bistiazolidinas alrededor del tiol comparada con las L- bistiazolidinas, orientando las bistiazolidinas para hacer interacciones hidrofóbicas con tres residuos (Pro226, Phe156 y Ile162, en gris, Figura 4.10B) de los cuales solo Pro226 es uno de los dos residuos de L1 involucrado en la unión de L-CS319. La estructura de L1:D-VC26 indica que la presencia de un grupo gemdimetilo no afecta este modo de unión (Figura

## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

4.10C). D-VC26 realiza las mismas interacciones hidrofóbicas que D-CS319 y se une con distancias tiol-Zn(II) y Zn1-Zn2 similares. Como en el caso de la estructura de L1:D-CS319, la interacción del carboxilato de D-VC26 con Tyr32 también está mediada por una molécula de agua.



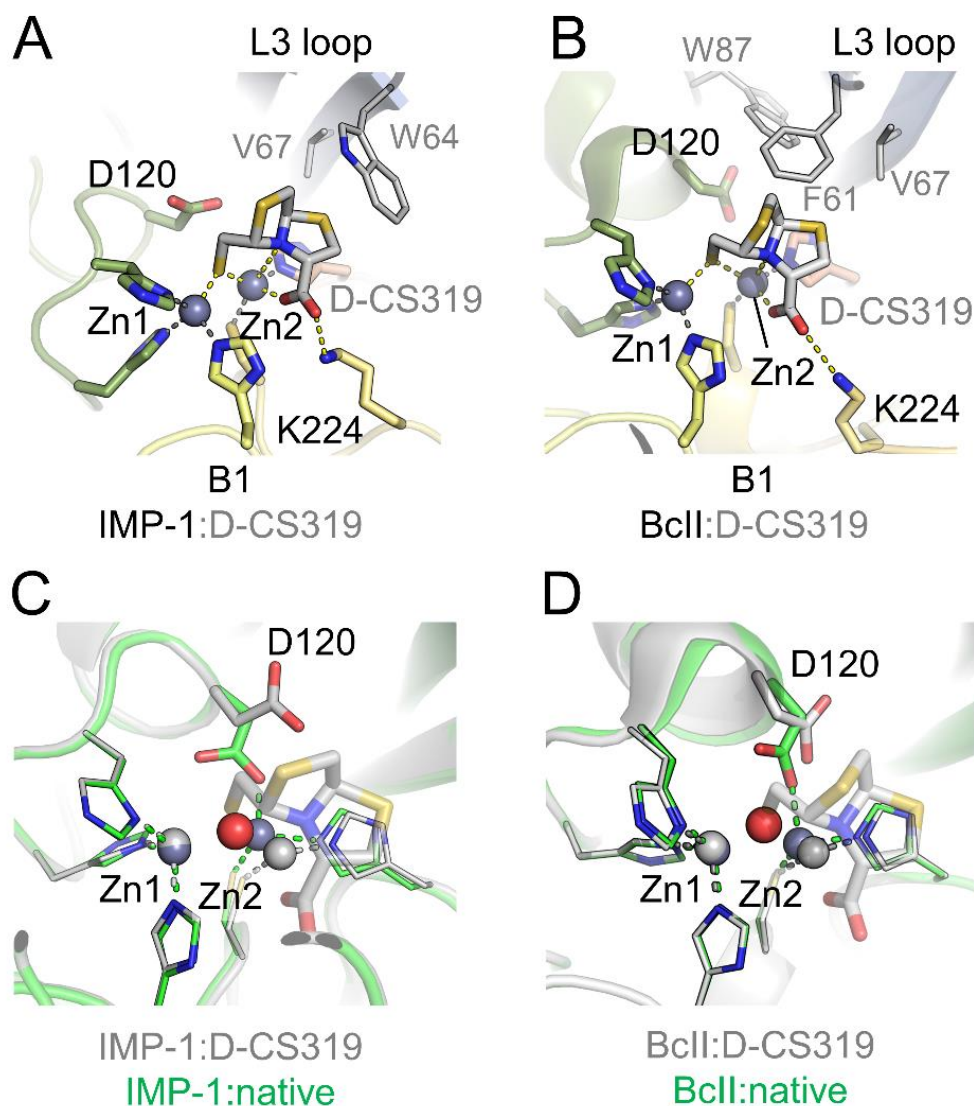
**Figura 4.10.** (A) Vista del sitio activo de L1 unida a D-CS319. (B) Superposición de los aductos L1:D-CS319 y L1:L-CS319. (C) Vista del sitio activo de L1 unida a D-VC26.

### 4.2.4.3. La unión de D-CS319 a las MBLs de subclase B1 involucra múltiples interacciones ligando-Zn(II)

Las estructuras de D-CS319 unido a las enzimas B1 BclI e IMP-1 revelan una unión fuerte del inhibidor a ambos iones Zn(II) al sitio activo. Sin embargo, el modo de unión de las bistiazolidinas no provoca cambios conformacionales globales en ninguna de las dos enzimas (RMSD de 0,41 Å sobre los C $\alpha$  para BclI:D-CS319 comparada con BclI libre, RMSD de 0,28 Å sobre los C $\alpha$  para IMP:D-CS319 comparada con IMP-1 libre). La unión de D-CS319 a IMP-1 muestra cuatro interacciones ligando:zinc, el carboxilato (2,1 Å) y el nitrógeno de fusión (2,8 Å) con el Zn2 y el tiol a puente del Zn1 (2,0 Å) y del Zn2 (2,2 Å), con un aumento de la distancia Zn1-Zn2 de (0,2-0,3 Å) (Figura 4.11A). La unión es favorecida por interacción del carboxilato con la Lys224, como en el caso de la unión de L-CS319 a BclI y L-VC26 a IMP-1. Como en el complejo de IMP-1:L-VC26 y BclI:L-CS319, los residuos Trp64 y Val67 en el

## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

bucle L3 están involucrados en interacciones hidrofóbicas con el inhibidor, con el Trp64 en particular formando interacciones de acoplamiento  $\pi$  con el anillo bicíclico de las bistiazolidinas. Sin embargo, a pesar de que como se señaló en el Capítulo anterior el bucle L3 en NDM-1 puede “cerrarse” sobre el sitio activo al unirse L-CS319, la posición del bucle L3 en IMP-1 es más estable, sin cambios conformacionales evidentes al unirse la bistiazolidinas en comparación a la enzima libre. D-CS319 realiza interacciones muy similares al unirse a BcII (Figura 4.11B), es decir, el carboxilato (2,0 Å) y el nitrógeno de fusión (2,7 Å) con el Zn2, el carboxilato (2,9 Å) con la Lys224, y el tiol equidistante de ambos iones Zn(II) a 2,2 Å, con



**Figura 4.11.** Vista del sitio activo de IMP-1 (A) y BcII (B) unidas a D-CS319. En (C) y (D) se muestra una superposición de las estructuras con las formas de las enzimas libres, respectivamente.

un aumento de la distancia intermetálica de 0,3 Å en comparación con la enzima libre (PDB 4C09). Se forman tres interacciones hidrofóbicas, una con el Trp87 y dos con los residuos Phe61 y Val67 en el bucle L3, las cuales se forman luego de que el bucle se “cierre” aproximadamente entre 3,0-4,6 Å en comparación a su posición en la enzima libre. Como se observó para el complejo de Sfh-I:L-CS319, hay también importantes reacomodamientos en los sitios activos de IMP-1 y BclI al unirse D-CS319. Notablemente, la densidad electrónica define claramente un desplazamiento del ligando de Zn<sup>2+</sup> Asp120 y la consecuente pérdida de la interacción Asp120-Zn<sup>2+</sup>. Por el contrario, el Asp120 se reorienta para formar puentes de hidrógeno con Glu59 (IMP-1) o Ser69 (BclI). Esto da lugar a una geometría tetraédrica irregular para el Zn<sup>2+</sup> y un alejamiento de 1 Å (IMP-1) o 0,7 Å (BclI) del Zn<sup>2+</sup> del Asp120 (Figuras 4.11C-D).

### 4.3. Discusión

En este Capítulo nos propusimos extender el análisis de la capacidad inhibitoria de las bistiazolidinas sobre diferentes enzimas tanto de subclase B1, como de las subclases B2 y B3. La gran capacidad de diseminación que han mostrado las MBLs durante los últimos 25 años nos indica que el desarrollo de inhibidores eficientes que medien la inhibición de estas enzimas deberían ser capaces de atacar no solamente un blanco específico sino también a diversas enzimas de la familia MBL.

Esto sin embargo es un objetivo altamente difícil de conseguir, ya que las enzimas de las distintas subclases presentan estructuras y topologías alrededor del sitio de unión de sustratos muy diferentes entre sí. Es por este motivo que en el presente trabajo de Tesis nos propusimos el desarrollo de inhibidores a partir de las características estructurales de los β-lactámicos y tratando asimismo de simular las interacciones preservadas en complejos de MBLs con productos de reacción, lo cual *a priori* nos daría mayores chances de encontrar un motivo químico que permita obtener altos niveles de inhibición en diferentes enzimas.

En este Capítulo nos enfocamos en el estudio de las enzimas IMP-1, BclI, Sfh-I, L1 y GOB-18. La enzima IMP-1 es una típica enzima de subclase B1, altamente diseminada alrededor del mundo y con un alto impacto en la clínica, mientras que la enzima BclI es una

**Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs**

enzima ampliamente utilizada en el laboratorio como modelo mecanístico y de evolución. La enzima Sfh-I es mononuclear y carbapenemasa exclusiva, típica de las MBLs de subclase B2. Finalmente, las enzimas L1 y GOB-18 son MBLs de subclase B3 y de amplio espectro de sustrato que han sido ampliamente estudiadas como modelo mecanístico [138-141].

El análisis *in vitro* de las bistiazolidinas indicó que estos compuestos son capaces de inhibir eficientemente a todas las MBLs analizadas, con constantes de inhibición ( $K_i$ ) que varían desde 0,26 a 84  $\mu\text{M}$ . Para el caso de IMP-1 hubo una leve preferencia por los compuestos sin el grupo gemdimetilo, mientras que la estereoquímica resultó un factor menos determinante en cuanto a la potencia inhibitoria. Al contrario, para el caso de BclI hubo una leve preferencia de los derivados L- sobre los D-, mientras que el grupo gemdimetilo parece no ser un factor importante en la eficiencia inhibitoria. En el caso de Sfh-I hay una clara preferencia por los derivados L- con respecto a los D-, con una diferencia de dos órdenes de magnitud en cuanto a los valores de  $K_i$ . Esto demuestra una fuerte dependencia de Sfh-I con respecto a la estereoquímica de los compuestos, no evidenciada en los otros casos analizados en esta Tesis. Finalmente, en el caso de GOB-18 se observa una leve preferencia hacia el compuesto gemdimetilado D-VC26, mientras que para la enzima L1 los valores de  $K_i$  resultaron similares en todos los casos.

La técnica de RMN nos permitió monitorear la interacción del compuesto L-CS319 en el sitio activo de BclI. El análisis de este experimento sugiere que numerosos residuos se perturban en el sitio activo (por ejemplo, en los bucles adyacentes al mismo como L3, L7, y L10), por motivos que pueden ser tanto por interacción directa (debido al compuesto) como indirectos (debido a la perturbación del compuesto sobre residuos adyacentes). El mapeo de dicha interacción evidencia que en solución residuos que se encuentran debajo del bucle L3 son perturbados, posiblemente por efecto indirecto sobre residuos superficiales. Una hipótesis interesante a explorar sería si bistiazolidinas derivatizadas con grupos químicos hidrofóbicos y flexibles serían capaces de introducirse en la base del bucle L3 e interactuar en forma directa con este "bolsillo". En relación a esto, se ha reportado un inhibidor de la enzima VIM-2 que presenta un tipo de interacción similar en esta región [142].

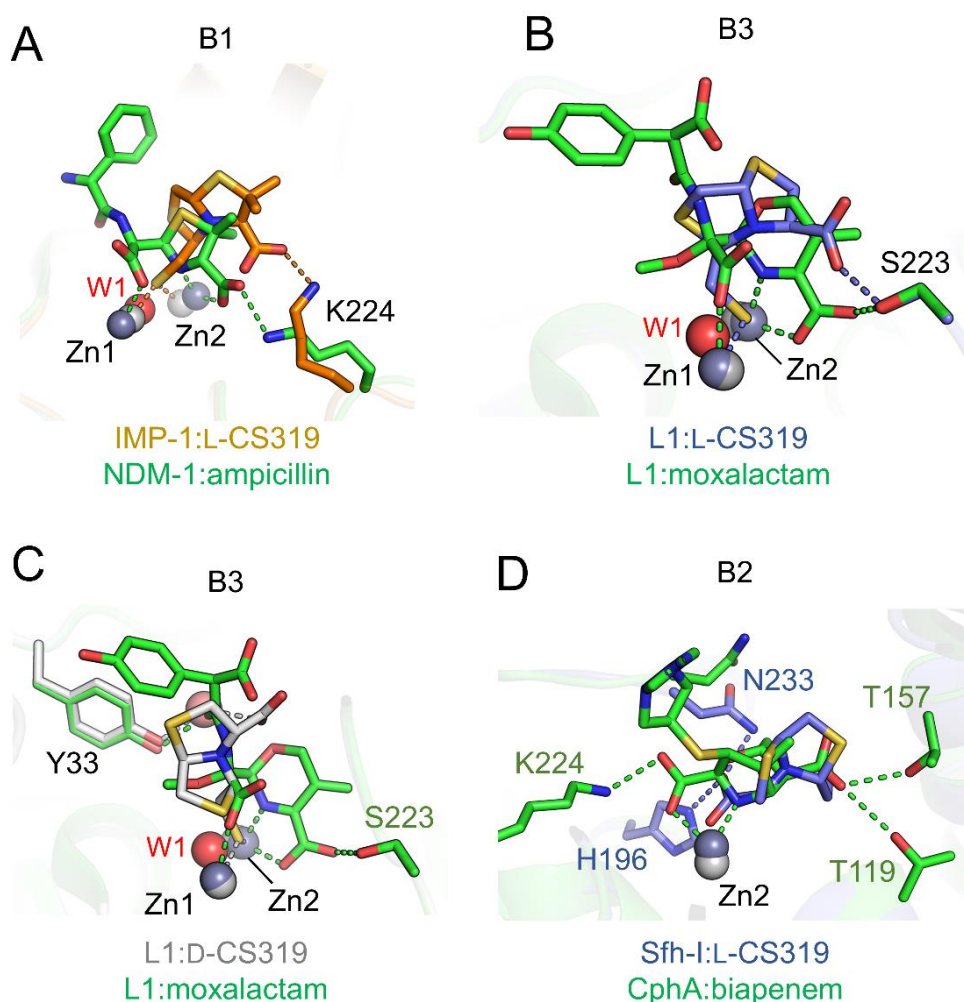
## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

Los ensayos de inhibición mediante curvas de muerte celular indicaron que los compuestos presentan capacidad de restablecer la susceptibilidad hacia imipenem en células de *E. coli* que expresan las MBLs como así también restablecen la susceptibilidad hacia ticarcilina y clavulanato en cepas de *S. maltophilia* que expresan L1. En particular, en el caso de la cepa productora de IMP-1 se observó un efecto sinérgico tanto a 300 como a 500 minutos de comenzar el experimento, con una mayor actividad de los estereoisómeros de la serie D-. En el caso de las células que expresan BclI, y paralelo a los resultados *in vitro* con la enzima purificada, las bistiazolidinas mostraron un efecto relativamente leve contra esta enzima. Para la cepa productora de Sfh-I se observó un efecto muy potente en el caso del compuesto L-CS319, ya que no se evidenció presencia celular en ninguna de las 3 repeticiones del ensayo, confirmando la alta selectividad de este compuesto como se había observado *in vitro* con la enzima purificada. Es de remarcar que tanto el compuesto L-VC26, el cual muestra un efecto inhibitorio similar al del L-CS319 *in vitro*, como los compuestos dimetilados, no producen un efecto inhibitorio significativo en estos ensayos, no pudiéndose explicar por el momento esta falta de actividad en las células. Finalmente, para los casos de las cepas productoras de L1 y GOB-18, se observa un efecto similar y relativamente potente para los 4 compuestos tanto a 300 (8 h para el caso de *S. maltophilia*) como a 500 minutos (12 h para el caso de *S. maltophilia*) de comenzar el experimento.

La obtención de las estructuras cristalográficas entre las bistiazolidinas y las MBLs nos permite hacer un análisis comparativo con las estructuras reportadas entre MBLs y productos de hidrólisis. La comparación de las L-bistiazolidinas:MBL y producto:MBL destacan tanto similitudes como diferencias en los modos de unión. Las MBLs de subclase B1 y B3 unen el antibiótico en forma similar, ejemplificado por las estructuras NDM-1:ampicilina y L1:moxalactam. En el caso de la unión de las bistiazolidinas, la Lys224 (B1) y la Ser223 (B3) estabilizan la unión por interacción con el carboxilato del ligando. Sin embargo, en las enzimas de subclase B1 y B3 la unión del antibiótico se caracteriza también por interacciones sustanciales del Zn<sup>2+</sup> con el nitrógeno y el carboxilato del β-lactámico, interacciones que no están presentes en los complejos L-CS319:MBL. La ausencia de esta interacción entre el nitrógeno de las bistiazolidinas y el Zn<sup>2+</sup> es consistente, sin embargo, con diversos modelos del mecanismo de MBLs que dan cuenta de una interacción entre el Zn<sup>2+</sup> y

## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

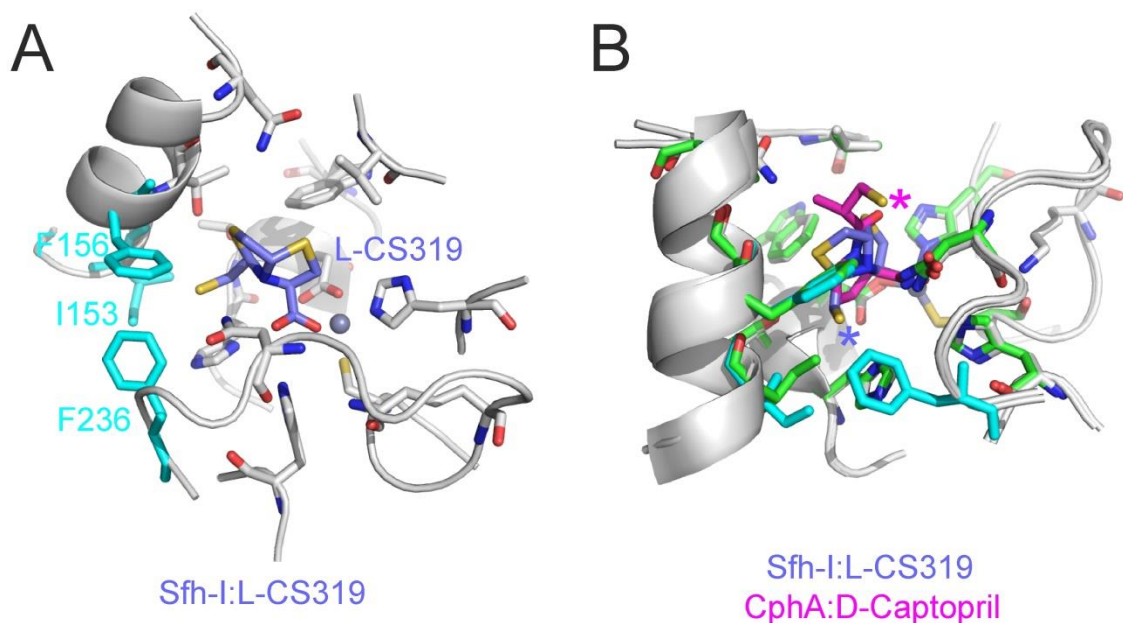
el nitrógeno sólo después de que el enlace amida se ha roto y el anillo  $\beta$ -lactámico se ha abierto [116]. Por otro lado, la unión de bistiazolidinas involucra la unión a puente del grupo tiol entre Zn1 y Zn2, y el desplazamiento del agua nucleofílica (W1), mientras que en los complejos con el antibiótico hidrolizado la W1 está presente (Figura 4.12A-B). La unión de D-CS319 a L1 también involucra menores interacciones con el Zn2 que la del antibiótico hidrolizado, aunque es de notar que la Tyr32, la cual ayuda a estabilizar la unión del inhibidor por interacción con el carboxilato de la bistiazolidina también estabiliza la unión del antibiótico a través de interacciones con el oxígeno carbonílico del moxalactam (Figura 4.12C).



