



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Caracterización bioquímica y estructural de la PBP 5/6 de *Acinetobacter baumannii*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:  
Biól. Armando Avila Rosas

Dr. Enrique Rudiño Piñera  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
[Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán, IBt, UNAM](#)  
[Dra. Carmen Nina Pastor Colón, CIDC, UAEM](#)

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2022

**Cuernavaca, Morelos**

**Septiembre, 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ***Agradecimientos:***

Quiero agradecer a mi madre, a mi padre, a mi hermano, a mi abuela, a Morgoth y a Dinorah Gallardo por el incondicional apoyo, amor y la comprensión de estar tan lejos pero siempre cerca de mi corazón.

Gracias al laboratorio 8 del grupo de Bioquímica Estructural del Instituto de Biotecnología de la UNAM, al Dr. Enrique Rudiño Piñera por orientarme y creer en mi en la realización de este proyecto, a la Dra. Paloma Columba Gil Rodríguez por ayudarme en la realización de mis experimentos, así como a mis compañeros de laboratorio que me enseñaron y apoyaron en los experimentos necesarios para salir adelante con este proyecto Ricardo, Cristina, Ezequiel, Aranza, Sandra, Lety, Alfredo y Aldo.

También agradezco a los miembros de mi comité tutorial el Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán y a la Dra. Carmen Nina Pastor Colon por su apoyo y guía.

## **JURADO ASIGNADO**

### **PRESIDENTE:**

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

### **SECRETARIO:**

Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete

### **VOCALES:**

Dr. José Arcadio Farías Rico

Dra. Isabel Gómez Gómez

Dr. Santiago Castillo Ramírez

Este proyecto fue realizado en el Laboratorio 8 con el Grupo de Bioquímica Estructural del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Enrique Rudiño Piñera.

Los experimentos realizados en esta Tesis fueron apoyados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). No. de CVU 956512.

.

## Índice:

1. Resumen.....	1
1.1. Abstract.....	2
2. Introducción.....	3
2.1 El problema mundial de la resistencia a los antibióticos.....	3
2.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos y lista de patógenos prioritarios.....	4
2.3 Métodos para determinar la resistencia a antibiótico.....	4
2.4 Las PBP's como proteínas importantes para la supervivencia de las bacterias.....	5
2.5 Mecanismo de reacción general de las PBP's.....	6
2.6 Cristalografía de proteínas de rayos X.....	7
3. Antecedentes.....	8
3.1 Sobre la biología y epidemiología de <i>A. baumannii</i> .....	9
3.2 Características de la PBP 5/6 y sus homólogos a nivel estructural.....	10
3.3 La PBP 5/6 presenta residuos similares con bibliotecas de mutantes resistentes a antibióticos.....	12
3.4 Justificación.....	13
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivos.....	13
6. Métodos.....	14
6.1 Clonación y ligación de <i>dacC</i> .....	14
6.2 Clonación y expresión de la PBP 5/6 por medio de un gen sintético.....	14
6.3 Ensayos de concentración mínima inhibitoria y pruebas de viabilidad de las células.....	15
6.4 Purificación de la PBP 5/6 sin remover el imidazol del medio.....	16
6.5 Purificación de la PBP 5/6 removiendo el imidazol del medio.....	17
6.6 Pruebas de actividad enzimática.....	18
6.7 Pruebas de cristalización por <i>microbatch</i> de la PBP 5/6.....	19

6.8 Generación del modelo por homología de la PBP 5/6 de <i>A. baumannii</i> .....	19
7. Resultados y discusión.....	21
7.1 Clonación y expresión de la PBP 5/6.....	21
7.2 Ensayos de concentración mínima inhibitoria y pruebas de viabilidad de las células.....	28
7.3 Purificación de la PBP 5/6.....	35
7.4 Pruebas de actividad enzimática.....	39
7.5 Pruebas de cristalización por microbatch de la PBP 5/6.....	43
8. Conclusiones.....	47
9. Perspectivas.....	48
10. Referencias.....	49
11. Anexos.....	55

## 1. Resumen

*Acinetobacter baumannii* es una bacteria Gram negativa de importancia médica, ya que es responsable de infecciones nosocomiales en todo el mundo, por otro lado, existen cepas de esta especie que presentan resistencia a múltiples antibióticos, es por esto que el estudio de las enzimas responsables de sintetizar la pared celular de esta bacteria abreviadas como PBP's es de gran interés porque son el principal blanco de los antibióticos betalactámicos, pero también se ha encontrado que en diferentes especies bacterianas existen enzimas de este tipo que pueden conferir resistencia, además de tener su función canónica de sintetizar la pared celular.

En particular, la PBP 5/6 de *A. baumannii* ha sido una enzima poco estudiada y en el presente trabajo se muestra que mediante la expresión heteróloga de esta enzima en la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3), presento resistencia frente al antibiótico meropenem por medio de cinéticas de crecimiento. Por otro lado, se hicieron comparaciones entre un modelo por homología realizado en el servidor I-TASSER de la PBP 5/6 y la posición de los residuos importantes en la actividad hidrolítica con otras PBP's que se sabe que confieren resistencia y con la betalactamasa BlaC para identificar posibles similitudes. Además, se estandarizó un protocolo de purificación a la PBP 5/6 empleando una columna de afinidad a níquel y con la enzima una vez purificada. Se realizaron cinéticas enzimáticas con la PBP 5/6 en presencia de nitrocefina, dando como resultado y por primera vez reportado en la literatura que la PBP 5/6 tiene capacidad hidrolítica contra antibióticos betalactámicos. Paralelamente, con la PBP 5/6 purificada, se concentró y se montaron pruebas de cristalización para poder obtener a futuro la estructura cristalográfica en complejo con antibiótico.

En conclusión, se demostró que el sistema heterólogo que expresa a la PBP 5/6 es resistente a altas concentraciones de meropenem, se infirió mediante predicciones estructurales que la PBP 5/6 tiene residuos en común con enzimas homologas que poseen capacidad hidrolítica, se estandarizó un protocolo de purificación para la PBP 5/6 y se demostró la capacidad hidrolítica de la PBP 5/6.

## 1.1 Abstract

*Acinetobacter baumannii* is a Gram-negative bacterium of medical importance, since it is responsible for nosocomial infections throughout the world, on the other hand, there are strains of this species that present resistance to multiple antibiotics, which is why the study of the enzymes responsible for synthesizing the cell wall of this bacterium, abbreviated as PBP's, is of great interest because they are the main target of beta-lactam antibiotics, but it has also been found that in different bacterial species there are enzymes of this type that can confer resistance, in addition to having their function canonical way of synthesizing the cell wall.

In particular, the PBP 5/6 of *A. baumannii* has been an enzyme little studied, and in the present work, it is shown that through the heterologous expression of this enzyme in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain, it presents resistance against the antibiotic meropenem by growth kinetics medium. On the other hand, comparisons were made between a homology model performed on the I-TASSER server of PBP 5/6 and the position of residues important in hydrolytic activity with other PBPs known to confer resistance and with BlaC beta-lactamase. to identify possible similarities. In addition, a purification protocol was standardized to PBP 5/6 employing a nickel affinity column and with the enzyme once purified. Enzymatic kinetics were performed with PBP 5/6 in the presence of nitrocefin, resulting in and for the first time reported in the literature that PBP 5/6 has hydrolytic capacity against beta-lactam antibiotics. At the same time, with the purified PBP 5/6, it was concentrated and crystallization tests were set up to obtain the crystallographic structure in complex with antibiotics in the future.

In conclusion, it was shown that the heterologous system that expresses PBP 5/6 is resistant to high concentrations of meropenem, it was inferred through structural predictions that PBP 5/6 has residues in common with homologous enzymes that have the hydrolytic capacity, it was standardized a purification protocol for PBP 5/6 and the hydrolytic capacity of PBP 5/6 was demonstrated.



## **2. Introducción**

### 2.1 El problema mundial de la resistencia a los antibióticos.

La resistencia a los antibióticos, es un fenómeno biológico que ocurre de manera natural en diferentes especies de bacterias dentro de su hábitat gracias al proceso de variabilidad genética y la necesidad de adaptación al ambiente que forman parte de la selección natural, con el paso del tiempo y la aparición de nuevos antibióticos en el mercado han aparecido en la naturaleza nuevas cepas resistentes o multiresistentes, ya que los antibióticos funcionan como una presión de selección (Baquero & Cantón, 2017; Jacoby & Jacoby, 2017).

De manera paralela, al apareamiento de una nueva presión de selección, los organismos se ven forzados a adaptarse o extinguirse en el proceso, gracias al mal uso generalizado durante décadas por los seres humanos con los antibióticos y a la ausencia de nuevos antibióticos en el mercado, diferentes especies bacterianas han llegado a adaptarse y presentar cepas que en casos extremos se les ha conferido diferentes tipos de multiresistencia como resistencia extendida, es decir que son resistentes a al menos un tipo de antibiótico de cada familia de estos fármacos o en el peor de los casos, se puede presentar cepas panresistentes que son bacterias resistentes a cualquier tipo de antibiótico conocido como respuesta a las presiones de selección, las cuales amenazan año con año la vida de miles de personas en el mundo y de acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2050 la crisis por la multiresistencia será un problema a nivel mundial con consecuencias a nivel de vidas humanas y económicas en los sistemas de salud principalmente en países subdesarrollados (Boucher et al., 2009; Magiorakos et al., 2012; Mayers et al., 2017; World Health Organization, 2014).

Debido a este problema, la OMS publicó una lista de las bacterias patógenas de mayor importancia médica dividiéndolas en tres niveles de prioridad debido a su alto índice de mortalidad y de resistencia a múltiples antibióticos o antimicrobianos: media, alta y crítica, y en esta lista en el nivel de las bacterias de importancia crítica

se encuentran las especies *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.* y *Morganella spp.*, la principal razón por la que estas bacterias se encuentran a este nivel es porque se han encontrado cepas multirresistentes a diferentes antibióticos incluyendo a los de última generación como los carbapenémicos, que son antibióticos diseñados específicamente para poder inhibir a las enzimas formadoras de la pared celular y también evitar la hidrólisis de betalactamasas (“WHO | Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics,” 2017).

## [2.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos y lista de patógenos prioritarios.](#)

Las bacterias poseen múltiples sistemas para contender en un medio con antibióticos, dichos sistemas moleculares consisten en enzimas que han pasado por un proceso de mutación que evita que el antibiótico o inhibidor se una correctamente a la enzima blanco como es el caso de algunas topoisomerasas, girasas o de algunas subunidades del ribosoma, también existen proteínas transmembranales que sirven como bombas de flujo que permiten expulsar el antibiótico de la bacteria y este no llegue a su molécula blanco, pero la forma más estudiada con la que las bacterias logran resistir ambientes con altas concentraciones de antibióticos son la betalactamasas, que son enzimas altamente especializadas en hidrolizar cierto tipo de antibióticos muy usados en la medicina como son los antibióticos betalactámicos (Asif et al., 2018; Iyer, 2022; Kapoor et al., 2017).

## [2.3 Métodos para determinar la resistencia a antibióticos:](#)

El surgimiento del problema de la resistencia a antibióticos es estudiado mediante diferentes técnicas microbiológicas y moleculares, algunos de los métodos más usados en el laboratorio y recomendados por el *Clinical and Laboratory Standards*

*Institute* (CLSI), o el *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) para estudiar a los organismos resistentes a uno o varios tipos de antibióticos son las cinéticas de crecimiento en presencia de antibióticos en diferentes concentraciones, realizadas por diluciones para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es decir, la concentración mínima de antibiótico que se necesita para inhibir el crecimiento bacteriano, este método se basa en medir el crecimiento reflejado por la absorbancia (a 600 nm) del medio de cultivo inoculado con bacterias control y bacterias experimentales en presencia de antibiótico durante un periodo determinado de tiempo que puede ser entre 12 a 24 horas en agitación y temperatura constantes (Jorgensen & Ferraro, 2009; Theophel et al., 2014).

Entre otras técnicas que se enfocan menos en el crecimiento de las células y más en la función de enzimas candidatas que pueden tener un papel en conferir resistencia a antibióticos es la cinética enzimática, ejemplo de esto son las pruebas cinéticas para determinar las constantes cinéticas de las betalactamasas y su eficiencia catalítica para hidrolizar antibióticos betalactámicos o los ensayos cinéticos para determinar las constantes de inhibición en proteínas involucradas en la síntesis de la pared celular, en la replicación del material genético o en las sub unidades ribosomales implicadas en el proceso de traducción.

#### [2.4 Las PBP's como proteínas importantes para la supervivencia de las bacterias:](#)

Como previamente se mencionó, los antibióticos betalactámicos son hidrolizados por las betalactamasas y las betalactamasas juegan un papel crítico en la supervivencia de las bacterias, ya que los antibióticos betalactámicos son inhibidores específicos de proteínas implicadas en la síntesis de la pared celular las bacterias, dichas enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular bacteriana son conocidas como proteínas de unión a penicilina o por sus siglas en ingles PBP's (*Penicillin Binding Proteins*), que de hecho PBP's y betalactamasas comparten una

historia evolutiva estrecha debido a que las PBP's son las enzimas ancestrales de las betalactamasas (Bush, 2010, 2018; Iyer, 2022).

Las PBP's parte de una familia de enzimas compuesta por carboxil peptidasas, endopeptidasas y transpeptidasa que se dividen en dos clases: 1) de alto peso molecular (HMM, kDa > 60) y 2) de bajo peso molecular (LMM, kDa < 60). En ambos casos, estas enzimas están involucradas en la formación de la pared celular en bacterias, sintetizando el peptidoglicano que la compone, ya que son las responsables de la catálisis del pentapéptido que une a las cadenas de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina que forman al peptidoglicano, y su principal diferencia entre estas dos clases es la cantidad de residuos de aminoácidos que las componen, es que las HMM se enfocan en polimerizar e incorporar el peptidoglicano de la pared celular pre existente, mientras que las LMM a su vez se enfocan en él, reciclaje y maduración del peptidoglicano durante la división celular actuando como D-D carboxil peptidasas o D-D endopeptidasas (Aguilera Rossi et al., 2016; Sauvage et al., 2008). Es por esto, que las PBP's han sido durante décadas uno de los blancos preferidos de los antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias patógenas (Sauvage et al., 2008; Ventola, 2015; Zapun et al., 2009). Por otro lado, el sitio activo de las PBP's se compone por tres motivos conservados en su estructura primaria, el motivo 1 (SXXK), el motivo 2 (SXM) y el motivo 3 (KTG) los cuales tienen funciones que se explicaran a continuación (Moon et al., 2018; Sauvage et al., 2008).

### [2.5 Mecanismo de reacción general de las PBP's.](#)

El principal motivo es el SXXK ya que tiene un papel crítico en el proceso de acilación y desacilación de la D-Ala D-Ala del pentapéptido que une al peptidoglicano, la lisina de este mismo motivo permite la desprotonación de la serina el cual al estar desprotonada permite el ataque nucleofílico del grupo carboxilo de la D-Ala con el oxígeno libre de la cadena lateral de la serina lo cual prepara al carboxilo para la unión del grupo amino de la cadena principal de la D-Lys de otra

cadena de peptidoglicano. Por otro lado, el motivo SXN promueve la unión con el sustrato gracias a la formación de puentes de hidrógeno, mientras que el motivo KTG permite un anclaje del sustrato gracias a las fuerzas electrostáticas gracias al grupo carboxilo del sustrato que posee carga negativa (Fig. 1) (Smith et al., 2013; Zhang et al., 2007). Adicionalmente, el motivo KTG se ha propuesto que tiene la función de orientar a los antibióticos betalactámicos mediante la formación de puentes de hidrógeno con el carboxilato del anillo betalactámico (Alexander et al., 2018a).

