



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

TRABAJO DE FIN DE GRADO
KLEBSAZOLICIN: NUEVA DIANA
FRENTE A SUPERBACTERIA
RESISTENTE

Autor: Néstor Martínez Martínez

Tutor: Andrés Rafael Alcántara León

Convocatoria: Febrero 2019

RESUMEN

En estos últimos años, el uso de las enzimas en la industria farmacéutica se ha incrementado por la excelente selectividad que presentan los biocatalizadores y la buena sostenibilidad que nos proporciona su empleo, permitiéndonos obtener productos semisintéticos difícilmente alcanzables por los métodos químicos clásicos.

En primer lugar, se describe la naturaleza de *Klebsiella pneumoniae*. En segundo lugar, se explica toda la información relevante a Klebsazolicin (KLB). Por último, se detalla el mecanismo de acción de la enzima YcaO para la inhibición del ribosoma 70S.

Klebsazolicin (KLB) es un antibiótico peptídico para *Klebsiella pneumoniae* que se dirige al túnel de salida del ribosoma bacteriano. In vitro, mostramos que la enzima de maduración KlpD del dominio YcaO es una ciclodeshidratasa bifuncional necesaria para la formación de los heterociclos centrales y el anillo de amidina N-terminal. La versatilidad de KlpD abre posibilidades para la introducción de modificaciones en varios esqueletos peptídicos.

Palabras clave

Klebsazolicin (KLB); *Klebsiella pneumoniae*; YcaO; RiPP; carbapenemasas; Gram negativo;

ABSTRACT

In the last years, the use of enzymes in the pharmaceutical industry has increased because of the excellent selectivity of biocatalyst, and the good sustainability that provide us its employment, allowing us to get semisynthetic products hardly achievable by classics chemical methods.

Firstly, it is described the importance of the study of *Klebsiella pneumoniae*. Secondly, it is explained all the relevant information about Klebsazolicin (KLB). Finally, it is detailed the mechanism of action of the enzyme YcaO for the inhibition of 70S ribosome.

Klebsazolicin (KLB) is a recently discovered *Klebsiella pneumoniae* peptide antibiotic targeting the exit tunnel of bacterial ribosome. In vitro, we show that the YcaO-domain KlpD maturation enzyme is a bifunctional cyclodehydratase required for the formation of both the core heterocycles and the N-terminal amidine ring. The versatility of KlpD opens up possibilities for introduction of modifications into various peptide backbones.

Keywords

Klebsazolicin (KLB); *Klebsiella pneumoniae*; YcaO; RiPP; carbapenemasas; Gram negative;

ÍNDICE

1. Introducción y antecedentes	4
2. Objetivos.....	13
3. Materiales y métodos	13
4. Resultados y discusión.....	16
5. Conclusión.....	17
6. Bibliografía.....	18

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* son con frecuencia patógenos oportunistas implicados en infecciones del tracto urinario asociadas a pacientes hospitalizados e individuos comprometidos. Las infecciones son particularmente difíciles de tratar ya que la mayoría de los aislamientos clínicos muestran resistencia a varios antibióticos, lo que lleva al fracaso del tratamiento y la posibilidad de diseminación sistémica. Se ha demostrado que varios factores de virulencia median en la infectividad de *K. pneumoniae* e incluyen, factores de adherencia, producción de cápsulas, presencia de lipopolisacáridos y actividad de sideróforo.

En cuanto a la mayoría de las infecciones oportunistas, el papel de los factores del huésped y los rasgos bacterianos son cruciales para determinar el resultado de las infecciones. Además, estas cepas multirresistentes se han convertido en un grave problema y es necesario desarrollar nuevas estrategias para prevenir e inhibir el crecimiento bacteriano.

Klebsiella pneumoniae

Desde el descubrimiento de la penicilina, se han venido produciendo numerosos antibióticos para el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas, y gracias a ello se ha modificado favorablemente el panorama de la morbimortalidad ya que estas afecciones ocupan un lugar importante entre las causas de muerte.

A principios de los años 80 empezaron a reportarse los primeros aislamientos de *Klebsiella spp.* resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, mediante la producción de β lactamasas de espectro extendido (BLEE), situación que constituyó el primer paso para el ingreso de esta bacteria al grupo de las multirresistentes, y en 1996 el hallazgo de cepas resistentes a los carbapenemos confirmó su entrada al grupo de las 'superbacterias'.

• **Características**

K. pneumoniae es un bacilo gram- negativo, inmóvil, fermentador de lactosa, productor de gas y de la familia *Enterobacteriaceae*. Es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*. Usualmente desarrolla una cápsula que actúa como factor determinante en la virulencia de la bacteria. La cápsula protege al microorganismo de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares y de los factores bactericidas séricos, inhibiendo la activación del complemento, especialmente del C3b.

La primera etapa en el proceso infeccioso es la adherencia del agente a las células del hospedador, función que en el caso de las enterobacterias es desempeñada por unas proyecciones filamentosas de la superficie bacteriana llamadas *pilis*, de las cuales existen dos tipos predominantes: el tipo 1 y el tipo 3. El tipo 1 está asociado en la patogénesis de las

infecciones del tracto urinario, adhiriéndose a las células del túbulo proximal. Su adherencia a las células del tracto respiratorio afecta a la resistencia a la colonización, lo cual conlleva a la proliferación de patógenos potenciales y puede conducir a neumonía, principalmente en pacientes con ventilación mecánica; el *pili* tipo 3 interviene en la adherencia a las células endoteliales y los epitelios del tracto respiratorio y urinario. Una posible explicación del mecanismo es el enmascaramiento del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria por parte de la cápsula, de tal forma que presenta una estructura que no activa el complemento.

El hierro es un elemento vital para el desarrollo bacteriano, y su disponibilidad en el ambiente del hospedador es muy limitado, pero muchas bacterias lo obtienen produciendo agentes quelantes llamados sideróforos, que son capaces de tomarlo de las proteínas del hospedador. Existen varios tipos de sideróforos que se han reunido en dos grupos químicos diferentes, según produzcan enterobactinas y aerobactinas, las cuales, son producidas por las especies del género *Klebsiella spp*; también se ha descrito la producción de citotoxinas, enterotoxinas y hemolisinas, factores que en el caso de *Klebsiella spp* parecen jugar un papel menor en su patogenicidad.¹

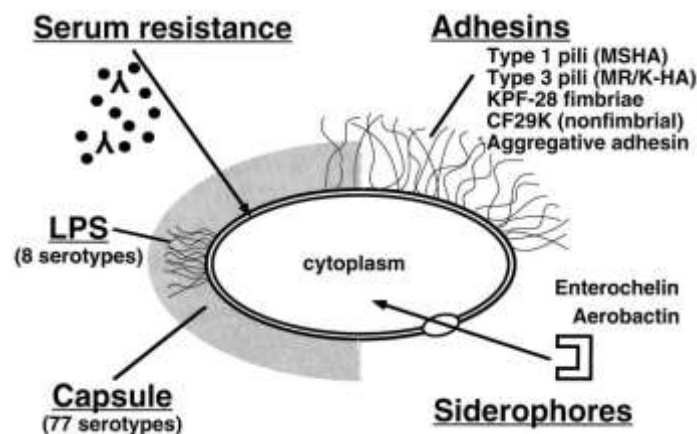


Figura 1. Representación esquemática de factores patogénicos de *Klebsiella spp*. Fuente: CMR²

- **Infecciones asociadas**

K. pneumoniae es un patógeno oportunista que puede causar enfermedades tales como sepsis, neumonía e infecciones del tracto urinario y de los tejidos blandos. La mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria se presentan en personas que han estado en contacto con entidades asociadas al cuidado de pacientes, entre las cuales, los hospitalizados, inmunosuprimidos o con enfermedades de base. Es causa además de bacteriemia, infecciones del sitio quirúrgico, infecciones del tracto biliar, peritonitis y meningitis.

