



## O importante papel da dinâmica conformacional na evolução de $\beta$ -lactamases

\*Luiz M. Costa<sup>1</sup>, Rafael Rospendowski<sup>1</sup>, Víctor U. Antunes<sup>1</sup>, Ronaldo J. Oliveira<sup>2</sup> e Denize C. Favaro<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas <sup>2</sup>Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil

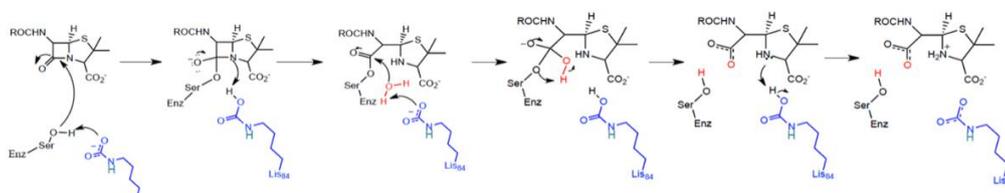
\*luizdmcosta@gmail.com

**Palavras-chave:** evolução enzimática, dinâmica conformacional, catálise enzimática.

### Introdução:

Saúde é uma palavra-chave para ano de 2020. O Grupo de Coordenação Interagências em Resistência Antimicrobiana das Nações Unidas (IAGC) realizou um relatório sobre a relevante problemática atual e futura da resistência bacteriana em 2019 [1]. Segundo o IAGC, há vários motivos para o crescimento da resistência antimicrobiana como o uso indiscriminado e inadequado de antibióticos em pessoas e na agropecuária, problemas no tratamento de esgoto, higienização de alimentos, migração de organismos vivos com patógenos resistentes e efluentes industriais [1]. Como consequências dessa resistência, são previstos: danos na economia mundial, aumento de custos hospitalares, riscos para a produção de alimentos e, acima de tudo, o aumento de morbidades e mortalidade em humanos e animais. Sobre esse último impacto, a Organização Mundial da Saúde (WHO) estimou que para 2050 o número de vítimas fatais para microrganismos resistentes seja da ordem de 10 milhões, sendo que o patógeno *Acinetobacter baumannii* se mostra como um dos mais preocupantes e ameaçadores [1, 2].

*Acinetobacter baumannii* é uma bactéria Gram-negativa panresistente, ou seja, apresenta cepas resistentes a todos os antibióticos conhecidos, fazendo crítica a necessidade do desenvolvimento de novos inibidores e antimicrobianos. Essas linhagens de *A. baumannii* já são a maior fonte de infecções hospitalares no mundo e afligem, principalmente, pacientes imunodeprimidos [2]. O principal mecanismo de resistência a  $\beta$ -lactâmicos, principal classe de antibióticos utilizada, é a presença de  $\beta$ -lactamases – enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico, inativando-os [3]. Dentre as espécies de *Acinetobacter sp.* as oxacilinasas (OXAs), em especial a subclasse CHDLs (*Carbapenem Hydrolysing Class D- $\beta$ -lactamase*), constituem o principal mecanismo de defesa desses organismos contra antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. As OXAs são serino- $\beta$ -lactamases, cujo mecanismo de envolve uma lisina carbamilada, pós-translacionalmente, atuando como base geral no **mecanismo ácido-base** proposto abaixo [4]:



**Figura 1.** Mecanismo de reação de hidrólise proposto para as CHDLs.

Em 2009, a OXA-143 foi isolada no Brasil em ambiente hospitalar, sendo posteriormente isoladas variantes como as OXA-231 (OXA-143 D224A), OXA-499, OXA-182, OXA-253, e OXA-255. Visto que as mutações podem dar indícios de como a evolução dessas enzimas pode estar direcionada, foram realizados diversos estudos relacionando as diferenças de identidade de sequência com estrutura e eficiência catalítica [3, 5]. Antunes e colaboradores mostraram que a mutação P227S, localizada no  $\beta$ 5- $\beta$ 6 loop, leva a um aumento na flexibilidade conformacional da OXA-143 e, conseqüentemente, a uma aumento da eficiência catalítica da enzima contra todas as classes de  $\beta$ -lactâmicos [5]. Dessa forma, é importante investigar essa mutante a fim de responder perguntas sobre a viabilidade de uma evolução desse tipo em OXAs.

