



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

Análisis bioinformático de los genes de lacasas YfiH en clones virulentos de *Acinetobacter baumannii*

Autor:

Miguel Díez Fernández de Bobadilla

Directora:

Dra. Lucía Gallego Andrés

Codirector

Dr. Vladimir Kaberdin

© 2015, Miguel Díez Fernández de Bobadilla

Leioa · 3 de Septiembre de 2015

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract	1
2. Introducción.....	2
3. Objetivos	5
4. Materiales y métodos.....	6
4.1 Determinación de actividad de las lacasas.....	6
4.2 Análisis bioinformático	7
4.2.1 Traducción de la cadena nucleotídica.....	7
4.2.2 Motivos de clúster de cobre.....	7
4.2.3 Búsqueda de secuencias similares en otras especies bacterianas	7
4.2.4 Alineamiento múltiple y neighbour joining	8
4.2.5 Predicción de la estructura secundaria.....	8
4.2.6 Predicción de la estructura terciaria.....	8
5. Resultados y discusión	9
5.1 Determinación de actividad lacasa.....	9
5.2 Estudio de la estructura primaria	10
5.2.1 Búsqueda de estructuras lacasas clásicas en muestras hospitalarias	10
5.2.2 Alineamiento múltiple	11
5.2.3 Localización de los clúster de cobre.....	13
5.3 Estudio de la estructura secundaria.....	14
5.4 Estudio de la estructura terciaria	15
6. Conclusiones	18
7. Bibliografía.....	19

1. RESUMEN/ABSTRACT

Acinetobacter baumannii es una bacteria Gram negativa, patógena y multirresistente. Su alta capacidad de supervivencia en hospitales y su resistencia a químicos puede deberse a la producción de lacasas. Estas enzimas son capaces de oxidar un sinfín de compuestos como los fenoles utilizados en hospitales para la desinfección de superficies. En este estudio se ha realizado un análisis de actividad lacasa en aislamientos altamente virulentos de los clones internacionales I y II, observando que estas cepas presentan actividad lacasa. Paralelamente, se ha realizado un análisis bioinformático con el que se ha determinado la similitud de los genes de estas lacasas con las ya descritas de la familia “YfiH” y con otras enzimas procedentes de otras especies, demostrando su similitud de secuencia con la lacasa RL5, procedente de una muestra de rumen bovino. Estos hechos suponen un avance en el estudio de lacasas bacterianas en *Acinetobacter baumannii* cuya caracterización podría desembocar en nuevas líneas de lucha contra dicho patógeno.

Acinetobacter baumannii is a Gram negative pathogenic and multi-resistant bacteria. Its elevated survival rate in hospitals and its resistance to chemical substances could be due to laccases production. These enzymes are able to oxidize a great amount of compounds, such as phenols used in hospitals to sterilize surfaces. In this study an analysis on laccase activity in the highly virulent international clones I and II has been performed, and it has been concluded that these strains present laccase activity. Simultaneously a bioinformatics analysis has been carried out to which it has been confirmed that these laccases are similar to those already described of the “YfiH” family and other enzymes belonging to other species. Showing its similarity with the RL5 laccase of bovine rumen. These facts constitute a significant step forward to the study of bacterial laccases in *Acinetobacter baumannii* whose characterization could lead into new lines of fight against this pathogen.

2. INTRODUCCIÓN

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son unas enzimas del tipo oxirreductasas. Se pueden encontrar en todo tipo de organismos, tanto eucariotas como procariotas, siendo más frecuentes en plantas superiores y hongos [1, 2]. Se estudiaron por primera vez en 1883 al ser extraídas de *Rhus vernicifera*, una planta de origen japonés cuya savia es utilizada para realizar lacados, de ahí su nombre. [3]