- **Epidemiología**

Klebsiella spp. es ubicua en la naturaleza, de tal forma que se encuentra en las superficies de las aguas, tierra y plantas, así como en algunas de las mucosas de mamíferos como los humanos, los caballos y los cerdos; en el humano se encuentra específicamente en la mucosa

de nasofaringe y del intestino. Los principales reservorios son el tracto gastrointestinal de los pacientes y las manos del personal al cuidado de ellos.

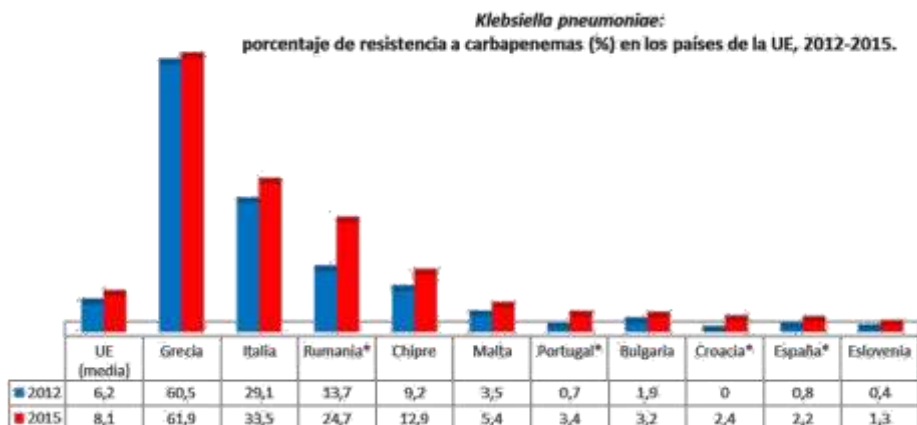


Figura 2. Representación gráfica de los 10 países de la Unión Europea con mayores valores de proporción de cepas resistentes de *K. pneumoniae* en 2012 y 2015. Fuente: ECDC.³

- **Resistencia antimicrobiana**

En la gran mayoría de los casos *K. pneumoniae* es resistente a la ampicilina por medio de la presencia de la β lactamasa SHV– 1, codificada en el cromosoma de la bacteria. A principios de la década de los años 80 el uso de nuevos antibióticos capaces de evadir la resistencia por este tipo de enzima promovió la aparición de cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Las modificaciones de la enzimas SHV– 1 y TEM– 1 (responsable de la resistencia a la ampicilina en *E. coli* y otras bacterias), y posteriormente el surgimiento de una nueva familia llamada CTX-M, por su predilección de hidrolizar la cefotaxima, ocasionaron la aparición de numerosos tipos de BLEE. Muchas de las cepas productoras de BLEE son además resistentes a otros antibióticos, y la mayoría de las infecciones severas, responden solamente a los antimicrobianos del grupo de las carbapenemas, apareciendo nuevas resistencias a los mismos, con las consecuencias que esto trae en cuanto a costos y presión selectiva de la flora microbiana.

En el caso de *K. pneumoniae* se describieron los primeros casos de resistencia mediante la producción de metalobetalactamasas (MLBs) en países del lejano oriente como Japón, Taiwan y Singapur. Estas enzimas (tipo IMP, VIM, SMP y GIM), dependientes del zinc para su actividad y clasificadas en el grupo B de Ambler (clasificación de β -lactamasas), no son inhibidas por el ácido clavulánico, tazobactam o sulbactam, son susceptibles al quelante EDTA y capaces de degradar virtualmente a todos los β lactámicos, con excepción del aztreonam, y se encuentran más frecuentemente en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Un segundo grupo de β lactamasas inhibidoras de carbapenemas del grupo A de Ambler se describe en el este de los Estados Unidos en el año 2001, pero esta vez le confería

resistencia a las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemas, la cual se denominó como KPC. En las enterobacterias la resistencia a las carbapenemas puede presentarse por tres mecanismos. En primer término, la hiperproducción de AmpC en asociación con la pérdida de porinas de la membrana externa. El segundo mecanismo corresponde a cambios en la afinidad de las 'enzimas blanco' (proteínas a las cuales se unen las penicilinas). El tercer mecanismo coincide con la producción de una β lactamasa que sea capaz de hidrolizar las carbapenemas.^{4 5 6}

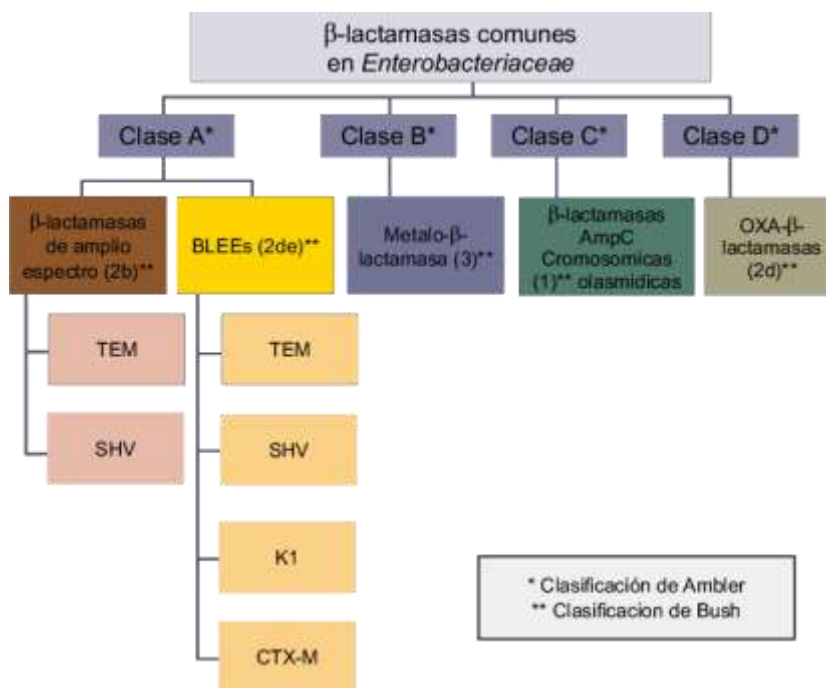


Figura 3. Esquema de clasificación de B-Lactamasas. Fuente: ResearchGate⁷

- **Pruebas para la detección de la resistencia e interpretación**

La prueba estándar para el estudio de la resistencia microbiana es la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por la técnica de dilución en caldo o en agar, pero debido a que su realización es poco práctica en la rutina diaria se ha recurrido a otras técnicas, como la prueba de difusión con disco y los métodos de microdilución en caldo, empleados en los sistemas de identificación y estudio de sensibilidad microbiana. También se puede estudiar la CIM por la técnica denominada Epsilon test, pero es poco utilizada por sus altos costos.