### Objetivos:

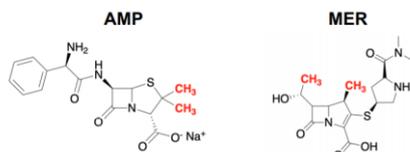
O presente projeto tem como objetivos o estudo comparativo do efeito do pH na estrutura secundária e na eficiência catalítica da enzima OXA-143 e da variante OXA-143(P227S) frente aos antibióticos ampicilina e meropenem, representantes das subclasses penicilina e carbapenêmicos, respectivamente. Além disso, foram investigados limites de pH da mutante e uma análise do efeito da mutação na flexibilidade conformacional por dinâmica molecular.

### Metodologia:

**Expressão e purificação:** A transformação do DNA plasmidial foi realizada pelo protocolo de choque térmico em *Escherichia coli* competente (BL21(DE3)). Após incubação em 1 mL de meio LB (Luria-Bertani) por 1 hora à 37 °C, as

bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo canamicina e deixadas crescer por 16 horas à 37 °C. A expressão ocorreu de maneira heteróloga com as cepas transformadas em meio LB à 37 °C e 200 rpm. A indução foi realizada com 500 µM de IPTG (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*), após a densidade óptica, absorvância em 600 nm, atingir o valor de 0,8. O processo de indução teve duração de 24 h à 200 rpm com temperatura de 16 °C. A seguir, a solução foi centrifugada e o *pellet* ressuscitado em tampão (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7) e lisado (lisozima, seguido de ultrassom). O meio foi centrifugado e o sobrenadante, contendo a proteína, foi purificado com coluna de afinidade a níquel seguido de uma cromatografia de exclusão de tamanho. O processo foi acompanhado pela eletroforese de gel acrilamida/bis-acrilamida (10%) e a concentração da enzima foi determinada pela absorvância a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar teórico de 43300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

**Cinética Enzimática:** A obtenção dos parâmetros cinéticos contra ampicilina (AMP) e meropenem (MER), **Figura 2**, foi realizada em um espectrofotômetro UV-Vis *Varian Cary 50*. Os ensaios foram feitos em temperatura ambiente (293 K), com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm nos comprimentos de onda 235 nm e 298 nm.



**Figura 2:** Antibióticos de estudo: ampicilina e meropenem

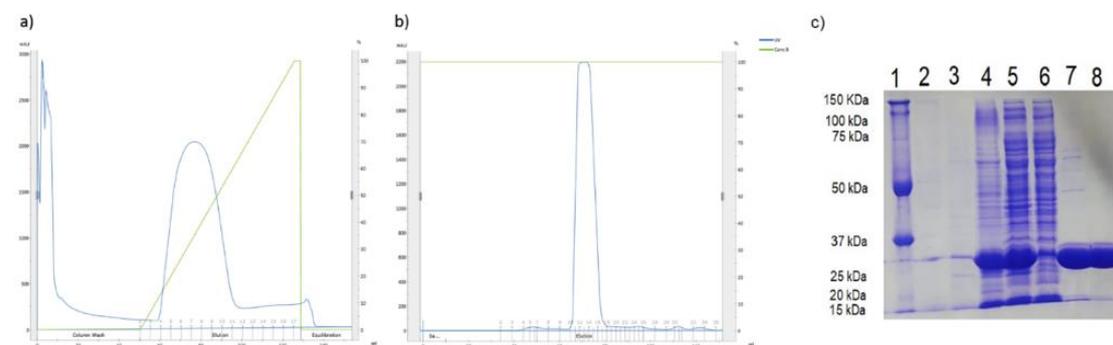
Além disso, as cinéticas em pH 7,0 também foram realizadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a fim de conferir se houve uma reação de hidrólise. Os experimentos foram realizados em um espectrômetro Avance-III Bruker, ressonando a 600 MHz na frequência de <sup>1</sup>H. Para os ensaios de pH, usamos tampões de concentração de 50 mM com força iônica controlada de 150 mM.