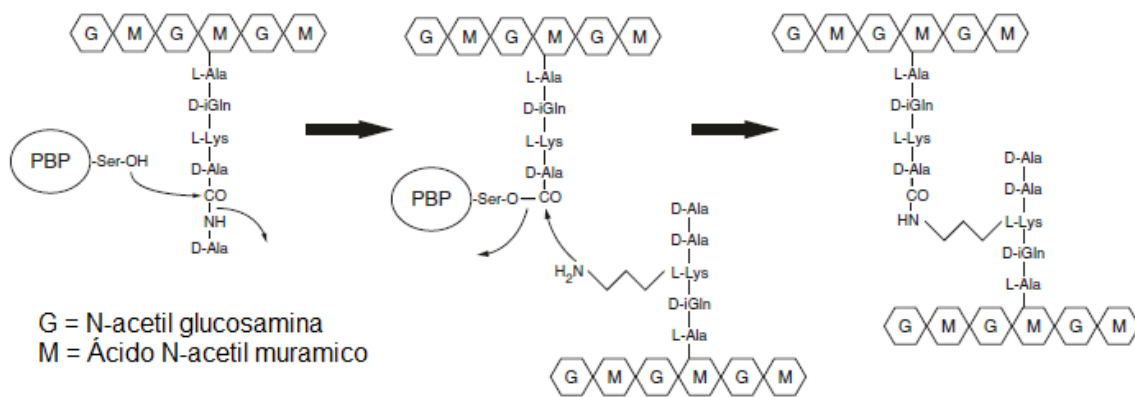


Fig. 1. Mecanismo de acción de las proteínas de unión a penicilinas (PBP's). Figura tomada y editada de Zapun A., Macheboeuf P. & Vernet T. (2009).

## [2.6 Cristalografía de proteínas de rayos X.](#)

La difracción de cristales con rayos X es una herramienta muy buena para poder determinar la estructura tridimensional de las proteínas con gran precisión, esta técnica fue inventada por W. H. Bragg y W. L. Bragg en 1912 y hasta nuestros tiempos es la técnica más importante para conocer la estructura tridimensional de proteínas aún más que la resonancia magnética nuclear o la criomicroscopía electrónica (Gu & Bourne, 2009; Rupp, 2010). La cristalografía de proteínas, es una técnica que consiste principalmente y primeramente en obtener una proteína con un alto grado de pureza, posterior a esto esta proteína pura y concentrada se somete a condiciones fisicoquímicas óptimas que faciliten la formación de un cristal

microscópico, este proceso es crítico y representa el filtro más difícil a superar en la cristalografía de proteínas, ya que no es trivial encontrar las condiciones de cristalización de una proteína porque pueden existir condiciones muy diversas y específicas para cada tipo de proteína, pasando por ese filtro y obteniendo el cristal de proteína, este es difractado en una fuente de rayos X como puede ser un ánodo rotatorio un acelerador de partículas como lo es un sincrotrón, y el patrón de difracción que se genera a través de este proceso permite determinar las coordenadas de los átomos dentro del cristal mediante diversos procesos matemáticos como las integrales de Fourier (Åkerfeldt, 2009; Drenth & Mesters, 2007; Rupp, 2010).

La relevancia de esta técnica de difracción de cristales de proteínas con rayos X, es que muestra la importancia de las interacciones fisicoquímicas de las proteínas con sus inhibidores o sustratos en determinadas regiones, como sus sitios activos que se componen de residuos de aminoácidos claves para la función de estas enzimas, entre otras, estas características estructurales pueden llevar a proponer nuevos compuestos que sirvan como inhibidores y que a futuro representen moléculas de importancia farmacológica o industrial (Rupp, 2010; Strandberg et al., 2009).

### **3. Antecedentes**

Existen estudios que han demostrado que algunas PBP's son capaces de conferir resistencia a antibióticos en algunas especies de bacterias patógenas como *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, *S. aureus* y *Enterococcus faecalis*. Esto convierte a las PBP's, en particular a las de bajo peso molecular, en un grupo de enzimas de interés médico (da Costa et al., 2018; Moon et al., 2018; Ropy et al., 2015; Sarkar et al., 2011; Sun et al., 2014; Zapun et al., 2017). El estudio bioquímico y estructural de estas enzimas en bacterias patógenas se ha enfocado sobre todo a organismos modelo, como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* o *Streptococcus pneumoniae*, que si bien son bacterias que presentan cepas patógenas en la naturaleza, se les da ha dado mayor atención que a otras especies

bacterianas de mayor o igual importancia médica como es el caso a de la bacteria *A. baumannii* (Sauvage et al., 2008).

### 3.1 Sobre la biología y epidemiología de *A. baumannii*.

*A. baumannii*, es un bacilo Gram negativo, aerobio, de la clase gammaproteobacteria de la familia moraxellaceae. Es un microorganismo patógeno oportunista y es uno de los principales agentes de infecciones nosocomiales a nivel mundial, provocando primordialmente bacteriemia y neumonía en personas inmunocomprometidas (Morris et al., 2019). Además, existen cepas multirresistentes a fármacos y/o antimicrobianos que dificultan los tratamientos y que pueden llegar a producir un 46% de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos infectados (Asif et al., 2018; Harding et al., 2018).

En el caso de México, estudios realizados entre el año 2011 al 2016 encontraron 108 pacientes fueron relacionados con cepas de *A. baumannii* que presentaban multirresistencia en diferentes hospitales del país, por otro lado, de acuerdo a los datos del 2018 del Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), *A. baumannii* presento un incremento en el número de casos hospitalarios que presentaban cuadros de bacteriemia asociados a cepas multirresistentes con respecto años anteriores, además, al contrastar los resultados del número de cepas multirresistentes con otras bacterias como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella sp.*, y *Enterobacter sp.*, *A. baumannii* presento de manera alarmante un mayor número de cepas multirresistentes en comparación con las otras especies previamente mencionadas, lo cual pone de manifiesto la importancia clínica de esta bacteria (Cornejo-Juárez et al., 2020; Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), 2019).

### 3.2 Características de la PBP 5/6 y sus homólogos a nivel estructural.

En el caso de *A. baumannii*, antecedentes como el de Seungil Han, Nicole Caspers *et al.* 2011 y el de Rodrigo Cayo, María-Cruz Rodríguez *et al.* 2011 muestran que PBP's como la que es codificada por el gen *dacC* (PBP5/6), este gen, se encuentra en múltiples cepas y aislados de importancia médica de la bacteria *A. baumannii* y solo se encuentra una copia del gen en el cromosoma bacteriano según la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), se desconoce su función fisiológica a nivel experimental, pero por análisis de homología de secuencia se infiere que pertenece al grupo de las D-Ala D-Ala carboxil peptidasas y está clasificada como una LMM. Por otro lado, la PBP 5/6 comparte homología y características en su estructura primaria y terciaria con otras PBP's de bacterias Gram negativas resistentes a antibióticos, con base en modelos de determinación de estructura terciaria y estructuras cristalográficas reportadas en el PDB.

En detalle, la PBP 5/6 de *A. baumannii* tiene un homólogo presente en *P. aeruginosa* (PaPBP5) con un 50% de identidad de secuencia en la estructura primaria, dicho homólogo ha demostrado que tiene la capacidad de conferirle resistencia a distintos antibióticos betalactámicos como la ampicilina, la penicilina G, cefalosporinas y a carbapenémicos a *P. aeruginosa* (Ropy *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2013). En dicho estudio sobre la PaPBP5 sugieren además, que el *loop 1* puede influir en la actividad como betalactamasa, ya que se encuentra cerca del sitio activo de la enzima puede ser capaz de interactuar con antibióticos betalactámicos, hidrolizándolos y evitando así que estos entren al sitio activo de la enzima, sin embargo, al comparar estructuras cristalográficas de diferentes sitios activos de PBP's y el modelo por homología de la PBP5/6 de *A. baumannii* contra betalactamasas como la BlaC de *Mycobacterium tuberculosis* llama la atención el gran parecido estructural entre PBP's resistentes a antibióticos y la betalactamasa en las posiciones de los sitios involucrados en la hidrólisis de antibióticos betalactámicos (Fig. 2 y 3.).



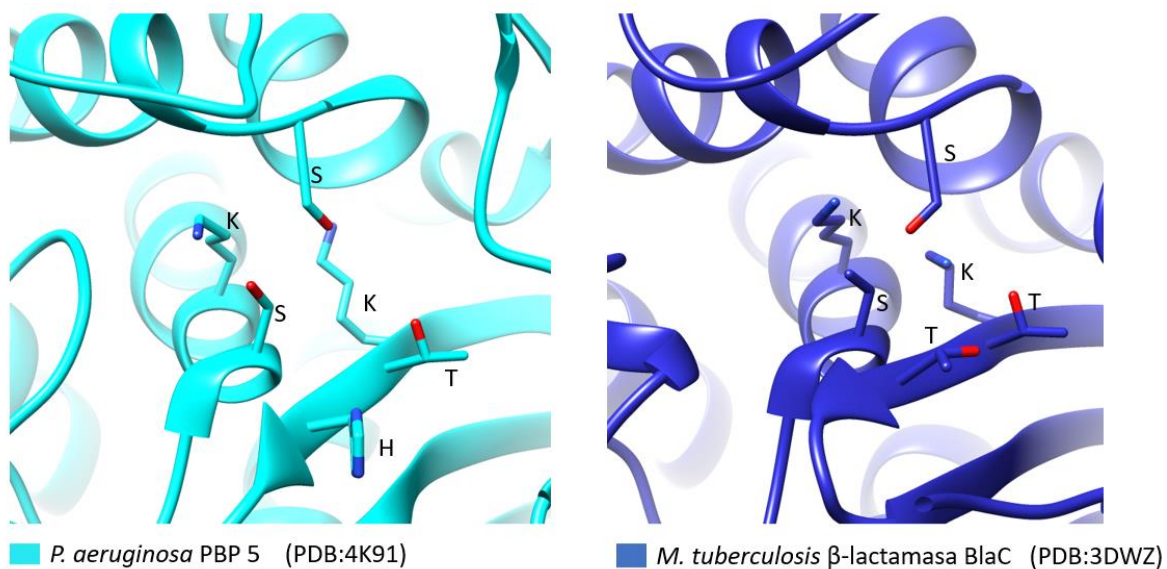


Fig. 2. Estructuras cristalográficas del sitio activo del homólogo estructural de la PBP 5/6 de *A. baumannii* presente en *P. aeruginosa* (PaPBP5) en color cian es muy similar al de las betalactamasas como la BlaC de *M. tuberculosis* en color azul. El sitio activo de la PaPBP5 se asemeja al sitio activo de la betalactamasa BlaC en la forma en la que se disponen los residuos catalíticos de ambas enzimas.

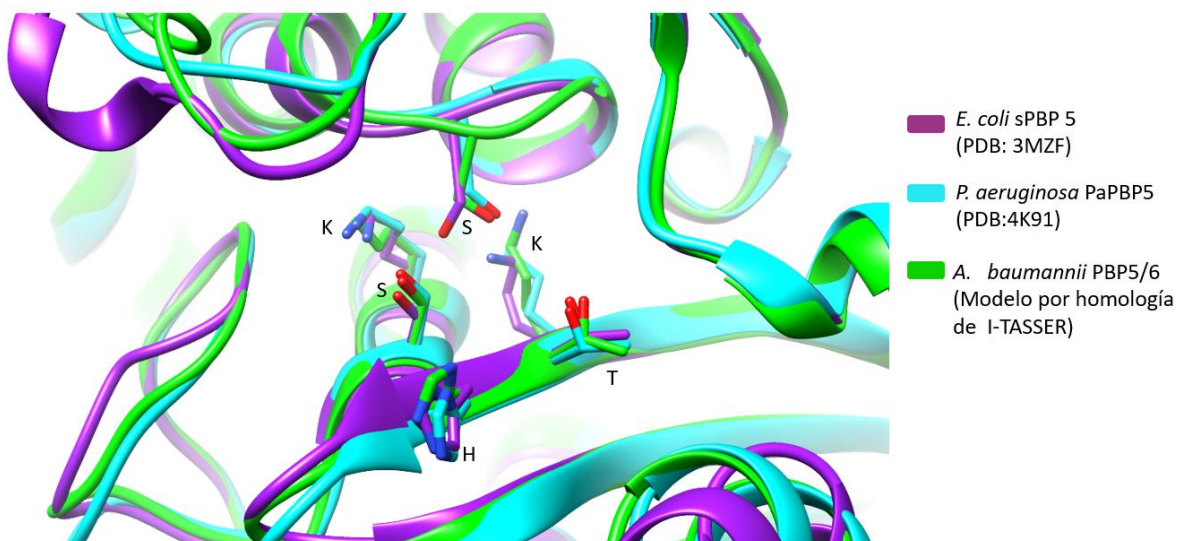


Fig. 3. Similitud de los sitios activos de la sPBP 5, la PaPBP5 y la PBP 5/6. La posición y tipo de residuos involucrados en la función de las PBP's de *E. coli* y *P. aeruginosa* en las estructuras cristalográficas es similar a la posición y tipo de residuos en el modelo por homología de la PBP 5/6 de *A. baumannii*.

Como es de esperarse el modelo por homología de la PBP 5/6 tiene un gran parecido al de la sPBP 5 y la PaPBP 5 (Fig. 3), ya que estas enzimas son las que mayor identidad de secuencia tienen con la PBP 5/6, esto nos sugirió que el acomodamiento de los residuos del sitio activo es importante para la función contra los antibióticos betalactámicos, pero también las diferencias que se encuentran cerca del sitio activo como es el caso del *loop* 1 deberían tener un papel en la actividad enzimática de estas enzimas. El modelo por homología hecho en I-TASSER si bien sugirió que el sitio activo entre las diferentes PBP's es muy parecido, el otro 50% de diferencia que tiene la PBP 5/6 con respecto a la PaPBP 5 o a la sPBP 5 puede tener características particulares que no son tan claras en diferentes zonas que están cerca del sitio activo como puede ser el *loop* 1 de la PBP 5/6 y que pueden tener impacto en la actividad de estas enzimas como se mostró en el trabajo de Smith et al, 2013 solo por mencionar alguno.

### [3.3 La PBP 5/6 presenta residuos similares con bibliotecas de mutantes resistentes a antibióticos.](#)

Adicionalmente, se han realizado estudios para generar bibliotecas de mutantes de la PBP 6 de *S. enterica* serotipo Typhimurium que obtuvieron como resultado el incremento en la resistencia a distintos antibióticos betalactámicos, y dentro de este estudio llama la atención que las mutantes de la PBP 6 con cambios en los residuos S120T, S147N, S199P, A104T les confieren resistencia a antibióticos betalactámicos en *S. enterica* y esto es importante porque los residuos que cambiaron en las mutantes se presentan de manera natural en la secuencia de la PBP 5/6 de *A. baumannii* o con cambios por aminoácido con una naturaleza química muy parecida como el caso de la mutante A104T, donde en lugar de tener una treonina *A. baumannii* tiene en su lugar una serina cuya naturaleza química es similar al de la treonina (Sun et al., 2014).

### 3.4 Justificación.

El objetivo principal de este trabajo de investigación, fue demostrar que el gen *dacC* que expresa a la PBP 5/6 confiere resistencia en un sistema de expresión heterólogo por medio de una *E. coli* BL21 (DE3) y además, elaborar un protocolo de purificación óptimo de la PBP 5/6 así como comprobar que la PBP 5/6 tiene una actividad de hidrolasa que previamente no se había descrito en la literatura con lo cual se propuso como una enzima de interés para conocer su estructura tridimensional, pero que como se muestra más adelante no se pudo obtener una condición de cristalización óptima para la obtención de cristales que sirvieran para difractarlos y obtener datos para conocer su estructura tridimensional. Con esta información se podrá reconocer, todo esto con el fin de entender aún más su papel en la resistencia a antibióticos, y así poder proponer posibles blancos para el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos contra *A. baumannii*.

### **4. Hipótesis**

La PBP 5/6 de *A. baumannii* debe tener función hidrolítica ante nitrocefina al igual que sus homólogos estructurales.

### **5. Objetivos**

General: Expresar y purificar la PBP 5/6 para caracterizar cinética y estructuralmente a la PBP 5/6 (*dacC*) proveniente de *Acinetobacter baumannii* 17978.

#### Específicos:

- Transformar cepas de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET22b (+) con el gen de *dacC* para sobre expresar y purificar la enzima PBP 5/6 de *A. baumannii*.
- Realizar antibiogramas del sistema heterólogo que expresa la PBP 5/6 en presencia de meropenem y ceftazidima.
- Hacer ensayos cinéticos de la PBP 5/6 en presencia de nitrocefina.
- Identificar las condiciones de cristalización óptimas de la PBP 5/6 para obtener cristales y en su caso difractarlos para resolver su estructura cristalográfica.

## 6. Métodos

### 6.1 Clonación y ligación de *dacC*.

Se realizaron intentos para clonar el gen *dacC* en el vector de expresión pET22b (*Agilent technologies*), que agrega una cola de histidinas al producto del gen deseado. Inicialmente se amplificó el gen utilizando oligos específicos para el gen *dacC* de *A. baumannii*, que incluían los sitios de corte para las enzimas de restricción NdeI y XhoI, mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN amplificado se purificó utilizando un kit de purificación de producto de PCR (*Thermo Scientific™*). Se realizaron ensayos de doble digestión con las enzimas NdeI y XhoI (*Thermo Scientific™*) sobre el vector pET22b y el producto de PCR. Finalmente se realizaron reacciones de ligación utilizando la ligasa del fago T4 en una solución purificada del plásmido con cinco veces la concentración de ADN del producto de PCR, previamente digeridos por las enzimas NdeI y XhoI.