K. pneumoniae es resistente en la gran mayoría de los casos a ampicilina, por lo tanto, cuando el método utilizado reporte como sensible a la cepa identificada como tal, este resultado se debe confirmar por otro método, corroborando a la vez la identificación de la bacteria cultivada.

El Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda estudiar la sensibilidad en *K. pneumoniae* a por lo menos dos cefalosporinas de amplio espectro (ceftriaxona o

cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima) o al aztreonam, como prueba de tamización para detectar la presencia de BLEE. En caso de confirmarse la presencia de BLEE la cepa debe reportarse como resistente a todas las penicilinas y cefalosporinas y al aztreonam. En el año 2009 el CLSI aprobó los procedimientos de tamización y confirmación para determinar la presencia de una carbapenemasa en enterobacterias. Se debe tener presente que el ertapenem y el meropenem son los más sensibles y menos específicos, pero están apareciendo resistencias a estos. Esto implica que si una bacteria se muestra resistente a ertapenem se deberá suponer una resistencia cruzada con el resto de antibióticos carbapenémicos.^{8 9}

Specimen: Blood		Final Report with Optional Comment
Diagnosis: Pneumonia		
Klebsiella pneumoniae		
MIC (µg/ml)		
amikacin	>32 R	"This <i>Klebsiella pneumoniae</i> has unusual carbapenem results and is considered carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE); Infectious Diseases Consult suggested"
cefepime	>32 R	
ceftriaxone	>32 R	
ciprofloxacín	>2 R	
ertapenem	>4 R	
gentamicin	>10 R	
meropenem	4 R	
piperacillin-tazo	>128/4 R	
tobramycin	>10 R	
trimeth-sulfa	>4/76 R	

Figura 4. Resistencia a ertapenem y meropenem en *Klebsiella pneumoniae*
Fuente: CLSI¹⁰

Klebsazolicin

Antibiótico de *Klebsiella pneumoniae* que inhibe el crecimiento de células sensibles al actuar sobre los ribosomas. El análisis estructural del complejo ribosoma-KLB mostró que el compuesto adopta una conformación compacta y obstruye en gran medida el túnel de salida del péptido superponiéndose con los sitios de unión de macrólidos o estreptogramina-B.

Se observó que los fragmentos diseñados de KLB poseen actividad in vitro y, por lo tanto, pueden servir como punto de partida para el desarrollo de nuevos compuestos bioactivos.

El desarrollo de las técnicas de secuenciación del ADN ha llevado al descubrimiento de que múltiples productos se originan, de manera natural, dando lugar a los péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados post-traduccionamente (RiPP). Estos RiPP tienen una amplia gama de funciones biológicas como su actuación como agentes antimicrobianos.¹¹

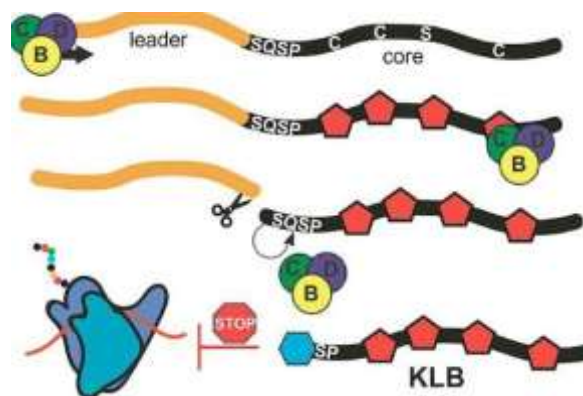


Figura 5. Biosíntesis de Klebsazolicin catalizada por la enzima YcaO. Fuente: JACS¹¹

Klebsazolicin (KLB) es un péptido descrito recientemente que contiene tres heterociclos de tiazol, un heterociclo de oxazol y un anillo de amidina N-terminal dispuestos de manera lineal e introducidos durante la modificación postraduccional de un péptido precursor de KlpA sintetizado ribosomalmente. KLB es un inhibidor de la traducción que obstruye el túnel de salida del ribosoma bacteriano, impidiendo el paso del nuevo péptido. Los tres azoles y el anillo de amidina N-terminal son esenciales para la actividad, ya que median el apilamiento y las interacciones de pares de bases con el ARNr 23S. En este caso, el péptido precursor de KLB contiene una secuencia central, sujeta a modificación postraduccional, y una secuencia líder N-terminal, reconocida por la maquinaria de modificación.

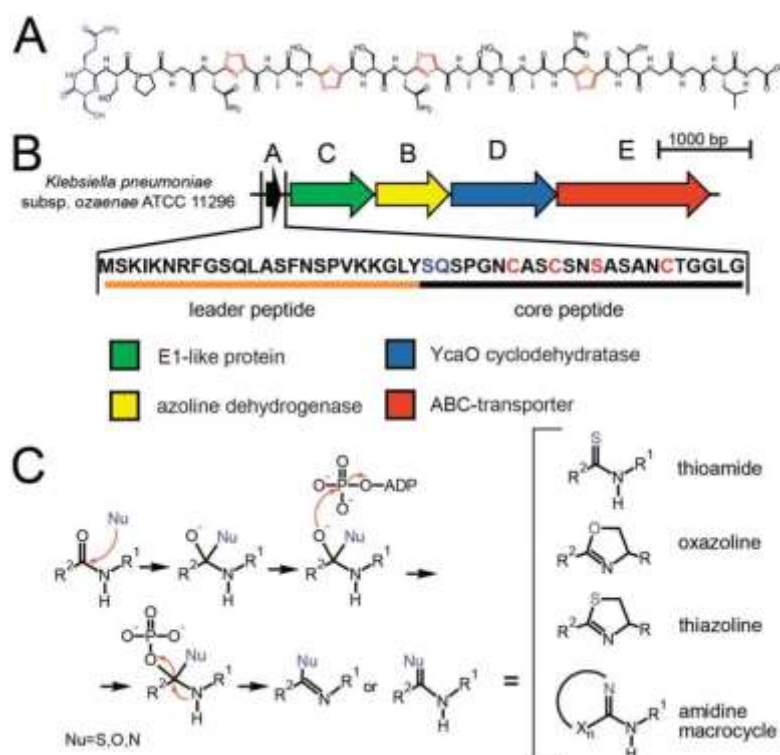
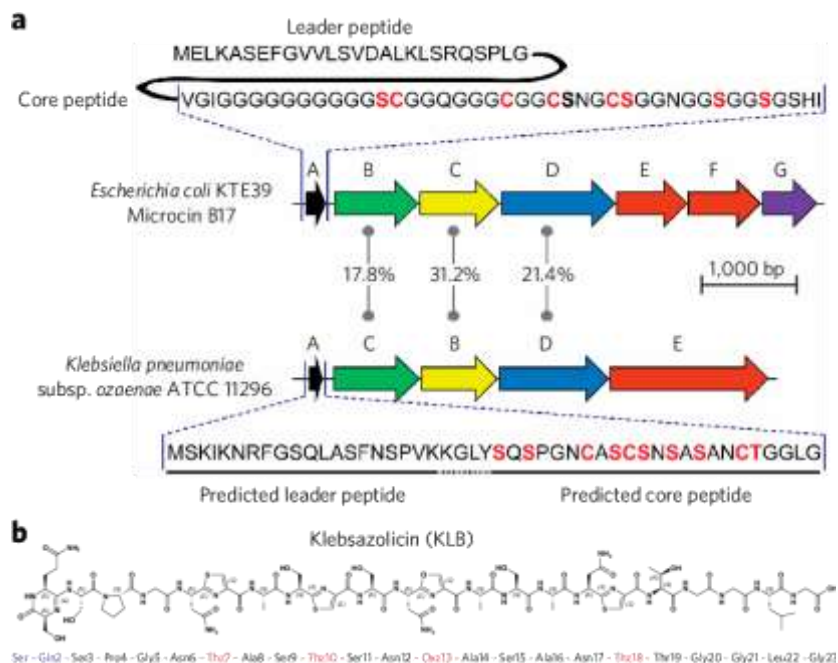


