



Caracterização estrutural e estudo da eficiência catalítica da enzima β -lactamase OXA-499

*Rafael Rospendowski¹, Luiz M. Costa¹, Víctor U. Antunes¹ e Denize C. Favaro¹.

¹Universidade Estadual de Campinas, Brasil

[*r223719@dac.unicamp.br](mailto:r223719@dac.unicamp.br)

Palavras-chave: evolução enzimática, catálise enzimática, bioremediação.

Introdução:

Devido à grande aplicabilidade frente à diversas bactérias, poucos efeitos colaterais e uma cinética favorável, antibióticos β -lactâmicos sempre foram amplamente aplicados em tratamentos de infecções bacterianas. Porém, seu uso indiscriminado vem trazendo sérios problemas ligados diretamente ao seu destino final, sendo o principal: possibilitar a seleção de bactérias resistentes frente à essa classe de antibióticos[1]. Os antibióticos β -lactâmicos são caracterizados pela presença do anel β -lactâmico, onde as classes mais utilizadas são Penicilinas (primeira classe de β -lactâmicos a ser usada clinicamente – 1946 com a benzilpenicilina), Cefalosporinas, Carbapenêmicos (precursor Tienamicina, descoberto em meados de 1970), sendo o Imipenem o primeiro a ser usado clinicamente – aprovado em 1985, e Monobactâmicos, **Figura 1.** [1].

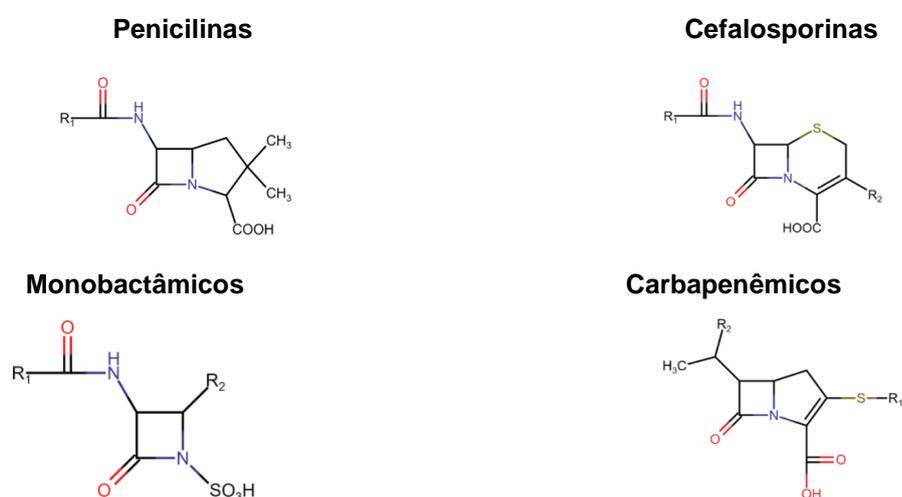


Figura 1. Estrutura dos quatro principais tipos de antibióticos β -lactâmicos.

Devido à sua estrutura, os β -lactâmicos são capazes de ligar e inativar irreversivelmente as *transpeptidases* conhecidas como *Penicillin Binding Proteins* (PBPs). Uma vez que essas enzimas atuam no processo de síntese da camada de peptidoglicano, principal componente da parede celular de bactérias gram-negativas, sua inibição leva à perda da regulação osmótica e consequente morte celular[2]. Entretanto, se tratando da aplicação de qualquer agente farmacêutico, o potencial de resistência ou tolerância do organismo frente à aplicação desses compostos é um claro fator limitador a qualquer tipo de tratamento. No que se refere à resistência antibióticos β -lactâmicos, os principais mecanismos bacterianos são: **impermeabilização da membrana externa**, que se trata basicamente em modificações nos canais de porina, que resultam nessa impermeabilização seletiva na célula, **mutações nas PBPs**, que objetivamente seriam alterações nos alvos destes antibióticos, as PBP's, que acarretam em uma anulação ou diminuição efetiva na atividade dos β -lactâmicos, **bombas de efluxo**, que consiste no bombeamento de líquidos do meio intracelular para o meio extracelular, que resulta a concentração destes antibióticos, tornando-os ineficazes, e principalmente, as **β -lactamases**[3], sendo este o mais efetivo método de resistência bacteriana frente aos antibióticos, que consiste na existência das proteínas β -lactamases, que são enzimas capazes de hidrolisar os anéis β -lactâmicos, na sua ligação CO-N, tornando o antibiótico em questão completamente inativo.