**Dicroísmo Circular:** Os experimentos de estrutura secundária e estabilidade térmica variando o pH de 4,0 até 11,0 foram realizados por dicroísmo circular pelos espectro-polarímetros *Jasco-720* (IQ-Unicamp) e *Jasco-810* (LNBIO-CNPEM) para ambas as enzimas. Apenas os valores de pH 4 e 11 foram feitos para a OXA-143(P227S) para a investigação dos extremos. Esses extremos foram estudados por RMN para verificar a estrutura da proteína. Os experimentos foram realizados utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm. O tratamento dos dados foi feito pelo *software Origin 2018*.

**Dinâmica Molecular:** As simulações foram realizadas no *software Gromacs 5.1.4* utilizando o campo de força GROMOS 54a7. As corridas foram realizadas por 100 ns com um passo de 2 ps. Os resultados de trajetória foram tratados utilizando o mesmo programa.

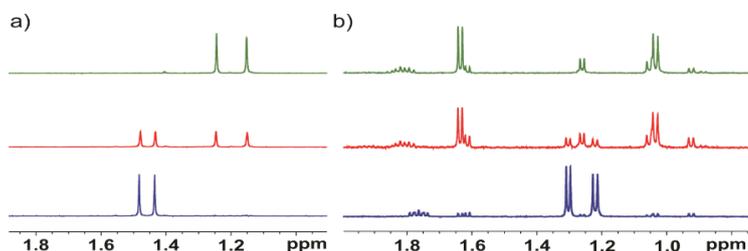
## Resultados e Discussão:

**Expressão e purificação:** As **Figura 3A e 3B** mostra os cromatogramas da purificação da OXA-143(P227S) por afinidade e gel-filtração, respectivamente. A eluição pela coluna de Ni<sup>2+</sup> carregada com enzima ocorreu a partir da concentração de 0,23 mM de Imidazol. A análise do gel de acrilamida/bis-acrilamida (10%), mostra bastante proteína tanto no sobrenadante quanto no pellet. Além disso, pode-se verificar a proteína pura acima de 25 kDa após a GF (o peso molecular das proteínas de interesse é 29,5 kDa).



**Figura 3:** Cromatogramas relativos às etapas de purificação da enzima OXA-143(P227S) por afinidade (a) e gel-filtração (b). Análise do processo de purificação da OXA-143(P227S): 1 – Padrão de peso molecular, 2 – Antes da Indução, 3 – Pós indução, 4 – Sobrenadantes pós lise, 5 – *Pallet* pós lise, 6 – *Flow Through* da Coluna de Afinidade, 7 - Pós Coluna de Afinidade, 8 - Pós Gel-filtração (c).

**Ensaio cinéticos:** A **Figura 4** mostra uma ampliação dos espectros de AMP (**Figura 4A**) e MER (**Figura 4B**), na região do deslocamento químico das metilas destacas em vermelho na **Figura 2**, na ausência da P227S (**azul**), em um tempo intermediário (**vermelho**) e após hidrólise completa (**verde**).



**Figura 4.** Espectros de RMN dos antibióticos a) 5 mM AMP e b) 1,2 mM MER na ausência de enzima (azul) e após a adição de 20 nM de OXA-143(P227S), no caso da ampicilina e 1,5 μM no caso do MER (vermelho e verde).

Dessa forma, foram feitas as análises comparativas de pH entre a OXA-143 e a OXA-143(P227S) com os parâmetros cinéticos, ver **Tabela 1**. Tanto as atividades *penicilinase* quanto *carbapenemase* apresentaram um perfil de *curva em forma de sino* com intervalo de atividade ótimo entre os pHs 6,6 e 9,0.

No caso dos ensaios com ampicilina, as condições de cinética no UV permitiram extrair um perfil de Michaelis-Menten das curvas, sendo possível encontrar diretamente os parâmetros  $k_{cat}$  e  $K_m$ . Comparando as enzimas, a nativa apresentou em geral maior  $k_{cat}$ , enquanto a mutante apresentou maior afinidade e eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ). Além disso, a OXA-143 apresentou uma queda de atividade bem expressiva fora da região de ótima de ação, tanto que não foi possível obter os dados em pH abaixo de 5,0 por UV, enquanto isso não foi tão expressivo na OXA-143(P227S).