Figura 6. (A) Estructura química de Klebsazolicin. (B) Organización en la biosíntesis del grupo de genes *klpABCDE*. (C) Mecanismo propuesto catalizado por enzimas YcaO. Fuente: JACS¹¹

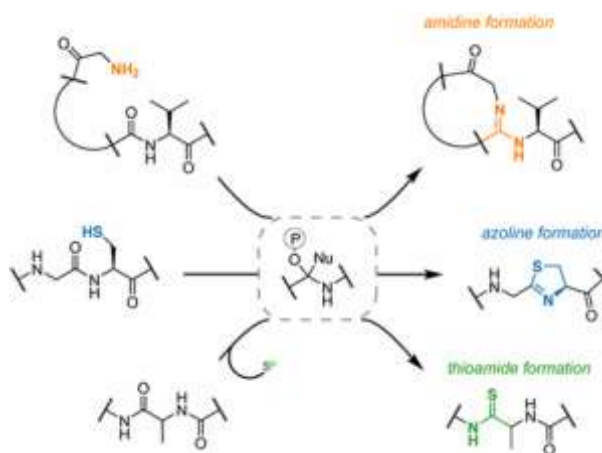
El grupo de genes biosintéticos KLB *klpABCDE* se encuentra en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 11296). El péptido precursor está codificado por el gen *KlpA* ya que no coincide con el de las TOMM (microcinas tiazol/oxazol modificadas) catalogadas, lo que indica que la *KlpA* podría tener propiedades estructurales y funcionales inusuales. Mientras que, en base a la similitud de las proteínas *McbB*, *McbC* y *McbD* codificadas por la microcina B17 (agrupación de genes que inhiben la girasa de ADN), se conoce que *KlpC*, *KlpB* y *KlpD* actúan como enzima ciclodeshidratasa dependiente de ATP en el dominio YcaO. Además, el producto del gen *KlpE* es un supuesto transportador ABC que exporta moléculas maduras de la célula bacteriana.

Figura 7. Organización del grupo de genes y producción de KLB a través de *E. coli*. Fuente: Nature¹²



Respecto a las enzimas con el dominio YcaO, la función mejor estudiada es la formación de tiazolina, oxazolina, y los ciclos de metiloxazolina, que son el resultado de la ciclodeshidratación dependiente de ATP de los residuos de Cys, Ser y Thr, respectivamente. El mecanismo propuesto de esta reacción incluye el ataque nucleofílico de la cadena lateral de Cys, Ser o Thr en la carbonil amida del residuo de aminoácido adyacente con la subsiguiente eliminación dependiente de ATP del oxígeno derivado de carbonilo.

Figura 8. Funciones de la familia de enzimas YcaO. Fuente: JACS¹²



Este estudio amplía la comprensión de la versatilidad catalítica de las proteínas de la superfamilia YcaO que puede contribuir a la síntesis in vitro de nuevos compuestos antibacterianos.

- **Expresión y caracterización estructural de un nuevo TOMM**

Para investigar si la expresión del grupo de genes klpABCDE conduce a la producción de un TOMM, se expresó el grupo completo en un huésped sustituto de *E. coli*, utilizando un sistema de dos plásmidos que permitía una expresión separada inducible de klpA y los genes klpBCDE. Seguidamente se analizaron los sobrenadantes de cultivos de células bacterianas de

células inducidas y no inducidas por HPLC de fase inversa y espectrometría de masas.

El espectro de absorbancia UV fue característico de péptidos que contienen azol. El análisis espectrométrico y de secuencia del péptido precursor KlpA identificó un péptido central que quedaba después de que el péptido líder se escindiera y proporcionó información inicial sobre los residuos involucrados en la formación de azoles: Cys7, Cys10, Ser13 y Cys18. Sorprendentemente, los dos primeros aminoácidos N-terminales (Ser1 y Gln2) del KLB también estuvieron involucrados en una modificación que condujo a la pérdida de una molécula de agua (-18 Da). Se descubrió que los residuos de aminoácidos N-terminales Ser1 y Gln2 forman un heterociclo de seis miembros a través del enlace amidina similar al que se encuentra en la bottromicina, donde su formación parece ser catalizada por una proteína YcaO independiente. En el caso de KLB, el complejo de maduración de KlpBCD parece ser responsable de la activación del carbonilo de Gln2, que conduce al enlace entre el extremo N del péptido (formado después de la escisión del péptido líder) y el esqueleto del péptido para producir el heterociclo de amidina N-terminal.

Por lo tanto, se determinó la estructura química de KLB por RMN bidimensional

• Evaluación de la actividad antimicrobiana de KLB

En un ensayo de microdilución en caldo, KLB inhibió el crecimiento de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Yersinia pseudotuberculosis* en medio LB (caldo de Lisogenia) a 16–65 μM .

Los resultados sugieren que KLB se transporta dentro de células sensibles de *E. coli* a través de transportadores OmpF y SbmA, ya que la eliminación de los genes correspondientes condujo a una sensibilidad reducida (ΔompF) o incluso a una resistencia completa (ΔsbmA) a KLB, mientras que la sobreexpresión de estos genes causó una mayor sensibilidad.

Para determinar inequívocamente los modos de unión y

acción de KLB, se cristalizaron los ribosomas 70S *Thermus thermophilus* en presencia de KLB. Luego determinaron la estructura del complejo mediante cristalografía de rayos X resolviendo la estructura mediante reemplazo molecular, utilizando el ribosoma 70S de *T. thermophilus* como modelo.

La densidad electrónica confirmó la presencia del anillo de amidina y los azoles en la estructura del KLB-ribosoma. El ciclo de amidina N-terminal forma una serie de contactos

Table 1 | Klebsazolicin MICs for various bacterial strains in rich LB medium and minimal M9-glucose medium

Microorganism (strain)	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC (μM)
LB medium		
<i>Escherichia coli</i> B	32	16
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	128	65
<i>Escherichia coli</i> MG1655 (ΔompF)	256	130
<i>Escherichia coli</i> MG1655 (ΔsbmA)	>1,024	>519
<i>Escherichia coli</i> MG1655 (pBAD-sbmA-ompF)	64	32
<i>Escherichia coli</i> MG1655 (pBAD-klpE)	1,024	519
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	64	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	128	65
<i>Vibrio cholerae</i>	>1,024	>519
<i>Acinetobacter baumannii</i>	>1,024	>519
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1,024	>519
<i>Pseudomonas putida</i>	>1,024	>519
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1,024	>519
<i>Bacillus subtilis</i>	>1,024	>519
<i>Bacillus cereus</i>	>1,024	>519
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	>1,024	>519
<i>Listeria grayi</i>	>1,024	>519
<i>Streptomyces lividans</i>	>1,024	>519

Figura 9. CIM de Klebsazolicin para varias cepas bacterianas en un medio LB rico. Fuente: Nature ¹³

con los nucleótidos universalmente conservados en el PTC (Centro Peptidil Transferasa).