Metodologia:

Expressão e purificação da OXA-499: Após o processo de expressão, a enzima foi purificada utilizando uma coluna de afinidade de níquel (Ni⁺²HisTrap^{HP}) e uma gel-filtração (purificação por exclusão de tamanho) (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg) com eluição isocrática em tampão 50 mM NaH₂PO₄ pH 7. Todo o processo de preparação das enzimas (expressão e purificação) foi acompanhado por eletroforese de gel de poliácridamida (uma para cada novo processo de expressão realizado).

Caracterização dos parâmetros cinéticos (k_{cat}, K_m) da enzima livre: Os parâmetros cinéticos (k_{cat} e K_m) para a OXA-499 frente aos antibióticos ampicilina, cloxacilina, oxacilina, meropenem, ertapenem, aztreonam e ceftazidima foram obtidos através das técnicas UV-Visível e Calorimetria de Titulação Isotérmica. Todos experimentos foram realizados em tampão fosfato 50 mM, pH 7, suplementado com 25 mM de bicarbonato de sódio. Os parâmetros cinéticos obtidos para a OXA-499 serão sempre comparados com os valores obtidos para a OXA-143, enzima que dá nome à família a qual pertence a OXA-499 e, com a qual, esta enzima possui 93 % de identidade de sequência.

A análise dos dados foi realizada com a equação de Michaelis-Menten, **Equação 1**.

$$\frac{V}{[E]} = \frac{k_{cat} * [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo que:

- V: Velocidade inicial de reação;
- [S]: Concentração de Substrato;
- K_m: Constante de Michaelis;
- k_{cat} = V_{max}/[E]: Constante Catalítica.

Resultados e Discussão:

UV-Vis: Os ensaios de cinética frente à ampicilina foram realizados em comprimento de onda fixo, 235 nm. A concentração de enzima na cubeta foi mantida constante, 22 nM, e a do antibiótico foi variada de 20 μM a 2500 μM, **Figura 2**. É importante ressaltar que a OXA-499 se mostrou mais ativa que a enzima OXA-143 (k_{cat}/K_M = 605 s⁻¹mM).

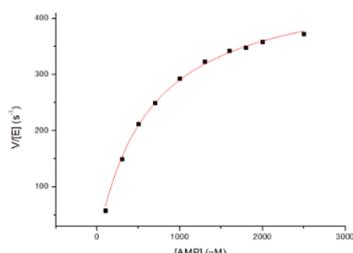


Figura 2: Curva de degradação da Ampicilina em tampão fosfato 50 mM e bicarbonato 25 mM e pH 7,0 na presença de 22 nM de OXA-499.

K_m = 624,9 μM e k_{cat} = 472,0 s⁻¹;

k_{cat}/K_m = 755,3 s⁻¹mM

Para os antibióticos carbapenêmicos, que apresentam afinidade enzimática pelas OXAs na ordem de nanomolar, o K_M foi determinado através de experimentos onde estes são tratados como inibidores competitivos[4]. Os experimentos foram realizados monitorando a absorbância em 235 nm, usando uma concentração fixa de ampicilina de 400 μM, variando as concentrações de meropenem e ertapenem, **Tabela 1**. Os dados foram fitados conforme a **Equação 2**.

$$V_c = v_u - \frac{v_u [I]}{\left(K_{mI} \left(1 + \frac{[S]}{K_{mS}} \right) \right) + [I]} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo que:

- V_c: Velocidade de reação calculada;
- v_u: Velocidade de catálise da Ampicilina na ausência de inibidores;
- K_{mI}: Constante de Michaelis do inibidor;
- K_{mS}: Constante de Michaelis da ampicilina na ausência de inibidores.
- [I]: Concentração de inibidor, ou seja, carbapenêmicos.



Tabela 1: Parâmetros cinéticos, k_{cat} e K_m , para a OXA-499 adquiridas pelo método de UV-Vis. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 50 mM, bicarbonato 25 mM, pH 7.

Meropenem	
K_m	40 nM
k_{cat}	0,027 s ⁻¹
k_{cat}/K_m	675 s ⁻¹ mM ⁻¹
Ertapenem	
K_m	25,6 nM
k_{cat}	0,032 s ⁻¹
k_{cat}/K_m	1250 s ⁻¹ mM ⁻¹

Vale ressaltar que a OXA-499 é uma carbapenemase menos eficiente que a OXA-143 e que as razões para essa menor eficiência estão sendo investigados e serão reportados futuramente.