**Figura 4.12.** Comparación del modo de unión de los antibióticos con el de las bistiazolidinas.

## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

En forma similar a lo que ocurre con las enzimas B1 y B3, la caracterización estructural del biapenem hidrolizado unido a la enzima B2 CphA revela que el antibiótico interactúa con el Zn<sup>2+</sup> por medio del nitrógeno del anillo β-lactámico y por el carboxilato, y por puente de hidrógeno con la Lys224, Thr157 y Thr119 (Figura 4.12D). En comparación, solo el grupo carboxilato de la bistiazolidinas interactúa con el ion Zn(II) de Sfh-I, y dos residuos que no están involucrados en la unión del antibiótico a CphA, His196 y Asn233, están a distancia de puente de hidrógeno de L-CS319. Sin embargo, en las enzimas B2 tales como CphA y Sfh-I, se piensa que residuos hidrofóbicos conservados en la larga hélice α<sub>3</sub> que rodea el sitio activo forman una “pared hidrofóbica” que contribuye a la unión selectiva de los carbapenemes. Incluso, varios residuos hidrofóbicos en esta “pared” estabilizan la unión del biapenem hidrolizado a CphA, es decir, Tyr59, Val67, Trp87, Tyr164, Pro165 y Phe236, junto con Ile153, Phe156 y Leu161 en la hélice α<sub>3</sub>. Es interesante destacar, al contrario de lo que ocurre en la estructura del captopril unido CphA (Figura 4.13), el grupo tiol en L-CS319 se encuentra localizado en esta cavidad, rodeado por los residuos Trp87, Ile153, Phe236 y

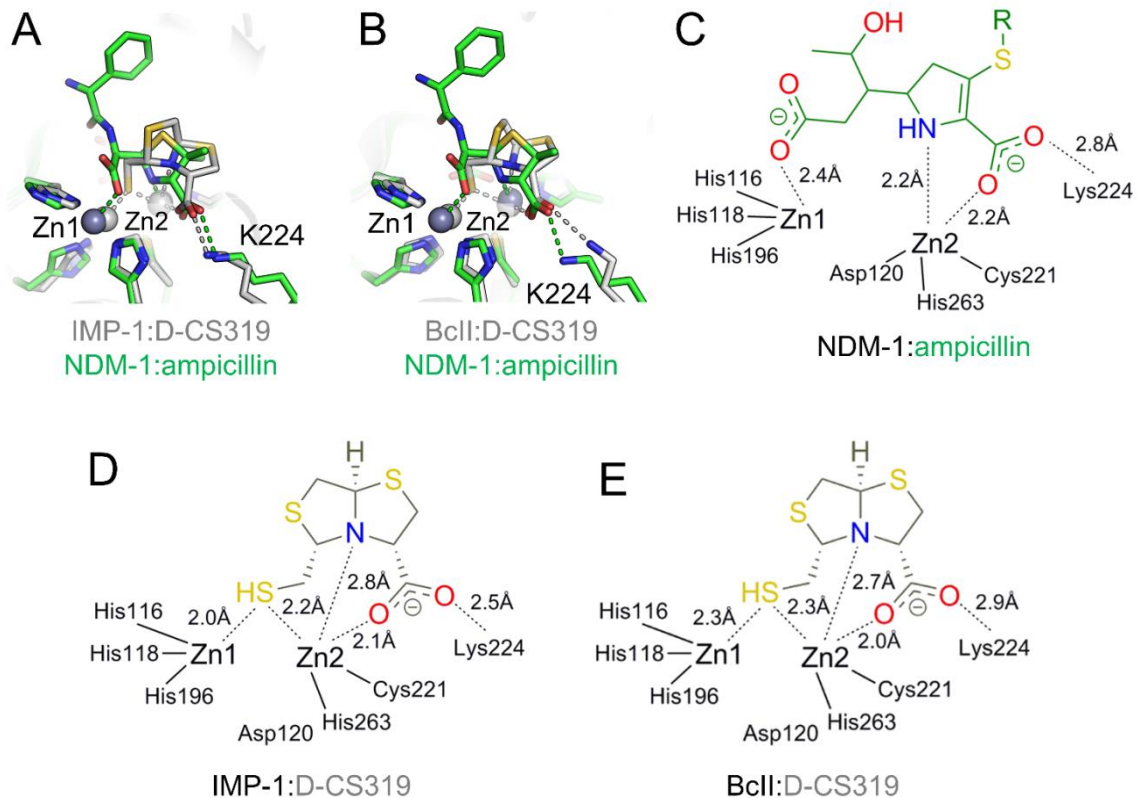


**Figura 4.13.** (A) Vista del modo de unión de L-CS319 a Sfh-I. Se muestra en celeste residuos de la región hidrofóbica α<sub>3</sub>. (B) Comparación con respecto a la unión de D-captopril a CphA (residuos coloreados en verde, el resto en forma estándar). El D-captopril se muestra con los carbonos en rosa, el resto en forma estándar. Se señala con un \* la distinta conformación que adopta el tiol libre en ambos casos.

## Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs

Phe156, indicando que la “pared hidrofóbica” de las MBLs B2 no sólo juega un rol importante en la unión y estabilización del sustrato, sino también en la unión de las bistiazolidinas. Este análisis sugiere que solo las L-bistiazolidinas adoptan una conformación adecuada capaz de unirse en forma eficiente al sitio activo de Sfh-I.

En comparación con lo que se observa para los complejos L- bistiazolidinas:MBLs, o para la unión de D-bistiazolidinas a L1, el modo de unión de D-CS319 a las MBLs B1 IMP-1 y BclI difiere sustancialmente, y el modo de unión se asemeja mucho más al observado para los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Figura 4.14A-B). Esto es particularmente evidente con respecto a las interacciones que involucran al Zn2 y a la Lys224, como se observa al comparar complejos IMP-1:D-CS319 y BclI:D-CS319 con el de ampicilina hidrolizada unida a NDM-1. Imágenes esquemáticas de estas interacciones se observan en la Figura 4.14, revelando las similitudes en las distancias de enlace entre los ligandos y las MBLs. En particular, tanto el carboxilato de las bistiazolidinas como de la ampicilina interactúan con el Zn2 (2,0-2,2 Å) y por puente de hidrógeno al N $\epsilon$  de la Lys224 (2,5-2,9 Å). Además, aunque el nitrógeno del  $\beta$ -



**Figura 4.14.** Comparación del modo de unión de las bistiazolidinas de la serie D- a enzimas B1 con respecto al modo de unión de los  $\beta$ -lactámicos.

**Ensayo de bistiazolidinas como inhibidores de amplio espectro de MBLs**

lactámico se encuentra a sólo 2,2 Å de distancia del Zn<sup>2+</sup>, en los complejos D-CS319:MBLs aún se dispone a distancia de enlace (2,7-2,8 Å). A pesar de que este análisis da cuenta de un modo de unión más similar a la unión de los β-lactámicos, las  $K_i$  indican que las D-bistiazolidinas no son más efectivos inhibidores de las MBLs B1. Una posible explicación a esto podría deberse al hecho de que se produce una disrupción energéticamente desfavorable de la interacción entre el Asp120 y el Zn<sup>2+</sup> en estos complejos, la cual podría deberse a la tensión conformacional inducida por la orientación que adoptan las D-bistiazolidinas en el sitio activo, guiada principalmente por la unión del tiol al sitio metálico.

Como conclusión podemos afirmar que las bistiazolidinas son capaces de inhibir a MBLs de todas las subclases, incluyendo enzimas clínicamente relevantes de patógenos oportunistas, tales como *E. coli*, *P. aeruginosa* o *S. maltophilia*, las cuales pueden causar infecciones que pongan en riesgo las vidas de los pacientes. La capacidad de las bistiazolidinas de unirse en múltiples orientaciones en diversos sitios activos de MBLs, así como también la presencia de dos grupos funcionales que juntos permiten la unión tanto a sitios mono como dinucleares, son claves para la potencia inhibitoria. Por otro lado, la unión de los enantiómeros D- al sitio activo de las enzimas B1 replican varias de las interacciones observadas para la unión de los β-lactámicos en complejos cristalográficos con MBLs. Por lo tanto, las bistiazolidinas son un motivo químico novedoso, versátil y, en consecuencia, susceptible de mejoramiento por métodos sintéticos que agreguen grupos capaces de interactuar en el sitio activo de las MBLs.

## Capítulo 5

# Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución

### 5.1. Introducción

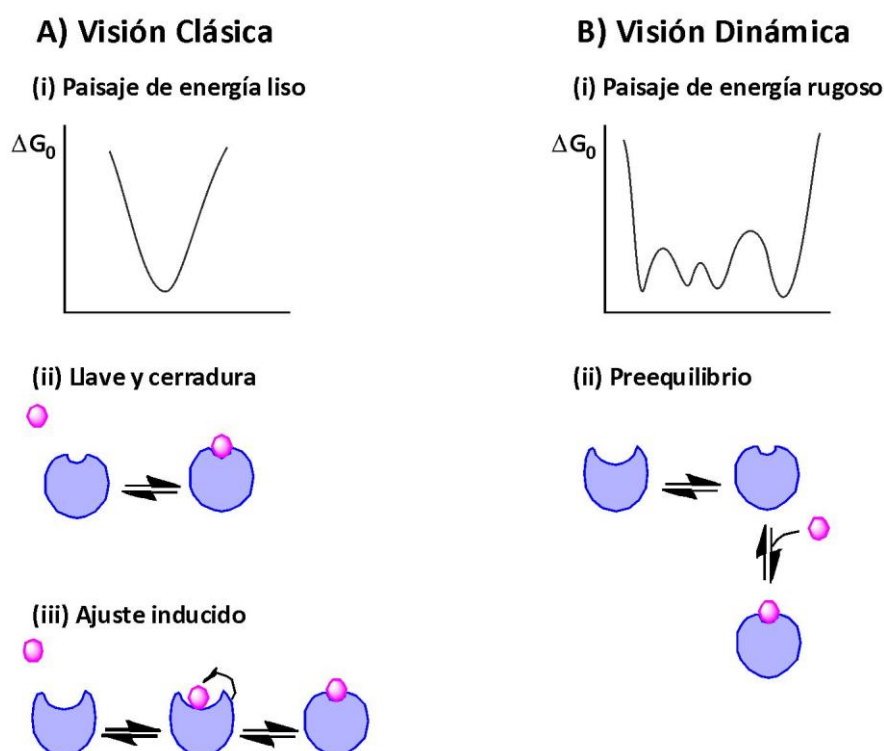
#### 5.1.1. La estructura proteica: una visión avant-garde

Los organismos complejos han evolucionado a partir de un número limitado de genes y proteínas primordiales. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las primeras proteínas evolucionaron y luego sirvieron como precursoras de la actual diversidad de funciones proteicas se desconocen. A la luz de nuevos resultados surgidos en los últimos años, el paradigma “una secuencia, una estructura, una función” ha sido objeto de cuestionamientos [143]. Las proteínas (cuya visión clásica las asume como provistas de un único plegamiento rígido) existen como un conjunto de diferentes conformaciones en equilibrio antes de encontrar un sustrato o un hapteno. Esto ha promovido una “nueva visión” sobre la estructura y función proteica, en donde la diversidad conformacional provee un mecanismo para el control de la activación proteica y permite la multifuncionalidad de las mismas [144,145].

Tradicionalmente, se asume que una dada secuencia dicta una única estructura tridimensional de la cual depende la función de la proteína. Esta visión se manifiesta en los modelos mecanísticos clásicos de “llave y cerradura” y de “ajuste inducido” [146,147], en los cuales la estructura está totalmente fija o cambia (localmente, alrededor del sitio activo) solamente luego de la unión de un ligando (Figura 5.1). Ambos modelos fueron fuertemente sostenidos por el principal método usado para el estudio de la estructura proteica: la cristalografía de rayos X. Sin embargo, la cristalización es por definición un proceso de purificación que lleva a la obtención de moléculas conformacional y químicamente homogéneas. La estructura cristalina de una proteína puede no ser la única conformación que adopte en solución y, debido a la influencia de las fuerzas de empaquetamiento en el cristal, puede no ser incluso la más representativa. Por ejemplo, el modelo de “llave y

## Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución

cerradura” se asumió en el caso de un anticuerpo unido y libre, dadas las estructuras idénticas obtenidas [148]. Sin embargo, estudios de cinética en estado preestacionario revelaron posteriormente un preequilibrio entre dos isómeros del anticuerpo, solo uno de los cuales se une al hapteno con alta afinidad. Estudios de cinética llevados a cabo en el medio de cristalización mostraron que el mismo altera el equilibrio a favor del isómero de alta afinidad, explicando por qué la misma estructura se observó en presencia y en ausencia del hapteno [148].



**Figura 5.1.** Paisajes de energía esquemáticos y modelos de función en proteínas. (A) El modelo “clásico” describe un paisaje de energía de un único conformero estable (i) y un modo de función de llave y cerradura (ii) o de ajuste inducido (iii). (B) La “visión dinámica” establece un conjunto de conformeros de similar energía (i), y un modo de funcionamiento basado en un equilibrio entre dos (o más) isómeros preexistentes, solo uno de los cuales ejecuta la función (ii).

La magnitud de la diversidad conformacional observada en proteínas abarca desde fluctuaciones de las cadenas laterales al movimiento de bucles y estructuras secundarias, e incluso reacomodamientos globales de estructura terciaria. La técnica de RMN se ha mostrado particularmente exitosa en revelar la verdadera diversidad conformacional en

**Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución**

proteínas [80,149,150]. Los análisis de RMN han demostrado que las proteínas pueden, de hecho, adoptar muchas conformaciones alternativas en solución en ausencia del ligando. Ejemplos notables de este comportamiento constituyó el hallazgo de las proteínas intrínsecamente desordenadas, la identificación de proteínas y dominios que interconvierten espontáneamente entre diferentes estructuras secundarias y la determinación de conformaciones activas preexistentes en proteínas alostéricas [144,151-154].

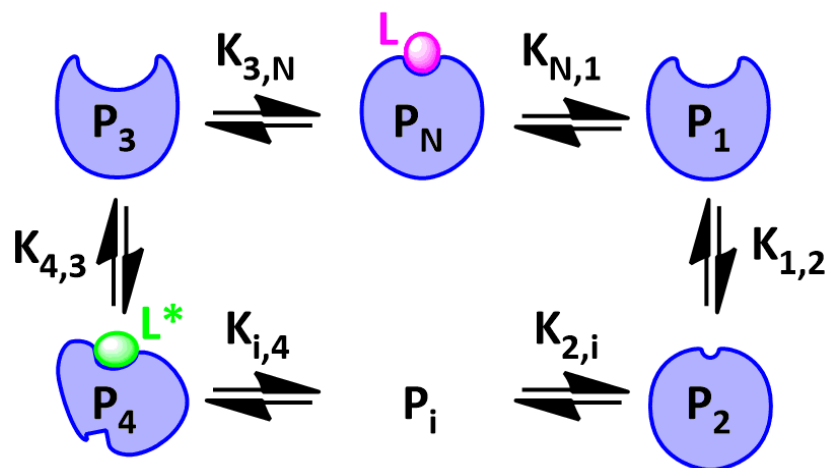
El modelo de regulación alostérica de Monod-Wyman-Changeux (MWC) reconoció por primera vez la posibilidad de la existencia de un equilibrio entre conformaciones preexistentes [155]. Este modelo posee un elemento esencial de la “visión dinámica”, es decir, una única proteína equilibrando libremente (en ausencia del ligando) entre dos isómeros estructurales (Figura 5.1). Un ejemplo bien caracterizado de diversidad conformacional a nivel de estructura secundaria proviene de los trabajos con el dominio de unión a ADN del represor Arc [156]. El represor mutante Arc-N11L interconvierte espontáneamente entre una estructura de dos cadenas de láminas  $\beta$  antiparalelas y dos hélices  $3_{10}$ . En ausencia del ligando (ADN), estas dos conformaciones diferentes están en un preequilibrio en proporción casi igual. La adición de ADN, cambia el equilibrio hacia la forma de lámina  $\beta$  [156].

Una consecuencia interesante de la diversidad conformacional es que provee un mecanismo para la diversidad funcional. Una proteína que adopta varias conformaciones diferentes podría, en principio, ejecutar o adaptarse a varias funciones diferentes [157]. Se han identificado un significativo número de proteínas que exhiben múltiples actividades [158,159], pero el mecanismo detrás de esta promiscuidad o reactividad cruzada, en la mayoría de los casos, involucra la misma configuración del sitio activo que confiere la actividad original. Aun así, las mismas características del sitio activo pueden ser reclutadas para la catálisis de actividades muy distintas. Por tanto, la misma actividad puede encontrarse en proteínas no relacionadas debido a que comparten características similares en el sitio activo [160-166].

### 5.1.2. Diversidad conformacional y evolución proteica

Durante la década de 1930, Karl Landsteiner y Linus Pauling [145] propusieron que las proteínas (anticuerpos en este caso) pueden existir como un conjunto de isómeros con diferentes estructuras pero con energías libres similares. En su momento postularon que si cada isómero era capaz de unirse a un ligando diferente, entonces la diversidad funcional podía ir mucho más allá de la diversidad de secuencia. Esta conclusión además posee importantes implicancias en relación a la evolución de proteínas en general.

La limitación de diversidad de secuencia es un problema fundamental en la evolución de proteínas. El número general de permutaciones para una proteína de 100 aminoácidos es  $\sim 20^{100}$  ( $\sim 10^{130}$ ), mientras que el número total de diferentes genes en la biosfera es  $>100$  órdenes de magnitud más pequeño ( $\sim 10^{13}$ ). Por tanto, el proceso evolutivo muestrea una fracción increíblemente pequeña del espacio de secuencia pero puede, de alguna forma, alcanzar una diversidad enorme, quizás irrestricta. Incluso si asumimos que la diversa gama de proteínas actuales han evolucionado a partir de un puñado de proteínas primordiales, aún queda por explicar cómo estas proteínas primordiales evolucionaron en primer lugar. Además, aunque la duplicación génica explica cómo los genes existentes son liberados para evolucionar nuevas funciones, la misma no explica cómo se generan las nuevas funciones. ¿Pueden las mutaciones y la deriva explicar esta aparición? ¿Pueden explicar la evolución de nuevas proteínas en la naturaleza en una escala de tiempo de décadas? Después de todo, la evolución Darwiniana se basa en la evolución del gen que confiere una ventaja selectiva desde la primera etapa de su desarrollo. Este paradigma presenta, sin embargo, una contradicción: una nueva función puede evolucionar solamente si la misma ya está presente en algún grado, de otra forma el organismo no sobreviviría y el proceso evolutivo no podría comenzar. Así, parece una proposición interesante que la naturaleza evolucione nuevas funciones mediante el reclutamiento de actividades promiscuas existentes y luego las mejore gradualmente (Figura 5.2). Las mutaciones pueden cambiar el equilibrio hacia dichas funciones y estructuras alternativas y, de esta manera, constituir el material de partida sobre el cual actúa la selección natural. De esta forma, la diversidad conformacional y la promiscuidad funcional pueden considerarse rasgos de la capacidad evolutiva de una proteína [167].