De acuerdo con la ubicación de las mutaciones que confieren resistencia, KLB forma contactos de Van der Waals con U2609 de rARN 23S. Además, el grupo hidroxilo de la cadena lateral del residuo Ser1 en KLB forma un enlace H con U2585, y Ser9 interactúa con U2506 de manera similar. El contacto entre Gln2 con U2585 y U2586 también pareció ser esencial, ya que su sustitución resultó en una pérdida completa de actividad tanto in vivo como in vitro.

Por lo tanto, el fragmento N-terminal de KLB que incluye tres de los cuatro ciclos de tiazol / oxazol parece ser el núcleo funcional mínimo capaz de inhibir el ribosoma.

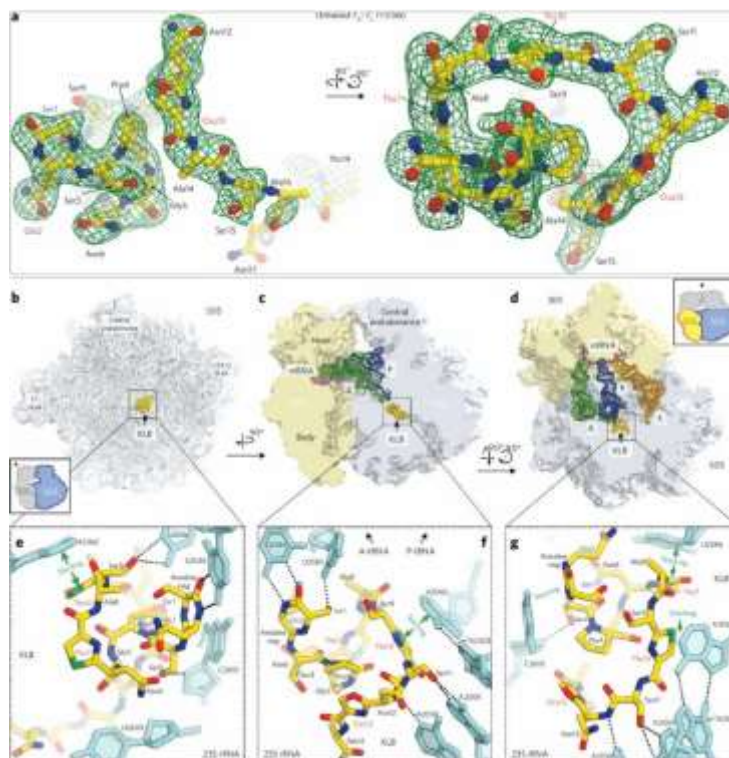


Figura 10. La estructura del complejo KLB con ribosoma 70S y P-ARNt y A-ARNt. Fuente: Nature ¹³

En comparación con otros antibióticos, los macrólidos no obstruyen completamente el túnel de salida; más bien, lo ocluyen parcialmente en un lado, lo que permite que muchos péptidos nacientes pasen a través de él. En contraste con la eritromicina pequeña y compacta, la molécula de KLB extendida adopta una conformación plegada en el túnel de salida del péptido y, por lo tanto, la ocluye significativamente.

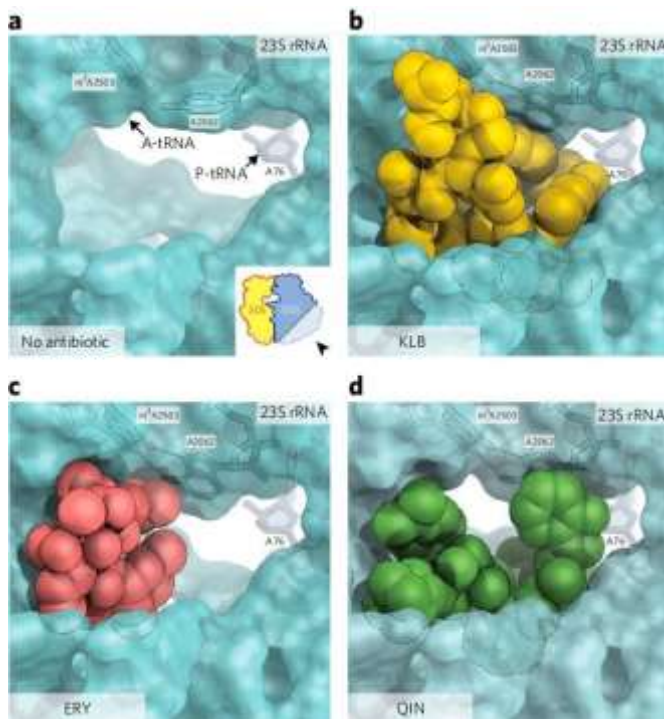


Figura 11. Oclusión por antibióticos del túnel de salida del péptido nascente. Fuente: Nature¹³

II. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es realizar una exhaustiva revisión bibliográfica para analizar el problema de la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos, actual tanto en la Unión Europea como en España, y poner en conocimiento las futuras soluciones desde un punto de vista preclínico. Se tendrán en cuenta sus principales características, epidemiología, alternativas terapéuticas y resultados de estudio.

Todo ello con el fin de plasmar el creciente e inmediato problema que supone la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos y aportar información innovadora que contribuya al desempeño científico.

1. Aportar toda información intrínseca a *Klebsiella pneumoniae* y conocer así su evolución.
2. Profundizar en la ruta de biosíntesis para la obtención del antibiótico Klebsazolicin.
3. Describir el comportamiento del antibiótico Klebsazolicin en los estudios realizados.
4. Informar sobre la innovación en el desarrollo de nuevos antibióticos que están siguiendo las líneas de investigación y concienciar del problema de las resistencias.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para asentar las bases de información sobre la materia se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica utilizando bases de datos como "Pubmed", "Scopus", "Web Of Science" así como el buscador "SciFinder" que combina varias bases de datos que tratan sobre la química sostenible y acotando la búsqueda a un rango de antigüedad de 3 años, seleccionando principalmente trabajos completos de acceso gratuito. Con el mismo criterio se ha utilizado Google Scholar para la búsqueda de estudios científicos publicados,

principalmente en revistas online.

Se ha utilizado la base de datos “ResearchGate” para el estudio de enzimas, así como diversos artículos científicos que tratan sobre su estructura y su actividad catalítica.

Las palabras claves utilizadas en la búsqueda fueron: resistencia a antibióticos, *Klebsiella pneumoniae*, resistencia a *Klebsiella pneumoniae*, Klebsazolicin, guía Mensa, enzima YcaO . Las fechas de búsqueda han sido durante el mes de octubre, noviembre y diciembre de 2018.

De igual forma se ha utilizado la página web de “European Centre for Disease Prevention and Control” (ECDC) para obtener datos referentes a la Unión Europea. Además reúne un gran número de publicaciones de elaboración propia con información actualizada sobre la resistencia bacteriana a antibióticos.