Calorimetria de Titulação Isotérmica: As cinéticas com os substratos oxacilina, cloxacilina e aztreonam foram feitas unicamente em um microcalorímetro ITC-200. Os ensaios foram realizados utilizando o método desenvolvido por Todd & Gomez[5], utilizando a enzima OXA-499 na célula a uma concentração de 50 nM (oxacilina e cloxacilina), 100 μM (aztreonam) e os antibióticos à 10 mM na seringa. Primeiramente, foram realizados experimentos para a obtenção do ΔH . A seguir, foram obtidos experimentos *steps*, e os parâmetros cinéticos (k_{cat} e K_m) obtidos através deste último experimento com os dados advindos das curvas do ΔH .

Nestes experimentos, o calor é detectado à medida que o substrato é injetado na célula calorimétrica. E com esses dados, é possível obter o parâmetro termodinâmico ΔH , que por fim, com o conhecimento de todos esses parâmetros e o volume da célula, têm-se a velocidade de reação, que pode ser fitada segundo os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten.

Os parâmetros cinéticos, k_{cat} e K_m , apresentados na **Tabela 2** foram obtidos através do experimento de múltiplas injeções (9 x 2 μL; 2 x 4 μL e 2 x 5 μL), e o parâmetro termodinâmico (ΔH) para a OXA-499 frente à diferentes antibióticos está apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos, k_{cat} e K_m , para a OXA-499 (50 nM) adquiridas pelo método calorimétrico de Titulação Isotérmica. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 50 mM, bicarbonato 25 mM, pH 7.

Cloxacilina (10 mM)	
K_m	1,25 mM
k_{cat}	46,8 s ⁻¹
k_{cat}/K_m	37,44 s ⁻¹ mM ⁻¹
Oxacilina (10 mM)	
K_m	4,10 mM
k_{cat}	34,8 s ⁻¹
k_{cat}/K_m	8,49 s ⁻¹ mM ⁻¹

Dado o exposto, é possível fazer comparações diretas com a enzima OXA-143 (enzima que dá o nome à classe que a OXA-499 esta inserida), quanto aos substratos ampicilina, oxacilina e cloxacilina a OXA-499 possui menores valores de k_{cat} do que em relação à OXA-143, já quanto ao K_m , para todos os valores o único menor é para o substrato ampicilina, e finalmente, quanto à eficiência enzimática (parâmetro fundamental para a análise de processos com catálise enzimática), a OXA-499 terá um maior valor apenas para o caso da ampicilina.

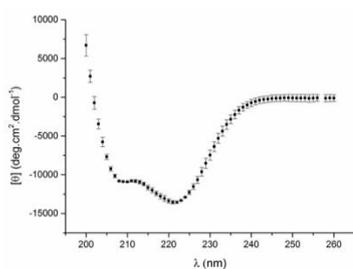
Tabela 3: Parâmetro termodinâmico (ΔH) para a OXA-499 adquiridas pelo método calorimétrico de Titulação Isotérmica. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 50 mM, bicarbonato 25 mM, pH 7. Hidrólise completa do substrato.

Antibióticos	OXA - 499 ΔH (cal.mol ⁻¹)
Ampicilina	-12529,82
Oxacilina	-15633,4
Cloxacilina	-17132,6
Aztreonam	-18060



Caracterização estrutural (CD): Para investigação da estrutura secundária e estabilidade térmica da enzima OXA-499, foram realizados ensaios de dicroísmo circular com soluções contendo 8 μM da proteína em tampão pH 7,0 com Fosfato 50 mM e Bicarbonato 25 mM. Assim, para o experimento de desnovelamento térmico (**Figura 3B**), obteve-se o resultado de que a temperatura de *melting* (T_m) é de 48,9°C e com o espectro da proteína (**Figura 3A**), obteve-se um percentual de α -Hélice de 42,4 %.