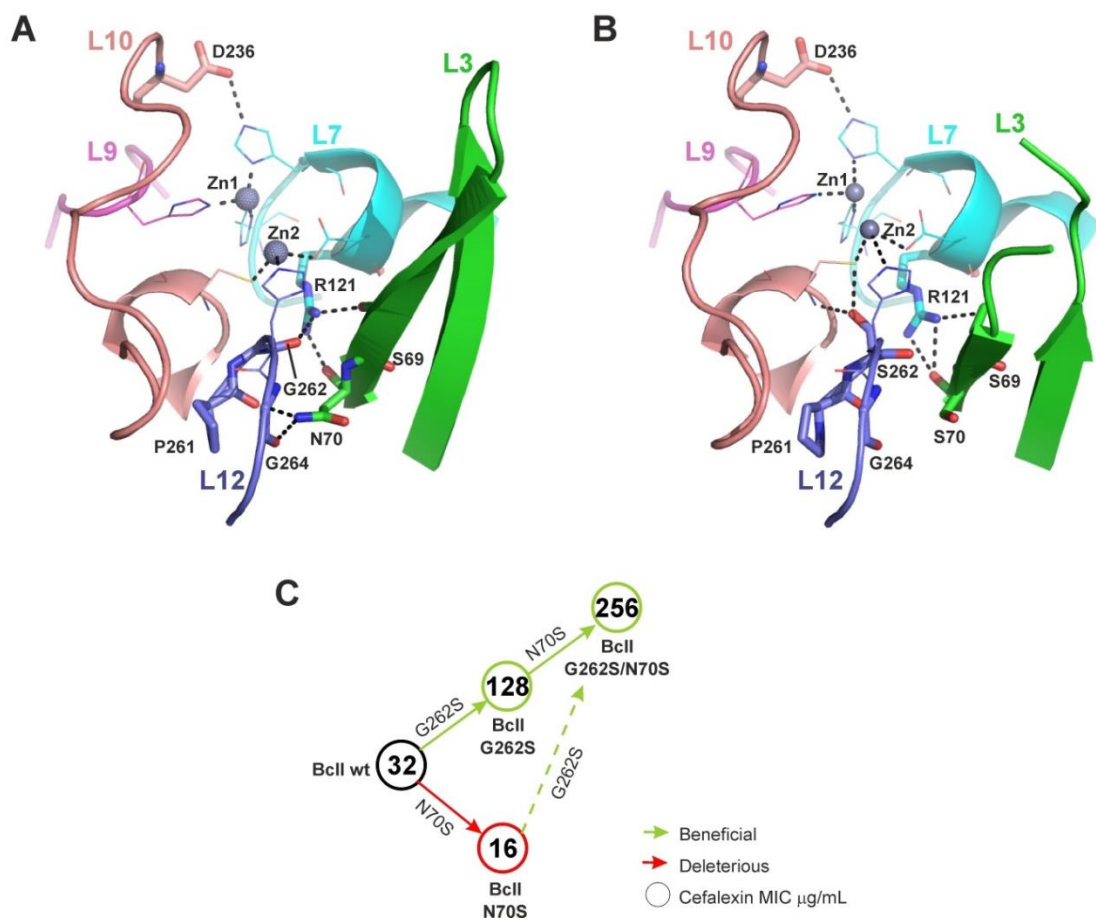
**Figura 5.2.** La dinámica de la estructura y función proteica y la “evolucionabilidad” de las proteínas. Las proteínas son capaces de unirse a su ligando natural L en su estado nativo ( $P_N$ ). Los conformeros alternativos se relacionan por variaciones estructurales que abarcan desde rotaciones de cadenas laterales y reacomodamientos de bucles del sitio activo a transiciones de plegamiento globales. Los conformeros minoritarios (por ejemplo,  $P_4$ ) podrían mediar funciones alternativas, tales como la interacción promiscua con  $L^*$  (donde  $L^*$  es un ligando diferente a aquel para el cual la proteína evolucionó). Las mutaciones pueden alterar gradualmente este equilibrio de manera tal que los conformeros poco poblados se vuelvan más favorables con efectos sobre la correspondiente función promiscua. De forma similar, una mayor especificidad podría evolucionar por medio de mutaciones que reducen la ocupancia de ciertos conformeros promiscuos.

### 5.1.3. Las MBLs como modelos de evolución: el caso de BclI

La MBL de *Bacillus cereus* BclI (una bacteria del suelo no presente en infecciones hospitalarias) ha sido utilizada ampliamente por nuestro grupo como modelo evolutivo y mecanístico [32,33,57,58,69]. Las características estructurales y funcionales de la enzima BclI, han llevado a postular que la misma es un precursor evolutivo de MBLs más eficientes aisladas de bacterias patógenas. Por lo tanto, y para explorar el potencial evolutivo de esta enzima, durante el trabajo de tesis del Dr. Pablo Tomatis, se realizó un estudio de evolución molecular dirigida (EMD) de BclI, que permitió obtener una variante optimizada la cual es capaz de conferir una mayor resistencia a antibióticos a la bacteria hospedadora (Figura 5.3C). El estudio funcional de esta enzima optimizada reveló que la EMD fue capaz de mejorar notablemente la actividad frente a un sustrato pobremente hidrolizado por la enzima silvestre (cefalexina), sin afectar drásticamente sus capacidades hidrolíticas frente a otros sustratos. En otras palabras, la EMD dio lugar a una enzima optimizada con un espectro de sustrato expandido [57]. Sorprendentemente, las mutaciones que indujeron

**Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución**

estos cambios no están en el sitio activo de la enzima. La estructura cristalográfica de la mutante sugiere que dos de estas mutaciones (N70S y G262S), ubicadas en la base de bucles que rodean el sitio activo (Figura 5.3A-B), serían los principales efectores de la expansión del perfil de sustrato, posiblemente aumentando la heterogeneidad conformacional y flexibilidad de estos bucles [58]. Sin embargo, la evidencia experimental obtenida hasta el momento consistió en simulaciones de dinámica molecular en la escala de los nanosegundos, una escala de tiempo poco relevante para los eventos de catálisis que ocurren en estas enzimas.



**Figura 5.3.** Estructura de BclI silvestre (A) y mutante conteniendo las mutaciones N70S y G262S (B). Se denotan los sitios Zn1 y Zn2 como esferas grises, los ligandos de metal como figuras de líneas y las posiciones 69, 70, 121, 236, 261, 262 y 264 como figuras de tubos. En (C) se muestra la trayectoria evolutiva epistática seguida por BclI durante la evolución desde la enzima silvestre a la mutante optimizada BclI G262S/N70S. Los valores de CIM, tomados de [69], son ordenados secuencialmente de acuerdo al aumento de las mutaciones. Las flechas indican si la mutación es beneficiosa (verde) o deletérea (rojo) en ese contexto genético. Los colores de los círculos indican si la variante muestra un incremento (verde) o una disminución (rojo) en el valor de CIM relativo a la enzima silvestre.

Por otra parte, en otro de los trabajos llevados a cabo en el laboratorio durante la tesis de la Dra. Rocío Meini, se determinó que la actividad catalítica y la afinidad por Zn(II) son los rasgos dominantes en este sistema modelo. La estabilidad proteica no mostró ser relevante, en contraste con otros sistemas [168-171]. En la vía evolutiva favorecida, las mutaciones G262S y N70S incrementan la actividad contra cefalexina dos órdenes de magnitud con respecto a la enzima silvestre [58]. La mutación G262S es responsable del aumento de la eficiencia catalítica de la enzima, pero a costa de disminuir la afinidad por los iones metálicos, rasgo funcional clave en las MBLs. Por el contrario, la mutación N70S es deletérea para la enzima silvestre. Sin embargo, cuando la mutación N70S se introduce en el contexto de la variante BcII G262S es capaz de restaurar la afinidad por metal afectada por G262S [69], dando lugar a un mayor fenotipo de resistencia. Esto es un claro ejemplo de lo que se conoce como epistasis de signo, la cual limita el número de trayectorias de mutaciones disponibles a la selección, debido a que algunas vías hacia un óptimo contienen disminuciones en la capacidad de adaptación (Figura 5.3C) [69,172].

En virtud de todos estos resultados, decidimos explorar la hipótesis acerca de cómo afectan estas mutaciones a la flexibilidad conformacional en las MBLs durante estos procesos evolutivos y, del mismo modo tratar de determinar de qué modo se modularía la afinidad por metal en estas enzimas. Por este motivo, decidimos estudiar a las distintas variantes de BcII obtenidas por EMD utilizando la RMN, una técnica que nos provee información dinámica y estructural sitio específica en solución y en distintas escalas de tiempo.

## 5.2. Resultados

### 5.2.1. Expresión de las MBLs

Como se comentó en el Capítulo anterior, construimos vectores pET28 mediante la introducción de los genes que codifican para la enzima BcII silvestre y para las variantes optimizadas BcII G262S y BcII G262S/N70S, así como también para la variante BcII N70S. Posteriormente, realizamos la puesta a punto de la expresión y purificación de estas enzimas, las cuales fueron purificadas a homogeneidad y llevadas a solución buffer 100 mM MES a pH 6,4, 200 mM NaCl y 10% D<sub>2</sub>O. El contenido de metal de cada variante fue similar y

**Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución**

se indica en la Tabla 5.1. El rendimiento promedio de las variantes fue de alrededor de 10 mg de proteína por litro de medio mínimo suplementado con los isótopos  $^{15}\text{N}$  o  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  según se requiriera para su análisis por RMN.

Variante	Contenido de metal
BcII silvestre	$1,7 \pm 0,1$
BcII N70S	$1,8 \pm 0,1$
BcII G262S	$2,0 \pm 0,1$
BcII G262S/N70S	$2,0 \pm 0,1$

**Tabla 5.1.** Contenido de metal de las variantes analizadas en este capítulo.

### 5.2.2. Asignación de los espectros $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC

Todas las enzimas resultaron estables durante el tiempo experimental y las medidas se realizaron a 298 K. La asignación de la enzima silvestre realizada a 308 K y disponible en la literatura fue ajustada a las condiciones empleadas en este trabajo [173]. Para la asignación de las mutantes de BcII realizamos los siguientes experimentos: HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH y HNCACB, los cuales se utilizaron para la asignación de los átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . De los 222 residuos presentes en BcII (excluyendo 5 residuos de Pro) pudimos asignar 211 para las variantes silvestre y N70S, 206 para la variante G262S y 205 para la doble mutante G262S/N70S. Los 11 residuos que no pudieron ser asignados en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC en la enzima silvestre y en la variante N70S son: los tres residuos N-terminal (Ser27, Gln28, Lys29), Lys50, Asn62, Ser77, Lys102, Ala119, Asn184, Gly193 y Asn233. Las señales correspondientes a estos residuos tampoco pudieron identificarse en las variantes G262S y N70S/G262, junto con los residuos Ile96, Cys221, Lys224, Gly264 y Leu283 en BcII G262S y Asp120, Cys221, Val223, Lys224, Gly264 y Leu283 en BcII G262S/N70S, la mayoría de los cuales se localizan cerca del sitio activo. De esta forma, estos residuos están involucrados en un proceso de intercambio químico cuya frecuencia reside en una escala de tiempo intermedia en la escala de los desplazamientos químicos que ensancha a las señales más allá del límite de detección (ver sección 5.2.4).

### 5.2.3. Efecto de las mutaciones en residuos de la primera y segunda esfera de coordinación

Una de las propiedades más importantes para la capacidad de conferir resistencia en las MBLs consiste en la afinidad que posean para unir a los iones metálicos, los cuales son esenciales para la unión e hidrólisis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos [174]. Por lo tanto, el siguiente paso consistió en analizar cómo se afectan las señales en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC correspondientes a los residuos de la primera y segunda esfera de coordinación debido a la introducción de cada mutación. El objetivo fue determinar si el agregado de una misma mutación en diferente contexto genético produce un efecto diferencial en la posición de las señales de los residuos que intervienen en la unión a metal. La cuantificación de la perturbación del desplazamiento químico (PDQ) de cada señal en el espectro se determinó en base a la ecuación 5.1:

$$\text{PDQ} = \sqrt{\Delta(^1\text{H})^2 + \frac{\Delta(^{15}\text{N})^2}{25}}$$

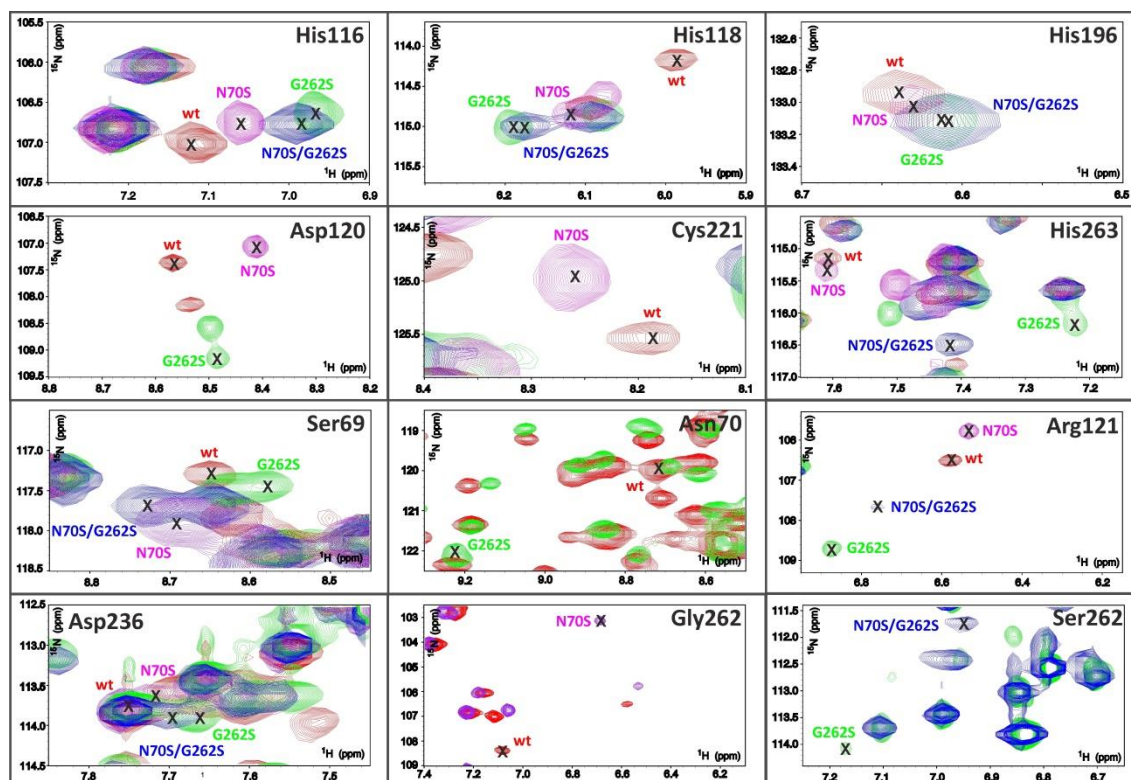
Ecuación 5.1

donde  $\Delta(^1\text{H})$  y  $\Delta(^{15}\text{N})$  corresponden a la diferencia (en ppm) entre los valores de desplazamiento químico de  $^1\text{H}$  y  $^{15}\text{N}$ , respectivamente, determinados para las señales de un dado residuo entre dos variantes de la enzima. La Tabla 5.2 resume los valores de PDQ observados.

En primer lugar analizamos el efecto de la mutación G262S sobre la enzima silvestre. Al comparar estas dos variantes vemos que los residuos His116 y His118 (en el sitio Zn1), Asp120 y His263 (en el sitio Zn2), así como también el residuo de segunda esfera de coordinación Arg121, son altamente perturbados por la introducción de esta mutación. En el caso de la Cys221, este residuo no se encuentra asignado en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC en la mutante BcII G262S lo cual indica que pasa a un régimen de intercambio químico intermedio en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos. Por último, cabe señalar en este momento que el residuo His196 (el cual completa la coordinación al sitio Zn1) queda prácticamente inalterado en todas las variantes analizadas.

## Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución

Seguidamente analizamos el efecto de la mutación N70S sobre la enzima silvestre. En este caso, la comparación indica que los residuos His116, His118, Asp120, Cys221 y Arg121 son poco perturbados por la introducción de esta mutación. Por otro lado, His263 permanece casi inalterada con respecto a su posición en el espectro de la enzima silvestre. Esto indica que el efecto global en términos de PDQ de la mutación N70S sobre la enzima silvestre en los residuos de unión a metal abarca ambos sitios, aunque en general es menor al que produce la mutación G262S.



**Figura 5.4.** Se muestran las señales en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de cada residuo de la primera y segunda esfera de coordinación de BclII.

Finalmente, y siguiendo el análisis a través de la vía evolutiva favorecida (Figura 5.3C), consideramos el efecto de la mutación N70S sobre la variante BclII G262S. En este caso, observamos que los residuos de unión al Zn1 permanecen inalterados al comparar las señales de las variantes BclII G262S y BclII G262S/N70S, mientras que el residuo de unión al Zn2 His263, así como también los residuos de la segunda esfera de coordinación Arg121 y Ser262 se ven altamente perturbados. En el caso del residuo Asp120, el mismo no pudo ser asignado en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC en la mutante BclII G262S/N70S, lo cual indica que pasa

## Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución

a un régimen de intercambio químico intermedio en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos. En resumen, este análisis sugiere: (1) que el efecto de la mutación N70S depende del contexto genético en el cual es introducida y (2) que la mutación N70S sobre BclI G262S genera una perturbación de los residuos alrededor del sitio Zn2, dejando inalterados a los residuos de unión a Zn1.

PDQ	Ligandos de Zn1			Ligandos de Zn2			Segunda Esfera				
							Zn1	Zn2			
	His116	His118	His196	Asp120	Cys221	His263	Asp236	Ser69	Asn70	Arg121	262
wt – G	0.17	0.26	0.03	0.36	-(1)	0.43	0.09	0.06	0.87	0.51	-
wt – N	0.07	0.13	0.02	0.17	0.14	0.04	0.04	0.12	-	0.15	1.1 <sub>Gly</sub>
G – GN	0.04	0.02	0.01	-(2)	N.D.	0.20	0.03	0.15	-	0.22	0.52 <sub>Ser</sub>

**Tabla 5.2.** Valores de PDQ obtenidos utilizando la ecuación 5.1 en donde se observa el efecto producido por la mutación G262S sobre la enzima silvestre (primera fila, wt-G), el efecto de la mutación N70S sobre la enzima silvestre (segunda fila, wt-N) y el efecto de la mutación N70S sobre la enzima BclI G262S (tercera fila, wt-GN). Los valores se colorearon de acuerdo al siguiente criterio:  $0 < \text{PDQ} < 0,05$  (gris, considerados como no perturbados);  $0,05 < \text{PDQ} < 0,20$  (naranja, considerados como levemente perturbados);  $\text{PDQ} \geq 0,20$  (rojos, considerados como altamente perturbados). (1) La Cys221 no pudo ser asignada en el espectro  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC de la enzima BclI G262S ni de la enzima BclI G262S/N70S, lo cual indica que este residuo se encuentra en intercambio químico intermedio en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos. (2) El Asp120 no pudo ser asignada en el espectro  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC de la enzima BclI G262S/N70S, lo cual indica que este residuo se encuentra en intercambio químico intermedio en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos. N.D.: no determinado.

### 5.2.4. Efecto de las mutaciones en la flexibilidad conformacional

#### 5.2.4.1. Dinámica en la escala de picosegundos a nanosegundos (ps-ns)

Posteriormente llevamos a cabo el análisis del efecto de estas mutaciones sobre la flexibilidad conformacional mediante estudios de dinámica por RMN en la enzima silvestre y en las variantes estudiadas. En el caso de la dinámica rápida en la escala de ps-ns medimos las velocidades de relajación longitudinal y transversal ( $R_1$  y  $R_2$ ) de los átomos de  $^{15}\text{N}$  y el NOE Heteronuclear  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  (ver Sección 2.20.5). Todos estos experimentos fueron realizados en las mismas condiciones de pH y temperatura para todas las enzimas. Para todos los estudios de dinámica, los residuos cuyas señales en el espectro  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC estuvieran total

**Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución**

o parcialmente solapadas fueron excluidos del análisis. En la Figura 5.4 se muestran comparativamente los perfiles de  $R_1$ ,  $R_2$ , NOE Heteronuclear obtenidos para la enzima BcII silvestre y sus variantes en función de la secuencia. Los valores promedio de estos parámetros se muestran en la Tabla 5.2.