### 6.2 Clonación y expresión de la PBP 5/6 por medio de un gen sintético.

De manera paralela a la clonación y ligación del gen *dacC* al vector pET22b (+) como se ve en la sección 6.1, se solicitó la síntesis de un vector de expresión pET22b (+) con el gen *dacC* a la empresa Catálisis ([www.catalisis.org](http://www.catalisis.org)). Dado que la estrategia de síntesis del gen *dacC* en el vector pET22b (+) dio lugar a obtener proteína suficiente al expresar, se optó por dejar a un lado la estrategia de ligar el gen y se continuó usando el gen que fue sintetizado, con el cual se transformaron bacterias químicocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) con el fin de purificar plásmido y secuenciarlo para su verificación en la unidad de secuenciación masiva del Instituto de Biotecnología, UNAM. Al sistema heterólogo compuesto por la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET22b (+) y el inserto del gen *dacC* se le mencionará a lo largo de este trabajo como “BL21-*dacC*.” Los detalles sobre la secuencia del gen y la estructura primaria se pueden ver en el Anexo 1 de este trabajo.

El vector pET22b (+), además de agregarle una cola de histidinas al producto del gen *dacC* posee un promotor inducible por Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se evaluó que las colonias transformadas del sistema BL21-*dacC* expresaran a la PBP 5/6 y se realizó una cinética de expresión para reconocer el incremento de la expresión de la PBP 5/6 a través del tiempo a 37 °C a 200 rpm en un máximo de 6 horas después de la inducción de la expresión de la proteína utilizando IPTG a una concentración final de 1 μM.

### 6.3 Ensayos de concentración mínima inhibitoria y pruebas de viabilidad de las células.

Los ensayos para la determinación cuantitativa de la resistencia a antibióticos de aislados bacterianos por microdilución en caldo, se realizaron basándose en el manual M100 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 27<sup>a</sup> Edición, 2017) a partir de soluciones *stock* de 100 μL de antibióticos (penicilina, meropenem y ceftazidima) a una concentración 5,120 μg/ml y medio *Muller-Hinton* adicionado de soluciones estériles de cationes MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> con una concentración de 10 mg/mL cada una, esta solución se le llamó CAMHB (*Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth*). Posteriormente, se agregan 100 μL de las diluciones con 32 a 0.125 μg/ml de antibiótico en una placa de 96 pozos usando la primera fila como control de medio CAMHB sin antibiótico y la última como medio CAMHB sin inóculo bacteriano, cada pozo fue inoculado con 10 μL con 5 x 10<sup>6</sup> UFC/ml de cultivo bacteriano previamente incubado de la cepa *E. coli* BL21-*dacC* inducida con IPTG que contenía el vector pET22b(+) con el gen *dacC* que previamente se sintetizó (como se explica en el apartado 1.0), *E. coli* BL21-*dacC* sin inducir con IPTG y *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET22b (+) sin el inserto *dacC* como control. Los cultivos se inocularon a 37 °C, con una agitación de 170 rpm y se determinó el crecimiento por absorbancia a 600 nm de los pozos cada 20 minutos por 24 horas usando el equipo lector de microplacas Epoch Bio-Tek.

Las pruebas de viabilidad se realizaron tomando 10  $\mu$ L del medio inoculado con *E. coli* BL21-*dacC* sin inducir y *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET22b(+) sin el inserto *dacC* de las concentraciones de meropenem a 8 y 4  $\mu$ g/mL y se diluyeron de manera independientemente en 90  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos salino (PBS) estéril cada muestra, posteriormente se hicieron seis diluciones de este primer amortiguador con bacterias y se contaron el número de Unidades Formadoras de colonias (UFC's) de cada muestra.

#### 6.4 Purificación de la PBP 5/6 sin remover el imidazol del medio.

Se inoculó 1 L de medio LB con *E. coli* BL21 (DE3) + pET22b + *dacC* (*E. coli* BL21-*dacC*) con ampicilina 1  $\mu$ M concentración final a 37 °C y 200 rpm. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0.6 de absorbancia medida a 600 nm, se indujo la expresión de la PBD 5/6 adicionando 500  $\mu$ L de IPTG para llegar a la concentración final de IPTG de 0.8  $\mu$ M. El cultivo se incubó durante 6 horas posterior a la inducción con IPTG a 37 °C en agitación a 200 rpm y se centrifugó a 6000 rpm durante 40 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se resuspendieron en un amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM e imidazol 15 mM a pH 7.2, Triton X-100® 1% y se sonicaron durante 2 min con pulsos de 2 segundos de pulso y 2 segundos de descanso entre cada pulso con potencia de 35%. Finalmente, el sonicado se centrifugó durante 40 minutos a 18,000 rpm para separar la fracción soluble con la PBP5/6 de la fracción insoluble.

La fracción soluble se cargó en una columna de cromatografía de afinidad a níquel HisTrap™ previamente lavada con 5 volúmenes de agua y equilibrada con 5 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM e imidazol 15 mM a pH 7.2, se realizaron lavados por gravedad para eliminar las proteínas que no interactúan con la resina de níquel agregando cinco volúmenes de amortiguadores Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM pH 7.2 con diferentes concentraciones de imidazol 15 mM, 30 mM y 50 mM, al final se cargó 2 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, imidazol 500 mM pH 7.2 para obtener la enzima PBP 5/6 purificada.

Se realizó un gel SDS-Page al 12%, para reconocer la presencia de la PBP 5/6 en los diferentes pasos de purificación y se determinó la concentración de la enzima utilizando un NanoDrop 2000 de *Thermo Scientific*<sup>TM</sup>.

Se tomaron los 2 mL del lavado final que contenían a la PBP 5/6 para diluir la enzima para realizar los ensayos cinéticos como se describen en la sección 6.6. Por otro lado, se usaron los 2 mL del último lavado que contenía a la PBP 5/6 para concentrar la proteína usando un Amicon® de 10,000 NMWL a 3700 rpm por 1 hora hasta llegar a una concentración cercana a 10 µg/mL de enzima, con el fin de montar pruebas de cristalización como se describe en la sección 6.7 de la metodología.

#### 6.5 Purificación de la PBP 5/6 removiendo el imidazol del medio.

Alternativamente a los pasos que se realizaron durante el método de purificación de la sección 4.0, se eliminó el exceso de imidazol de la proteína purificada cargando los 2 mL resultantes de la columna de afinidad a níquel a una columna de desalinización (Sephadex) previamente lavada con 5 volúmenes de NaOH 0.1 M y equilibrada con 5 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM pH 7.2 de la cual se obtuvieron 8 fracciones de 1 mL y se realizó un gel SDS-Page al 12%, para reconocer la presencia de la PBP 5/6 en las diferentes fracciones de purificación. Si bien este paso de purificación removía el imidazol del amortiguador en el que se encontraba la PBP 5/6 se decidió no continuar realizándolo porque comprometía la estabilidad de la proteína provocando que se precipitara en cuestión de segundos.

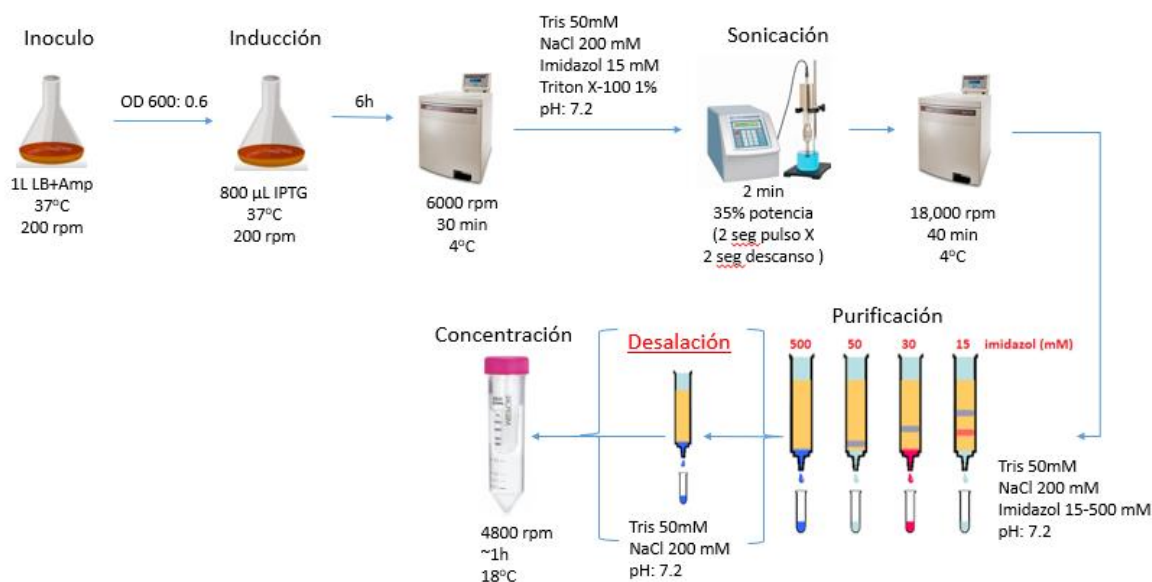


Fig. 4. Diagrama de purificación de la PBP 5/6 de *A. baumannii*

### 6.6 Pruebas de actividad enzimática.

A partir del método estandarizado para purificar la PBP 5/6 que se encuentra en la sección 6.4 de los métodos de este trabajo, se utilizó la PBP 5/6 purificada para las pruebas de cinética enzimática se prepararon 200 µL de nitrocefina a 2 mM agregando 20 µL de nitrocefina 20 mM, 40 µL de amortiguador NaPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.0 y 140 µL de DMSO. De la solución de nitrocefina 2 mM se tomaron las cantidades necesarias para llevar al antibiótico a concentraciones de 0.02 mM a 0.6 mM diluyéndolo en amortiguador de NaPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.0 en un volumen final de 100 µL dentro de una celda de cuarzo. La captura de los datos se obtuvo midiendo durante 15 minutos a una absorbancia de 490 nm, temperatura ambiente de 25 °C y una distancia de 1 cm de la celda a la fuente de luz por triplicado en el equipo Cary 60 UV-Vis. Para graficar la gráfica de Michaelis-Menten y obtener los parámetros cinéticos se utilizó el programa GraphPad Prism 8.



### 6.7 Pruebas de cristalización por microbatch de la PBP 5/6.

Para las pruebas de cristalización es necesario llevar a la proteína, la cual fue obtenida mediante el método estandarizado para purificar la PBP 5/6 de la sección 6.4 de la metodología, se utilizó la proteína purificada y se llevó a una alta concentración (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en presencia de algún agente precipitante que regule la formación de centros de nucleación y de este modo se obtengan cristales de proteína dicho agente puede ser el 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), el polietilenglicol (PEG) o el NaCl, con este fin se hizo un barrido de pruebas de cristalización concentrando a la enzima a 4, 6, 9 y 24  $\text{mg}/\text{mL}$  en amortiguadores con Tris 50  $\text{mM}$  y diferentes concentraciones de NaCl 50  $\text{mM}$ , 100  $\text{mM}$  y 200  $\text{mM}$  con 500  $\text{mM}$  de imidazol y también sin esta última.

En placas de *microbatch* se adicionaron 1  $\mu\text{L}$  de la enzima PBP 5/6 junto con 1  $\mu\text{L}$  de una de las condiciones de cristalización que contienen agentes precipitantes de los *Kits Index* o Rigaku Wizard I y II, al final se agregaron 13  $\mu\text{L}$  de aceite de parafina a 18  $^{\circ}\text{C}$  de temperatura ambiente. Se revisaron a través de microscopio óptico las pruebas de cristalización 15 días después de haberlas colocado.

### 6.8 Generación del modelo por homología de la PBP 5/6 de *A. baumannii*.

Para la generación de un modelo por homología de la PBP 5/6 de *A. baumannii*, se empleó el servidor en línea de I-TASSER (<https://seq2fun.dcmf.med.umich.edu/I-TASSER/>) utilizando la secuencia de aminoácidos referencia con código de entrada en UniProt (<https://www.uniprot.org/>): G1C735. Las opciones para la predicción del modelo proporcionadas por el servidor de I-TASSER fueron las predeterminadas y no se realizó ningún cambio. Con lo anterior, es importante mencionar que las opciones que ofrece el servidor de I-TASSER sirven principalmente para descartar o usar estructuras previamente conocidas que sirvan como plantilla sin tomar en cuenta otras estructuras que pueda haber en otras bases de datos, en consecuencia, para este trabajo de investigación, se buscó obtener el modelo por homología a partir de

una búsqueda de todas las estructuras de PBP's depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB) y no solo de unas cuantas PBP's homologas, todo esto con el fin de tener un panorama más amplio de posibles formas plegamiento para la PBP 5/6.

I-TASSER es un servidor de internet que se dedica a predecir y modelar estructuras tridimensionales de proteínas a partir de templados de otras estructuras proteicas que se encuentran depositadas en PDB, el sistema que utiliza I-TASSER es el de encontrar a partir de la secuencia de aminoácidos posibles homólogos que tengan reportada una estructura que haya sido determinada experimentalmente y generar una serie de modelos que se ajusten los más posible al templado, todo esto sin atender contra las restricciones fisicoquímicas que cumplen las biomoléculas como los ángulos de torción entre los aminoácidos de la cadena principal o las interacciones covalentes y no covalentes dentro de la molécula por mencionar algunos, además, I-TASSER arroja como resultado una lista de modelos que tienen un índice de calidad llamado C-Core, el cual varia con valores de -2 a 2 siendo 2 el valor más óptimo con base en que tanto nivel de confianza tiene el modelo predicho con respecto a los homólogos estructurales y la secuencia depositada en el servidor (Yang et al., 2015; Yang & Zhang, 2015).

## 7. Resultados y discusión.

### 7.1 Clonación y expresión de la PBP 5/6.

Del método de purificación de DNA genómico basado en el método de Green & Sambrook, se prepararon cinco muestras que funcionaron como *stock* (Green 1954-, 2012). Las cinco muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1% con amortiguador de Tris-Acetato-EDTA o TAE (Tris 40 Mm, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM y pH 8.2) y se observó que las muestras 1 y 5 contenían el material genético más integro, ya que no presentaban signos de degradación a diferencia de las muestras 2 y 3, por lo tanto, las muestras 1 y 5 se utilizaron para la realización de las pruebas de PCR para aislar el gen de *dacC* (Fig. 5). Las concentraciones de las muestras se midieron con el equipo nanodrop 2000 *spectrophotometer* (Thermo Scientific™) y se obtuvo que las muestra 1, 2, 3, 4 y 5 estaban a concentración 765.1 ng/μL, 339.4 ng/μL 293.6 ng/μL y 446.4 ng/μL respectivamente.



Fig. 5. Purificación de DNA genómico de *A. baumannii* 17978. Las unidades del marcador se encuentran en pares de bases (pb).

A partir de las muestras de DNA genómico de *A. baumannii*, se continuó con la elaboración de un protocolo para el aislamiento del gen *dacC*. Las condiciones

óptimas para la amplificación del gen *dacC* se muestran en la Tabla 1 y 2. El producto de PCR con su duplicado se cargaron en dos pozos de un gel de agarosa al 1%, en este gel se observaron bandas nítidas y únicas que coinciden con el peso aproximado del gen *dacC* que es de 1149 pb (Fig. 6B). Posteriormente, se cuantificó la concentración del producto de PCR con el equipo nanodrop 2000 *spectrophotometer* (*Thermo Scientific*<sup>TM</sup>) dando como resultado una concentración de 155.1 ng/μL y relación 260/280 nm = 1.88. Al purificar el producto de PCR con el *kit GeneJET PCR Purification* de *Thermo Scientific*<sup>TM</sup> este obtuvo una concentración de = 124 ng/μL 260/280 nm = 1.68 y con este se realizaron pruebas de ligación con el vector pET22b (+).

Tabla 1. Volúmenes óptimos de reactivos para la amplificación del gen *dacC* de *A. baumannii* por PCR.