Las lacasas representan el mayor subgrupo de oxidasas del cobre azules (MCO), contienen cuatro átomos de cobre en tres zonas diferentes. Utilizan la capacidad redox de los iones cobre para catalizar la oxidación de una gran variedad de sustratos, a la vez que reducen el oxígeno molecular a agua, siendo este el único residuo que generan. Por otra parte, al contrario que muchas oxirreductasas, no necesitan cofactores como NAD(P)H y no producen intermediarios tóxicos de peróxido [4]. Gracias a estas cualidades, en los últimos años se han comenzado a aprovechar en la industria en un intento de hacer más ecológicos procesos en fábricas papeleras y textiles, donde son utilizadas como catalizadores ecológicos, alternativos a las rutas químicas convencionales [5, 6, 7, 8, 9, 10].

Las lacasas más estudiadas y utilizadas en la industria son las encontradas en basidiomicetos y ascomicetos. Estos hongos utilizan las lacasas en labores como morfogénesis, interacciones patógeno/hospedador, defensa ante el estrés y degradación de lignina. Son proteínas extracelulares de un tamaño aproximado de 60-70 kDa, se encuentran activas entre los 30°C y los 55°C y necesitan condiciones ácidas (pH 4) para actuar. Normalmente, la enzima está glicosilada en un ratio de entre el 10% y el 25% encontrándose por encima de este en pocos casos. [2, 11]

Todas comparten una estructura común dividida en tres zonas: las zonas T1 y T2 que contienen una molécula de cobre cada una, y la zona T3 que contiene dos. Cada uno de estos sitios reacciona de forma diferente a la luz. En T1 se absorbe intensamente a 600nm y se emite luz azul, en T2 no se produce ninguna absorción mientras que en T3 la absorbancia es a 330nm [4, 12]. El mecanismo de transferencia de electrones es todavía desconocido, se cree que el ciclo comienza con la oxidación de las moléculas de sustrato para dar lugar a cuatro electrones en la zona T1. Estos electrones son enviados al clúster trinuclear (T2 y T3) donde el proceso acaba con la reducción de una molécula de oxígeno (O₂) a dos moléculas de agua [4]. Siendo la

estructura terciaria que adopta la proteína le permite oxidar a una gran variedad de compuestos como difenoles, polifenoles, fenoles de sustitución, diaminas y aminas aromáticas [13,14].

El uso de lacasas fúngicas en procesos biotecnológicos es aún muy limitado debido a la dificultad para adaptarse a las condiciones de los procesos industriales. Por otra parte, son muy específicas por ello, cuando se usan fenoles como sustrato son poco efectivas [15, 16]. Además, la cantidad de enzima producida es muy limitada y la expresión heteróloga de las lacasas fúngicas tampoco es una solución ya que es muy complicada, especialmente en aquellas con un alto potencial redox, debido a la existencia de barreras post-traduccionales [17].

Con el objetivo de superar estas dificultades se ha intensificado el estudio de lacasas bacterianas en los últimos años. La primera lacasa microbiana fue descubierta en 1993, en cepas no motiles de *Azospirillum lipoferum* aislada en la rizosfera de una planta de arroz mientras se medía la actividad fenoloxidasas. Desde entonces, se han encontrado lacasas en todo tipo de bacterias, especialmente en los géneros *Streptomyces*, *Bacillus* spp., y *Pseudomonas* spp. siendo CotA de *Bacillus subtilis* la lacasa bacteriana más estudiada [4, 18]. Además, en la última década el desarrollo de la bioinformática y la metagenómica ha permitido encontrar nuevos ejemplares de lacasas bacterianas procedentes de bacterias no cultivables en el laboratorio. Este es el caso de la lacasa RL5, hallada gracias a la metagenómica en el rumen de una vaca. [19]