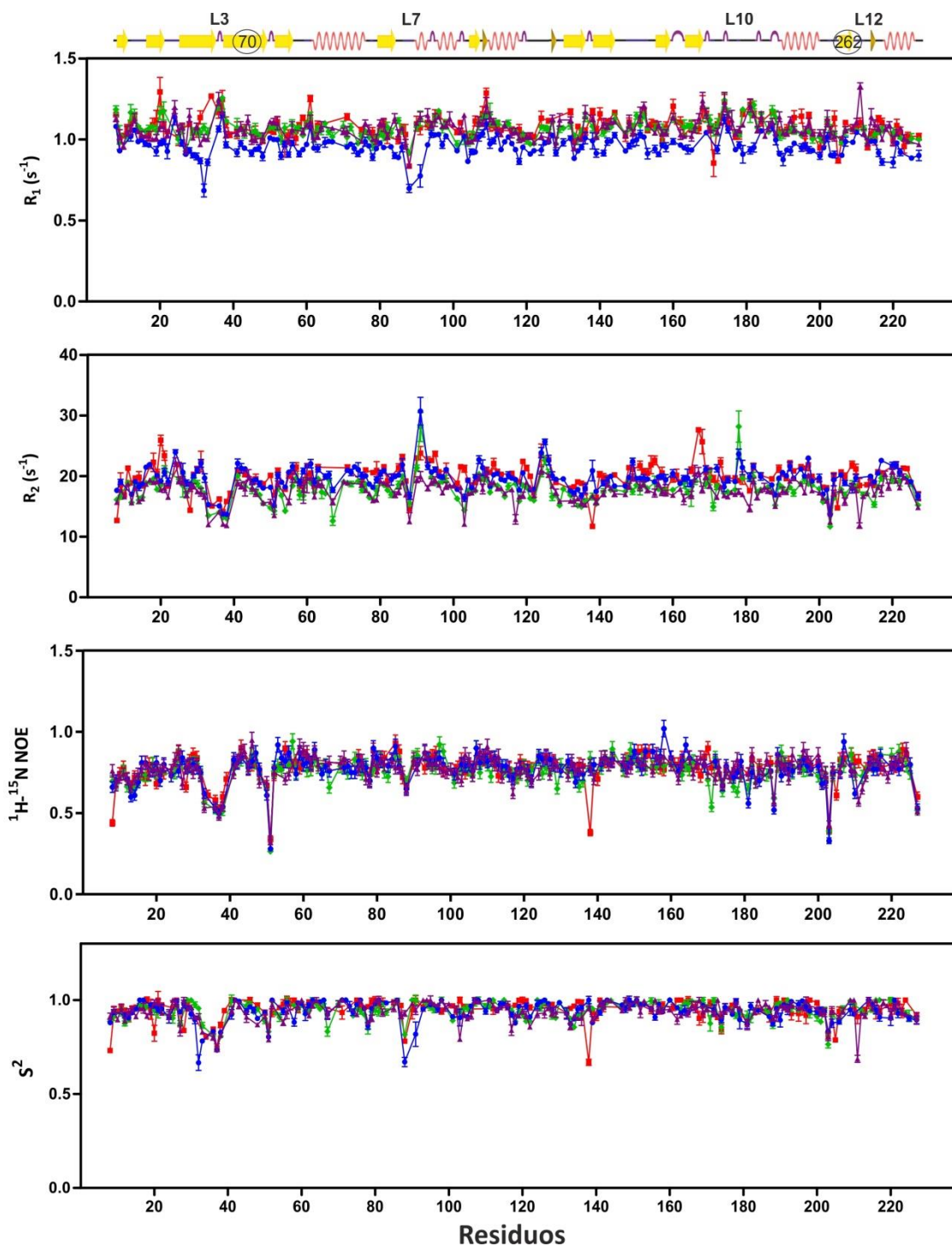
Variante	$R_1$ ( $s^{-1}$ )	$R_2$ ( $s^{-1}$ )	NOE HN
BcII silvestre	$1,08 \pm 0,07$	$20 \pm 2$	$0,78 \pm 0,07$
BcII N70S	$1,07 \pm 0,07$	$18 \pm 2$	$0,77 \pm 0,09$
BcII G262S	$1,07 \pm 0,06$	$18 \pm 2$	$0,76 \pm 0,09$
BcII G262S/N70S	$0,96 \pm 0,06$	$20 \pm 2$	$0,8 \pm 0,1$

**Tabla 5.3.** Resumen de los parámetros de relajación obtenidos para las MBLs.

El análisis de los parámetros de relajación mediante el formalismo Model Free, implementado en el programa Tensor v2.0, arrojó valores de tiempo de correlación rotacional de  $13,5 \pm 0,1$  para la enzima silvestre,  $12,7 \pm 0,1$  para las variantes BcII N70S y BcII G262S y  $14,3 \pm 0,1$  para la variante BcII G262S/N70S, valores esperados para una proteína globular de 26 kDa.

Los correspondientes perfiles de  $S^2$  en función de la secuencia proteica se muestran también en la Figura 5.4. Se puede observar que los valores de  $S^2$  para las 4 MBLs analizadas son notablemente altos a lo largo de la mayoría de la secuencia, alcanzando valores promedio de  $0,94 \pm 0,01$ . Sin embargo, las 4 MBLs presentan valores de  $S^2$  significativamente menores al promedio alrededor del bucle L3 y, para la doble mutante, también alrededor del bucle L7. A partir de este análisis puede concluirse que la comparación de los perfiles de  $S^2$  no revela diferencias significativas en la dinámica de los grupos amidas del esqueleto peptídico en la escala de ps-ns en las distintas MBLs.

Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución



**Figura 5.5.** Perfiles de  $R_1$ ,  $R_2$  y NOE Heteronuclear y parámetro de orden ( $S^2$ ) en función de la secuencia proteica para BclI silvestre (en rojo), BclI N70S (en violeta), BclI G262S (en verde) y BclI G262S/N70S (en azul). Los círculos señalan los sitios de mutación N70S y G262S. Todos los experimentos se realizaron a 298 K en solución buffer 100 mM MES a pH 6,4, con 200 mM NaCl y 10%  $D_2O$ .

#### 5.2.4.2. Dinámica en la escala de microsegundos a milisegundos ( $\mu\text{s}$ - $\text{ms}$ )

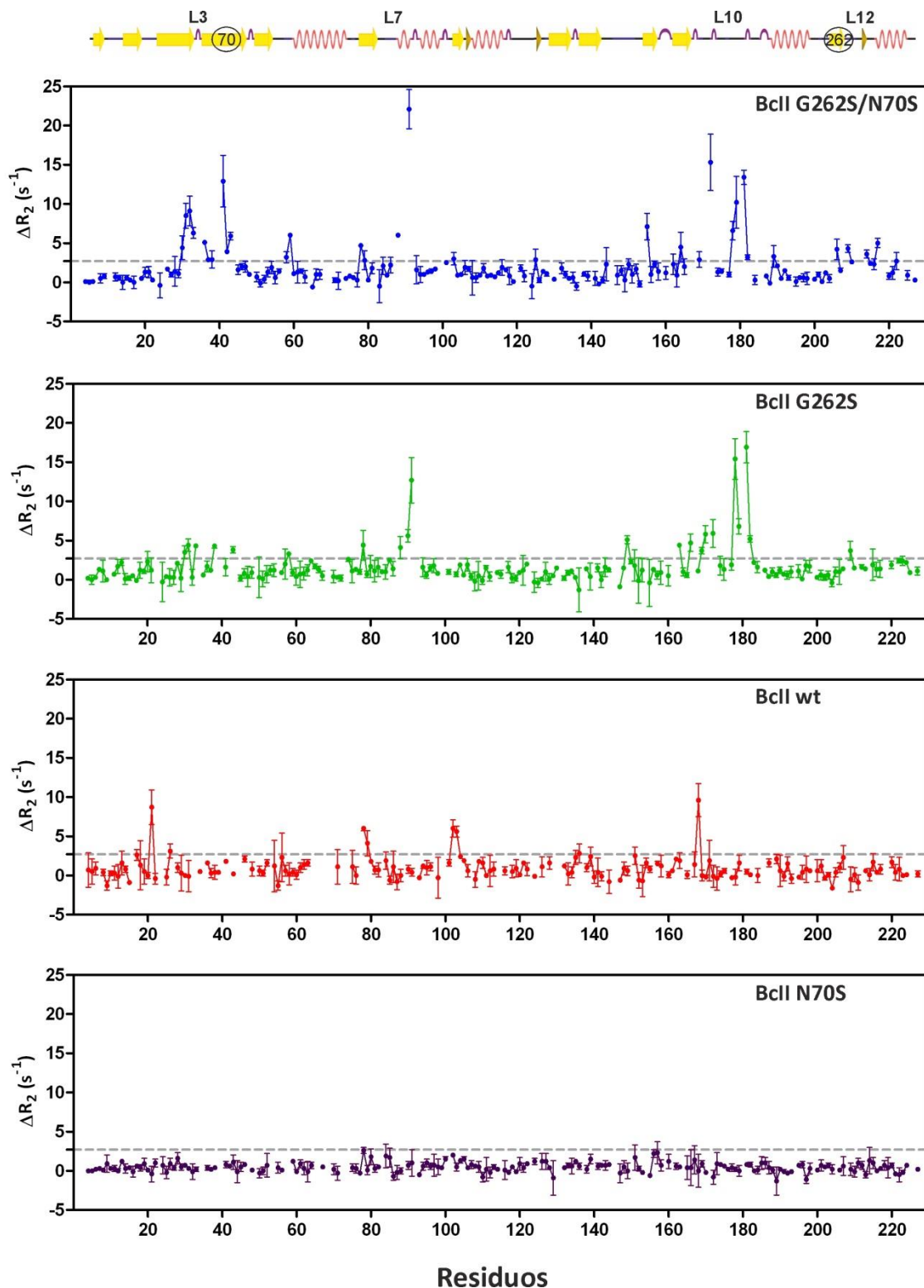
La dinámica proteica en la escala de  $\mu\text{s}$ - $\text{ms}$  en las variantes de BcII se estudió mediante experimentos de dispersión de la relajación transversal a tiempo constante (*constant-time CPMG Relaxation Dispersion*), midiendo la contribución del intercambio químico en esta escala de tiempo a la velocidad de relajación transversal efectiva [175]. La Figura 5.6 muestra los perfiles de  $\Delta R_2$  obtenidos para las MBLs, en donde  $\Delta R_2$  es la diferencia entre los valores de  $R_2^{\text{eff}}$  determinados a frecuencias de CPMG de 33 Hz y 966 Hz. Mediante este tipo de análisis se puede obtener información semicuantitativa sobre eventos de dinámica, dado que valores de  $\Delta R_2$  mayores a un dado umbral son indicativos de flexibilidad o dinámica de los residuos correspondientes en la escala de  $\mu\text{s}$ - $\text{ms}$ . Las diferencias más significativas entre las distintas variantes se observan en la región de bucles que rodean al sitio de unión de sustratos, más específicamente, los bucles L3, L7, L10 y L12.

A partir de la Figura 5.6 se seleccionaron los residuos en cada variante cuyos valores de  $\Delta R_2$  eran más elevados que el valor límite establecido de acuerdo al ruido espectral ( $\Delta R_2 > 2,7 \text{ s}^{-1}$ ) y se analizaron utilizando el programa NESSY 12.3.1 ([www.home.gna.org/nessy/](http://www.home.gna.org/nessy/)). Los resultados obtenidos se presentan en el Anexo 1. En la Figura 5.7A se mapearon los residuos que presentan flexibilidad conformacional en cada variante.

En el caso de la enzima BcII silvestre se identificaron sólo 5 residuos en intercambio conformacional en esta escala de tiempo. Por otra parte, en general estos residuos, con la excepción de la Cys221, se encuentran alejados del sitio activo en regiones accesibles al solvente.

Para el caso de la enzima BcII N70S no encontramos ningún residuo con valores de  $\Delta R_2$  significativamente elevados, con lo cual podemos afirmar que esta mutación estaría disminuyendo la leve flexibilidad exhibida por la enzima silvestre.

Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución



**Figura 5.6.** Perfiles de CPMG en función de la secuencia proteica para BclI silvestre (en rojo), BclI N70S (en violeta), BclI G262S (en verde) y BclI G262S/N70S (en azul). Los círculos señalan los sitios de mutación N70S y G262S. Todos los experimentos se realizaron a 298 K en solución buffer 100 mM MES a pH 6,4, con 200 mM NaCl y 10% D<sub>2</sub>O.

## Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución

Sin embargo, al analizar las enzimas BcII G262S y BcII G262S/N70S vemos que ambas presentan 19 y 28 residuos con flexibilidad conformacional, respectivamente. Estos residuos en su mayoría mapean en los bucles cercanos al sitio activo. Para el caso de la enzima BcII G262S los residuos con intercambio químico son: Glu57, Leu58, Ser60, Ala66 and Gly71 (en o cerca del bucle L3), Asp120 and Arg121 (L7), Gly219, Leu222, Val223, Ser225, Leu231, Gly232, Val234 and Ala235 (L10). Los restantes residuos con valores elevados de  $\Delta R_2$  son: Ser86, Arg107 and His196. Esta flexibilidad también se evidencia en la doble mutante G262S/N70S, incluyendo en este caso algunos residuos más: Glu57, Leu58, Gly59, Ser60, Gly63, Glu64, Ala66, Ser69, Ser70, Gly71 (L3), His118, Arg121 (L7), Leu222, Ser225, Leu231, Gly232, Val234, Ala235 (L10) and Val259, Ser262, Gly278 and Gly281 (L12). Los residuos flexibles restantes son: Ser86, Trp87, Arg107, Val202, Leu217 and Trp242.

### 5.2.4.3. Dinámica en la escala de milisegundos a segundos (ms-s)

Como se señaló en el apartado 5.2.2, varios residuos en todas las MBLs están ausentes en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de las 4 proteínas, sugiriendo que los mismos se encuentran en procesos de intercambio químico en un régimen intermedio de la escala de tiempo de los desplazamientos químicos. Once residuos están ausentes en las 4 variantes: los 3 residuos N-terminales (Ser27, Gln28, Lys29), Lys50, Asn62, Ser77, Lys102, Ala119, Asn184, Gly193 and Asn233. Cabe destacar aquí que algunos residuos cercanos al sitio activo se encuentran ensanchados más allá del límite de detección en las mutantes evolucionadas: la Cys221 presenta intercambio conformacional en la enzima silvestre; sin embargo, la señal de este residuo no pudo ser asignada en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de las variantes BcII G262S y BcII G262S/N70S, lo cual implica que la mutación G262S enlentece el proceso conformacional de Cys221 desde un proceso rápido a otro intermedio en la escala de tiempo de los desplazamientos químicos en ambas variantes. Un efecto similar se observa para los residuos Asp120 y Val223: estos residuos tienen valores de  $\Delta R_2$  elevados en BcII G262S pero se encuentran ensanchados más allá del límite de detección en la variante BcII G262S/N70S. Por otra parte, la Gly264 no posee intercambio conformacional en las variantes BcII silvestre y BcII N70S, mientras que no se detecta en ambas variantes evolucionadas BcII G262S y G262S/N70S; por otro lado la Lys224, la cual se asignó tanto en la variante silvestre como en la N70S, no se detecta en las mutantes G262S y G262S/N70S. De esta forma, se observa

dinámica lenta en la escala de los milisegundos a segundos en residuos cercanos al sitio activo en las variantes G262S y G262S/N70S. En la Figura 5.7A se mapean los residuos flexibles en cada variante y se resume la información de dinámica lenta en las MBLs.

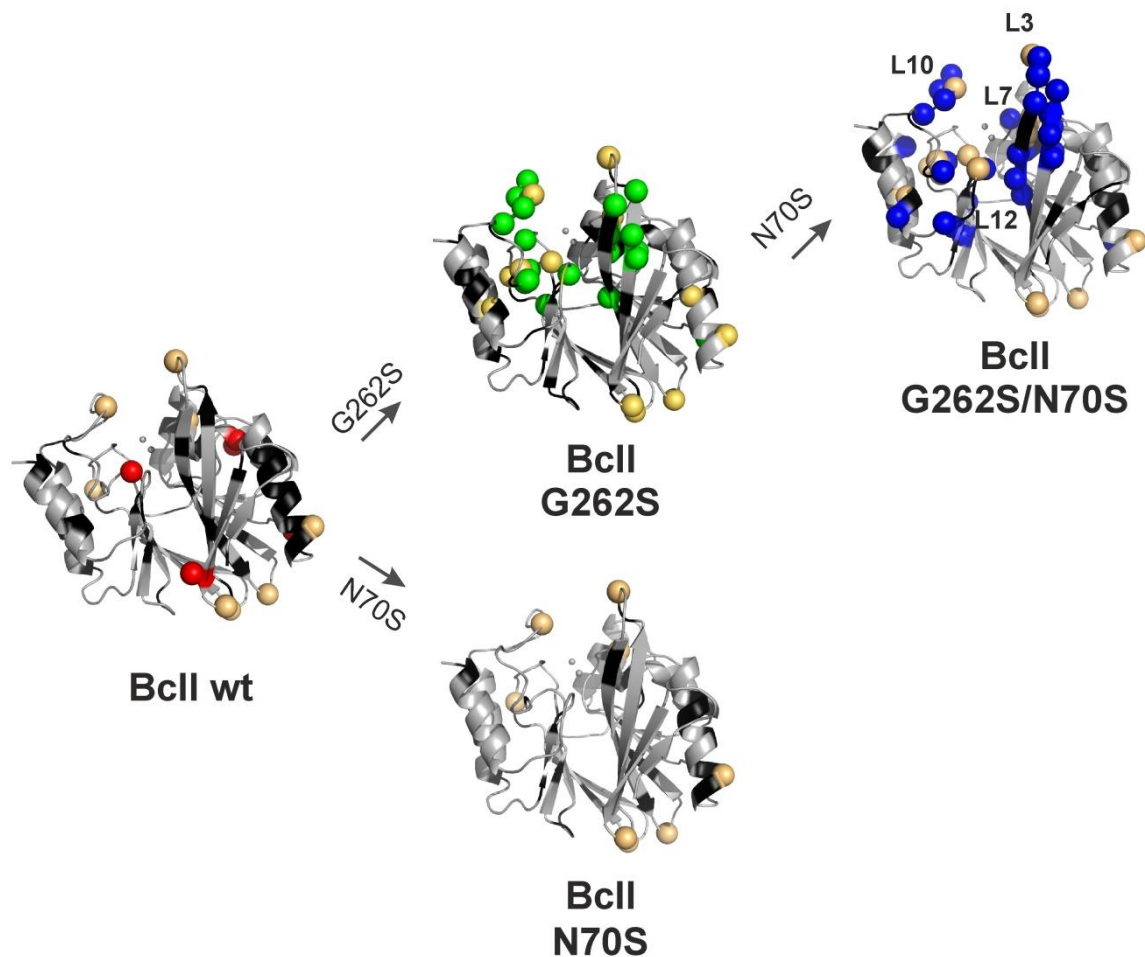
### 5.3. Discusión

Una de las cuestiones más importantes en el estudio de la evolución de proteínas radica en diseccionar las contribuciones de diversos rasgos biofísicos y bioquímicos con la capacidad de adaptación de un dado organismo [168]. Estos esfuerzos se ven a menudo complicados debido al hecho de que el impacto de las mutaciones sobre la aptitud es a menudo no-aditivo, un fenómeno conocido como epistasis [69,169,176-179]. Esto implica que el efecto de las mutaciones depende de la presencia o ausencia de otra, es decir, del contexto genético en donde una dada mutación tiene lugar.

Los efectos epistáticos han sido generalmente descritos en base a los efectos pleiotrópicos de las mutaciones en diferentes rasgos moleculares, como en la eficiencia catalítica y en la estabilidad en el caso de enzimas [168,169,180]. Debido a esto, los paisajes de aptitud son modulados por la epistasis, la cual determina las vías evolutivas favorecidas [59,69,169,178]. Sin embargo, la comprensión de cómo los efectos epistáticos operan a nivel molecular para afectar diversos rasgos proteicos es insuficiente; además, no está claro incluso cuáles son los rasgos moleculares más importantes que determinan la aptitud proteica a nivel molecular, más allá de los requerimientos básicos de eficiencia catalítica y estabilidad.

La adaptación se puede describir cuantitativamente en base a los rasgos biofísicos y bioquímicos que son afectados por las mutaciones a lo largo de la evolución de proteínas [168,181,182]. En años recientes se ha reconocido el rol clave que juega la dinámica proteica en el reconocimiento proteína-proteína, unión de ligandos, alostería y catálisis, etc., representando por lo tanto una restricción potencialmente importante a la evolución proteica, como se ha sugerido recientemente [60,62,144]. Esta idea es de alguna forma apoyada por la variabilidad observada en las estructuras cristalográficas y por simulaciones de dinámica molecular, pero nunca ha sido probada a través de métodos sensibles a dinámica proteica en escalas de tiempo relevantes.