	1 Reacción en 50 μL	2 Reacciones en 50 μL
Amortiguador Taq polimerasa ( <i>Thermo Scientific</i> <sup>TM</sup> )	10 μL	20 μL
dNTP's	2 μL	4 μL
MgCl <sub>2</sub>	4 μL	8 μL
Cebador líder ( <i>Forward</i> )	2 μL	4 μL
Cebador retrasado ( <i>Reverse</i> )	2 μL	4 μL
DNA genómico	1 μL	2 μL
H <sub>2</sub> O	29 μL	8 μL
Taq polimerasa ( <i>Thermo Scientific</i> <sup>TM</sup> )	0.25 μL	0.50 μL

Tabla 2. Tiempos y temperaturas para los 30 ciclos de amplificación del gen *dacC* por PCR.

95 °C	5 min
95 °C	45 seg
57 °C	1 min
72 °C	1 min
72 °C	5 min
12 °C	∞

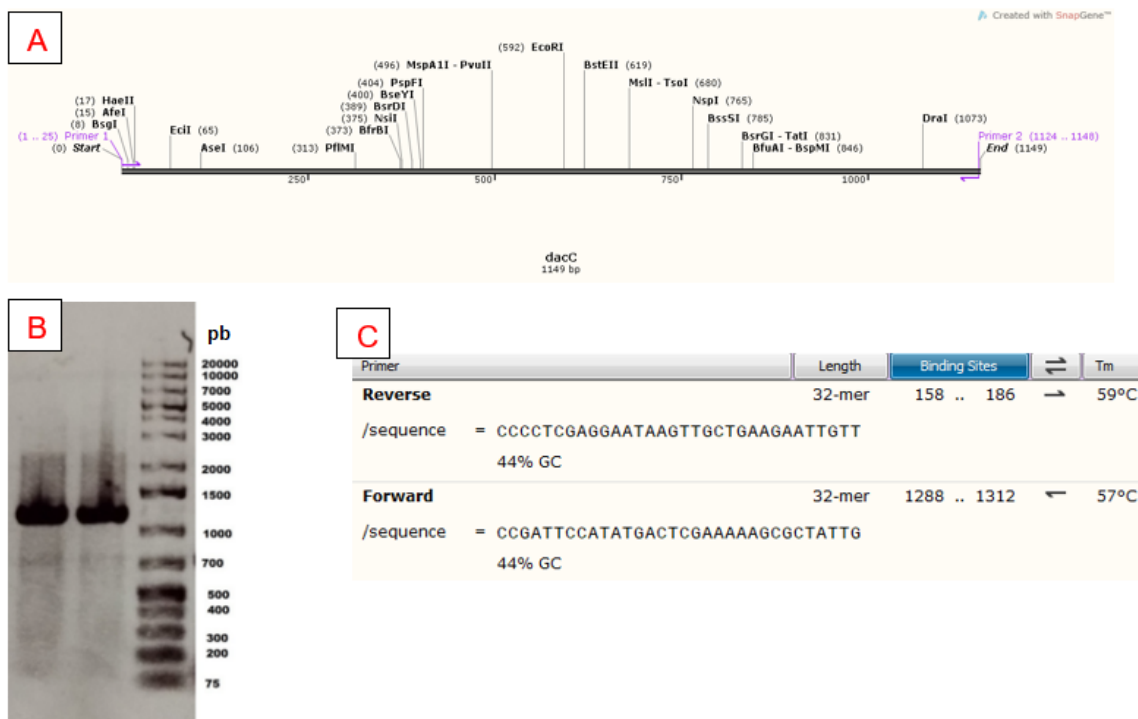


Fig. 6. Amplificación del gen *dacC* por PCR. A) Mapa del gen *dacC* de *A. baumannii* con sitios de restricción que no son afines a las enzimas de restricción utilizadas para evitar su degradación. B) Producto de los ensayos por PCR. C) Cebadores utilizados para la amplificación de *dacC*.

Paralelamente a las pruebas de PCR, se realizaron pruebas de doble digestión enzimática utilizando las enzimas NdeI y XhoI dando como resultado una digestión óptima que logro linealización del vector pET22b (+), ya que como se muestra en la Fig. 7. Se inactivaron las enzimas de restricción a 65 °C durante 15 minutos y se cargó la muestra en un gel de agarosa al 1%. En los productos de la doble digestión (carril 1 y 2), se puede apreciar que estos formaron una única banda que migra a través del gel llegando aproximadamente de 5 kb que corresponde al peso esperado del vector de clonación, a diferencia del carril P que funge como control negativo, ya que a esta muestra no se le agregaron enzimas de restricción. Las condiciones óptimas para la digestión del vector pET22b (+) se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones óptimas para la doble digestión del plásmido pET22b (+) en un volumen final de 50 µL.

DNA plasmídico	1 µg
Amortiguador <i>CutSmart</i> ® 3.1 10X ( <i>New England Biolabs</i> )	5 µL
NdeI ( <i>Thermo Scientific</i> ™)	1 µL (20 unidades)
XhoI ( <i>Promega</i> ™)	1 µL (20 unidades)
H <sub>2</sub> O tetradestilada estéril ajustada al volumen final.	34 µL

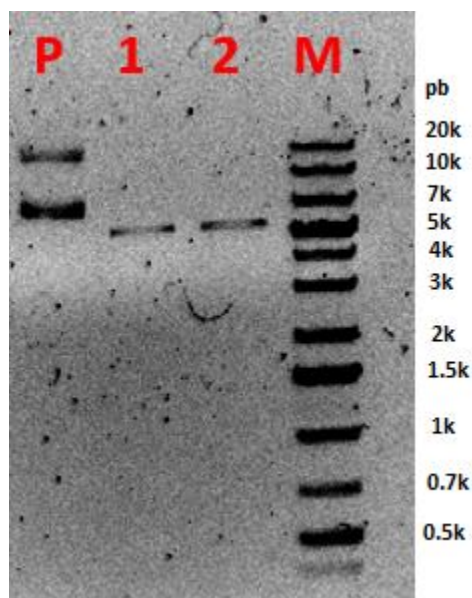


Fig. 7. Pruebas de doble digestión del plásmido con las enzimas NdeI y XhoI. (M) Marcador. (P) Plásmido sin digerir. (1 y 2) Plásmido digerido con ambas enzimas.

Para realizar los ensayos de ligación, se purifico la banda del gel correspondiente al plásmido digerido y linealizado con el *kit GeneJET Gel Extraction* de *Thermo Scientific™*. A partir del plásmido linealizado y del producto de PCR purificado, se diluyeron a una relación 1:5 junto con 2  $\mu$ L de amortiguador 10X de la ligasa del fago T4 (*Thermo Scientific™*), 1  $\mu$ L de ligasa del fago T4 de la marca *Thermo Scientific™* y aproximadamente 20  $\mu$ L H<sub>2</sub>O tetradestilada estéril durante toda la noche a 16 °C. Los resultados de las pruebas de ligación no presentaron resultados contundentes.

De manera paralela al proceso de ligación, que se describió previamente y como se detalla más en la sección 6.1 de la metodología, se solicitó sintetizar el gen *dacC* integrado al vector pET22b (+) como se describe en sección de metodología 6.2. Con el producto de la síntesis del gen *dacC* dentro del plásmido pET22b (+), se transformaron bacterias químicocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) y se purificó plásmido, el cual fue cargado a un gel de agarosa 1% para identificar que el peso del vector con el gen sintetizado *dacC*, fueran mayor que el del vector sin el inserto de *dacC*, todo esto con el fin de observar que la diferencia fuera proporcional al peso del gen *dacC*. Además, de manera paralela el vector con el inserto *dacC* se

llevó a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para asegurar que no existieran irregularidades en la secuencia del gen (Fig. 8).

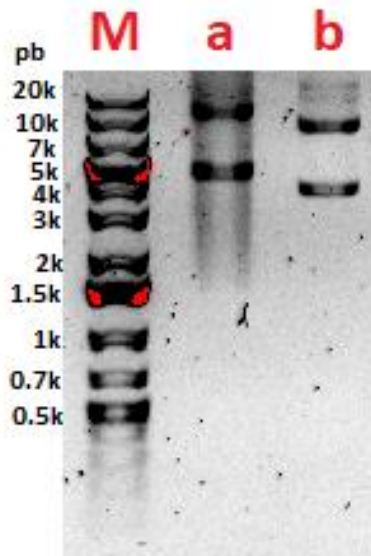


Fig. 8. Gel de agarosa con el plásmido pET22b (+) con el gen de *dacC* integrado (a) y el plásmido pET22b (+) sin el gen de *dacC* (b). Marcador de peso molecular (M). Se puede apreciar que la muestra *a* se encuentra ligeramente por arriba de la muestra *b* debido a que es más pesada por contener el gen de *dacC*.

Posteriormente, las colonias transformadas fueron identificadas en medio LB sólido con ampicilina y se realizaron pruebas de expresión por IPTG en diferentes colonias transformadas, estas colonias revelaron la presencia de una banda que corresponde al peso molecular de la PBP 5/6 de *A. baumannii* y todas las colonias presentaron una expresión uniforme con respecto a las demás (Fig. 9). Adicionalmente, se generaron gliceroles y se purificó el vector de clonación con el gen de *dacC* integrado para su almacenamiento.



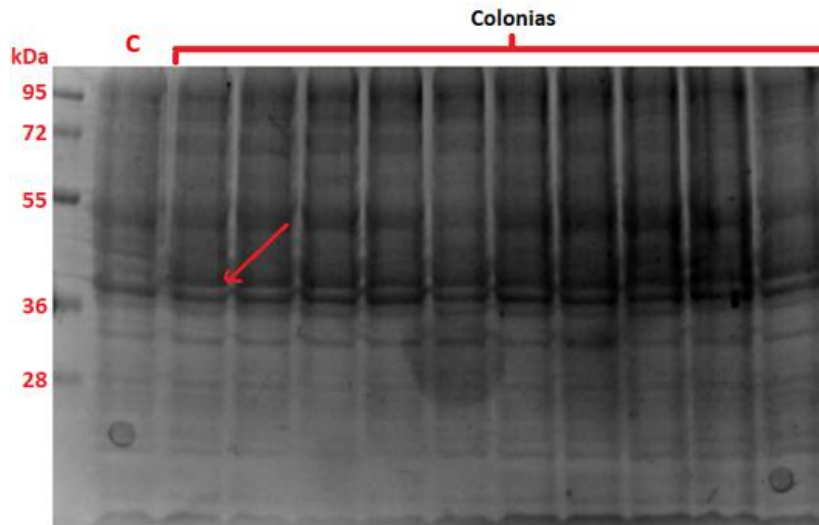


Fig. 9. SDS-Page de las pruebas de expresión en diferentes colonias transformadas de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET22b (+) con el gen de *dacC* integrado. Control (C). La flecha roja señala a la banda que corresponden a la PBP 5/6 de *A. baumannii* 17978.

Los ensayos cinéticos a 37 °C y 200 rpm, mostraron que a partir de las 4 horas después de la inducción por IPTG 0.8  $\mu$ M concentración final se observa una banda, que corresponde al peso de la PBP 5/6 de *A. baumannii* que es de 41.7 kDa, dicha banda es considerablemente más grande con respecto al control no inducido con IPTG (C), además, a las 6 horas después de la inducción se llega a obtener una banda ligeramente más grande con respecto a las bandas de 4 y 5 horas (Fig. 10). Adicionalmente se realizaron pruebas de expresión a 18 °C, sin embargo, los niveles de expresión en la bacteria no eran considerables por lo que se optó incubar los cultivos celulares a la temperatura original de 37 °C.

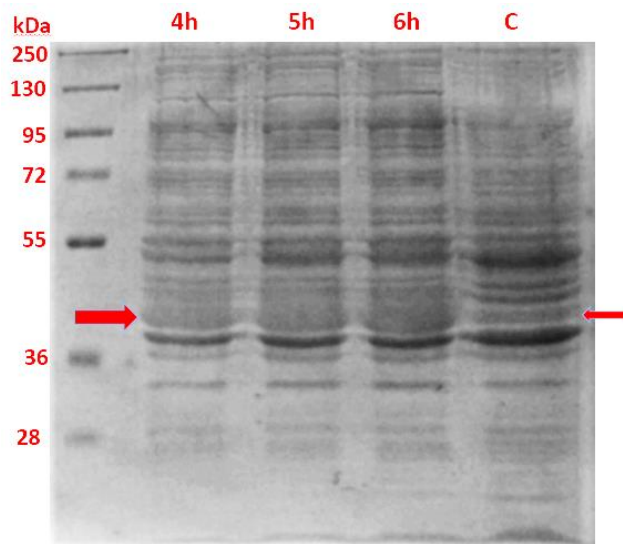


Fig. 10. Cinéticas de expresión de la PBP 5/6 a 4, 5 y 6 horas después de la inoculación con IPTG a concentración 0.8  $\mu$ M. Las flechas rojas indican la banda que corresponde a la PBP 5/6 de *A. baumannii*. Control sin inducir (C).

### 7.2 Ensayos de concentración mínima inhibitoria y pruebas de viabilidad de las células.

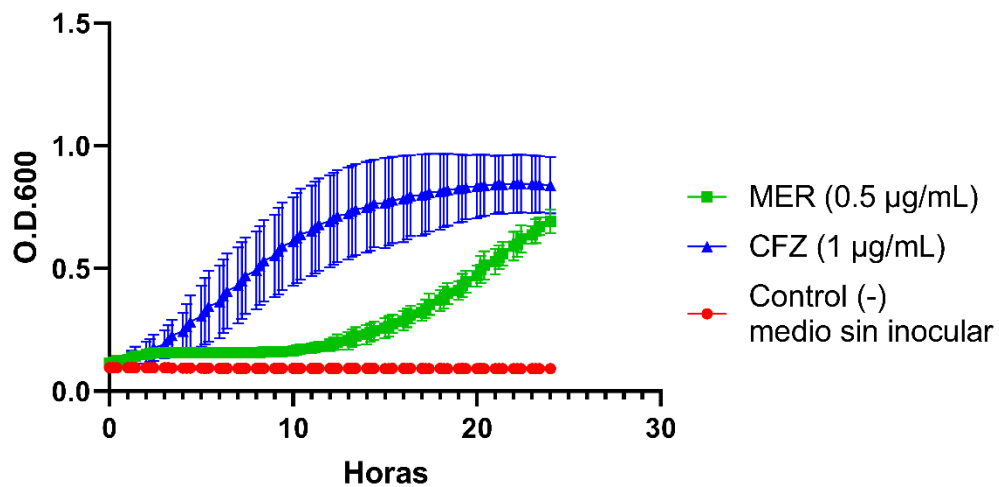


Fig. 11. Cinética de crecimiento de la bacteria *A. baumannii* 17978 en presencia de meropenem (MER) y ceftazidima (CFZ).