**Tabela 1:** Estudo comparativo da atividade *penicilinase* pelo pH.

pH	P227S			OXA-143		
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$k_{cat} / K_m$ (s <sup>-1</sup> · μM <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$k_{cat} / K_m$ (s <sup>-1</sup> · μM <sup>-1</sup> )
4.5	91	804	0,11 ± 0,01	*	*	*
5.0	99	361	0,27 ± 0,03	*	*	*
5.5	141	340	0,42 ± 0,04	29	1049	0,027 ± 0,003
6.2	114	44	2,6 ± 0,3	76	339	0,22 ± 0,02
6.6	112	57	2,0 ± 0,2	77	343	0,22 ± 0,02
7.0	77	48	1,6 ± 0,2	131	214	0,61 ± 0,06
7.4	103	33	3,1 ± 0,3	104	171	0,61 ± 0,06
8.0	64	27	2,4 ± 0,3	153	190	0,81 ± 0,08
8.5	74	25	3,0 ± 0,3	107	138	0,77 ± 0,08
9.0	86	27	3,2 ± 0,3	107	133	0,80 ± 0,08
9.5	41	22	1,9 ± 0,2	60	238	0,25 ± 0,03
10.0	32	35	0,9 ± 0,1	42	191	0,22 ± 0,02
11.0	16	359	0,04 ± 0,004	*	*	*

\* não foi possível ver atividade na condição por UV-Vis, mesmo aumentando concentração de enzima. **Erro: 10 %.**

No caso dos ensaios com meropenem, as condições de cinética no UV não permitiram visualizar um perfil Michaeliano das curvas, pois a enzima se encontrava na velocidade máxima em todas as condições testadas, o que indicava um  $K_m$  na ordem de nanomolar. Dessa forma, foi obtido  $k_{cat}$  a partir dos ensaios com o MER a 298 nm, já o  $K_m$  foi obtido utilizando a ensaios de competição com AMP a 235 nm [6]. Observa-se na **Tabela 2** que as enzimas OXA-143 e P227S apresentaram resultados bem próximos para todos os parâmetros. Comparando a ordem de grandeza da eficiência catalítica na região ótima entre as duas enzimas para os dois antibióticos, observou-se uma maior eficiência e afinidade carbapenemase que penicilinase, o que corrobora a proposta de evolução dessas bactérias resistentes à antibióticos “*last resorts*” presentes em ambientes hospitalares.

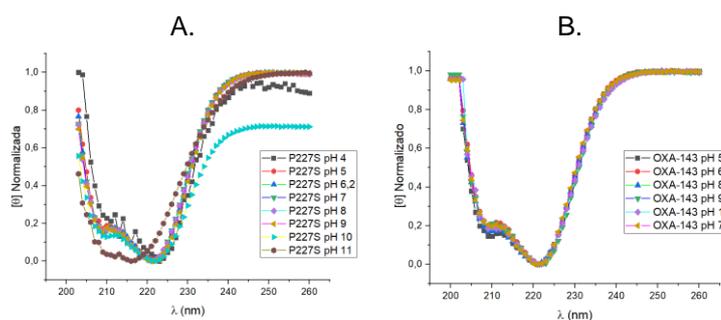
**Tabela 2.** Estudo comparativo da atividade *carbapenemase* versus pH.

pH	P227S			OXA-143		
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$k_{cat} / K_m$ (s <sup>-1</sup> · μM <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$k_{cat} / K_m$ (s <sup>-1</sup> · μM <sup>-1</sup> )
4.5	0,12	0,058	2,1 ± 0,2	0,14	*	*
5.0	0,12	0,010	11 ± 1	0,14	*	*
5.5	0,14	0,0014	95 ± 10	0,15	0,0030	51 ± 5
6.2	0,20	0,0068	30 ± 3	0,12	0,0043	28 ± 3
6.6	0,15	0,0054	28 ± 3	0,10	0,0030	34 ± 3
7.0	0,14	0,0023	62 ± 6	0,10	0,00076	13E1 ± 1E1

7.4	0,13	0,00459	29 ± 3	0,093	0,0012	78 ± 8
8.0	0,31	9,50E-04	33E1 ± 3E1	0,088	0,00083	11E1 ± 1E1
8.5	0,12	0,00461	26 ± 6	0,063	0,0012	53 ± 5
9.0	0,14	0,00263	54 ± 5	0,059	0,00088	67 ± 7
9.5	0,055	0,00666	8,2 ± 0,8	0,044	0,0019	23 ± 2
10.0	0,048	0,01018	5,0 ± 0,5	0,039	0,0028	14 ± 1
11.0	**	**	**	**	**	**

\*não foi possível extrair  $K_m$  de AMP para o cálculo da constante de MER. \*\*próprio tampão degradou antibiótico.