En este Capítulo hemos utilizado la RMN para identificar el rol de la dinámica proteica en dos vías evolutivas de la MBL BclI hacia una doble mutante con un perfil de sustrato expandido, y reportamos que: (1) el análisis de las señales en los espectros  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC indican perturbaciones precisas en la estructura y dinámica proteica que dan cuenta del efecto de las mutaciones en la afinidad por Zn(II); (2) el impacto de las mutaciones en la dinámica depende fuertemente del contexto genético, es decir, es epistático; y (3) la vía exitosa acumula mutaciones sucesivamente incrementando la dinámica de los bucles del sitio activo principalmente en la escala de micro a milisegundos, dando origen a un perfil de sustrato más amplio. En general, estos resultados nos permiten concluir firmemente que la



**Figura 5.7.** Mapeo de los residuos con intercambio conformacional en BclI silvestre (círculos en rojo), BclI G262S (círculos en verde) y BclI G262S/N70S (círculos en azul). Los círculos amarillos señalan residuos no detectados en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC debido a flexibilidad en ms-s. Todos los experimentos se realizaron a 298 K en solución buffer 100 mM MES a pH 6,4, con 200 mM NaCl y 10%  $\text{D}_2\text{O}$ .

**Estudio de la flexibilidad en las MBLs durante la evolución**

dinámica conformacional en escalas de tiempo catalíticamente relevantes es un importante rasgo biofísico en la evolución de proteínas.

El aumento de la flexibilidad en los bucles que rodean el sitio activo en las variantes evolucionadas BcII G262S y BcII G262S/N70S correlaciona con la expansión en el perfil de sustrato, mientras que al contrario, la rigidez suscitada por la mutación N70S en el contexto silvestre da origen a efectos negativos sobre la eficiencia catalítica. Es de destacar que hay una relación directa entre el impacto de la mutación G262S sobre la aptitud de la enzima que correlaciona con un aumento en la flexibilidad del sitio activo. Por otro lado, el efecto de la mutación N70S sobre la flexibilidad depende del contexto genético en el cual es introducida. Este efecto epistático observado en la flexibilidad es paralelo al encontrado en la aptitud como se refleja en las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) de las variantes enzimáticas expresadas en el hospedador bacteriano (Figura 5.7C), al mismo tiempo dando cuenta de la expansión del perfil de sustrato.

Estudios recientes han dado evidencia de la importancia de las mutaciones remotas en la evolución de proteínas al hacer ajustes finos de las características de los sitios activos [62,132,176,183]. El atrapamiento de diferentes conformaciones en las estructuras cristalográficas ha sugerido que el rol principal de estas mutaciones es su efecto en la estabilidad y/o en la dinámica proteica. Sin embargo, estas “fotografías estructurales” podrían representar estados de ajuste inducido en lugar de reflejar un comportamiento dinámico real. Las simulaciones de dinámica molecular también se han usado para analizar los efectos de las mutaciones, pero apenas alcanzan las escalas de tiempo más rápidas relevantes para unión de sustratos y catálisis. En esta Tesis hemos aportado evidencia experimental directa de las ventajas evolutivas de la incorporación de mutaciones remotas que específicamente aumentan la heterogeneidad conformacional en los bucles del sitio activo en la vía evolutiva favorecida sobre escalas de tiempo relevantes. La ausencia de efectos estabilizadores compensatorios dentro de esta vía sugiere que la flexibilidad se puede ganar a expensas de la estabilidad siempre que sea posible.

Dentro de una perspectiva Darwiniana de la evolución, una nueva función se puede desarrollar en base a una funcionalidad existente o incipiente [184,185]. La mutación G262S incrementa la dinámica del sitio activo para aumentar la actividad cefalexinasa, permitiendo por lo tanto a la enzima explorar conformaciones alternativas [186] (Figura 5.7A). En base a

esto proponemos que esta flexibilidad aumentada hace a la variante G262S más “evolucionable”, dado que la mutación N70S puede actuar al mismo tiempo incrementando el perfil de sustrato y restaurando la afinidad por Zn(II), es decir, actuando en dos rasgos moleculares que incrementan la aptitud. En otras palabras, estos resultados nos permiten sugerir que la heterogeneidad conformacional juega un rol clave en la evolución de proteínas.

## Resumen y Conclusiones

La resistencia bacteriana a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos constituye uno de los problemas clínicos más preocupantes en la actualidad y ha sido reconocida por la comunidad científica la urgente necesidad de llevar a cabo programas para la identificación de nuevos compuestos antibacterianos que puedan paliar esta situación.

Uno de los mecanismos de resistencia más importantes constituye la expresión de enzimas capaces de inactivar a los  $\beta$ -lactámicos denominadas  $\beta$ -lactamasas. Las enzimas serín- $\beta$ -lactamasas (SBLs), las cuales presentan una Ser esencial en el sitio activo, fueron las primeras enzimas identificadas capaces de inactivar a estos antibióticos. Las  $\beta$ -lactamasas dependientes de Zn(II), denominadas metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs), fueron identificadas inicialmente en cepas inocuas. Sin embargo, a partir de finales de la década de 1980, nuevas y más eficientes MBLs fueron identificadas en diversas cepas de Enterobacterias y patógenos oportunistas, lo cual promovió el estudio e identificación de los rasgos moleculares y biofísicos que participan durante el mecanismo catalítico y evolución en estas enzimas.

El estudio del mecanismo catalítico en las enzimas SBLs permitió el diseño de inhibidores basados en el mecanismo. Hoy en día estos inhibidores se administran junto con los  $\beta$ -lactámicos para el tratamiento de infecciones. Sin embargo, debido a que el mecanismo catalítico en las MBLs es fundamentalmente distinto, no ha sido posible identificar inhibidores en base al mecanismo y no hay inhibidores de uso clínico disponibles.

Durante el presente trabajo de Tesis se diseñaron y sintetizaron 4 bistiazolidinas que presentan dos anillos de tiazolidina fusionados por un átomo de nitrógeno, un grupo carboxilato similar al carboxilato presente en las posiciones 3 de penicilinas y carbapenemes y en posición 4 de cefalosporinas junto con un grupo tiol que provee un motivo de unión a metal. Estos compuestos constituyen 2 pares de enantiómeros que difieren en la presencia de un grupo gemdimetilo similar al encontrado en las penicilinas. Los mismos fueron ensayados como inhibidores de MBLs de distintas subclases: NDM-1, IMP-1 y BcII (B1), Sfh-I (B2), L1 y GOB-18 (B3).

Por otro lado, las MBLs constituyen un sistema modelo ideal para el estudio de la evolución de proteínas, ya que es posible desarrollar un sistema que permita la evolución dirigida de estas enzimas en el laboratorio. Previamente, se había obtenido por estas técnicas una variante evolucionada de BclI que confería mayor resistencia a la bacteria hospedadora contra un antibiótico pobremente hidrolizado por la enzima silvestre. En este trabajo de Tesis exploramos la hipótesis acerca de si la dinámica conformacional en proteínas puede constituir un rasgo evolutivo susceptible de ser optimizado para conferir una mayor capacidad de adaptación a un nuevo desafío funcional.

Como conclusiones generales podemos mencionar:

- 1) Las bistiazolidinas ideadas y sintetizadas para ser ensayadas como inhibidores de MBLs, fueron capaces de inhibir la actividad carbapenemasa de NDM-1, una enzima que se ha diseminado muy rápidamente entre diferentes cepas patógenas en todo el mundo.
- 2) Asimismo, estos compuestos demostraron ser capaces incluso de inhibir la actividad de enzimas de subclase B1, B2 y B3. Estos resultados indican que las bistiazolidinas son capaces de unirse eficientemente y ejercer un efecto inhibitorio en enzimas con diferentes topologías en los sitios activos.
- 3) Con excepción del caso de los derivados de la serie L- con Sfh-I, no se observó una clara diferencia en la potencia inhibitoria debida a la estereoquímica de los compuestos ni en la presencia o ausencia del grupo gemdimetilo. Para el caso de Sfh-I se observó una clara preferencia por los derivados de la serie L-, los cuales mostraron una disminución de dos órdenes de magnitud en cuanto a los valores de  $K_i$ .
- 4) Mediante experimentos de RMN demostramos que estos compuestos son capaces de penetrar al interior de la bacteria atravesando la membrana externa de *E. coli* e inhibir a la enzima *in situ*. Asimismo, los experimentos de muerte celular llevados a cabo en bacterias que expresan MBLs dan cuenta de la capacidad de estas bistiazolidinas de restaurar la susceptibilidad hacia los  $\beta$ -lactámicos.

- 5) A partir de las estructuras cristalográficas podemos observar que las bistiazolidinas presentan la capacidad de unirse a los sitios activos de las MBLs en diferentes conformaciones. En general, salvo para el caso de L-CS319 con Sfh-I, las bistiazolidinas se unen al sitio activo mediante coordinación del grupo tiol entre ambos iones Zn(II) a distancias similares para Zn1 y Zn2, desplazando a la molécula de agua/hidróxido a puente. El carboxilato de estos compuestos queda interactuando con residuos estructuralmente equivalentes en enzimas de subclase B1 y B3 (Lys224 y Ser223, respectivamente). Para el caso de los derivados de la serie D-, la unión de los compuestos es ligeramente diferente, presentando una interacción entre el N de fusión de anillos con el Zn2, similar a lo observado en las estructuras cristalográficas de aductos enzima: $\beta$ -lactámico.
- 6) En el caso de L-CS319 unido a Sfh-I se observó que este compuesto se une por medio del carboxilato al sitio metálico, mientras que el grupo tiol se posiciona dentro de la región hidrofóbica  $\alpha$ 3. Esto contrasta con la estructura reportada entre la enzima B2 CphA y D-captopril, en donde si bien en este caso también el compuesto se une por medio del carboxilato al metal, el tiol queda en una posición más expuesta sobre la superficie del sitio activo. Es posible que la diferencia de potencia inhibitoria de los derivados de la serie L- se deba a que solo estos compuestos presentarían la capacidad de unirse de esta forma a Sfh-I. Dado que las enzimas de subclase B2 son carbapenemasas exclusivas, la topología de los sitios activos de estas enzimas serían capaces de ejercer una mayor restricción en cuanto a qué compuestos pueden ingresar y unirse en los mismos.
- 7) Por último estudiamos cómo es modulada la flexibilidad conformacional en las MBLs durante la evolución. El estudio por RMN de las variantes BcII wt, BcII G262, BcII N70S y BcII G262/N70S nos permitió establecer que (1) el análisis de las señales en los espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC indican perturbaciones precisas en la estructura y dinámica proteica que dan cuenta del efecto de las mutaciones en la afinidad por Zn(II); (2) el impacto de las mutaciones en la dinámica depende fuertemente del contexto genético, es decir, es epistático; y (3) la vía exitosa acumula mutaciones sucesivamente incrementando la dinámica de los bucles del sitio activo

principalmente en la escala de micro a milisegundos, dando origen a un perfil de sustrato más amplio. Estos resultados nos permiten sugerir que la dinámica conformacional en escalas de tiempo catalíticamente relevantes es un importante rasgo biofísico en la evolución de proteínas.

## Bibliografía

1. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH (2012) History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research* **25**, 67-77.
2. Plough HH (1945) Penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and its clinical implications. *American journal of clinical pathology* **15**, 446-451.
3. Wright GD (2012) The origins of antibiotic resistance. *Handbook of experimental pharmacology*, 13-30.
4. Perros M (2015) Infectious disease. A sustainable model for antibiotics. *Science* **347**, 1062-1064.
5. Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S (2005) Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.* **105**, 395-424.
6. Crowder MW, Spencer J, Vila AJ (2006) Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Acc. Chem. Res.* **39**, 721-728.
7. Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011) Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infect. Dis.* **17**, 1791-1798.
8. Sabath LD, Abraham EP (1966) Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem J* **98**, 11C-13C.
9. Sabath LD, Abraham EP (1965) Cephalosporinase and penicillinase activity of *Bacillus cereus*. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* **5**, 392-397.
10. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M *et al.* (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 147-151.
11. Rasmussen BA, Gluzman Y, Tally FP (1990) Cloning and sequencing of the class B beta-lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1590-1592.
12. Massidda O, Rossolini GM, Satta G (1991) The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *J. Bacteriol.* **173**, 4611-4617.
13. Carfi A, Pares S, Duée E *et al.* (1995) The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J.* **14**, 4914-4921.
14. Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM *et al.* (2001) Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 660-663.

15. Bebrone C (2007) Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 1686-1701.
16. Brogden RN, Heel RC (1986) Aztreonam. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* **31**, 96-130.
17. Poirel L, Revathi G, Bernabeu S *et al.* (2011) Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 934-936.
18. Chen J, Shang X, Hu F *et al.* (2013) beta-Lactamase inhibitors: an update. *Mini Rev Med Chem* **13**, 1846-1861.
19. Siemann S, Brewer D, Clarke AJ *et al.* (2002) IMP-1 metallo-beta-lactamase: effect of chelators and assessment of metal requirement by electrospray mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1571**, 190-200.
20. Singh S, Khodr H, Taylor MI *et al.* (1995) Therapeutic iron chelators and their potential side-effects. *Biochemical Society symposium* **61**, 127-137.
21. Merino M, Pérez-Llarena FJ, Kerff F *et al.* (2010) Role of changes in the L3 loop of the active site in the evolution of enzymatic activity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1950-1954.
22. Moali C, Anne C, Lamotte-Brasseur J *et al.* (2003) Analysis of the importance of the metallo-beta-lactamase active site loop in substrate binding and catalysis. *Chem. Biol.* **10**, 319-329.
23. Garau G, Bebrone C, Anne C *et al.* (2005) A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol.* **345**, 785-795.
24. Page MI, Badarau A (2008) The mechanisms of catalysis by metallo beta-lactamases. *Bioinorg Chem Appl.*
25. Kim Y, Cunningham MA, Mire J *et al.* (2013) NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism. *FASEB J.* **27**, 1917-1927.
26. Gonzalez JM, Meini MR, Tomatis PE *et al.* (2012) Metallo-beta-lactamases withstand low Zn(II) conditions by tuning metal-ligand interactions. *Nat Chem Biol* **8**, 698-700.
27. Bebrone C, Delbrück H, Kupper MB *et al.* (2009) The structure of the dizinc subclass B2 metallo-beta-lactamase CphA reveals that the second inhibitory zinc ion binds in the histidine site. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4464-4471.
28. King DT, Worrall LJ, Gruninger RJ *et al.* (2012) New Delhi Metallo-β-Lactamase: Structural Insights into β-Lactam Recognition and Inhibition. *Journal of the American Chemical Society.*

29. Fabiane SM, Sohi MK, Wan T *et al.* (1998) Crystal structure of the zinc-dependent beta-lactamase from *Bacillus cereus* at 1.9 Å resolution: binuclear active site with features of a mononuclear enzyme. *Biochemistry* **37**, 12404-12411.
30. Badarau A, Page MI (2008) Loss of enzyme activity during turnover of the *Bacillus cereus* beta-lactamase catalysed hydrolysis of beta-lactams due to loss of zinc ion. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 919-928.
31. Badarau A, Page MI (2006) Enzyme deactivation due to metal-ion dissociation during turnover of the cobalt-beta-lactamase catalyzed hydrolysis of beta-lactams. *Biochemistry* **45**, 11012-11020.
32. Llarrull LI, Tioni MF, Vila AJ (2008) Metal content and localization during turnover in *B. cereus* metallo-beta-lactamase. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 15842-15851.
33. Tioni MF, Llarrull LI, Poeylout-Palena AA *et al.* (2008) Trapping and characterization of a reaction intermediate in carbapenem hydrolysis by *B. cereus* metallo-beta-lactamase. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 15852-15863.
34. Toney JH, Fitzgerald PM, Grover-Sharma N *et al.* (1998) Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent inhibitors of *Bacteroides fragilis* metallo-beta-lactamase. *Chem. Biol.* **5**, 185-196.
35. Toney JH, Cleary KA, Hammond GG *et al.* (1999) Structure-activity relationships of biphenyl tetrazoles as metallo-beta-lactamase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 2741-2746.
36. Park H, Merz KM, Jr. (2005) Force field design and molecular dynamics simulations of the carbapenem- and cephamycin-resistant dinuclear zinc metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis* and its complex with a biphenyl tetrazole inhibitor. *J. Med. Chem.* **48**, 1630-1637.
37. Mohamed MS, Hussein WM, McGeary RP *et al.* (2011) Synthesis and kinetic testing of new inhibitors for a metallo- $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Med Chem* **46**, 6075-6082.
38. Toney JH, Hammond GG, Fitzgerald PM *et al.* (2001) Succinic acids as potent inhibitors of plasmid-borne IMP-1 metallo-beta-lactamase. *J. Biol. Chem.* **276**, 31913-31918.
39. Moloughney JG, D Thomas J, Toney JH (2005) Novel IMP-1 metallo-beta-lactamase inhibitors can reverse meropenem resistance in *Escherichia coli* expressing IMP-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**, 65-71.
40. Olsen L, Jost S, Adolph H-W *et al.* (2006) New leads of metallo-beta-lactamase inhibitors from structure-based pharmacophore design. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 2627-2635.

41. Brem J, van Berkel SS, Aik W *et al.* (2014) Rhodanine hydrolysis leads to potent thioenolate mediated metallo-beta-lactamase inhibition. *Nat Chem* **6**, 1084-1090.
42. Sun Q, Law A, Crowder MW *et al.* (2006) Homo-cysteinyl peptide inhibitors of the L1 metallo-beta-lactamase, and SAR as determined by combinatorial library synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 5169-5175.
43. Liénard BMR, Garau G, Horsfall L *et al.* (2008) Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo-beta-lactamases by thiols. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 2282-2294.
44. Vella P, Hussein WM, Leung EWW *et al.* (2011) The identification of new metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor leads from fragment-based screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 3282-3285.
45. Faridoon, Hussein WM, Vella P *et al.* (2012) 3-mercapto-1,2,4-triazoles and N-acylated thiosemicarbazides as metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 380-386.
46. Mollard C, Moali C, Papamicael C *et al.* (2001) Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc beta-lactamases: kinetic and spectroscopic studies. *J. Biol. Chem.* **276**, 45015-45023.
47. Lassaux P, Hamel M, Gulea M *et al.* (2010) Mercaptophosphonate compounds as broad-spectrum inhibitors of the metallo-beta-lactamases. *J. Med. Chem.* **53**, 4862-4876.
48. Kurosaki H, Yamaguchi Y, Higashi T *et al.* (2005) Irreversible inhibition of metallo-beta-lactamase (IMP-1) by 3-(3-mercaptopropionylsulfanyl)propionic acid pentafluorophenyl ester. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 3861-3864.
49. Payne DJ, Bateson JH, Gasson BC *et al.* (1997) Inhibition of metallo-beta-lactamases by a series of mercaptoacetic acid thiol ester derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 135-140.
50. King AM, Reid-Yu SA, Wang W *et al.* (2014) Aspergillomarasmine A overcomes metallo- $\beta$ -lactamase antibiotic resistance. *Nature* **510**, 503-506.
51. Yoshizumi A, Ishii Y, Livermore DM *et al.* (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.* **19**, 992-995.
52. Morán-Barrio J, González JM, Lisa MN *et al.* (2007) The metallo-beta-lactamase GOB is a mono-Zn(II) enzyme with a novel active site. *J. Biol. Chem.* **282**, 18286-18293.
53. Srivastava A, Singhal N, Goel M *et al.* (2014) CBMAR: a comprehensive beta-lactamase molecular annotation resource. *Database : the journal of biological databases and curation* **2014**, bau111.