Se ha utilizado también el programa EndNote para la gestión de la bibliografía utilizada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

KLB es el primer péptido que contiene grupos azol de manera lineal para el cual se ha caracterizado estructuralmente el modo de unión. KLB es un péptido único que contiene tiazol / oxazol que inhibe la síntesis de proteínas al unirse al ribosoma bacteriano en el túnel de salida de péptidos. Se une en una conformación fuertemente plegada y bloquea el alargamiento después de que solo tres aminoácidos del péptido nuevo hayan sido polimerizados. Un anillo de amidina de KLB participa en múltiples interacciones con el núcleo conservado del rRNA 23S. La estructura de KLB parece ser modular: sus 14 residuos N-terminales son esenciales para la inhibición del ribosoma, mientras que sus 9 residuos C-terminales probablemente sean importantes para la captación de la molécula.

En este trabajo, reconstituimos toda la información relevante a Klebsazolicin. El sistema de síntesis de KLB consiste en el péptido precursor KlpA, el complejo KlpBCD y la proteasa TldD / E.

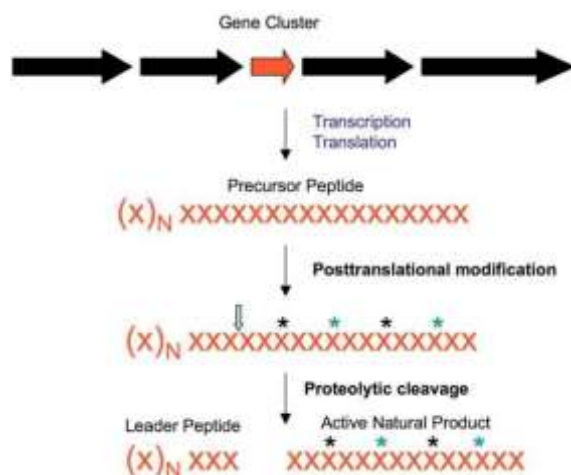


Figura 12. Ruta de biosíntesis de un RiPP. Fuente: PubMed

A continuación se proponen diferentes reacciones que ha seguido KLB para su síntesis a partir de estudios descritos en la literatura.

- **Deshidratación de Serina y Treonina**

Nuestro compuesto contiene aminoácidos de Ser y Thr cuyos grupos hidroxilo están deshidratados con pérdida de asimetría en el carbono α . La deshidratación de Ser y Thr proporciona a estos residuos reactividad con sulfhidrilo o amina, y con frecuencia reaccionan intramolecularmente para formar otros compuestos químicos como lantionina o lisinoalanina. Las enzimas de deshidratación que se conocen son LanB, LctM y NisB. En particular, LctM es una proteína única que utiliza diferentes dominios para catalizar la deshidratación y las reacciones de formación de enlaces de lantionina. Esta proteína requiere ATP y Mg^{2+} .

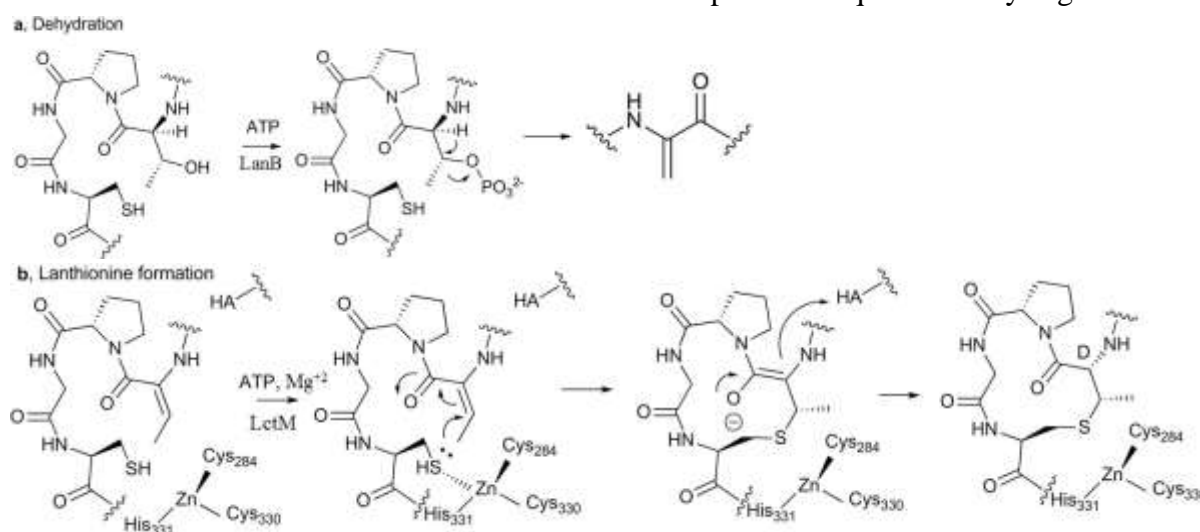


Figura 13. Deshidratación y formación de lantionina. Fuente: PubMed¹³

- **Heterociclación de Cisteína, Serina y Treonina**

La heterociclación involucra varias proteínas / dominios que incluyen (1) una proteína de unión a zinc. (2) una proteína de acoplamiento con actividad ATPasa / GTPasa, y (3) una oxidasa. En este caso, la proteína de unión a zinc se asemeja a la procedente de la microcina B17, McbB, responsable de la reacción de heterociclización debido a su similitud en el estudio comparativo. La actividad ATPasa / GTPasa de la proteína de acoplamiento es similar a McbD. McbD fosforila el oxígeno adyacente a Cys, Ser o Thr siguiendo con el ataque al grupo amino para inducir la deshidratación. Por último, McbC, microcina B17 oxidasa, es una flavoproteína, que oxida las tiazolinas y oxazolinas a los tiazoles y oxazoles.

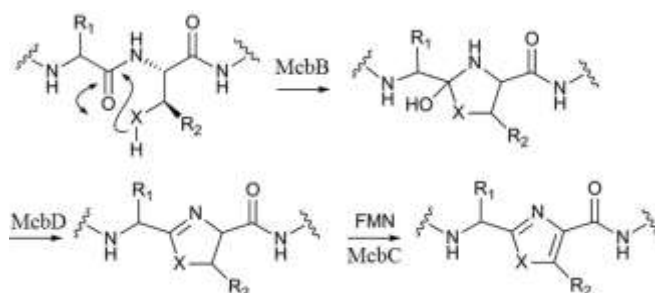


Figura 14. Heterociclación propuesta a partir de los estudios de la microcina B17. Fuente: PubMed

• **Epimerización**

La epimerización es una rara modificación que proporciona estabilidad frente a la proteólisis. Sólo se han caracterizado las enzimas que catalizan la epimerización en el sistema de lacticina 3147. Se ha propuesto que los residuos de L-Ser se convierten en D-Ala, convirtiéndose primero en un intermedio de dehidroalanina, que, es una modificación común entre los lantibióticos (péptidos antimicrobianos producidos por bacterias, codificados en el genoma bacteriano). De los varios genes contenidos en los dos operones de lacticina 3147, uno en particular, *ltnJ*, es el único candidato probable para catalizar la etapa de reducción estereoselectiva.