Las lacasas procariotas tienen un tamaño de entre 28-180kDa, y pueden organizarse como monómeros, trímeros o tetrámeros [20]. Su disposición más habitual es la de monómeros con tres dominios interconectados formando en conjunto una estructura globular. Pueden ser extracelulares o intracelulares, y su localización varía considerablemente en las bacterias. Se diferencian de las lacasas eucariotas por su alta termoestabilidad, su pH óptimo alcalino y su halotolerancia [4]. Si las comparamos con las fúngicas observamos baja homología, pese a ello mantienen la estructura de los sitios activos, con cuatro átomos de cobre en tres zonas [21, 22]. También se han visto diferencias en el potencial de reducción del sustrato, mientras que en las lacasas bacterianas suele ser menor de 0.5V en las fúngicas está entre 0.5-0.8, lo que dificulta su potencial uso industrial [23, 24]. Se cree que esto puede ser debido a la posición relativa del átomo de cobre en T1. Otra de las ventajas de las lacasas bacterianas es que la expresión heteróloga en *E. coli* resulta más simple, por lo que se hace más sencillo obtener mayores cantidades de enzima a un precio atractivo. Además, las modificaciones post-transcripcionales no son esenciales para la actividad enzimática de este tipo de lacasas, lo que facilita el proceso [4]. Por otra parte, se esperan grandes mejoras en eficiencia de estas lacasas a través de

ingeniería proteica en los próximos años. Todo esto nos indica que el estudio y aislamiento de nuevas lacasas bacterianas puede ser muy útil en un gran número de procesos biotecnológicos debido a sus interesantes características [26].

Este trabajo está centrado en el estudio de unas hipotéticas lacasas de *Acinetobacter baumannii* pertenecientes a dos cepas hospitalarias representativas de dos clones internacionales I y II con virulencia demostrada. *Acinetobacter baumannii* es un baciloco Gram negativo, catalasa positivo, oxidasa negativo, aerobio estricto y no fermentador. Diferentes especies del género *Acinetobacter* han sido aisladas de diversos lugares como hospitales, suelos, agua, alimentos o tejidos infectados [27, 28, 29]. Pero si por algo *Acinetobacter baumannii* está ganando cada vez más atención, es por su alta patogenicidad. Esta bacteria es responsable de un amplio rango de infecciones como sepsis, meningitis, neumonía e infecciones del tracto urinario. Además es uno de los más importantes patógenos Gram negativos causantes de infecciones en pacientes inmuno deprimidos. Su patogenicidad y virulencia se debe a su facilidad en la colonización de la piel y de los tejidos respiratorios, por su capacidad de adherencia a las células del huésped, así como su resistencia a la respuesta inmune en los tejidos cutáneos y mucosos [30]. Cabe destacar que es una bacteria muy difícil de eliminar debido a la aparición de cepas multirresistentes a distintos medicamentos que se están extendiendo por los hospitales de todo el mundo. Hasta hace unos años se trataban con carbapemasas, sin embargo mutaciones capaces de resistir a este fármaco se han ido transfiriendo horizontalmente entre las bacterias de los hospitales de todo el mundo, este hecho ha convertido a este tratamiento en inservible [31, 32]. Esto deja pocas o ninguna opción en el tratamiento de las infecciones provocadas por esta bacteria. Por este motivo, se está posicionando como uno de los patógenos más peligrosos en enfermedades nosocomiales del mundo y prioritario en los planes de control de la Organización Mundial de la Salud.

Los biofilms regulados por “quorum sensing” son esenciales en el crecimiento de estas bacterias. Se trata de complejos altamente estructurados que dan protección a las colonias bacterianas que lo integran permitiendo su supervivencia en condiciones muy desfavorables. Esto les permite colonizar todo tipo de superficies como suelos, sábanas, fregaderos, e incluso el propio material hospitalario, lo cual hace muy difícil su erradicación. Son capaces de sobrevivir en condiciones de sequía durante meses, por lo que pueden ser una fuente de infección durante largos periodos [33, 34]. Además, tampoco les afecta la exposición a los desinfectantes comunes de hospitales como fenoles, gluconato o clorhexidina. Lo cual se puede deber a su capacidad de producción de lacasas, que eliminarían dichos compuestos [35, 36]. Por lo tanto el estudio de estas lacasas puede conducir a una nueva vía para atacar a estos patógenos nosocomiales.