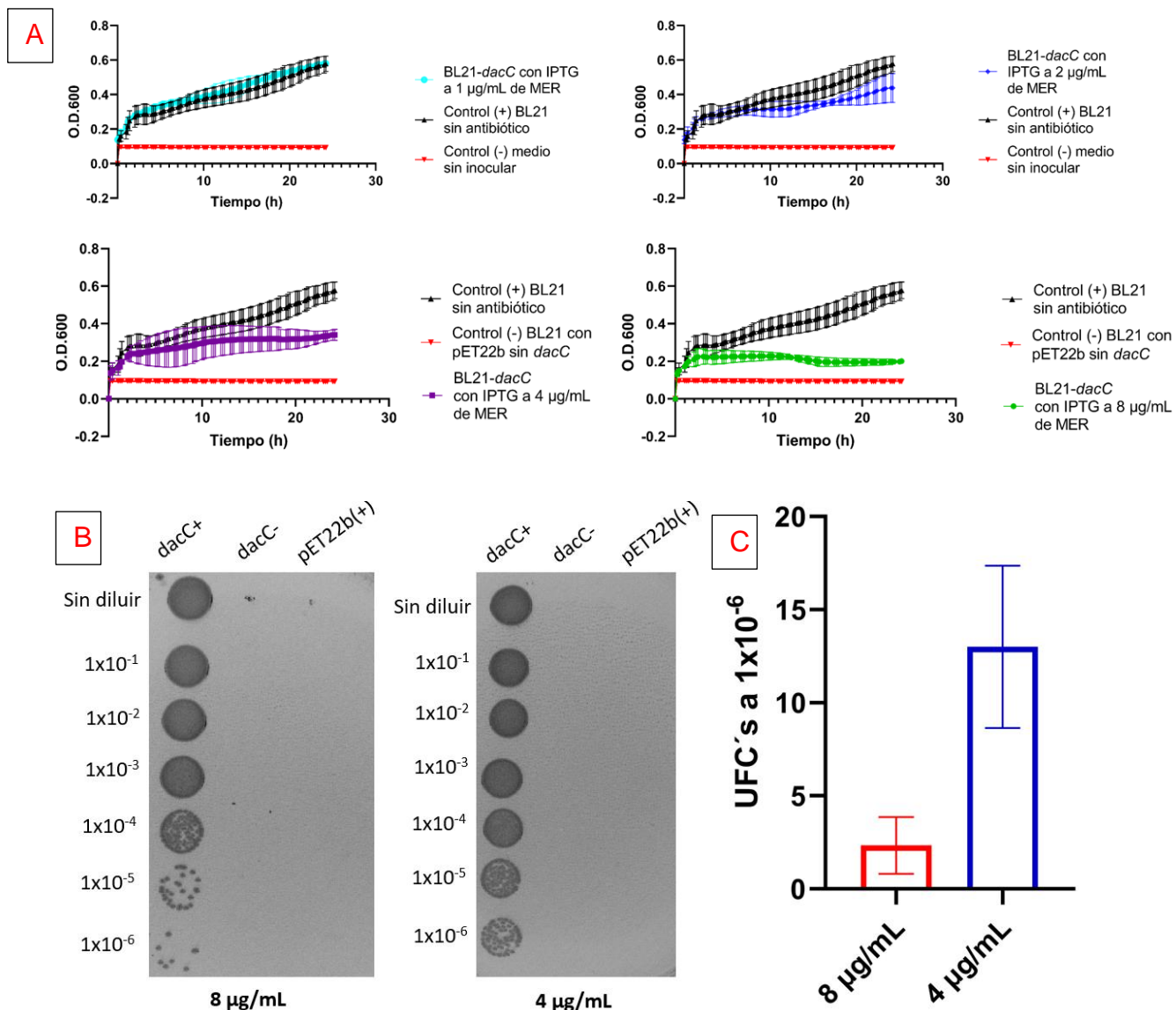


Fig. 12. (A) Cinéticas de crecimiento de las bacterias a concentraciones de meropenem (MER) de 1 a 8 µg/mL, *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET22b (+) sin el inserto *dacC* fungen como control negativo y *E. coli* BL21-*dacC* sin antibiótico fungen como control positivo. (B) Pruebas de viabilidad de las células en los medios con 8 y 4 µg/mL de meropenem. (C) Promedio de UFC's a una dilución 1x10<sup>-6</sup> de las *E. coli* BL21-*dacC* inducida con IPTG en medio con meropenem.

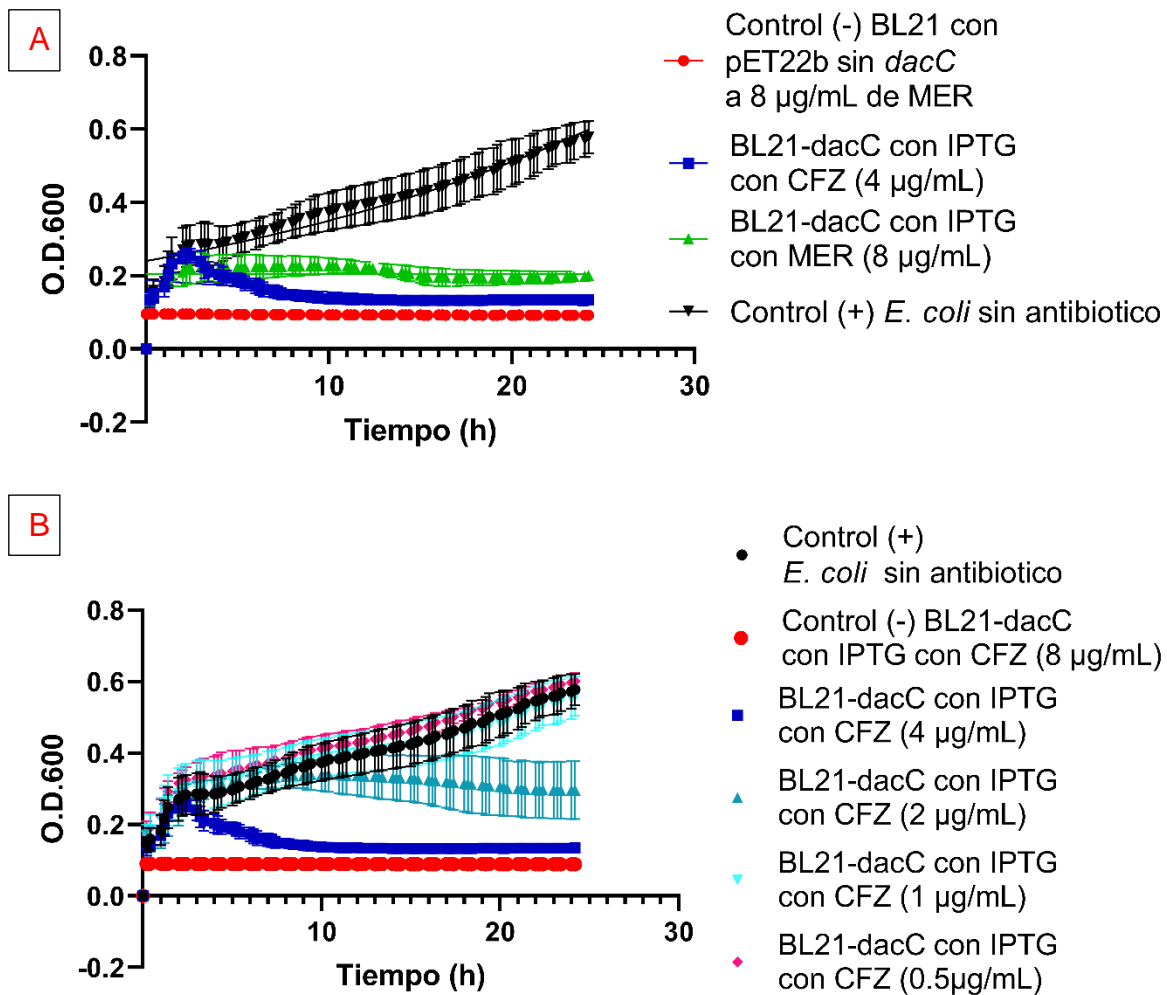


Fig. 13. (A) Cinética de crecimiento de las concentraciones máximas resistidas por las bacterias *E. coli* BL21-*dacC* inducidas con IPTG en presencia de antibióticos meropenem (MER) y ceftazidima (CFZ). *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET22b (+) sin el inserto *dacC* a 8  $\mu\text{g/mL}$  de MER funge como control negativo. (B) Cinéticas de crecimiento en medio con diferentes concentraciones de CFZ.

El meropenem como la ceftazidima, son antibióticos de amplio espectro diseñados para inhibir las PBP's de bacteria Gram positivas y negativas. De acuerdo al CLSI, la CMI para considerar a una bacteria resistente a meropenem y a ceftazidima es mayor o igual a 4  $\mu\text{g/mL}$  y 16  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, de acuerdo a este criterio como era esperado podemos observar que en el caso de *A. baumannii* 17978 la bacteria es susceptible a concentraciones mayores de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  de meropenem y 1  $\mu\text{g/mL}$  de ceftazidima (Fig. 11).

Por otro lado, en presencia de meropenem, la *E. coli* BL21-*dacC* inducidas con IPTG presento crecimiento a una concentración de hasta 8 µg/mL con una absorbancia de 0.2 a 600 nm (Fig. 12A) y a 4 µg/mL de 0.3 a 600 nm (Fig. 12B), a diferencia del control *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET22b(+) sin el inserto *dacC*, este resultado lo que nos indica es que las *E. coli* BL21-*dacC* presentan resistencia contra meropenem debido a que de acuerdo al CLSI se consideran resistentes las bacterias que presentan crecimiento a una concentración mayor o igual a 4 µg/mL (Fig. 12).

En presencia de ceftazidima la *E. coli* BL21-*dacC* inducidas con IPTG crecieron a una concentración máxima de 4 µg/mL, de acuerdo al CLSI esto no representaría una señal de que las bacterias hayan conferido una resistencia a la ceftazidima a diferencia del meropenem, esto debido a que la concentración mínima para que las bacterias sean consideradas resistentes a ceftazidima debe ser igual o mayor 16 µg/mL, por lo que se puede concluir que las *E. coli* BL21-*dacC* inducidas con IPTG confirieron resistencia a meropenem más no a ceftazidima (Fig. 13A).

Viendo a detalle las concentraciones en las que la *E. coli* BL21-*dacC* presento crecimiento, se puede observar que al reducir la concentración de CFZ el crecimiento bacteriano se va pareciendo más al del control positivo (Fig. 13B). A pesar de que el resultado, la *E. coli* BL21-*dacC* muestran que no resiste concentraciones de antibiótico necesarias para poder categorizarla como una bacteria resistente, pero, llama la atención que si comparamos el resultado entre la *E. coli* BL21-*dacC* contra la cepa de *A. baumannii* 17978, observamos que la concentración en la que pudo crecer la *E. coli* BL21-*dacC* fue mayor al de *A. baumannii* 17978, esto podría sugerir que aunque la acción del gen *dacC* no es suficiente para poder volver a la bacteria resistente a ceftazidima, el gen *dacC* si podría ayudar ligeramente a mejorar la supervivencia de la bacteria a concentraciones un poco mayores de 1 µg/mL (Fig. 13B).

Los experimentos de CMI, se realizaron diluciones de las bacterias en amortiguador PBS para hacer pruebas de viabilidad de las *E. coli* BL21-*dacC* inducida con IPTG y conocer el número de UFC's presentes en las concentraciones de 8 y 4 µg/mL

que de acuerdo al CLSI estarían catalogadas como bacterias resistentes. Las UFC's promedio de las bacterias que crecieron a 8 µg/mL de meropenem es de  $2.3 \pm 1.2$  a un factor de disolución de  $1 \times 10^{-6}$  mientras que para las bacterias que crecieron a una concentración de 4 µg/mL de meropenem el promedio de UFC's fue de  $13 \pm 3.5$  a un factor de dilución que está a  $1 \times 10^{-6}$ , esto nos indica que a 8 µg/mL de meropenem debe haber aproximadamente  $2.3 \times 10^5 \pm 1 \times 10^{-6}$  UFC's por 10 µL de medio de cultivo y a 4 µg/mL de meropenem debe de haber  $13 \times 10^6 \pm 2.8 \times 10^5$  UFC's por 10 µL de cultivo, este resultado lo que nos indica es que al reducir la concentración de meropenem al doble el número de UFC's se incrementa poco más de diez veces (Fig. 12C).

Aunque los resultados muestran que las *E. coli* BL21-*dacC* inducidas con IPTG fueron resistentes a dosis altas de meropenem, es importante mencionar que hay cepas aisladas clínicamente que pueden resistir tres o cuatro veces de la concentración mínima para ser considerada resistente, sin embargo, estos aislados clínicos cuentan con varios sistemas para poder minimizar los efectos de los antibióticos además de la PBP 5/6, como copias de diferentes betalactamasas o proteínas transmembranales que funcionan como bombas para expulsar los antibióticos (Asif et al., 2018; Harding et al., 2018; Morris et al., 2019).

Una de las razones que sugeriría porque la PBP 5/6 puede conferirle resistencia a la *E. coli-dacC* inducida con IPTG, puede ser el parecido estructural que sugiere el modelo por homología de la PBP 5/6, cuyo valor de calidad y confianza (C-Core) fue de 1.40 con su homólogo más cercano la PaPBP 5 de *P. aeruginosa* y una cobertura del 91% de la estructura de la PaPBP 5 con el modelo, lo cual nos invita a pensar que entre la PBP 5/6 y la PaPBP 5 hay un enorme parecido estructural y como previamente se mencionó se ha reconocido que la PaPBP 5 tiene la capacidad de hidrolizar meropenem entre otros antibióticos (Smith et al., 2013).

El modelo de la PBP 5/6, además de sugerir que hay un gran parecido entre el sitio activo de esta enzima con la PaPBP, 5 nos muestra que en la estructura cristalográfica de la betalactamasa BlaC también existe un gran parecido estructural, se sabe que esta betalactamasa le confiere resistencia a meropenem a

*M. tuberculosis*, al observar la posición entre los residuos de BlaC podemos ver que se encuentran en posiciones muy similares con el modelo por homología de la PBP 5/6 (Fig. 14A) (Chow et al., 2013).

En la estructura cristalográfica de la BlaC, se observan los residuos importantes para la hidrólisis del meropenem, la serina 70 que es la serina catalítica de la BlaC se necesita desprotonar gracias a la lisina 73, esta desprotonación permite un ataque nucleofílico del carbono 7 del anillo betalactámico del meropenem por el hidrógeno de la serina lo que provoca la unión covalente del oxígeno de la serina 70 con el carbono 7 del meropenem mientras que la lisina 73 y las treoninas 251 y 253 forman puentes hidrógeno para estabilizar el antibiótico dentro del sitio activo de la BlaC.

Cuando observamos el modelo por homología de la PBP 5/6, observamos que el sitio activo es muy similar al de la BlaC, con la pequeña diferencia de que hay una sustitución entre la treonina 253 de la BlaC por una histidina en la posición 207 de la PBP 5/6. Además, uno de los puentes de hidrógeno que se generan en la treonina 253 de la BlaC, es entre el grupo amino de la cadena principal de la treonina con un oxígeno unido al carbono 7 del meropenem, otro puente de hidrógeno se genera entre el oxígeno de la cadena lateral de la treonina y el grupo carboxilato del meropenem. Sin embargo, la distancia que hay para que se forme este puente de hidrogeno es muy grande y llega casi al límite de distancia permitida que hay para un puente de hidrógeno la cual es de 3.3 Å, por lo que es posible que este último puente no tenga un papel muy relevante, mientras que al ver la histidina 207 de la PBP 5/6 podría ser que se genere solo uno de los dos puentes de hidrógeno con el meropenem.

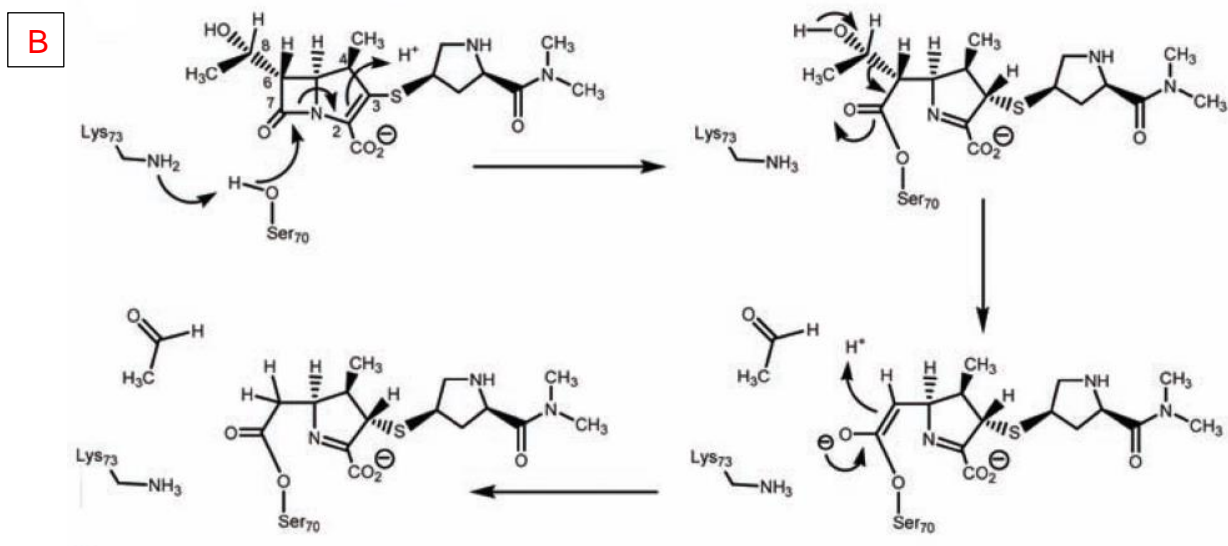
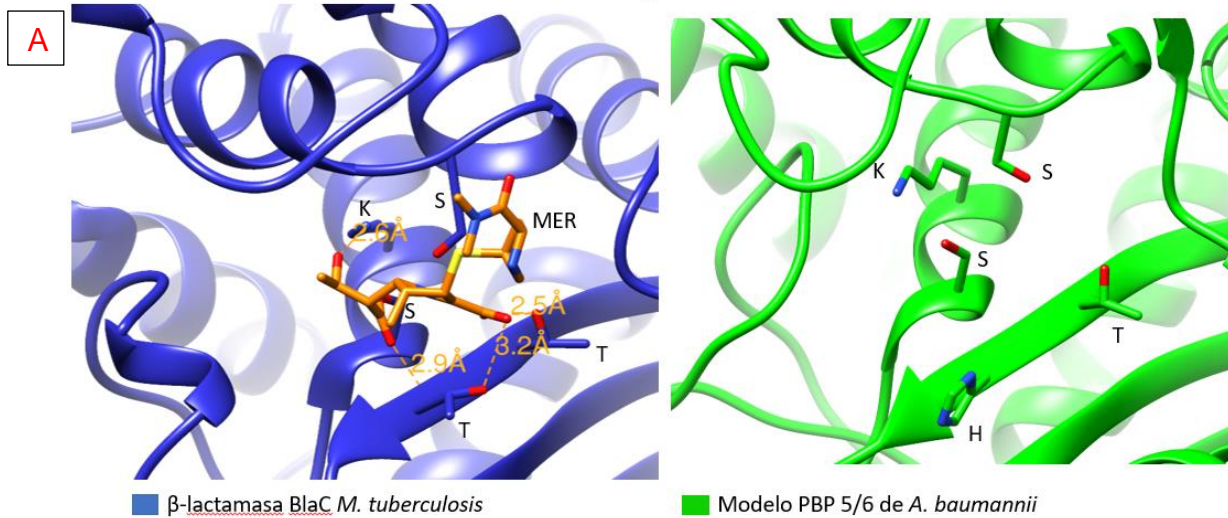


Fig. 14. Parecidos estructurales entre la betalactamasa BlaC de *M. tuberculosis* y la PBP 5/6. (A) Similitud entre el sitio activo de la estructura cristalográfica de la betalactamasa BlaC y el sitio activo de la PBP 5/6 según el modelo por homología hecho en I-TASSER. (B) Mecanismo de acción de la betalactamasa BlaC tomado de Chow, Xu, and Blanchard, 2013.