54. Dortet L, Poirel L, Nordmann P (2014) Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. *Biomed Res Int* **2014**.
55. Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J *et al.* (2000) Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2023-2027.
56. Lane MD, Seelig B (2014) Advances in the directed evolution of proteins. *Curr Opin Chem Biol* **22**, 129-136.
57. Tomatis PE, Rasia RM, Segovia L *et al.* (2005) Mimicking natural evolution in metallo-beta-lactamases through second-shell ligand mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13761-13766.
58. Tomatis PE, Fabiane SM, Simona F *et al.* (2008) Adaptive protein evolution grants organismal fitness by improving catalysis and flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 20605-20610.
59. Kaltenbach M, Jackson CJ, Campbell EC *et al.* (2015) Reverse evolution leads to genotypic incompatibility despite functional and active site convergence. *eLife* **4**.
60. Dellus-Gur E, Elias M, Caselli E *et al.* (2015) Negative Epistasis and Evolvability in TEM-1 beta-Lactamase-The Thin Line between an Enzyme's Conformational Freedom and Disorder. *J Mol Biol* **427**, 2396-2409.
61. Liu Y, Bahar I (2012) Sequence evolution correlates with structural dynamics. *Molecular biology and evolution* **29**, 2253-2263.
62. Zou T, Risso VA, Gavira JA *et al.* (2015) Evolution of conformational dynamics determines the conversion of a promiscuous generalist into a specialist enzyme. *Molecular biology and evolution* **32**, 132-143.
63. Houben K, Marion D, Tarbouriech N *et al.* (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.* **81**, 6807-6816.
64. Kapust RB, Tözsér J, Fox JD *et al.* (2001) Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng.* **14**, 993-1000.
65. Fonseca F, Arthur CJ, Bromley EHC *et al.* (2011) Biochemical characterization of Sfh-I, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5392-5395.
66. . <http://web.expasy.org/protparam/>

67. Crowder MW, Walsh TR, Banovic L *et al.* (1998) Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 921-926.
68. Kim Y, Tesar C, Mire J *et al.* (2011) Structure of apo- and monometalated forms of NDM-1--a highly potent carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase. *PLoS ONE* **6**.
69. Meini MR, Tomatis PE, Weinreich DM *et al.* (2015) Quantitative Description of a Protein Fitness Landscape based on Molecular Features. *Molecular biology and evolution* **32**, 1774-1787.
70. McManus-Munoz S, Crowder MW (1999) Kinetic mechanism of metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biochemistry* **38**, 1547-1553.
71. Dalvit C, Ardini E, Fogliatto GP *et al.* (2004) Reliable high-throughput functional screening with 3-FABS. *Drug Discov. Today* **9**, 595-602.
72. Bodenhausen G, Ruben DJ (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **69**, 185-189.
73. Morris GA, Freeman R (1979) Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *Journal of the American Chemical Society* **101**, 760-762.
74. Goddard TD, Kneller DG (2001) *SPARKY (University of California, San Francisco)*.
75. Bax A (2011) Triple resonance three-dimensional protein NMR: Before it became a black box. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **213**, 442-445.
76. Keller R (2004) CARA (Computer-Aided Resonance Assignment, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich).
77. Jarymowycz VA, Stone MJ (2006) Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences. *Chem. Rev.* **106**, 1624-1671.
78. Lipari G, Szabo A (1982) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546-4559.
79. Lipari G, Szabo A (1982) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4559-4570.
80. Boehr DD, Dyson HJ, Wright PE (2006) An NMR perspective on enzyme dynamics. *Chem. Rev.* **106**, 3055-3079.
81. Mulder FA, Skrynnikov NR, Hon B *et al.* (2001) Measurement of slow (micros-ms) time scale dynamics in protein side chains by  $(15)\text{N}$  relaxation dispersion NMR spectroscopy:

application to Asn and Gln residues in a cavity mutant of T4 lysozyme. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 967-975.

82. Yong D, Toleman MA, Giske CG *et al.* (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.* **53**, 5046-5054.

83. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR *et al.* (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* **10**, 597-602.

84. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP *et al.* (2010) New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. *Euro Surveill.* **15**.

85. Lascols C, Hackel M, Marshall SH *et al.* (2011) Increasing prevalence and dissemination of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in India: data from the SMART study (2009). *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 1992-1997.

86. Deshpande P, Rodrigues C, Shetty A *et al.* (2010) New Delhi Metallo-beta lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae: treatment options with carbapenems compromised. *J Assoc Physicians India* **58**, 147-149.

87. Deshpande P, Shetty A, Kapadia F *et al.* (2010) New Delhi metallo 1: have carbapenems met their doom? *Clin. Infect. Dis.* **51**.

88. Bharadwaj R, Joshi S, Dohe V *et al.* (2012) Prevalence of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1)-positive bacteria in a tertiary care centre in Pune, India. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39**, 265-266.

89. Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA *et al.* (2011) Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2288-2294.

90. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM *et al.* (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* **11**, 355-362.

91. Gecaj-Gashi A, Hasani A, Bruqi B *et al.* (2011) Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis* **11**.

92. Livermore DM, Walsh TR, Toleman M *et al.* (2011) Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis* **11**.

93. Halaby T, Reuland AE, Al Naiemi N *et al.* (2012) A case of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2790-2791.
94. Mazzariol A, Bošnjak Z, Ballarini P *et al.* (2012) NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerging Infect. Dis.* **18**, 532-534.
95. Zhang C, Qiu S, Wang Y *et al.* (2013) Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. *PLoS ONE* **8**.
96. Chen Y, Cui Y, Pu F *et al.* (2012) Draft genome sequence of an *Acinetobacter* genomic species 3 strain harboring a bla(NDM-1) gene. *J. Bacteriol.* **194**, 204-205.
97. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y *et al.* (2011) Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 1255-1259.
98. Hu H, Hu Y, Pan Y *et al.* (2012) Novel plasmid and its variant harboring both a bla(NDM-1) gene and type IV secretion system in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1698-1702.
99. Sun Y, Song Y, Song H *et al.* (2013) Complete Genome Sequence of an *Acinetobacter* Strain Harboring the NDM-1 Gene. *Genome Announc* **1**.
100. Boulanger A, Naas T, Fortineau N *et al.* (2012) NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2214-2215.
101. Espinal P, Fugazza G, López Y *et al.* (2011) Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5396-5398.
102. Espinal P, Poirel L, Carmeli Y *et al.* (2013) Spread of NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* in the Middle East. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 1928-1930.
103. Ghazawi A, Sonnevend A, Bonnin RA *et al.* (2012) NDM-2 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in the United Arab Emirates. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, E34-36.
104. Hammerum AM, Larsen AR, Hansen F *et al.* (2012) Patients transferred from Libya to Denmark carried OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **40**, 191-192.
105. Pasteran F, Meo A, Gomez S *et al.* (2014) Letter to the Editor. *Journal of global antimicrobial resistance* **2**, 344-345.

106. Brovedan M, Marchiaro PM, Moran-Barrio J *et al.* (2015) Complete Sequence of a blaNDM-1-Harboring Plasmid in an Acinetobacter bereziniae Clinical Strain Isolated in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 6667-6669.
107. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM *et al.* (2013) Isolation of NDM-producing Providencia rettgeri in Brazil. *J Antimicrob Chemother* **68**, 2956-2957.
108. Dolejska M, Villa L, Poirel L *et al.* (2013) Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 34-39.
109. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S *et al.* (2011) Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5403-5407.
110. Fleteau C, Janvier F, Delacour H *et al.* (2012) Recurrent pyelonephritis due to NDM-1 metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a patient returning from Serbia, France, 2012. *Euro Surveill.* **17**.
111. Jovicic B, Lepsanovic Z, Suljagic V *et al.* (2011) Emergence of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from Serbia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3929-3931.
112. Dortet L, Nordmann P, Poirel L (2012) Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1693-1697.
113. Bogaerts P, Rezende de Castro R, Roisin S *et al.* (2012) Emergence of NDM-1-producing Acinetobacter baumannii in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1552-1553.
114. Bonnin RA, Naas T, Poirel L *et al.* (2012) Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- $\beta$ -lactamase NDM in Acinetobacter baumannii. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1419-1421.
115. Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A *et al.* (2012) Tn125-related acquisition of blaNDM-like genes in Acinetobacter baumannii. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1087-1089.
116. Tioni MF, Llarrull LI, Poeylout-Palena AA *et al.* (2008) Trapping and characterization of a reaction intermediate in carbapenem hydrolysis by B. cereus metallo-beta-lactamase. *J Am Chem Soc* **130**, 15852-15863.
117. Ishii Y, Eto M, Mano Y *et al.* (2010) In vitro potentiation of carbapenems with ME1071, a novel metallo-beta-lactamase inhibitor, against metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3625-3629.

118. Feng H, Ding J, Zhu D *et al.* (2014) Structural and mechanistic insights into NDM-1 catalyzed hydrolysis of cephalosporins. *J Am Chem Soc* **136**, 14694-14697.
119. Spencer J, Read J, Sessions RB *et al.* (2005) Antibiotic recognition by binuclear metallo-beta-lactamases revealed by X-ray crystallography. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 14439-14444.
120. Poeylout-Palena AA, Tomatis PE, Karsisiotis AI *et al.* (2007) A minimalistic approach to identify substrate binding features in B1 Metallo-beta-lactamases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 5171-5174.
121. Baldwin JE, Lynch GP, Pitlik J (1991) Gamma-lactam analogues of beta-lactam antibiotics. *J. Antibiot.* **44**, 1-24.
122. Patel G, Bonomo RA (2013) "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol* **4**.
123. Chiou J, Leung TY, Chen S (2014) Molecular mechanisms of substrate recognition and specificity of New Delhi metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 5372-5378.
124. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R *et al.* (1994) Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 71-78.
125. Colwell RR, Mandel M (1965) Adansonian Analysis and Deoxyribonucleic Acid Base Composition of *Serratia Marcescens*. *J Bacteriol* **89**, 454-461.
126. Oelschlaeger P, Ai N, Duprez KT *et al.* (2010) Evolving carbapenemases: can medicinal chemists advance one step ahead of the coming storm? *J. Med. Chem.* **53**, 3013-3027.
127. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L *et al.* (2000) Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1229-1235.
128. Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM *et al.* (1999) Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo-beta-lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 902-906.
129. Peleg AY, Franklin C, Bell J *et al.* (2004) Emergence of IMP-4 metallo-beta-lactamase in a clinical isolate from Australia. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 699-700.

130. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA *et al.* (2002) Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 255-258.
131. Materon IC, Palzkill T (2001) Identification of residues critical for metallo-beta-lactamase function by codon randomization and selection. *Protein Sci.* **10**, 2556-2565.
132. Oelschlaeger P, Mayo SL (2005) Hydroxyl groups in the (beta)beta sandwich of metallo-beta-lactamases favor enzyme activity: a computational protein design study. *J. Mol. Biol.* **350**, 395-401.
133. Saavedra MJ, Peixe L, Sousa JC *et al.* (2003) Sfh-I, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2330-2333.
134. Walsh TR, Hall L, Assinder SJ *et al.* (1994) Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys. Acta* **1218**, 199-201.
135. Bellais S, Poirel L, Leotard S *et al.* (2000) Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamases from *Chryseobacterium* (Flavobacterium) *indologenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3028-3034.
136. Yum JH, Lee EY, Hur S-H *et al.* (2010) Genetic diversity of chromosomal metallo-beta-lactamase genes in clinical isolates of *Elizabethkingia meningoseptica* from Korea. *J. Microbiol.* **48**, 358-364.
137. Bebrone C, Lassaux P, Vercheval L *et al.* (2010) Current challenges in antimicrobial chemotherapy: focus on  $\beta$ -lactamase inhibition. *Drugs* **70**, 651-679.
138. Lisa MN, Moran-Barrio J, Guindon MF *et al.* (2012) Probing the role of Met221 in the unusual metallo-beta-lactamase GOB-18. *Inorg Chem* **51**, 12419-12425.
139. Moran-Barrio J, Lisa MN, Vila AJ (2012) In vivo impact of Met221 substitution in GOB metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 1769-1773.
140. Moran-Barrio J, Gonzalez JM, Lisa MN *et al.* (2007) The metallo-beta-lactamase GOB is a mono-Zn(II) enzyme with a novel active site. *J Biol Chem* **282**, 18286-18293.
141. Lisa M-N, Hemmingsen L, Vila AJ (2010) Catalytic role of the metal ion in the metallo-beta-lactamase GOB. *J. Biol. Chem.* **285**, 4570-4577.
142. Yamaguchi Y, Jin W, Matsunaga K *et al.* (2007) Crystallographic investigation of the inhibition mode of a VIM-2 metallo-beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* by a mercaptocarboxylate inhibitor. *J. Med. Chem.* **50**, 6647-6653.

143. Teilum K, Olsen JG, Kragelund BB (2009) Functional aspects of protein flexibility. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **66**, 2231-2247.
144. Boehr DD, Nussinov R, Wright PE (2009) The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nature chemical biology* **5**, 789-796.
145. James LC, Tawfik DS (2003) Conformational diversity and protein evolution--a 60-year-old hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 361-368.
146. Fischer E (1894) Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. II. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **27**, 3479-3483.
147. Koshland DE, Jr., Ray WJ, Jr., Erwin MJ (1958) Protein structure and enzyme action. *Federation proceedings* **17**, 1145-1150.
148. Lindner AB, Eshhar Z, Tawfik DS (1999) Conformational changes affect binding and catalysis by ester-hydrolysing antibodies. *J Mol Biol* **285**, 421-430.
149. Loria JP, Berlow RB, Watt ED (2008) Characterization of enzyme motions by solution NMR relaxation dispersion. *Acc. Chem. Res.* **41**, 214-221.
150. Henzler-Wildman K, Kern D (2007) Dynamic personalities of proteins. *Nature* **450**, 964-972.
151. Jensen MR, Ruigrok RW, Blackledge M (2013) Describing intrinsically disordered proteins at atomic resolution by NMR. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
152. Shapiro YE (2013) NMR spectroscopy on domain dynamics in biomacromolecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*
153. Masterson LR, Cembran A, Shi L *et al.* (2012) Allostery and binding cooperativity of the catalytic subunit of protein kinase A by NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations. *Adv Protein Chem Struct Biol* **87**, 363-389.
154. Kleckner IR, Gollnick P, Foster MP (2012) Mechanisms of allosteric gene regulation by NMR quantification of microsecond-millisecond protein dynamics. *J. Mol. Biol.* **415**, 372-381.
155. Changeux JP, Edelstein S (2011) Conformational selection or induced fit? 50 years of debate resolved. *F1000 biology reports* **3**, 19.
156. Cordes MH, Burton RE, Walsh NP *et al.* (2000) An evolutionary bridge to a new protein fold. *Nat Struct Biol* **7**, 1129-1132.
157. Ma B, Shatsky M, Wolfson HJ *et al.* (2002) Multiple diverse ligands binding at a single protein site: a matter of pre-existing populations. *Protein science : a publication of the Protein Society* **11**, 184-197.

158. O'Brien PJ, Herschlag D (1999) Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem Biol* **6**, R91-R105.
159. Copley SD (2003) Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 265-272.
160. James LC, Tawfik DS (2001) Catalytic and binding poly-reactivities shared by two unrelated proteins: The potential role of promiscuity in enzyme evolution. *Protein science : a publication of the Protein Society* **10**, 2600-2607.
161. Hollfelder F, Kirby AJ, Tawfik DS (1996) Off-the-shelf proteins that rival tailor-made antibodies as catalysts. *Nature* **383**, 60-62.
162. Ben-David M, Wieczorek G, Elias M *et al.* (2013) Catalytic metal ion rearrangements underline promiscuity and evolvability of a metalloenzyme. *J Mol Biol* **425**, 1028-1038.
163. Risso VA, Gavira JA, Mejia-Carmona DF *et al.* (2013) Hyperstability and substrate promiscuity in laboratory resurrections of Precambrian beta-lactamases. *J Am Chem Soc* **135**, 2899-2902.
164. Ben-David M, Elias M, Filippi JJ *et al.* (2012) Catalytic versatility and backups in enzyme active sites: the case of serum paraoxonase 1. *J Mol Biol* **418**, 181-196.
165. Elias M, Tawfik DS (2012) Divergence and convergence in enzyme evolution: parallel evolution of paraoxonases from quorum-quenching lactonases. *J Biol Chem* **287**, 11-20.
166. Khersonsky O, Tawfik DS (2010) Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annu Rev Biochem* **79**, 471-505.
167. Joyce GF (1997) Evolutionary chemistry: getting there from here. *Science* **276**, 1658-1659.
168. DePristo MA, Weinreich DM, Hartl DL (2005) Missense meanderings in sequence space: a biophysical view of protein evolution. *Nature reviews. Genetics* **6**, 678-687.
169. Weinreich DM, Delaney NF, Depristo MA *et al.* (2006) Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins. *Science* **312**, 111-114.
170. Beadle BM, Shoichet BK (2002) Structural bases of stability-function tradeoffs in enzymes. *J Mol Biol* **321**, 285-296.
171. Wang X, Minasov G, Shoichet BK (2002) Evolution of an antibiotic resistance enzyme constrained by stability and activity trade-offs. *J Mol Biol* **320**, 85-95.
172. Weinreich DM, Chao L (2005) Rapid evolutionary escape by large populations from local fitness peaks is likely in nature. *Evolution; international journal of organic evolution* **59**, 1175-1182.

173. Karsisiotis AI, Damblon C, Roberts GCK (2013) Complete (1)H, (15)N and (13)C resonance assignments of *Bacillus cereus* metallo- $\beta$ -lactamase and its complex with the inhibitor R-thiomandelic acid. *Biomol NMR Assign.*
174. Rasia RM, Vila AJ (2004) Structural determinants of substrate binding to *Bacillus cereus* metallo-beta-lactamase. *J. Biol. Chem.* **279**, 26046-26051.
175. Osawa M, Takeuchi K, Ueda T *et al.* (2012) Functional dynamics of proteins revealed by solution NMR. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 660-669.
176. Natarajan C, Inoguchi N, Weber RE *et al.* (2013) Epistasis among adaptive mutations in deer mouse hemoglobin. *Science* **340**, 1324-1327.
177. Breen MS, Kemena C, Vlasov PK *et al.* (2012) Epistasis as the primary factor in molecular evolution. *Nature* **490**, 535-538.
178. Salverda ML, Dellus E, Gorter FA *et al.* (2011) Initial mutations direct alternative pathways of protein evolution. *PLoS genetics* **7**, e1001321.
179. Gong LI, Bloom JD (2014) Epistatically interacting substitutions are enriched during adaptive protein evolution. *PLoS genetics* **10**, e1004328.
180. Mehta SC, Rice K, Palzkill T (2015) Natural Variants of the KPC-2 Carbapenemase have Evolved Increased Catalytic Efficiency for Ceftazidime Hydrolysis at the Cost of Enzyme Stability. *PLoS Pathog* **11**, e1004949.
181. Abriata LA, Palzkill T, Dal Peraro M (2015) How structural and physicochemical determinants shape sequence constraints in a functional enzyme. *PLoS ONE* **10**, e0118684.
182. Liberles DA, Teichmann SA, Bahar I *et al.* (2012) The interface of protein structure, protein biophysics, and molecular evolution. *Protein science : a publication of the Protein Society* **21**, 769-785.
183. Risso VA, Manssour-Triedo F, Delgado-Delgado A *et al.* (2015) Mutational studies on resurrected ancestral proteins reveal conservation of site-specific amino acid preferences throughout evolutionary history. *Molecular biology and evolution* **32**, 440-455.
184. Tokuriki N, Tawfik DS (2009) Protein dynamism and evolvability. *Science* **324**, 203-207.
185. Nobeli I, Favia AD, Thornton JM (2009) Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nature biotechnology* **27**, 157-167.
186. Korzhnev DM, Kay LE (2008) Probing invisible, low-populated States of protein molecules by relaxation dispersion NMR spectroscopy: an application to protein folding. *Acc. Chem. Res.* **41**, 442-451.

## Apéndice

Asignación de BcII silvestre y mutantes.