De este modo, el estudio de las hipotéticas lacasas los clones internacionales virulentos I y II en comparación con la cepa control no virulenta 19606 abre una nueva vía para aplacar la expansión de esta bacteria en los hospitales de todo el mundo. Si se impide el crecimiento en los hospitales de dichas bacterias se conseguiría reducir el número de muertes provocadas por enfermedades nosocomiales. Por ello el estudio y la caracterización de las hipotéticas lacasas de los clones I y II juega un papel clave en la lucha contra *A. baumannii*.

3. OBJETIVOS

Las lacasas son oxirreductasas de cobre con capacidad para oxidar una gran variedad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. La mayoría de las lacasas de las que se han estudiado su actividad, sus características y sus estructuras tanto terciarias como secundarias pertenecen a lacasas fúngicas. Por tanto, hay una ventana muy amplia para el estudio de lacasas bacterianas, y su futuro aprovechamiento en la industria debido a sus capacidades más adecuadas.

A. baumannii se ha convertido en un patógeno de gran peligrosidad como lo atestigua la importancia que le otorga la Organización Mundial de la Salud. Su capacidad para resistir a los fármacos así como su alto nivel de supervivencia en condiciones muy desfavorables hacen que el estudio de nuevas estrategias para acabar con ella sean una prioridad. En nuestra opinión las lacasas jugarían un papel clave en la supervivencia de esta bacteria en el medio ambiente hospitalario haciendo difícil su erradicación. Por ello, su estudio es muy interesante y novedoso.

Es por ello que los objetivos principales de este trabajo de fin de grado son:

- Expresión y análisis de la actividad de las lacasas de los clones internacionales I y II sobre los sustratos habitualmente utilizados en el estudio de lacasas.
- Análisis bioinformático de las secuencias del gen “YfiH” de los clones internacionales I y II comparado con una cepa control no virulenta de *A. baumannii* así como con enzimas conocidas de otras especies bacterianas, RL5, cotA (*Bacillus subtilis*), oxidasa múltiple del cobre ACICU (*Acinetobacter baumannii*) como ayuda a descubrir su posible actividad.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron dos estrategias diferentes: un método bioquímico para estudiar la actividad lacasa de los clones internacionales virulentos I y II de *A. Baumannii* y métodos bioinformáticos para analizar su estructura y actividad.

Se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* (BL21) transformada previamente por el grupo de investigación con un plásmido que contenía los genes con posible actividad lacasa aislados de los clones internacionales virulentos I y II obtenidos en hospitales y con un control proveniente de *A. baumannii*, ATCC 19606 (no virulenta). El clon I internacional pertenece a la cepa 5A/11 y el clon II a sm-28. Para el procesamiento bioinformático se ha hecho uso de la secuenciación realizada por el propio equipo de investigación de los clones I y II en proyectos anteriores.

4.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE LAS LACASAS

Se trabajó con los genes de las enzimas con posible actividad lacasa (clon I y clon II) y de la cepa control 19606 introducidos en *E. Coli*. Se tomó una muestra del stock de *E. coli* transformada (BL21) conservado en una placa de agar y se incubaron en 5mL de caldo LB durante 4 o 5 horas. A continuación, se añadieron dichas muestras a matraces de 50mL con medio LB y SO_4Cu 2mM (0.05mL). y se dejaron en incubación toda la noche.