Los experimentos de CMI, al haber presentado resultados interesantes sobre el papel que tiene la sobre expresión de la PBP 5/6 en la supervivencia de la *E. coli* BL21-*dacC* en presencia de meropenem, condujeron a elaborar un protocolo de purificación por afinidad a níquel como se mostró en la sección 6.4 y 6.5 de la metodología con el fin de realizar pruebas de actividad con la enzima purificada en



presencia de nitrocefina que es un antibiótico utilizado regularmente para hacer pruebas de actividad de betalactamasas (O'Callaghan et al., 1972; Papanicolaou & Medeiros, 1990). Para lo cual fue necesario primero purificar la enzima.

### [7.3 Purificación de la PBP 5/6.](#)

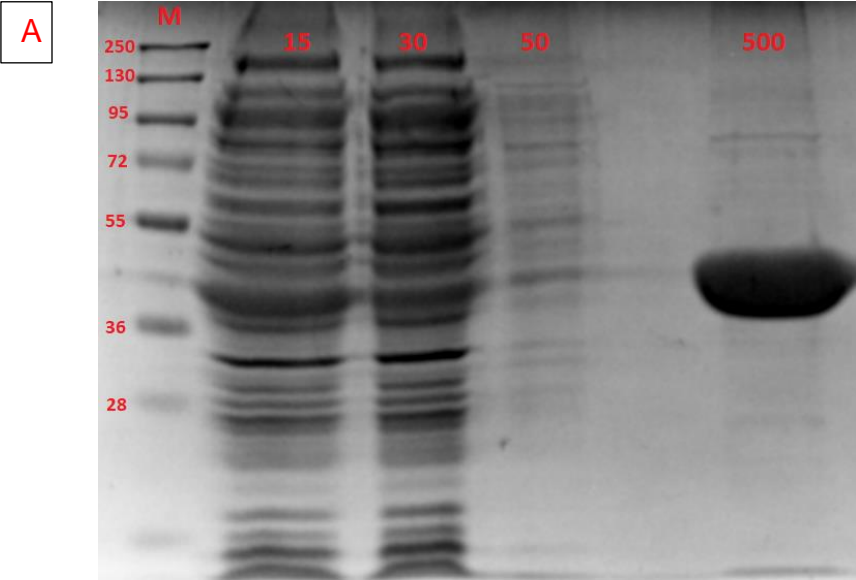
Después de haber centrifugado cultivos de 1 L de medio con ampicilina que expresaron por 6 horas la PBP 5/6 inducida por 800  $\mu$ L de IPTG se resuspendió el pélet de células con amortiguador Tris 50 MM, NaCl 200 mM, imidazol 15 mM, pH: 7.2 y Triton X-100 1%.

El Triton X-100 es un reactivo esencial para la purificación de la PBP 5/6, ya que como se muestra en la Fig. 15C la enzima se queda en la fracción insoluble si no se agrega este reactivo, una explicación de porque es necesario agregar este tipo de detergente puede ser debido a que las PBP's poseen un segmento en el dominio de C-terminal que se une a la membrana celular (Alexander et al., 2018b).

Con lo anterior, podríamos deducir que el segmento del dominio C-terminal podría mantenerse anclado a la membrana de la célula aun después del paso de sonicación. En consecuencia, el Triton X-100 permite la degradación de la membrana por lo que la enzima puede quedar libre y de este modo migrar hacia la fracción soluble durante el paso de centrifugación. Por otro lado, la concentración de Triton X-100 en la columna de afinidad se reduce tras los lavados graduales de amortiguador Tris 50 MM, NaCl 200 mM, imidazol 15-500 mM que no tienen Triton X-100, lo cual es importante, ya que reactivos como el Triton X-100 o diferentes detergentes pueden ser un contaminante que eviten el proceso de cristalización en las proteínas.

Los resultados obtenidos de los lavados con concentraciones graduales de imidazol muestran una purificación de la PBP 5/6 de más del 95%. El lavado con los amortiguadores con 15 y 30 mM son los más importantes, ya que eliminan la mayor parte de proteínas indeseables en la purificación como se muestra en la Fig. 15A.

La Fig. 15B muestra la concentración de proteína total promedio que se elimina tras cada paso de lavado, en el último lavado con 500 mM de imidazol se obtiene en promedio una concentración de la PBP 5/6 de 3.5 mg/mL en 2 mL de muestra.



**B**

Buffer de lavado de imidazol (mM)	15	30	50	500
Concentración de proteína obtenida.	~94 mg/mL	~5.4 mg/mL	~0.5 mg/mL	~3.5 mg/L

**C**

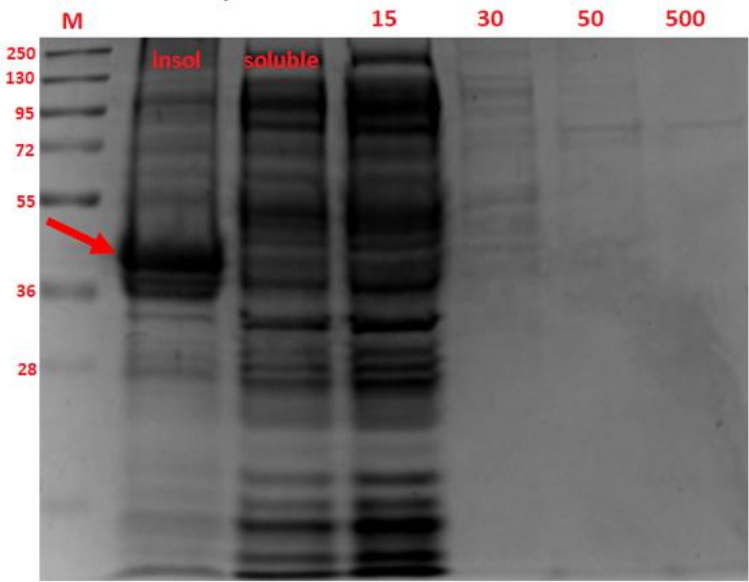


Fig. 15. SDS-Page del contenido de proteína a diferentes eluciones de imidazol. A) Cromatograma con las fracciones donde se logró separar a la PBP 5/6 de la

columna de afinidad a níquel. B) Concentraciones de proteína después de cada lavado gradual en la concentración de imidazol. C) SDS-Page de la fracción insoluble, soluble y lavados con imidazol de una muestra sin agregar Triton X-100, se puede apreciar que sin Triton X-100 la PBP 5/6 señalada con una flecha no puede salir de la fracción insoluble sin Triton X-100.

Alternativamente, como un paso más en la purificación de la PBP 5/6, se cargaron los 2 mL de la muestra final de la purificación con la columna de afinidad a níquel a una columna Sephadex para eliminar el exceso de imidazol en la muestra con amortiguador Tris 50 mM y NaCl 200 mM como se detalla en la sección 6.5 de la metodología (Fig. 16). Sin embargo, este paso de purificación se dejó de realizar en purificaciones posteriores debido a que al remover al imidazol la estabilidad de la proteína se comprometía lo que generaba que se precipitara en cuestión de segundos.

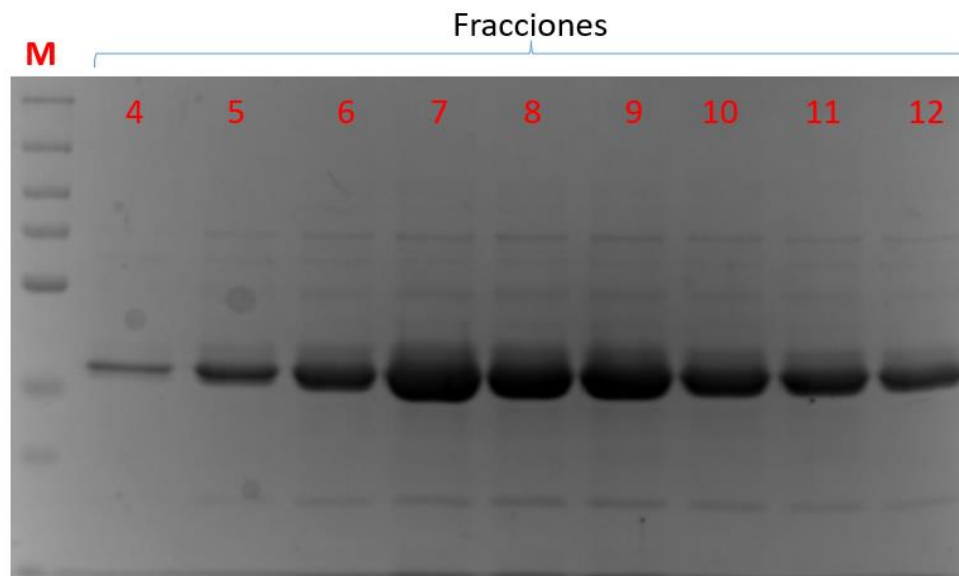


Fig. 16. Fracciones de desalación con la columna Sephadex. A) SDS-Page de las fracciones con la PBP 5/6 posterior a la eliminación del imidazol del amortiguador Tris 50mM, NaCl 200 mM, imidazol 500 mM pH: 7.2.

Para los resultados de los ensayos de cinéticas enzimáticas y pruebas de cristalización, la PBP 5/6 purificada únicamente por el paso de purificación de afinidad a níquel sin haberla pasado por la columna de exclusión para remover el imidazol como se describe en la sección 6.4 de la metodología. Al purificar a la PBP 5/6, se encontró que se mantiene estable a temperatura ambiente y las temperaturas bajas o muy altas favorecían su precipitación, en los primeros ensayos de purificación se encontró que esta enzima se precipita a cualquier temperatura y por tiempos prolongados que sobrepasen las 12 horas post purificación, por lo tanto, se optó por trabajar con ella de la manera más rápida posible después de ser purificada durante los ensayos cinéticos.

Adicionalmente, la enzima se concentró a 3700 rpm en los ensayos que tenían el fin de tener suficiente enzima para montar pruebas de cristalización, al centrifugar a una velocidad mayor a las 3700 rpm, se encontró que la enzima era propensa a precipitarse más rápido al incrementar su concentración a una cantidad superior a la de los 10 mg/mL, en consecuencia, esto nos dice que al incrementar mucho la concentración de esta tiende a perder estabilidad y el tiempo en el que se mantiene soluble se recorta notablemente.

Una vez que se pudo estandarizar el proceso de purificación por columna de afinidad a níquel afinidad de la PBP 5/6 sin remover el imidazol, se realizaron de ensayos cinéticos para poder confirmar las capacidades hidrolíticas de esta enzima en presencia de un antibiótico betalactámico específico para caracterizar betalactamasas.

#### 7.4 Pruebas de actividad enzimática.

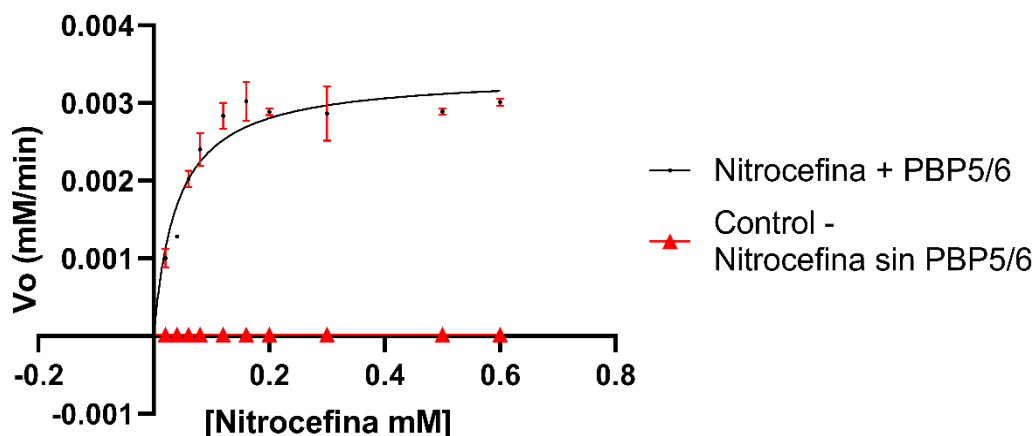


Fig. 17. Gráfica Michaelis-Menten de la hidrólisis de nitrocefina en presencia de la PBP 5/6 de *A. baumannii*.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la PBP 5/6 en presencia de nitrocefina.

	Km ( $\mu\text{M}$ )	Kcat ( $\text{s}^{-1}$ )	Kcat/Km ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
<i>A. baumannii</i> PBP 5/6	$40 \pm 10$	$1.26 \times 10^{-2}$	$329 \pm 69$
<i>E. coli</i> sPBP 5*	$48 \pm 6$	$5.1 \times 10^{-3} \pm 0.3 \times 10^{-3}$	$1047 \pm 44$
<i>P. aeruginosa</i> PaPBP 5*	$226 \pm 28$	$4.8 \times 10^{-3} \pm 0.4 \times 10^{-3}$	$21 \pm 2$
$\beta$ -lactamasa BlaC <i>M. tuberculosis</i> *	$86 \pm 6$	$38 \pm 2$	$4.4 \pm 0.1 \times 10^5$

\*Datos obtenidos de Jeffrey D. Smith, *et al.* 2013; Carmen Chow, Hua Xu & John S. Blanchard 2013

Los resultados de la curva de Michaelis-Menten de la Fig. 17, muestran que la PBP 5/6 obtenida de la purificación de afinidad que previamente se describió o que se describe en la sección 6.4 de la metodología, puede hidrolizar la nitrocefina a concentraciones de 0.02 a 0.6 mM, este antibiótico señala que de acuerdo al  $\beta$ -*Lactamase Activity Assay Kit* de la marca Sigma-Aldrich® la concentración estándar máxima para identificar la actividad betalactámica es de 0.2 mM. La forma, en la que se pudo identificar de que la PBP 5/6 tiene capacidad de romper el anillo betalactámico de la nitrocefina, es gracias a que se detectó absorbancia a 490 nm y al absorber a esa longitud de onda fue indicativo de la formación de ácido cefalosporánico que es el producto de la hidrólisis de la nitrocefina cuando se rompe el anillo betalactámico, ya que este producto de la hidrólisis es detectado a 490 nm.

Con estos resultados, se puede demostrar como se pensaba en la hipótesis que la PBP 5/6 tiene capacidad hidrolítica frente a la nitrocefina, es importante mencionar que la nitrocefina es un antibiótico específico para medir la actividad de betalactamasas de manera cualitativa y cuantitativa, por lo que las PBP's que no tienen capacidad hidrolítica no podrían hidrolizarlo. Por otro lado, este resultado lo que también nos indica, es que la PBP 5/6 tiene la capacidad intrínseca de poder hidrolizar el anillo betalactámico de las cefalosporinas y muy probablemente el anillo betalactámico de otros antibióticos, que pertenecen al mismo grupo de inhibidores de las proteínas que están involucradas en la síntesis de la pared celular, al igual que sus homólogos como la PaPBP5 presente en *P. aeruginosa* y la sPBP 5 en *E. coli*.