Numeración	Residuo	Num. BBL	BcII wt		BcII N70S	
			<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>15</sup> N (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>15</sup> N (ppm)
4	V	30	8.211	122.119	8.125	122.227
5	E	31	8.450	126.061	8.446	125.655
6	K	32	8.334	123.237	8.337	123.210
7	T	33	8.276	118.252	8.282	118.097
8	V	34	7.963	124.781	8.031	124.588
9	I	35	9.198	128.453	9.219	128.402
10	K	36	8.515	124.088	8.506	123.986
11	N	37	8.352	119.435	8.340	119.399
12	E	38	8.835	119.865	8.859	120.011
13	T	39	7.353	104.080	7.377	104.069
14	G	40	7.567	110.321	7.579	110.289
15	T	41	8.067	111.763	8.095	111.684
16	I	42	7.812	119.660	7.844	119.786
17	S	43	9.046	119.209	9.071	119.118
18	I	44	9.366	119.476	9.397	119.972
19	S	45	9.292	117.901	9.284	117.969
20	Q	47	8.264	129.022	8.251	128.795
21	L	48	8.552	127.565	8.557	127.459
22	N	49	8.136	115.212	8.227	115.246
23	K	50	-	-	-	-
24	N	51	8.243	114.194	8.313	114.331
25	V	52	7.550	119.593	7.612	119.726
26	W	53	9.405	128.203	9.481	128.386
27	V	54	9.877	124.251	9.955	124.163
28	H	55	8.399	126.229	8.356	125.882
29	T	56	9.325	121.678	9.259	120.906
30	E	57	9.001	122.575	9.393	123.287
31	L	58	8.816	124.719	8.914	124.970
32	G	59	8.099	112.519	8.226	112.219
33	S	60	7.411	115.218	7.498	115.560
34	F	61	8.555	124.825	8.551	124.797
35	N	62	-	-	-	-
36	G	63	8.384	104.214	8.408	104.250
37	E	64	7.608	120.389	7.639	120.457
38	A	66	8.350	126.535	8.421	126.291
39	V	67	8.456	124.799	8.576	124.760
40	P	68	-	-	-	-
41	S	69	8.641	117.304	8.690	117.850

42	<b>N</b>	70	8.610	118.896	8.893	120.625
43	<b>G</b>	71	8.534	108.152	8.120	109.300
44	<b>L</b>	72	8.932	120.154	8.711	120.167
45	<b>V</b>	73	9.928	124.317	9.934	124.477
46	<b>L</b>	74	9.430	125.959	9.482	125.958
47	<b>N</b>	75	8.738	122.909	8.761	122.791
48	<b>T</b>	76	7.239	115.620	7.244	115.604
49	<b>S</b>	77	-	-	-	-
50	<b>K</b>	78	8.024	120.719	8.025	120.737
51	<b>G</b>	79	7.216	106.841	7.227	106.830
52	<b>L</b>	80	8.895	120.002	8.903	120.048
53	<b>V</b>	81	8.554	121.240	8.513	121.201
54	<b>L</b>	82	8.454	124.050	8.420	124.238
55	<b>V</b>	83	9.231	122.350	9.319	122.437
56	<b>D</b>	84	9.188	120.374	9.184	120.721
57	<b>S</b>	85	8.179	113.840	8.237	113.568
58	<b>S</b>	86	7.444	115.705	7.436	115.808
59	<b>W</b>	87	7.440	109.946	7.463	109.643
60	<b>D</b>	88	7.217	109.319	7.222	109.207
61	<b>D</b>	89	8.712	119.986	8.732	119.933
62	<b>K</b>	90	8.086	123.897	8.108	123.877
63	<b>L</b>	91	9.468	121.782	9.491	121.829
64	<b>T</b>	92	7.681	113.569	7.616	113.649
65	<b>K</b>	93	8.520	121.886	8.574	121.838
66	<b>E</b>	94	7.490	118.502	7.475	118.310
67	<b>L</b>	95	8.392	121.749	8.386	121.717
68	<b>I</b>	96	8.267	118.041	8.251	117.985
69	<b>E</b>	97	8.303	118.539	8.251	118.245
70	<b>M</b>	98	8.343	118.335	8.338	118.508
71	<b>V</b>	99	8.350	112.834	8.357	112.923
72	<b>E</b>	100	8.730	122.706	8.756	122.984
73	<b>K</b>	102	-	-	-	-
74	<b>K</b>	103	7.564	118.379	7.546	118.441
75	<b>F</b>	104	8.029	112.518	8.027	112.500
76	<b>Q</b>	105	7.660	116.131	7.695	116.158
77	<b>K</b>	106	7.383	115.221	7.427	115.153
78	<b>R</b>	107	8.040	116.426	8.047	116.391
79	<b>V</b>	109	10.077	123.500	10.086	123.475
80	<b>T</b>	110	8.940	116.279	8.974	116.357
81	<b>D</b>	111	7.089	119.482	7.130	119.547
82	<b>V</b>	112	9.333	119.159	9.345	119.146
83	<b>I</b>	113	8.764	127.316	8.799	127.337
84	<b>I</b>	114	8.617	130.035	8.607	130.000
85	<b>T</b>	115	10.938	119.108	11.117	119.512

86	H	116	7.112	107.013	7.058	106.754
87	A	117	8.708	120.659	8.668	120.957
88	H	118	5.986	114.161	6.078	114.642
89	A	119	-	-	-	-
90	D	120	8.567	107.363	8.411	107.063
91	R	121	6.577	106.506	6.533	105.775
92	I	122	7.493	118.232	7.531	118.551
93	G	123	8.205	114.213	8.187	114.310
94	G	124	7.158	106.048	7.179	106.049
95	I	125	8.053	119.544	8.095	119.582
96	K	126	9.160	125.448	9.185	125.501
97	T	127	7.813	118.117	7.846	118.255
98	L	128	7.603	117.417	7.652	117.477
99	K	129	8.179	117.990	8.220	117.928
100	E	130	8.387	121.127	8.410	121.128
101	R	131	7.406	115.625	7.411	115.689
102	G	133	7.760	108.839	7.780	108.863
103	I	134	8.007	122.209	8.034	122.252
104	K	135	7.326	126.985	7.360	127.028
105	A	136	8.562	129.364	8.579	129.370
106	H	137	9.182	121.355	9.193	121.416
107	S	138	8.377	114.501	8.399	114.458
108	T	139	10.077	114.136	10.070	114.076
109	A	140	8.951	127.536	8.965	127.515
110	L	141	8.177	121.455	8.191	121.480
111	T	142	8.018	117.371	8.046	117.433
112	A	143	7.321	121.641	7.347	121.717
113	E	144	7.851	119.135	7.886	119.201
114	L	145	8.419	121.004	8.446	120.988
115	A	146	8.750	123.170	8.761	123.210
116	K	147	7.513	117.494	7.546	117.560
117	K	148	7.970	120.888	7.997	120.869
118	N	149	7.881	115.647	7.883	115.601
119	G	150	7.657	106.696	7.669	106.666
120	Y	167	8.167	120.096	8.177	120.079
121	E	168	7.933	118.858	7.948	118.930
122	E	169	8.162	116.791	8.176	116.846
123	P	170	-	-	-	-
124	L	171	8.721	113.660	8.737	113.659
125	G	172	7.271	102.876	7.283	102.911
126	D	173	9.659	115.447	9.672	115.431
127	L	174	8.433	121.728	8.409	121.876
128	Q	175	7.874	121.821	7.906	121.879
129	T	176	8.319	118.223	8.336	118.192

130	V	177	7.436	118.448	7.497	118.537
131	T	178	8.583	121.783	8.554	121.943
132	N	179	8.912	125.939	8.925	125.913
133	L	180	9.132	124.401	9.145	124.407
134	K	181	7.950	122.574	7.958	122.504
135	F	182	8.615	125.699	8.624	125.645
136	G	183	8.783	112.477	8.794	112.469
137	N	184	-	-	-	-
138	M	185	8.284	122.145	8.227	122.142
139	K	186	7.808	126.155	7.829	126.104
140	V	187	8.619	121.081	8.539	121.272
141	E	188	9.421	128.857	9.472	128.910
142	T	189	9.513	118.253	9.535	118.277
143	F	190	8.563	121.525	8.637	121.150
144	Y	191	8.767	130.175	8.753	130.071
145	P	192	-	-	-	-
146	G	193	-	-	-	-
147	K	194	7.812	112.266	7.830	112.259
148	G	195	7.824	106.041	7.835	106.075
149	H	196	6.637	132.945	6.631	133.037
150	T	197	7.267	102.633	7.314	102.752
151	E	198	9.697	119.733	9.716	119.622
152	D	199	9.500	110.863	9.472	110.960
153	N	200	6.371	115.919	6.383	115.961
154	I	201	8.178	113.245	8.221	113.651
155	V	202	9.085	112.570	9.051	111.946
156	V	203	7.849	118.132	7.862	118.049
157	W	204	10.132	131.412	10.156	131.328
158	L	205	7.886	125.649	7.952	125.756
159	P	209	-	-	-	-
160	Q	210	8.739	114.310	8.768	114.309
161	Y	211	6.692	112.485	6.711	112.329
162	N	215	7.407	116.811	7.439	116.798
163	I	216	6.096	114.770	6.117	114.857
164	L	217	8.789	127.182	8.831	127.331
165	V	218	10.337	129.011	10.384	128.865
166	G	219	8.408	114.539	8.370	114.249
167	G	220	7.737	106.097	7.844	106.640
168	C	221	8.189	125.541	8.259	124.957
169	L	222	6.557	115.825	6.630	115.933
170	V	223	7.515	113.957	7.382	113.499
171	K	224	8.398	124.754	8.382	124.240
172	S	225	8.235	112.652	8.312	113.196
173	T	226	8.323	113.854	8.220	114.340

174	S	227	7.877	113.075	7.884	113.057
175	A	228	7.633	126.186	7.633	126.020
176	K	229	8.854	121.793	8.883	121.753
177	D	230	7.784	116.337	7.806	116.468
178	L	231	8.338	115.338	8.334	115.251
179	G	232	8.848	112.503	8.861	112.263
180	N	233	-	-	-	-
181	V	234	8.770	122.270	8.780	122.119
182	A	235	8.081	126.732	8.092	126.736
183	D	236	7.756	113.731	7.725	113.642
184	A	237	6.805	119.777	6.832	119.808
185	Y	238	8.833	121.598	8.839	121.565
186	V	239	8.601	119.197	8.615	118.944
187	N	240	8.852	117.315	8.861	117.272
188	E	241	7.777	119.645	7.796	119.625
189	W	242	7.772	121.904	7.801	121.943
190	S	243	8.548	113.468	8.555	113.448
191	T	244	7.539	120.715	7.550	120.709
192	S	245	8.314	119.974	8.340	119.987
193	I	246	8.075	120.697	8.094	120.739
194	E	247	8.559	121.920	8.562	121.551
195	N	248	8.554	118.228	8.583	118.245
196	V	249	7.628	121.992	7.650	121.997
197	L	250	8.060	118.817	8.072	118.800
198	K	251	7.897	115.233	7.926	115.299
199	R	252	6.973	119.289	6.992	119.456
200	Y	253	7.134	118.538	7.164	118.582
201	R	254	7.802	119.214	7.809	119.219
202	N	255	8.450	118.134	8.468	118.119
203	I	256	8.201	120.755	8.202	120.737
204	N	257	9.296	126.654	9.334	126.618
205	A	258	7.322	118.529	7.339	118.579
206	V	259	8.604	119.785	8.576	120.006
207	V	260	8.876	126.574	8.922	127.023
208	P	261	-	-	-	-
209	G	262	7.079	108.393	6.685	103.132
210	H	263	7.607	115.141	7.611	115.332
211	G	264	9.280	112.139	8.579	110.770
212	E	265	8.207	117.816	8.089	117.663
213	V	277	8.295	120.883	8.214	120.443
214	G	278	8.093	114.286	8.280	114.877
215	D	279	8.337	128.118	8.363	127.392
216	K	280	8.618	117.842	8.661	117.872
217	G	281	9.161	108.464	9.189	108.551

218	L	282	8.517	121.313
219	L	283	7.945	120.745
220	L	284	6.881	118.585
221	H	285	8.738	119.224
222	T	286	7.592	114.583
223	L	287	7.385	118.195
224	D	288	7.618	119.986
225	L	289	7.365	118.466
226	L	290	6.953	119.131
227	K	291	6.970	125.666

8.454	121.441
7.955	120.733
6.934	118.672
8.792	119.012
7.589	114.764
7.377	118.265
7.656	119.819
7.312	118.495
7.004	119.241
6.982	125.641

Numeración	Residuo	Num. BBL	BcII G262S	
			<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>15</sup> N (ppm)
4	V	30	8.112	122.167
5	E	31	8.435	125.631
6	K	32	8.313	123.190
7	T	33	8.306	118.631
8	V	34	8.071	124.986
9	I	35	9.213	128.650
10	K	36	8.493	123.862
11	N	37	8.377	119.433
12	E	38	8.855	119.696
13	T	39	7.336	104.026
14	G	40	7.576	110.296
15	T	41	8.068	111.741
16	I	42	7.797	119.910
17	S	43	9.050	118.970
18	I	44	9.311	118.428
19	S	45	9.284	117.511
20	Q	47	8.206	129.055
21	L	48	8.567	127.815
22	N	49	8.121	115.124
23	K	50	-	-
24	N	51	8.240	114.003
25	V	52	7.563	119.683
26	W	53	9.412	128.065
27	V	54	9.868	124.155
28	H	55	8.410	125.794
29	T	56	9.324	120.953
30	E	57	9.213	122.707
31	L	58	8.948	125.558
32	G	59	8.215	112.058

BcII N70S/G262S	
<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>15</sup> N (ppm)
8.115	122.229
8.436	125.663
8.319	123.234
8.315	118.539
8.057	124.821
9.184	128.400
8.500	123.860
8.350	119.469
8.863	119.938
7.354	104.091
7.575	110.321
8.086	111.721
7.822	119.931
9.052	119.031
9.357	119.309
9.258	117.860
8.283	129.038
8.553	127.746
8.183	115.260
-	-
8.243	114.301
7.620	119.825
9.455	128.357
9.934	123.969
8.400	126.021
9.285	120.433
9.523	123.566
8.948	125.505
8.237	111.976

33	S	60	7.395	115.439	7.423	115.654
34	F	61	8.499	124.013	8.500	124.130
35	N	62	-	-	-	-
36	G	63	8.372	104.435	8.381	104.415
37	E	64	7.649	120.532	7.650	120.556
38	A	66	8.410	126.407	8.422	126.487
39	V	67	8.517	124.117	8.537	124.367
40	P	68	-	-	-	-
41	S	69	8.585	117.445	8.723	117.684
42	N	70	9.220	121.994	9.101	121.993
43	G	71	8.494	108.493	8.035	109.494
44	L	72	8.763	118.845	8.580	119.132
45	V	73	9.889	123.833	9.871	123.879
46	L	74	9.483	125.875	9.505	125.930
47	N	75	8.800	122.877	8.766	122.864
48	T	76	7.245	115.579	7.239	115.649
49	S	77	-	-	-	-
50	K	78	8.022	120.646	8.020	120.722
51	G	79	7.212	106.740	7.211	106.812
52	L	80	8.917	119.879	8.902	119.974
53	V	81	8.502	121.163	8.499	121.201
54	L	82	8.438	123.969	8.422	124.225
55	V	83	9.215	122.184	9.242	122.344
56	D	84	9.138	120.321	9.133	120.547
57	S	85	8.238	113.525	8.217	113.312
58	S	86	7.516	115.940	7.460	115.881
59	W	87	7.417	109.978	7.411	109.743
60	D	88	7.151	108.823	7.162	108.888
61	D	89	8.689	119.893	8.699	119.944
62	K	90	8.090	123.881	8.097	123.879
63	L	91	9.453	121.307	9.467	121.590
64	T	92	7.545	113.613	7.560	113.659
65	K	93	8.562	122.060	8.565	122.009
66	E	94	7.485	118.113	7.472	118.146
67	L	95	8.354	121.693	8.354	121.645
68	I	96	-	-	8.230	117.919
69	E	97	8.205	117.794	8.220	118.169
70	M	98	8.231	118.424	8.280	118.559
71	V	99	8.398	112.841	8.374	112.934
72	E	100	8.701	122.744	8.715	122.859
73	K	102	-	-	-	-
74	K	103	7.621	118.304	7.575	118.425
75	F	104	8.045	112.455	8.031	112.495
76	Q	105	7.657	116.028	7.674	116.127

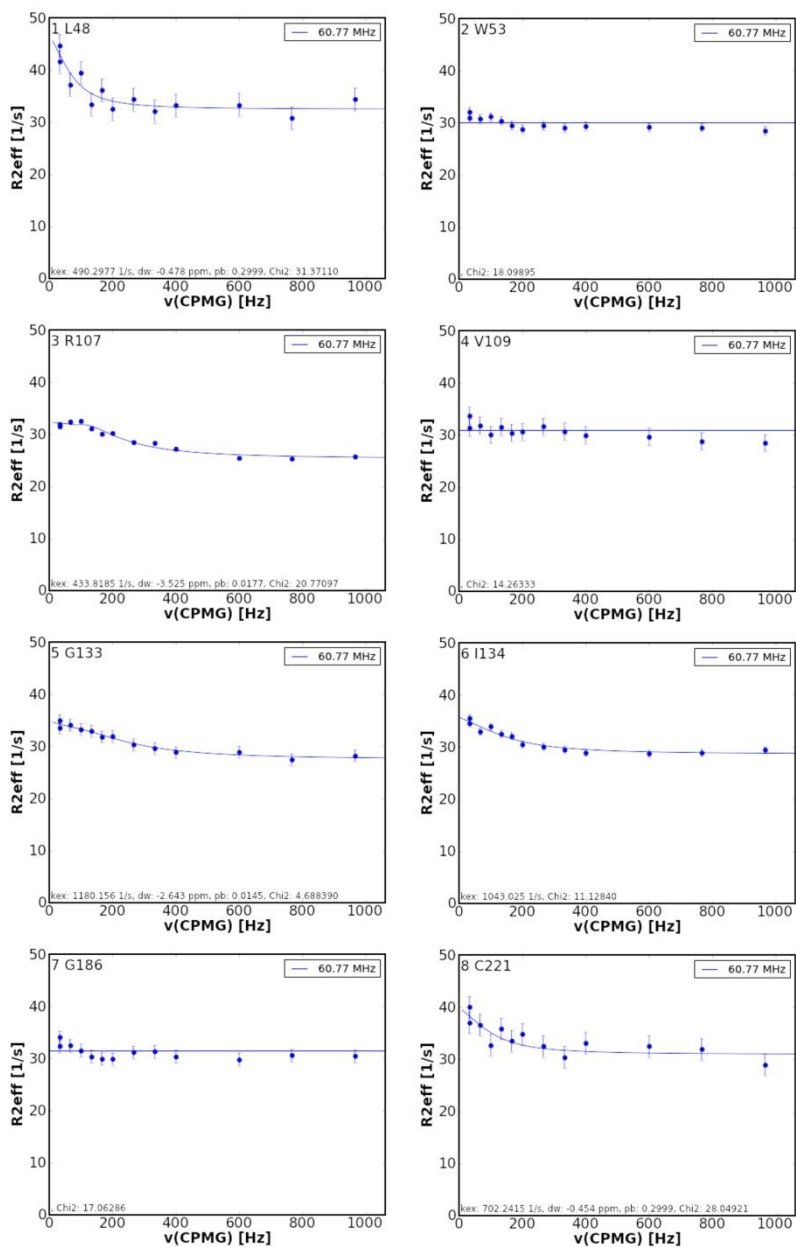
77	<b>K</b>	106	7.407	115.134	7.408	115.168
78	<b>R</b>	107	8.045	116.412	8.042	116.442
79	<b>V</b>	109	10.087	123.361	10.082	123.434
80	<b>T</b>	110	8.931	116.279	8.948	116.364
81	<b>D</b>	111	7.098	119.362	7.111	119.482
82	<b>V</b>	112	9.338	118.965	9.330	119.081
83	<b>I</b>	113	8.734	127.182	8.756	127.333
84	<b>I</b>	114	8.504	129.469	8.531	129.575
85	<b>T</b>	115	10.995	118.991	11.111	119.315
86	<b>H</b>	116	6.966	106.588	6.988	106.761
87	<b>A</b>	117	8.497	121.464	8.547	121.316
88	<b>H</b>	118	6.190	114.927	6.175	115.014
89	<b>A</b>	119	-	-	-	-
90	<b>D</b>	120	8.489	109.103	-	-
91	<b>R</b>	121	6.871	108.612	6.761	107.660
92	<b>I</b>	122	7.828	119.048	7.776	118.859
93	<b>G</b>	123	8.173	113.636	8.137	113.762
94	<b>G</b>	124	7.168	105.977	7.176	106.054
95	<b>I</b>	125	8.070	119.293	8.079	119.415
96	<b>K</b>	126	9.144	125.636	9.161	125.656
97	<b>T</b>	127	7.857	117.876	7.854	118.036
98	<b>L</b>	128	7.568	117.313	7.591	117.403
99	<b>K</b>	129	8.185	117.754	8.195	117.974
100	<b>E</b>	130	8.406	121.043	8.395	121.156
101	<b>R</b>	131	7.373	115.660	7.384	115.727
102	<b>G</b>	133	7.762	108.692	7.770	108.766
103	<b>I</b>	134	7.967	122.179	7.987	122.239
104	<b>K</b>	135	7.331	126.937	7.350	127.015
105	<b>A</b>	136	8.587	129.365	8.585	129.429
106	<b>H</b>	137	9.180	121.394	9.186	121.496
107	<b>S</b>	138	8.385	114.528	8.386	114.557
108	<b>T</b>	139	9.946	113.907	9.989	114.012
109	<b>A</b>	140	8.918	127.446	8.929	127.522
110	<b>L</b>	141	8.201	121.374	8.197	121.466
111	<b>T</b>	142	8.035	117.214	8.039	117.326
112	<b>A</b>	143	7.352	121.805	7.352	121.830
113	<b>E</b>	144	7.854	119.010	7.857	119.126
114	<b>L</b>	145	8.477	120.782	8.468	120.907
115	<b>A</b>	146	8.741	123.078	8.749	123.168
116	<b>K</b>	147	7.424	117.164	7.466	117.298
117	<b>K</b>	148	7.914	120.795	7.951	120.818
118	<b>N</b>	149	7.985	115.627	7.936	115.642
119	<b>G</b>	150	7.637	106.690	7.645	106.721
120	<b>Y</b>	167	8.215	120.033	8.197	120.081