**Estrutura Secundária:** Os dados de estrutura secundária foram obtidos por CD usando uma concentração de 8  $\mu\text{M}$  de enzima incubada no pH de interesse. Como os experimentos foram realizados por dois equipamentos e a proposta é qualitativa, sendo decidido fazer o comparativo usando a elipsidade normalizada, visto que minimiza as incertezas entre aparelhos e de concentração. A análise da **Figura 5** mostra, que a estrutura secundária das enzimas estão conservadas para uma faixa ampla de pHs (5,0 – 10,0). Os dados apresentados na **Tabela 3** mostram que a OXA-143 apresentou uma temperatura de *melting* ( $T_m$ ) maior que a  $T_m$  da P227S para todos os pHs, indicando uma maior estabilidade térmica.

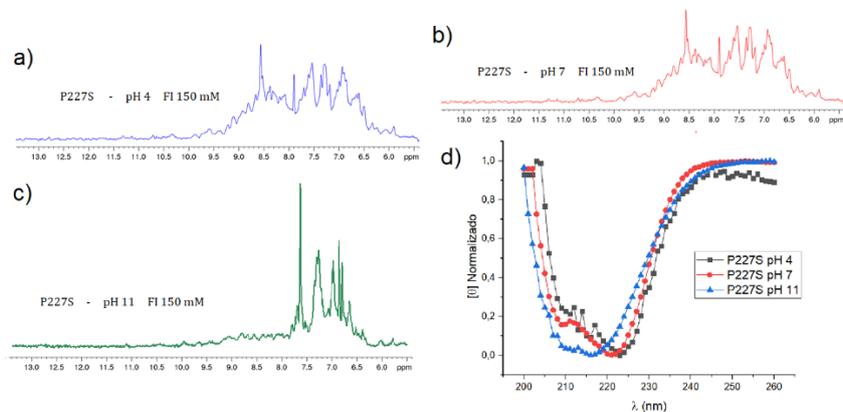


**Figura 5:** espectros de normalizados de CD da OXA-143(P227S) **A.** e da OXA-143 **B.** pela variação de pH.

**Tabela 3:** Estudo comparativo de temperatura de *melting* ( $T_m$ ) vs pH.

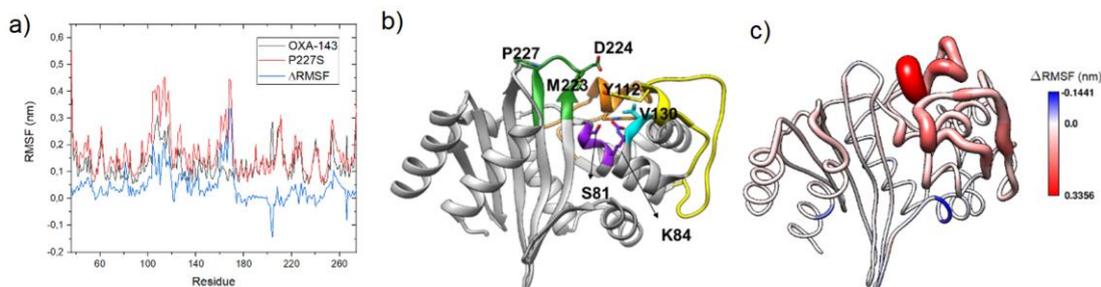
pH	P227S		OXA-143	
	$T_m$ (°C)	Erro (°C)	$T_m$ (°C)	Erro (°C)
4,0	30,1	0,1	35,7	0,1
5,0	34,5	0,1	39,1	0,1
6,2	39,9	0,2	42,3	0,1
7,0	38,1	0,3	43,1	0,1
8,0	39,6	0,3	44,3	0,1
9,0	42,1	0,2	46,0	0,1
10,0	35,9	0,4	40,7	0,1
11,0	30,5	0,1	40,7	0,1

**Limites de pH da OXA-143(P227S):** Experimentalmente, foi estabelecido como os limites de pH da OXA-143(P227S) como 4,0 e 11,0. No extremo ácido a P227S precipitou em concentrações maiores que 60  $\mu\text{M}$ , embora a estrutura esteja preservada – ver **Figura 6**. Uma vez que na concentração obtida não se observou atividade, não foi possível explorar a eficiência catalítica neste pH. Já no extremo básico a enzima perde estrutura, como pode ser observado nas análises de CD e RMN, **Figura 6**. Vale ressaltar que a mutante apresentou atividade em pH 11,0, fazendo a pergunta do funcionamento a ser investigada.