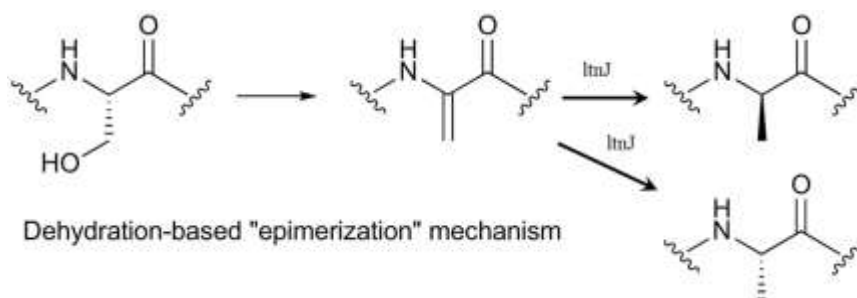


Figura 15. Mecanismo de epimerización tras una deshidratación. Fuente: PubMed¹³

• **Proteólisis**

Las secuencias de reconocimiento conservadas para las proteasas están presentes en los péptidos precursores, lo que permite la predicción de los sitios de escisión. Por ejemplo, en los lantibióticos, los residuos conservados pueden identificarse para permitir la predicción de los sitios de escisión de proteasas. Sin embargo, en otros casos, las proteasas relevantes se encuentran en otras partes del genoma, y algunas de estas proteasas "no agrupadas" como microcina B17, TldD y TldE, han sido descubiertas por estudios bioquímicos. Dentro del grupo lantibiótico, las proteínas LanT son transportadores ABC, que en algunas vías se fusionan con las proteasas de cisteína, lo que permite el acoplamiento de la proteólisis. Finalmente, las proteasas "no agrupadas" se consideran metaloproteasas dependientes de zinc, cuya función se conoce por estudios genéticos knock-out que muestran la acumulación de pro-MccB17.¹³

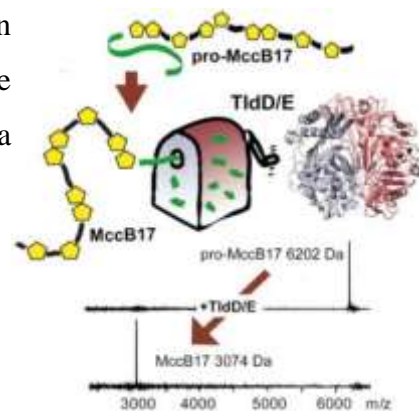


Figura 16. Gráfico del mecanismo de la proteólisis de TldD/E. Fuente: PubMed¹⁴

La primera etapa de la síntesis de KLB es la introducción de tres tiazoles y un ciclo de oxazol en la parte central del péptido por la acción combinada de la ciclodeshidratasa KlpD y la deshidrogenasa KlpB. Además, KlpD también es responsable de la biosíntesis de un ciclo de

amidina N-terminal requerido para su actividad biológica. La escisión proteolítica del péptido líder por la proteasa TldD / E es necesaria para la formación de KLB maduro. Se puede suponer que KlpD es una enzima YcaO bifuncional capaz de usar diferentes nucleófilos: grupos sulfhidrilo e hidroxilo de las cadenas laterales de Cys y Ser para la biosíntesis de los ciclos del núcleo azol, así como el grupo amino primario para la formación de la amidina N-terminal. Este escenario prevé un mecanismo directo de formación de amidina: un ataque nucleofílico del grupo amino primario en Ser1, generado después de la escisión del intermedio 3 por TldD / E, sobre la amida carbonilo de Gln2.

En un intento de profundizar en la biosíntesis de amidina se reveló la importancia del grupo hidroxilo en la cadena lateral de Ser3. A diferencia del mecanismo de "nucleófilo de amina" presentado en la Figura 17A, existe un mecanismo alternativo presentado en la Figura 17B en el que incluye un ataque de la cadena lateral de Ser3 en el carbonilo de Gln2 como el mecanismo generalmente aceptado para la formación de oxazolina seguido por un ataque del grupo amino N-terminal. Esto causa un reordenamiento que conduce al ciclo de la amidina.¹¹

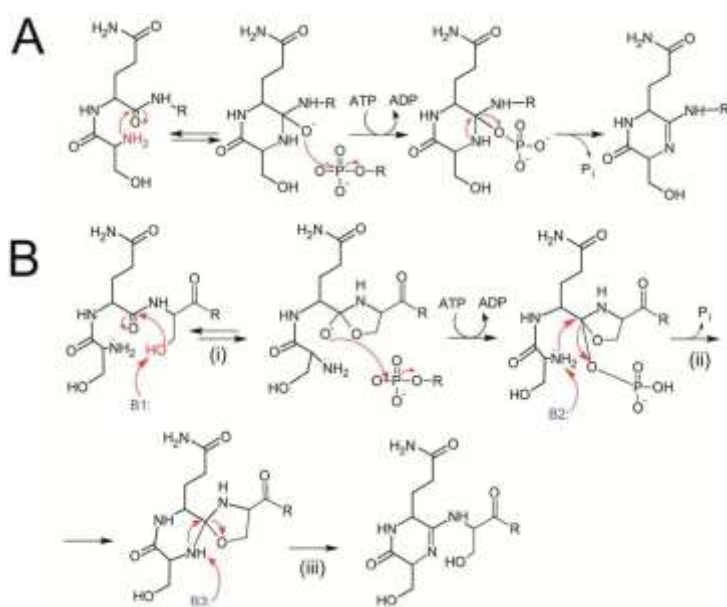


Figura 17. (A) Mecanismo similar a la bottromicina en un solo paso con ataque nucleofílico del grupo amino N-terminal. (B) Mecanismo de dos pasos que incluye un ataque dependiente de YcaO de la cadena lateral de Ser3 (i) antes del ataque del grupo amino N-terminal (ii) y la posterior reorganización (iii) que resulta en el ciclo de amidina.

Fuente: JACS¹¹

En este escenario, el grupo amina N-terminal está en una buena posición de ataque con respecto a una hemioctoamida (estado de transición) activada y no requiere un reconocimiento y activación específicos por parte de KlpD. La sustitución de Ser3 con cisteína, con un nucleófilo más fuerte, da como resultado la formación predominante de un ciclo de tiazol antes del péptido líder.

El tratamiento posterior de un precursor de KLB que contiene cinco azoles con TldD / E conduce a la escisión en el lugar esperado y la liberación de un compuesto con un extremo N intacto. Tras el procesamiento endoproteolítico en el sitio de unión y el cambio resultante en la conformación de la cadena peptídica, se produce la inhibición.¹¹

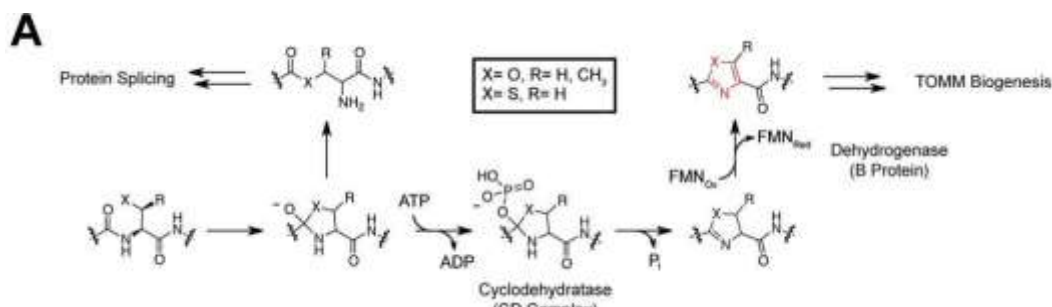


Figura 18. Mecanismo para la biosíntesis de heterociclos de azolina. Fuente: PubMed ¹⁶

- **Perspectiva futura para la Biocatálisis**

En el caso de poder aislar las enzimas YcaO, éstas se podrían utilizar en biocatálisis para la síntesis de azoles perdiendo sus estereocentros en el proceso de heterociclación. Esta pérdida de quiralidad permite obtener moléculas en un mismo plano, menos complejas.