121	E	168	7.946	118.679	7.943	118.806
122	E	169	8.178	116.716	8.175	116.807
123	P	170	-	-	-	-
124	L	171	8.729	113.622	8.734	113.687
125	G	172	7.277	102.767	7.283	102.831
126	D	173	9.663	115.386	9.665	115.445
127	L	174	8.420	121.408	8.411	121.715
128	Q	175	7.914	121.787	7.915	121.887
129	T	176	8.326	118.113	8.330	118.226
130	V	177	7.476	118.423	7.485	118.545
131	T	178	8.521	121.714	8.532	121.907
132	N	179	8.915	125.861	8.917	125.925
133	L	180	9.156	124.347	9.156	124.428
134	K	181	7.954	122.487	7.955	122.551
135	F	182	8.618	125.622	8.620	125.705
136	G	183	8.781	112.390	8.783	112.446
137	N	184	-	-	-	-
138	M	185	8.217	122.088	8.219	122.161
139	K	186	7.795	126.203	7.806	126.234
140	V	187	8.535	121.274	8.546	121.495
141	E	188	9.498	128.983	9.500	129.035
142	T	189	9.503	118.211	9.508	118.274
143	F	190	8.575	120.976	8.570	121.063
144	Y	191	8.725	130.088	8.749	130.092
145	P	192	-	-	-	-
146	G	193	-	-	-	-
147	K	194	7.822	112.245	7.818	112.313
148	G	195	7.787	105.859	7.808	105.970
149	H	196	6.614	133.052	6.608	133.118
150	T	197	7.318	102.790	7.339	102.849
151	E	198	9.745	119.203	9.726	119.305
152	D	199	9.320	111.122	9.379	111.139
153	N	200	6.368	115.808	6.376	115.881
154	I	201	8.203	113.265	8.194	113.427
155	V	202	9.035	111.818	9.014	111.635
156	V	203	7.724	117.720	7.704	117.687
157	W	204	10.125	131.400	10.128	131.373
158	L	205	8.013	125.690	8.009	125.742
159	P	209	-	-	-	-
160	Q	210	8.748	114.250	8.765	114.272
161	Y	211	6.690	112.382	6.721	112.433
162	N	215	7.417	116.951	7.429	117.018
163	I	216	6.078	114.770	6.089	114.883
164	L	217	8.857	127.371	8.812	127.404

165	V	218	10.365	128.545	10.359	128.642
166	G	219	8.453	113.612	8.238	113.668
167	G	220	7.779	108.689	7.800	108.791
168	C	221	-	-	-	-
169	L	222	6.836	115.775	6.894	116.050
170	V	223	6.855	111.902	-	-
171	K	224	-	-	-	-
172	S	225	8.414	113.550	8.463	114.488
173	T	226	8.162	113.484	8.215	113.869
174	S	227	7.845	113.108	7.838	113.202
175	A	228	7.605	126.002	7.616	126.018
176	K	229	8.850	121.332	8.860	121.605
177	D	230	7.751	116.323	7.784	116.541
178	L	231	8.324	115.756	8.305	115.680
179	G	232	8.832	112.015	8.831	112.051
180	N	233	-	-	-	-
181	V	234	8.768	122.106	8.769	122.201
182	A	235	8.179	126.666	8.152	126.705
183	D	236	7.665	113.865	7.691	113.918
184	A	237	6.854	119.735	6.854	119.835
185	Y	238	8.853	121.479	8.835	121.605
186	V	239	8.591	118.977	8.609	119.104
187	N	240	8.828	117.259	8.831	117.342
188	E	241	7.816	119.545	7.837	119.621
189	W	242	7.848	121.902	7.860	122.019
190	S	243	8.412	113.213	8.413	113.240
191	T	244	7.490	120.537	7.487	120.592
192	S	245	8.409	120.032	8.412	120.090
193	I	246	8.082	120.733	8.088	120.811
194	E	247	8.533	121.594	8.546	121.750
195	N	248	8.562	118.248	8.571	118.325
196	V	249	7.655	121.984	7.661	122.051
197	L	250	8.060	118.818	8.069	118.881
198	K	251	7.893	115.266	7.902	115.323
199	R	252	6.989	119.146	6.997	119.432
200	Y	253	7.176	118.583	7.177	118.653
201	R	254	7.783	119.090	7.782	119.153
202	N	255	8.450	118.055	8.452	118.136
203	I	256	8.224	120.816	8.225	120.876
204	N	257	9.297	126.584	9.327	126.688
205	A	258	7.372	118.428	7.375	118.471
206	V	259	8.613	120.101	8.579	120.337
207	V	260	9.025	126.343	9.034	126.764
208	P	261	-	-	-	-

209	<b>G</b>	262	7.170	114.049	6.944	111.735
210	<b>H</b>	263	7.222	116.106	7.408	116.483
211	<b>G</b>	264	-	-	-	-
212	<b>E</b>	265	8.157	117.313	8.330	119.379
213	<b>V</b>	277	8.255	119.998	8.235	120.299
214	<b>G</b>	278	8.153	114.920	8.224	114.842
215	<b>D</b>	279	8.352	126.924	8.367	127.095
216	<b>K</b>	280	8.628	117.494	8.647	117.677
217	<b>G</b>	281	9.186	108.790	9.166	108.730
218	<b>L</b>	282	8.419	121.101	8.430	121.331
219	<b>L</b>	283	-	-	-	-
220	<b>L</b>	284	6.936	118.626	6.923	118.717
221	<b>H</b>	285	8.741	118.967	8.732	119.079
222	<b>T</b>	286	7.566	114.606	7.582	114.717
223	<b>L</b>	287	7.396	118.359	7.377	118.296
224	<b>D</b>	288	7.607	119.765	7.649	119.815
225	<b>L</b>	289	7.311	118.464	7.310	118.483
226	<b>L</b>	290	6.982	119.074	6.995	119.111
227	<b>K</b>	291	6.963	125.547	6.969	125.608

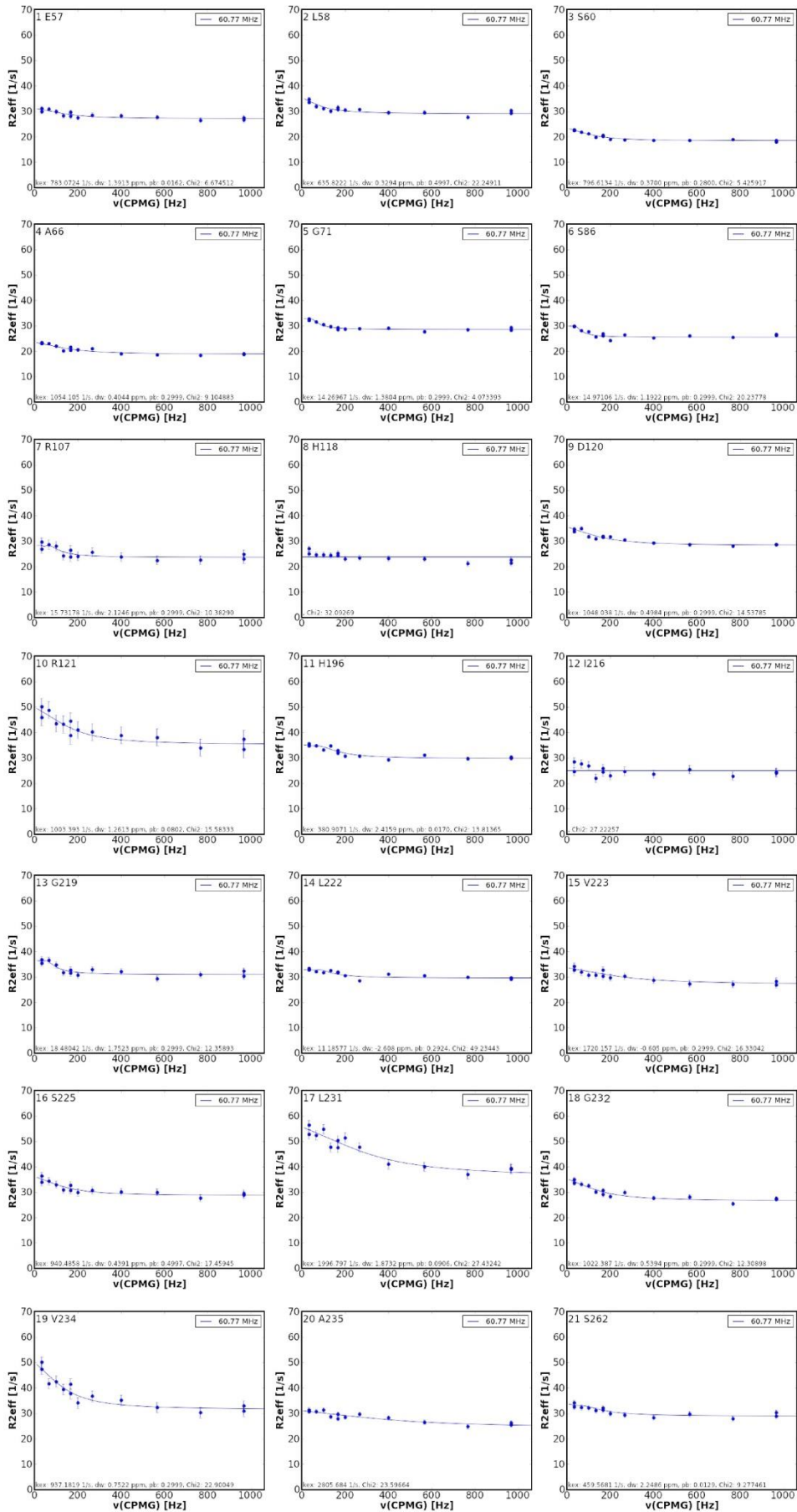
Ajuste de los datos de dispersión de la relajación con el programa NESSY para la enzima BclI silvestre.



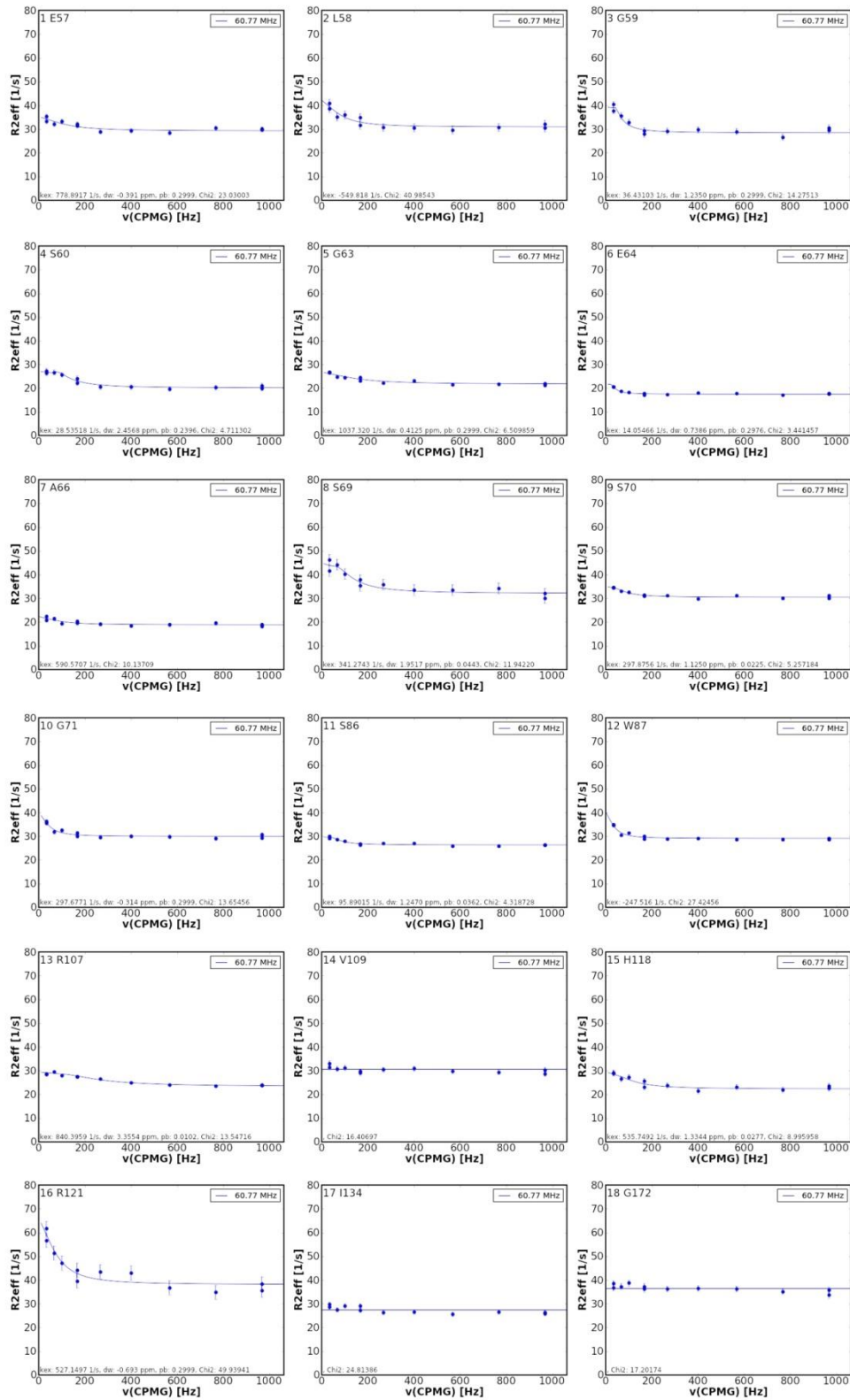
<b>Residuo</b>	<b><math>k_{ex}</math> [1/s]</b>	<b>err</b>
L48	500	200
W53		
R107	400	100
V109		
G133	1200	600
I134	1000	100
G186		
C221	700	300

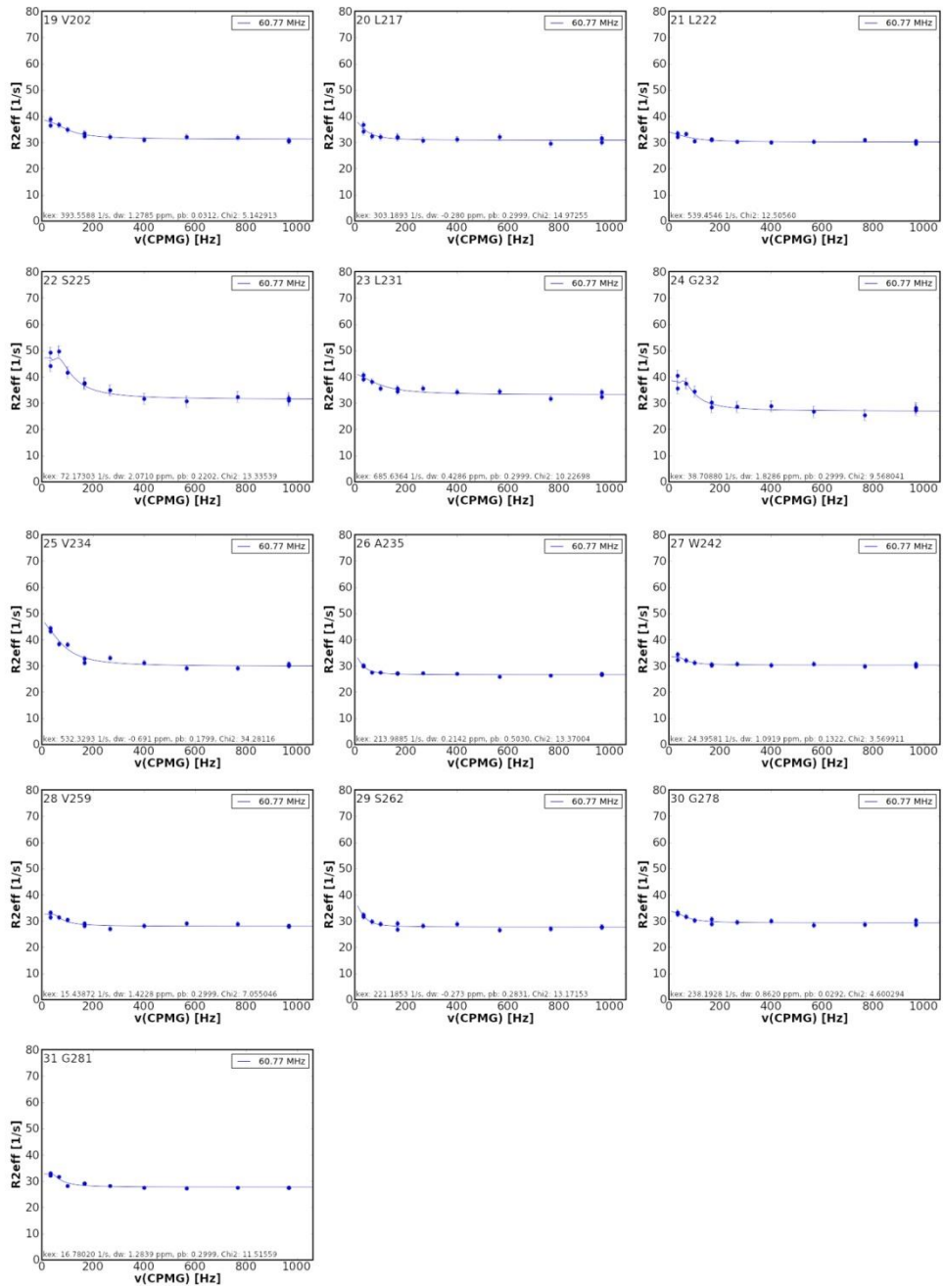
Ajuste de los datos de dispersión de la relajación con el programa NESSY para la enzima BclI G262S.

<b>Residuo</b>	<b><math>k_{ex}</math> [1/s]</b>	<b>err</b>
E57	800	400
L58	600	200
S60	800	100
A66	1100	200
G71	<160	
S86	<140	
R107	<100	
H118		
D120	1000	100
R121	1000	500
H196	400	200
I216		
G219	<70	
L222	<140	
V223	1700	500
S225	900	300
L231	2000	500
G232	1000	200
V234	900	200
A235	2800	700
S262	500	400



Ajuste de los datos de dispersión de la relajación con el programa NESSY para la enzima BclI G262S/N70S.





<b>Residuo</b>	<b><math>k_{ex}</math> [1/s]</b>	<b>err</b>
E57	800	200
L58	600	100
G59	<180	
S60	<250	
G63	1000	300
E64	<80	
A66	600	200
S69	300	300
S70	300	200
G71	300	100
S86	<190	
W87	250	40
R107	800	100
V109		
H118	500	300
R121	500	100
I134		
G172		
V202	400	300
L217	300	100
L222	500	100
S225	<220	
L231	700	200
G232	<120	
V234	500	100
A235	200	90
W242	<220	
V259	<200	
S262	200	100
G278	200	200
G281	<40	