A



B

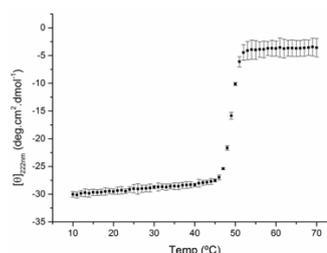
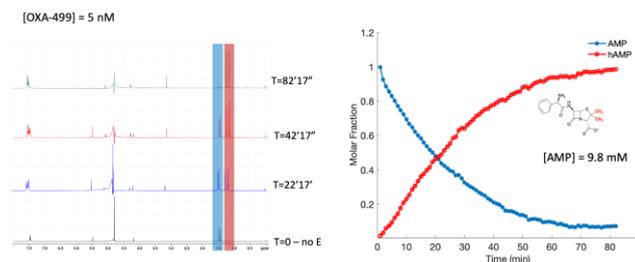


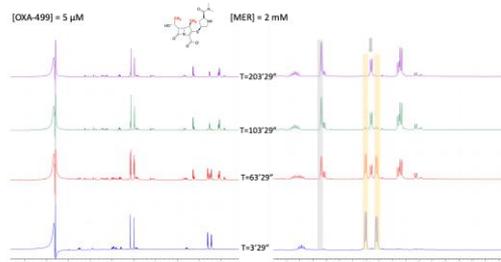
Figura 3: A Espectro de CD e B desnaturação térmica da enzima OXA-499.

RMN: A atividade da OXA-499 foi testada via RMN frente todos os substratos mencionados, ver **Figura 4**. Foi visto por meio dessa técnica, que a OXA-499 é capaz de hidrolisar todas as classes testadas, exceto a ceftazidima (dado não mostrado). É importante mencionar que os experimentos de RMN são primordiais para verificar a atividade enzimática, uma vez que esta técnica não deixa dúvida quanto à hidrólise do substrato.

A) Ampicilina



B) Meropenem



C) Aztreonam

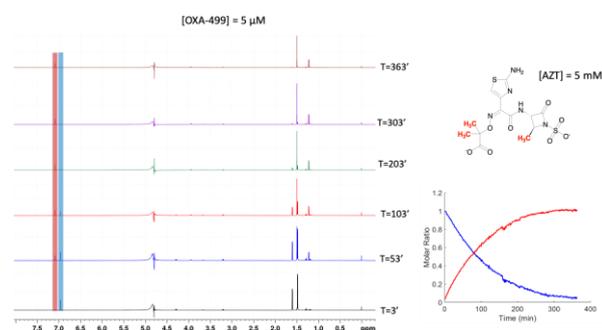


Figura 4: Cinética enzimática por RMN. A) Ampicilina; B) Meropenem; C) Aztreonam.

Conclusão:

Dado exposto, as constantes cinéticas adquiridas pela técnica de UV indica alta afinidade pelos antibióticos carbapenêmicos (K_M muito baixo – na escala nanomolar). Resultado esse que traz à tona um importante fator na resistência de bactérias. Como a quantidade desses fármacos que chega ao periplasma do indivíduo é muito baixa (já que é comum que as bactérias tenham todos os mecanismos de resistência), esse fato acaba requisitando que as β -lactamases sejam evoluídas ao passo de formarem interações de alta afinidade com esses substratos, impedindo-os de atingir o seu alvo, as *Penicilin Binding Proteins* (PBPs).



Com isso, considerando as constantes cinéticas é visível que, a exceção da ceftazidima, a OXA-499 apresenta boa eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) contra todos os antibióticos testados. Com base nisso, a enzima estudada se mostra como uma boa candidata para aplicação como um catalisador em bioprocessos.

Referências:

1. Tooke, C.L.; P. Hinchliffe; E.C. Bragginton; C.K. Colenso; V.H.A. Hirvonen; Y. Takebayashi, and J. Spencer, *beta-Lactamases and beta-Lactamase Inhibitors in the 21st Century*. J Mol Biol, 2019. **431**(18): p. 3472-3500.
2. Arzanlou, M.; W.C. Chai, and H. Venter, *Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria*. Essays Biochem, 2017. **61**(1): p. 49-59.
3. Kateryna Kon, M.R., *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*. Elsevier, 2016. **1st edition**.
4. Kaitany, K.C.; N.V. Klinger; C.M. June; M.E. Ramey; R.A. Bonomo; R.A. Powers, and D.A. Leonard, *Structures of the class D Carbapenemases OXA-23 and OXA-146: mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins, and aztreonam*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(10): p. 4848-55.
5. Todd, M.J. and J. Gomez, *Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity?* Anal Biochem, 2001. **296**(2): p. 179-87.