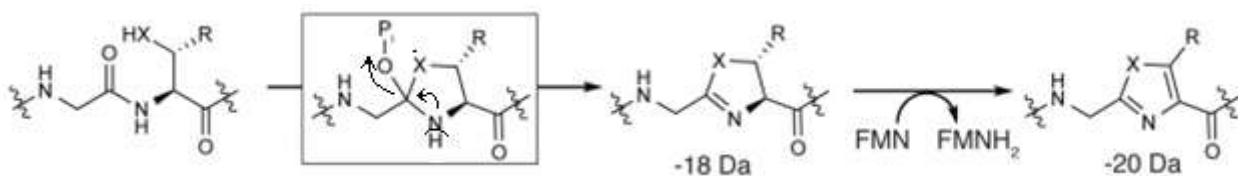


Figura 19. Pérdida de quiralidad por enzima YcaO. Fuente: Nature ¹⁷

V. CONCLUSIONES

Los crecientes casos de resistencia a múltiples fármacos y su diseminación mediada por plásmidos han estimulado a los científicos para enriquecer el arsenal terapéutico.

- El microbioma humano contiene una gran cantidad de genes de biosíntesis de antibióticos que da lugar a péptidos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano. Este descubrimiento puede contribuir a reducir la morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas tanto en los países subdesarrollados como en los más avanzados. Además, se evita el uso de productos contaminantes empleados en la síntesis química convencional.
- Los RiPP se encuentran entre los agentes antimicrobianos más abundantes sintetizados por la microbiota humana. Tienen la capacidad para modificar secuencialmente múltiples residuos de un péptido.
- YcaO es una unidad catalítica dependiente de ATP ciclodeshidratasa de microcinas (bacteriocinas) tiazol / oxazol modificadas (TOMM, subclase de RiPP). El descubrimiento de esta proteína ha permitido la síntesis de antibióticos como la bottromicina.
- Klebsazolicin (KLB), es el primer miembro de una nueva clase de inhibidores de la síntesis de proteínas diferenciándose de los macrólidos en que la molécula KLB adopta una conformación compacta, tapona el canal de salida y hace improbable el paso del nuevo péptido.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Murphy, Caitlin N., et al. "Role of Klebsiella Pneumoniae Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted into the Bladders of Mice as a Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections." *Infection and Immunity*, American Society for Microbiology Journals, 1 Aug. 2013, iai.asm.org/content/81/8/3009
2. Podschun, R., and U. Ullmann. "Klebsiella Spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors." *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for Microbiology Journals, 1 Oct. 1998
cmr.asm.org/content/11/4/589/figures-only
3. "Data from the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial Resistance." European Centre for Disease Prevention and Control. November 14, 2018.
<https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>
4. Vargas, López, et al. "K. Pneumoniae: ¿The New "Superbacteria"? Pathogenicity, Epidemiology and Resistance Mechanisms." *Revista EIA*,
www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000200007
5. Lina, et al. "Klebsiella Pneumoniae Multi-Resistente, Factores Predisponentes y Mortalidad Asociada En Un Hospital Universitario En Colombia." *Revista Chilena De Derecho*, Pontificia Universidad Católica De Chile. Facultad De Derecho,
scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000200009.
6. Clegg, S, and C N Murphy. "Epidemiology and Virulence of Klebsiella Pneumoniae." *Current Neurology and Neuroscience Reports.*, U.S. National Library of Medicine, Feb. 2016, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26999397.
7. Echeverri, Lina & Atehortúa, Santiago & Robledo, Jaime. (2009). K. pneumoniae y betalactamasas. Un problema creciente. 28.
https://www.researchgate.net/publication/277036113_K_pneumoniae_y_betalactamasas
Un problema creciente
8. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. *Open Forum Infect Dis.* 2015 (Apr); 2(2)
9. Galán, C., & Amanda. (2016, June 14). Klebsiella pneumoniae multirresistente: Un problema de salud pública. Estudio de su presencia en el Hospital General Universitario de Alicante. <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/56025>
10. Laboratory Detection and Reporting of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE). (2018). <https://clsi.org/media/1721/orwg-cre-laboratory-role-53016.pdf>
11. "Biosynthesis of Translation Inhibitor Klebsazolicin Proceeds through Heterocyclization and N-Terminal Amidine Formation Catalyzed by a Single YcaO Enzyme." ACS

Publications, pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.8b02277?journalCode=jacsat.

12. "YcaO-Dependent Posttranslational Amide Activation: Biosynthesis, Structure, and Function." ACS Publications. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.6b00623>.
13. Metelev, Mikhail, et al. "Klebsazolicin Inhibits 70S Ribosome by Obstructing the Peptide Exit Tunnel." *Nature News*, Nature Publishing Group, 28 Aug. 2017, www.nature.com/articles/nchembio.2462
14. McIntosh, J A, M S Donia, and E W Schmidt. "Ribosomal peptide natural products: Bridging the ribosomal and nonribosomal worlds." *Current neurology and neuroscience reports*. Apr. 2009. U.S. National Library of Medicine. 18 Jan. 2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19642421>.
15. Ghilarov, D., M. Serebryakova, C E Stevenson, S J Hearnshaw, D S Volkov, A. Maxwell, D M Lawson, and K. Severinov. "The Origins of Specificity in the Microcin-Processing Protease TldD/E." *Current neurology and neuroscience reports*. 03 Oct. 2017. U.S. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28943336>.
16. Dunbar, K L, and D A Mitchell. "Revealing nature's synthetic potential through the study of ribosomal natural product biosynthesis." *Current neurology and neuroscience reports*. 15 Mar. 2013. U.S. National Library of Medicine. 18 Jan. 2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23286465>
17. Dunbar, K. L., et al. "Discovery of a New ATP-binding Motif Involved in Peptidic Azoline Biosynthesis." *Current Neurology and Neuroscience Reports*. October 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129028>.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los amigos y familiares que de una manera u otra han contribuido en el cumplimiento de mi reto profesional y personal de estudiar en una prestigiosa universidad.

A todos los miembros del excelente equipo del Hospital Universitario de Getafe, especialmente a Javier Sánchez-Rubio Ferrández y Teresa Molina García, los cuales me han enseñado la labor desempeñada por un excelente profesional.

Gracias a todos los profesores que han aportado valor a mi formación, Manuel Córdoba Díaz, Andrés Rafael Alcántara León, Carlos Guillén Viejo, Jose Antonio Guerra Guirao, Santiago Torrado Durán, Amín, por la ayuda y orientación, pero sobre todo por el excelente ejemplo profesional y personal.