Es importante mencionar, que cuando se comparan los valores de los parámetros cinéticos de la PBP 5/6 con respecto a su homóloga la sPBP 5 de *E. coli* y la betalactamasa BlaC de *M. tuberculosis*, los valores de la constante de especificidad (Kcat/Km) son más bajos para el caso de la PBP 5/6, sin embargo, para el caso de la PaPBP 5 de *P. aeruginosa*, los valores de la constante de especificidad de la PBP 5/6 son más altos que los de la PaPBP 5, a pesar de ser una PBP que tiene un espectro de resistencia más amplio que el de la sPBP 5, por lo que los valores de la constante de especificidad entre diferentes PBP's pueden ser muy variable

dependiendo el antibiótico con el que actúan de acuerdo a la comparación de los parámetros cinéticos presentados en el artículo de Jeffrey D. Smith, *et al.* 2013, por lo que, el simple hecho de que la PBP 5/6 tenga un valor cercano de  $K_m$  y de  $K_{cat}/K_m$  es un descubrimiento que previamente no se había reportado en la literatura. Además, las PBP's son enzimas involucradas en la síntesis de pared celular más no en la hidrólisis de antibióticos como si lo son las betalactamasas, por lo que el hecho de encontrar una PBP que intrínsecamente puede hidrolizar un antibiótico usado para estandarizar la actividad de betalactamasas es bastante interesante.

Una razón por la que los parámetros cinéticos pueden variar, tanto de una PBP a otra para hidrolizar un mismo antibiótico como se puede apreciar en la Tabla 4, pueden ser los residuos del sitio activo así como el ambiente del mismo, que puede o no facilitar el proceso de desprotonación del motivo SXXN, además, un aspecto importante que podría tener un papel en la actividad podría ser el *loop* 1 que se encuentra arriba del sitio activo, que previamente se ha considerado como un *loop* importante en la actividad por el grupo de Jeffrey D. Smith y colaboradores en 2013, sin embargo, no se podría saber con certeza sus implicaciones en la hidrólisis de antibióticos hasta que se lograran hacer mutantes de dicho *loop* 1 con técnicas de biología molecular.

Por otro lado, existen estructuras cristalográficas reportadas de la PBP 4 de *S. aureus* las cuales demuestran que existe un cambio en la disposición del dominio SXN cuando la región del *loop* 1 se mueve, ya que determinaron que este mismo *loop* 1 tiene diferentes conformaciones de “abierto” y “cerrado” en presencia de diferentes antibióticos betalactámicos, esto invitaría a pensar que la conformación de dicho *loop* 1 podría jugar un papel en la disposición del motivo SXN, ya que en su conformación abierta este motivo se aleja del sitio activo de la enzima, por lo que provoca que se reduzca la distancia entre este motivo y el antibiótico betalactámico, este acomodamiento del motivo SXN podría jugar un papel en la forma en la que las PBP's manejan el proceso de hidrólisis de los antibióticos, ya que esta PBP 4 de *S. aureus*, además de ser homóloga de la PBP 5/6 también ha sido objeto de estudio

porque confiere resistencia en algunas cepas aisladas clínicamente (Alexander et al., 2018a; da Costa et al., 2018; Moon et al., 2018). Sin embargo, estas suposiciones como se mencionó previamente, podrían ser confirmadas mediante mutaciones deletéreas del *loop 1* utilizando técnicas de biología molecular, o bien sintetizado a los genes mutantes que carezcan del *loop 1*.

Al ver los resultados cinéticos de la PBP 5/6, desde un punto de vista evolutivo observamos que los valores de la constante de especificidad contra la de la betalactamasa BlaC y la sPBP 5, podemos notar que la betalactamasa BlaC como muchas de sus homólogas han pasado por un proceso de selección más específico que ha generado un perfeccionamiento para la función de la hidrólisis de antibióticos a diferencia de las PBP's, a pesar de esto, es muy probable que con el transcurso de la historia natural de las PBP's el uso desmedido de antibióticos ha generado una presión de selección en las bacterias. que conducido a que las PBP's de bajo peso molecular generen una mayor actividad hidrolítica y sean capaces de mejorar sus constantes de afinidad gracias a posibles nuevas mutaciones que las hagan más afines a los antibióticos, tal como paso hace millones de años con las primeras betalactamasas que surgieron de las PBP's, lo que eventualmente se convertiría en una amenaza a la salud publica en caso de que esto ocurra en cepas patógenas que se presenten en la naturaleza.

Por otro lado, la PBP 5/6 que se usó en este trabajo es una copia de la PBP 5/6 de la cepa *A. baumannii* 17978 la cual es una cepa que fue aislada en 1951, esto quiere decir, que es muy probable que actualmente la PBP 5/6 de cepas multirresistentes que estén en la actualidad tengan versiones optimizadas de esta enzima, por lo que este trabajo, puede servir como un buen complemento para el estudio de sistemas de resistencia microbiana basados en modificaciones a las PBP's de *A. baumannii* (Baumann et al., 1968).



### 7.5 Pruebas de cristalización por microbatch de la PBP 5/6.

Después de la purificación de la PBP 5/6 que se detalla en la sección 6.4, la PBP 5/6 se concentró la enzima en un Amicon® de 10,000 NMWL a 3700 rpm por 1 hora hasta llegar a una concentración cercana a 10 µg/mL de enzima. A partir de obtener la enzima concentrada, se realizaron pruebas de cristalización con y sin imidazol a 18 °C en placas de *microbatch* obteniendo como resultado cristales en cinco condiciones diferentes después de 15 días de haber puesto las pruebas de cristalización como se puede ver en la Fig. 18. Adicionalmente, se realizaron pruebas de los kits Wizard e Index a una temperatura de 4 °C.

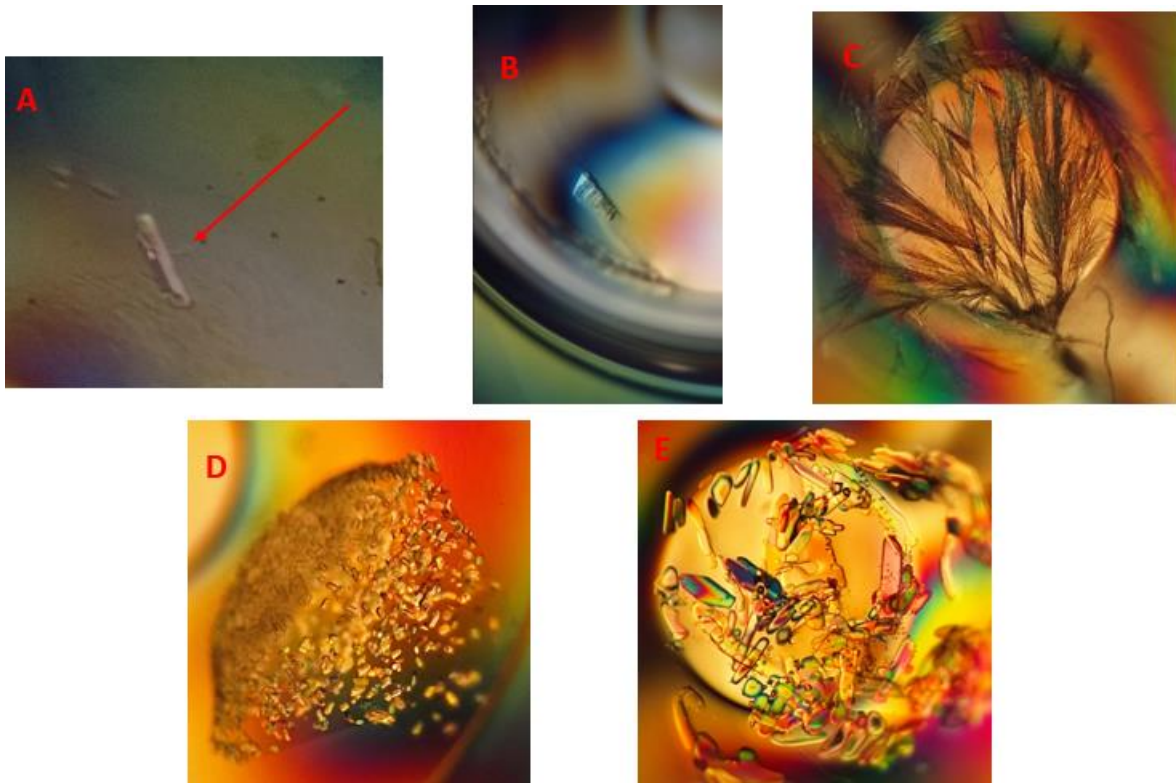


Fig. 18. Resultados obtenidos de pruebas de cristalización por técnica de microbatch a 18 °C con la PBP 5/6 de *A. baumannii*. A) Condición Wizard-13 260 mM Sulfato de amonio, 100 mM Cacodilato de sodio, Ácido clorhídrico pH 6.5 con 4 mg/mL de enzima sin imidazol. B) Condición Wizard-41 30% (w/v) PEG 3000 100 mM, CHES/ Hidróxido de sodio pH 9.5 con 24 mg/mL de enzima con imidazol. C)

Condición Wizard-26 10% (p / v) PEG 3000, CHES 100 mM / hidróxido de sodio pH 9.5 con 4 mg/mL de enzima sin imidazol. D) Condición Index-14 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 0.5 M formiato de magnesio dihidratado con 9 mg/mL de enzima con imidazol. E) Condición Index-30 0.1 M Cloruro de sodio, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 1.5 M Sulfato de amonio con 9 mg/mL de enzima con imidazol.

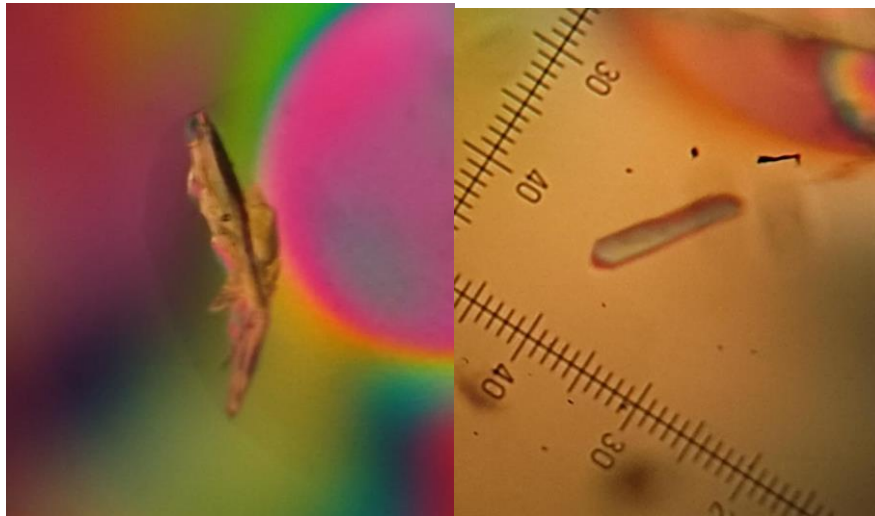


Fig. 19. Cristales obtenidos de las pruebas de cristalización de los kits Wizard I y II. A) Cristal obtenido de la condición 10 del kit Wizard I que contiene 20% (w/v) PEG 2000 MME, Tris base/ HCl pH 7.0, la enzima se concentró a 6 mg/mL, se montó la prueba de cristalización a 18 °C y el amortiguador con el que se purificó la enzima fue Tris 50mM, NaCl 200 mM, pH 9.0, imidazol 500 mM. B) Cristal obtenido de la condición 13 del kit Wizard II que contiene 35% MDP/100 mM MES, NaOH pH 6.0, 200 mM Sulfato de litio, la enzima se concentró a 10 mg/mL, se montó la prueba a 18 °C y se purificó la enzima en un amortiguador con Tris 50 mM, NaCl 200 mM, pH 9.0, imidazol 500 mM.

Los resultados para la obtención de cristales de proteína, aptos para poder difractarlos y determinar la estructura tridimensional de la PBP 5/6 en su forma apo o en complejo con algún antibiótico betalactámico, no ha dado resultados óptimos hasta la elaboración de este escrito. Sin embargo, se continúan realizando purificaciones de esta enzima y se ha continuado con el montaje de pruebas de

cristalización con diferentes *kits* de cristalización para alcanzar este objetivo, todo lo anterior, con el fin dilucidar la forma en la que los residuos del sitio activo de la PBP 5/6 se encuentran distribuidos y como estos podrían interactuar con algún antibiótico betalactámico, para poder comprender a mayor profundidad el mecanismo a través el cual la PBP 5/6 hidroliza el anillo betalactámico al igual que las betalactamasas.

## 8. Conclusiones:

El sistema heterólogo de la *E. coli* BL21 (DE3) que contiene el gen *dacC* de *A. baumannii* 17978 que codifica a la PBP 5/6 (*E. coli* BL21-*dacC*), al sobre expresarlo permite la supervivencia de la bacteria en concentraciones altas de meropenem en contraste con las *E. coli* BL21 (DE3) que no poseen el gen *dacC*, comprobando que la sobre expresión de la PBP 5/6 es importante para la supervivencia de la bacteria *E. coli* BL21-*dacC*. Por otro lado, la *E. coli* BL21-*dacC* no logra sobrevivir a concentraciones altas de ceftazidima, sin embargo, aunque no se puede decir que son resistentes a ceftazidima las bacterias que llevan este sistema heterólogo logran sobrevivir a concentraciones de ceftazidima mayores que la bacteria *A. baumannii* 17978 esto sugiere que la *E. coli* BL21-*dacC* pudo incrementar ligeramente la tolerancia a este antibiótico al compararlo con la bacteria *A. baumannii* 17978.

El protocolo de purificación de la PBP 5/6, por medio de una columna de afinidad a níquel, se estandarizó y se obtuvo una enzima con un alto grado de pureza, con esto se permitió que la enzima pudiera ser utilizada para experimentos de cinética enzimática, así como para montar pruebas de cristalización de proteínas. Este protocolo de purificación por medio de una columna de afinidad a níquel, además, demostró la importancia de utilizar detergentes como el Triton X-100 ® durante el proceso de lisis celular en este tipo de enzimas, ya que es fundamental para poder separar a la enzima de la fracción insoluble de la soluble. Por otro lado, gracias a este protocolo se encontraron las condiciones a través las cuales la PBP 5/6 es estable para su uso posterior como el de montar pruebas de cristalización, así como el de realizar cinéticas enzimáticas.

Los ensayos cinéticos de la PBP 5/6 que hasta la realización de este trabajo no se habían reportado en la literatura, demostraron que esta enzima tiene capacidad hidrolítica frente a nitrocefina, esto deja de manifiesto que la PBP 5/6 tiene la capacidad de hidrolizar y romper el anillo betalactámico de la nitrocefina, pero permite sugerir que también puede romper el anillo betalactámico de más antibióticos de este tipo que están diseñados para inhibir la síntesis de la pared

celular. Además, los valores en los parámetros cinéticos de la PBP 5/6 son similares a los de otras PBP's que previamente se saben que les confieren resistencia a otras bacterias, lo cual era de esperarse pues el modelo por homóloga y las estructuras cristalográficas sugieren que el sitio activo de la PBP 5/6 es similar frente al de sus homólogas. Con todo lo anterior, se puede demostrar que la hipótesis de este trabajo fue positiva.

Las pruebas de cristalización hasta el momento de la realización del presente escrito, no tuvieron éxito en encontrar una condición fisicoquímica idónea para la obtención de un cristal de proteína que sirva para poder ser enviado a difractar a una fuente de rayos x y así determinar la estructura cristalográfica de la PBP 5/6. Sin embargo, el modelo realizado por I-TASSER gracias a su calidad nos permite sugerir que los residuos que componen al sitio activo de las PBP's como la PaPBP 5, la sPBP 5 y la betalactamasa BlaC parecen ser muy similares a los que se deben encontrar a la PBP 5/6 de *A. baumannii*, los cuales deben de estar asociados a la naturaleza hidrolítica de esta enzima.

## 9. Perspectivas:

Estudiar de manera más amplia el papel de la resistencia ante antibióticos betalactámicos diferentes a los que se realizaron en este trabajo, mediante la realización de cinéticas de crecimiento en microplacas de 96 pozos, así como analizar los parámetros cinéticos de la PBP 5/6 en presencia de otros antibióticos betalactámicos.