**Figura 6.** Espectros de RMN e CD da OXA-143(P227S) obtidos nos pHs 4, 7 e 11 a 293 K (CD) e 298 K (RMN).

**Dinâmica Molecular:** Pelos resultados de raio de giro da trajetória e de *root-mean square deviation* (RMSD) da proteína (dados não mostrados), a trajetória de flutuação se mostrou estável e foi possível fazer uma análise de *root-mean square fluctuation* (RMSF) dos resíduos nos últimos 50 ns. Como o RMSF indica as regiões com maior mobilidade na trajetória, uma maior flutuação pode ser diretamente relacionada a uma maior flexibilidade. Os resultados apresentados na **Figura 6** mostram que a P227S apresenta maior flexibilidade conformacional, principalmente nos *loops*, motivos estruturais conservados entre as OXAs e que atuam diretamente na eficiência catalítica da enzima. Essa maior flexibilidade corrobora com os dados na literatura que a variante adquire maior afinidade e eficiência para antibióticos mais volumosos, como o antibiótico ceftazidima que a OXA-143 não é capaz de hidrolisar [5].



**Figura 7.** RMSF vs resíduo da OXA-143 e sua mutante no intervalo dos últimos 50 ns (a), estrutura da OXA-143 (PDB: 5IY2) com grupos conservados importantes destacados (b) e estrutura da OXA-143 com atributo de  $\Delta$ RMSF (c).

## Conclusão:

No resumo apresentado foi estudado a OXA-143(P227S), mutante de uma  $\beta$ -lactamase, enzima que confere resistência bacteriana, identificada em colônias de bactérias de *Acinetobacter baumannii* encontradas em ambiente hospitalar. O problema de resistência bacteriana é atual e tem implicações sérias para o futuro, fazendo necessário o estudo da evolução dessas enzimas a fim de desenvolvermos estratégias de produção de novos e eficientes fármacos.

Os dados apresentados nesse trabalho indicam que a OXA-143(P227S) apresenta maior *eficiência catalítica* contra os dois antibióticos testados (AMP, MER). Além disso, as duas enzimas apresentam como região de melhor atividade os pHs entre 6,6 e 9,0 para os dois antibióticos. Adicionalmente, os estudos de estrutura secundária mostram que tanto a OXA-143 quanto a variante P227S apresentam estrutura secundária intacta para uma faixa ampla de pHs (5,0 até 10,0). Por fim, observou-se que a OXA-143(P227S) é estruturada em pHs mais ácidos que a região ótima, enquanto pHs mais alcalinos levam a uma mudança na estrutura secundária e terciária da enzima, apesar de ter sido observada atividade. Por fim foi visto que a variante possui de forma geral uma maior flexibilidade pelos dados de RMSF, o que pode ajudar a explicar por que ela possui maior afinidade e eficiência.

## Referências:

- [1] INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. **Report To The Secretary-General Of The United Nations**. 2019.
- [2] MILLYARD, C., Drug-resistant bacteria ranked: "Drug-resistant bacteria ranked. World Health Organization hopes list will drive development of much-needed antibiotics." **Nature**, 2017. 543: p. 15.
- [3] Evans, B.A; S.G. Amyes, OXA beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, 2014. 27(2): p. 241-263.
- [4] Li, J., *et al.*, Lysine carboxylation in proteins: OXA-10 beta-lactamase. **Proteins**, 2005. 61(2): p. 246-57
- [5] ANTUNES, V. U; *et al.* Importance of the  $\beta$ 5- $\beta$ 6 Loop for the Structure, Catalytic Efficiency, and Stability of Carbapenem-Hydrolyzing Class D  $\beta$ -Lactamase Subfamily OXA-143. **Biochemistry**, 2019. 58 (34):p. 3604-3616.
- [6] KAITANY, K.-C. J.; *et al.* 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): 4848-4855.