Estudiar el papel en la resistencia de diferentes antibióticos betalactámicos en la sobre expresión de la PBP 5/6 en el sistema nativo de *A. baumannii*, lo cual requeriría transformar a la bacteria *A. baumannii* con un vector de expresión que contenga un promotor constitutivo y al gen de *dacC*, o bien, realizar mutaciones en el promotor del gen *dacC* que se encuentra en el genoma de la bacteria y de ese modo promover la sobre expresión de la PBP 5/6.

Realizar mutantes deletéreas en diferentes regiones cercanas al sitio activo como el *loop 1*, para poder identificar cambios en los parámetros cinéticos de la PBP 5/6 al igual que en otras PBP's y reconocer su posible importancia en la hidrólisis de antibióticos betalactámicos.

Continuar con el proceso de montaje de pruebas de cristalización con la PBP 5/6, utilizando diferentes *kits* y matrices de optimización para llegar a conocer la condición óptima para obtener cristales de proteína que, al difractarlos en una fuente de luz, permitan conocer la estructura tridimensional de la PBP 5/6 en su forma apo, así como en complejo con diferentes antibióticos betalactámicos.

## 10. Referencias:

- Aguilera Rossi, C. G., Gómez-Puertas, P., & Ayala Serrano, J. A. (2016). In vivo functional and molecular characterization of the Penicillin-Binding Protein 4 (DacB) of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, *16*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12866-016-0853-X/FIGURES/5>
- Åkerfeldt, K. (2009). Protein crystallography: A concise guide by Eaton E. Lattman and Patrick J. Loll. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, *37*(3), 198–198. <https://doi.org/10.1002/BMB.20282>
- Alexander, J. A. N., Chatterjee, S. S., Hamilton, S. M., Eltis, L. D., Chambers, H. F., & Strynadka, N. C. J. (2018a). Structural and kinetic analyses of penicillin-binding protein 4 (PBP4)-mediated antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(51), 19854–19865. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004952>
- Alexander, J. A. N., Chatterjee, S. S., Hamilton, S. M., Eltis, L. D., Chambers, H. F., & Strynadka, N. C. J. (2018b). Structural and kinetic analyses of penicillin-binding protein 4 (PBP4)-mediated antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(51), 19854–19865. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004952>
- Asif, M., Alvi, I. A., & Ur Rehman, S. (2018). Insight into acinetobacter baumannii: Pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 11, pp. 1249–1260). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S166750>
- Baquero, F., & Cantón, R. (2017). Evolutionary Biology of Drug Resistance. *Antimicrobial Drug Resistance*, 9–36. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4_2)
- Baumann, P., Doudoroff, M., & Stanier, R. Y. (1968). A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology*, *95*(5), 1520–1541. <https://doi.org/10.1128/JB.95.5.1520->

1541.1968

- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: No ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, *48*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
- Bush, K. (2010).  $\beta$ -Lactam antibiotics: penicillins. *Antibiotic and Chemotherapy: Expert Consult*, 200–225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4064-1.00014-2>
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
- Chow, C., Xu, H., & Blanchard, J. S. (2013). Kinetic Characterizations of Nitrocefin, Cefoxitin, and Meropenem Hydrolysis by  $\beta$ -lactamase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, *52*(23), 4097. <https://doi.org/10.1021/BI400177Y>
- Cornejo-Juárez, P., Cevallos, M. A., Castro-Jaimes, S., Castillo-Ramírez, S., Velázquez-Acosta, C., Martínez-Oliva, D., Pérez-Oseguera, A., Rivera-Buendía, F., & Volkow-Fernández, P. (2020). High mortality in an outbreak of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infection introduced to an oncological hospital by a patient transferred from a general hospital. *PLOS ONE*, *15*(7), e0234684. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0234684>
- da Costa, T., de Oliveira, C., Chambers, H., & Chatterjee, S. (2018). PBP4: A New Perspective on *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -Lactam Resistance. *Microorganisms*, *6*(3), 57. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030057>
- Drenth, J., & Mesters, J. (2007). *Principles of protein x-ray crystallography*. Springer.
- Green 1954-, M. R. (Michael R. (2012). *Molecular cloning : a laboratory manual / Michael R. Green, Joseph Sambrook* (J. Sambrook & C. S. H. Laboratory (Eds.)). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gu, J., & Bourne, P. E. (2009). *Structural bioinformatics*. Wiley-Blackwell.



<https://www.wiley.com/en-at/Structural+Bioinformatics%2C+2nd+Edition-p-9780470181058>

- Harding, C. M., Hennon, S. W., & Feldman, M. F. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 91–102). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
- Iyer, R. N. (2022). Beta lactam. *Comprehensive Pharmacology*, 3–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00212-7>
- Jacoby, G. A., & Jacoby, G. A. (2017). History of Drug-Resistant Microbes. *Antimicrobial Drug Resistance*, 3–8. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4_1)
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952/2/49-11-1749-FIG003.GIF>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. [https://doi.org/10.4103/JOACP.JOACP\\_349\\_15](https://doi.org/10.4103/JOACP.JOACP_349_15)
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2011.03570.X>
- Mayers, D. L., Sobel, J. D., Ouellette, M., Kaye, K. S., & Marchaim, D. (Eds.). (2017). *Antimicrobial Drug Resistance*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4>

- Moon, T. M., D'Andréa, É. D., Lee, C. W., Soares, A., Jakoncic, J., Desbonnet, C., Garcia-Solache, M., Rice, L. B., Page, R., & Peti, W. (2018). The structures of penicillin-binding protein 4 (PBP4) and PBP5 from Enterococci provide structural insights into  $\beta$ -lactam resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 293(48), 18574–18585. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006052>
- Morris, F. C., Dexter, C., Kostoulas, X., Uddin, M. I., & Peleg, A. Y. (2019). The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 10(JULY), 1601. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01601>
- O'Callaghan, C. H., Morris, A., Kirby, S. M., & Shingler, A. H. (1972). Novel Method for Detection of  $\beta$ -Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1(4), 283–288. <https://doi.org/10.1128/AAC.1.4.283>
- Papanicolaou, G. A., & Medeiros, A. A. (1990). Discrimination of extended-spectrum beta-lactamases by a novel nitrocefin competition assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(11), 2184–2192. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.11.2184>
- Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA). (2019). Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana México 2018. In *Segundo Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antimicrobianos*. [www.puis.unam.mx](http://www.puis.unam.mx)
- Ropy, A., Cabot, G., Sánchez-Diener, I., Aguilera, C., Moya, B., Ayala, J. A., & Oliver, A. (2015). Role of *Pseudomonas aeruginosa* low-molecular-mass penicillin-binding proteins in AmpC expression,  $\beta$ -lactam resistance, and peptidoglycan structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(7), 3925–3934. <https://doi.org/10.1128/AAC.05150-14>
- Rupp, B. (2010). *Biomolecular crystallography : principles, practice, and application to structural biology*. Garland Science. <https://www.crcpress.com/Biomolecular-Crystallography-Principles-Practice-and-Application-to/Rupp/p/book/9780815340812>

- Sarkar, S. K., Dutta, M., Chowdhury, C., Kumar, A., & Ghosh, A. S. (2011). PBP5, PBP6 and DacD play different roles in intrinsic  $\beta$ -lactam resistance of *Escherichia coli*. *Microbiology*, *157*(9), 2702–2707.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.046227-0>
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(2), 234–258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Smith, J. D., Kumarasiri, M., Zhang, W., Heseck, D., Lee, M., Toth, M., Vakulenko, S., Fisher, J. F., Mobashery, S., & Chen, Y. (2013). Structural analysis of the role of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 5 in  $\beta$ -lactam resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(7), 3137–3146.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00505-13>
- Strandberg, B., Dickerson, R. E., & Rossmann, M. G. (2009). 50 Years of Protein Structure Analysis. *Journal of Molecular Biology*, *392*(1), 2–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.087>
- Sun, S., Selmer, M., & Andersson, D. I. (2014). Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics conferred by point mutations in penicillin-binding proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in *Salmonella enterica*. *PLoS ONE*, *9*(5).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097202>
- Theophel, K., Schacht, V. J., Schlüter, M., Schnell, S., Stingu, C. S., Schaumann, R., & Bunge, M. (2014). The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, *5*(NOV), 544.  
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00544/BIBTEX>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: causes and threats. *P & T Journal*, *40*(4), 277–283. <https://doi.org/Article>
- WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. (2017). *WHO*.

<http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>

- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance - global report on surveillance. In *World Health Organization* (Vol. 61, Issue 3). World Health Organization.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247201><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2536104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, *12*(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3213>
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W174–W181. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV342>
- Zapun, A., Macheboeuf, P., & Vernet, T. (2009). Penicillin-Binding Proteins and  $\beta$ -Lactam Resistance. In *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 145–170). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-180-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-180-2_13)
- Zapun, A., Macheboeuf, P., & Vernet, T. (2017). Penicillin-Binding Proteins and  $\beta$ -Lactam Resistance. In *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 177–211). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4_13)
- Zhang, W., Shi, Q., Meroueh, S. O., Vakulenko, S. B., & Mobashery, S. (2007). Catalytic Mechanism of Penicillin-Binding Protein 5 of *Escherichia coli*†. *Biochemistry*, *46*(35), 10113–10121. <https://doi.org/10.1021/BI700777X>

## 11. Anexos

### Secuencia de nucleótidos del gen *dacC*.

>NZ\_CP009257.1:1669829-1670977 Acinetobacter baumannii strain 17978,  
complete genome\_dacC=PBP5/6 -----> Mw (teorico): 768,240 - 719,132.42  
Da

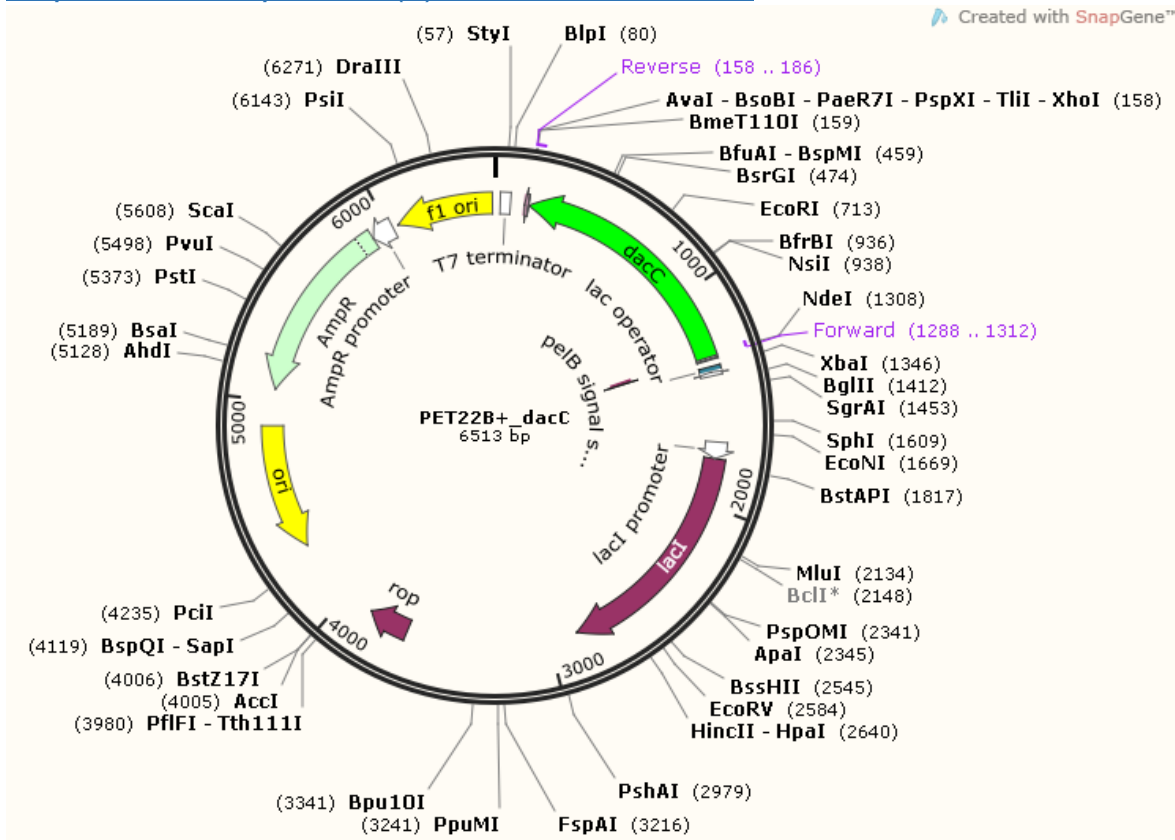
```
ATGACTCGAAAAAGCGCTATTGCTGCACTCCTCCTCTTACCAAGTTTTTCTTAT
GCAGCAACTGTCTTATCAGCTCCGCCAGAATTAATAATAAGTCTTATGTATTA
ATGGATTACGAGACAGGACAAATTCTCGCTTCTAAAAATGAAAATGAAAAGCT
TGCTCCTGCTTCTATGACTAAAATGATGACAAGCTACATCATTGAACAAAAATT
ATTAAGGTTGAACCTTACCGAAAATGAACAGGTTTCGTATGAACGAATCTGCTT
GGTGTAAGGCAGTAGTTCTGAATCATGTATGTATGTTCCATTAATGGTACA
GCAACTGTTTTAGAAATGCTTCGCGGTATTATTATTCAGTCAGGTAATGATGCA
TCAAAGCAATGGCTGAACATATTGCTGGGAATGAAGGTACTTTTGCTCACAT
GATGAACCAAGAAGCAAAACGTATCGGAATGACCAATACCCAATTTATTAAC
CAACAGGTATGCCAGCTGAAGGTCATTAACAAGGATATGGCTGTT
TTAGCACAACATATTATTAAGACAGCTCAAATACTACCCGATTTATTCTGAA
AAAGAATTCACATTTAACGGTATCAAACAAGGTAACCGTAATGCTTTACTTTAC
ACTGACCCAAGTGTTGATGGCTTAAAAACAGGCCATACTGATGAAGCTGGTTA
CTGCTTAACGACTTCAAGTAAACGCGGTCCAATGCGTTTAATCTCAGTTATTTT
TGGTACACCAAGCATGTCTGAACGTGCTGACCAAACCTCGTGCATTATTGGCAT
GGGGTTTTGCAAACCTTTGAAACTGCAAATGTACAACCTGCAAACCAAGTTCTT
GCAAAGCTAAAGTTTGGTTTGGTAAAGAAAATGAAGTTCAGGTTGGTTTAGC
TGAAAACCTTCAATGTAACCTATGCCTAAAGGCAAAGCGGACGGCATTAAACTC
AGTTGGTTGTTCAACCGAACCTAAATGCACCACTTCAAAGGTTCAAGTCGTT
GGTAAGCTTGTGCAAGTTTAGATGGTAAAGTTATTGCTGAAAACCATTTGGTT
GCTTTAAACCTGTTGAAGAAGCTGGTTTCTTCGCACGTTTAATTGACCATATC
AAACAATTCTTCAGCAACTTATTCTaaCACCACCACCACCACCAC
```

Secuencia de la estructura primaria de la PBP 5/6 sin la etiqueta de 6 histidinas.

>tr|G1C735|G1C735\_ACIBA D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase  
 OS=Acinetobacter baumannii OX=470 GN=dacC PE=3 SV=1 Mw: 41.7 kDa, pI (teorico) = 8.23

MTRKSAIAALLLLPSFSYAATVLSAPPELNNKSYVLMDYETGQILASKNENEKLP  
 ASMTKMMTSYIIEQKLLKGELTENEQVRMNESAWCKGSSSESCMYVPLNGTATV  
 LEMLRGIIIQSGNDASKAMAHEIAGNEGTFAHMMNQEAKRIGMTNTQFINSTGMP  
 AEGHYSTAKDMAVLAQHIIKDSSKYYPIYSEKEFTFNGIKQGNRNALLYTDPSVDG  
 LKTGHTDEAGYCLTTSSKRGPMRLISVIFGTPSMERADQTRALLAWGFANFETA  
 NVQPANQVLAKAKVWFGKENEVQVGLAENFNVTMPKGKADGIKTQLVVQPNLN  
 APLQKGQVVGKLVASLDGK VIAEKPLVALKPVEEAGFFARLIDHIKQFFSNLF

Mapa del vector pET22b (+) con el inserto dacC.



## Alineamiento entre las secuencias de la PBP 5/6 y la betalactamasa BlaC.