Se pasaron a tubos "falcon" de 50mL para proceder a su centrifugación a 800rpm durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 1mL de Tris-sacarosa y se procedió a congelar a -20°C . A continuación, se pasó a descongelar a baja temperatura (5°C) y volver a congelar varias veces para conseguir lisar las células. Tras este proceso, se pasó el contenido a un tubo "eppendorf" de 1.5mL, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante. Previamente se habían preparado diversos tubos de ensayo con un rango de pH de 1 a 9 de buffer tanto fosfato como acetato. Dicho sobrenadante se añadió en tubos "eppendorf" de 1.5mL que contuvieron 150 μL de buffer, 0.7 μL de siringaldazina o 9.38 μL de ABTS para hacer reaccionar a la enzima y 50 μL del sobrenadante. Para combinar todos estos factores fue necesario realizar varios experimentos espaciados en el tiempo. Tras añadir todos los componentes se esperaban unos segundos para observar el posible cambio de color in vivo, lo

cual sería indicativo de actividad lacasa. Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE con el sobrenadante para comprobar la presencia de la enzima [37].

4.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

4.2.1 TRADUCCIÓN DE LA CADENA NUCLEOTÍDICA

Se transformó la cadena nucleotídica de los clones I y II en la aminoacídica utilizando la herramienta “*Translation tool* de ExPASy” del instituto suizo de bioinformática [38]. La cadena peptídica de la cepa control se obtuvo de la base de datos del “NCBI” del centro nacional para la información biotecnológica accesible en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/260410647>) GenBank: EEX03945.1 para poder ser comparable globalmente. De esta manera todos los análisis bioinformáticos se basaron en la cadena aminoacídica.

4.2.2 MOTIVOS DE CLÚSTER DE COBRE

Se buscaron las secuencias características de los clúster de átomos de cobre de las lacasas bacterianas más estudiadas. Estas secuencias corresponden a zonas con alta densidad de metionina y secuencias conservadas del tipo: HXHG, HXH, HXXHXH y HCHXXHXXXM/L/F. Correspondiendo la “X” a cualquier aminoácido. Estas secuencias se encuentran en la mayoría de lacasas bacterianas, siendo el principal indicador de estas [39].

4.2.3 BÚSQUEDA DE SECUENCIAS SIMILARES EN OTRAS ESPECIES BACTERIANAS

Se examinaron secuencias similares a los clones I y II a través de la herramienta “Blast” del centro nacional de información bioinformática (NCBI) de Estados Unidos [40]. También se utilizó la base de datos de lacasas de la universidad de Stuttgart (<http://www.lccd.uni-stuttgart.de/>). Esta base de datos reúne la mayor cantidad de información sobre las lacasas, agrupándolas por familias según sus características.

4.2.4 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE Y NEIGHBOUR JOINING

Se compararon las secuencias de la cepa control, de los clones I y II, cotA (*Bacillus subtilis*) GenBank: AAB62305.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAB62305.1>) , ACICU oxidasa multicobre (*Acinetobacter baumannii*) GenBank: ACC55964.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ACC55964.1>) y RL5 GenBank: CAK32504.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/108248034>) con la técnica de alineamiento múltiple. Las secuencias de todas estas lacasas se obtuvieron en “Genbank” del NCBI. La lacasa RL5 fue secuenciada gracias a la metagenómica y se desconoce el microorganismo del que procede. Se analizó todo el material genético encontrado en el rumen de una vaca y se encontró esta lacasa. Para realizar el alineamiento múltiple se utilizó la herramienta “ClustalW2” del instituto europeo de bioinformática (EMBL-EBI). Esta herramienta es capaz de calcular el porcentaje de similitud entre distintas secuencias, alinearlas de manera que coincidan la mayor cantidad de aminoácidos. También se realizó un árbol filogenético a través de la matriz “neighbour joining” que permite conocer la distancia evolutiva entre distintas secuencias a través de la comparación de secuencias [41, 42].

4.2.5 PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

Se predijeron las estructuras secundarias más probables de la cepa control, de los clones I y II y de RL5. Para ello, se ha utilizado la herramienta “PSIPRED” del *University college* de Londres. Este software utiliza amplias bases de datos de secuencias con estructuras secundarias conocidas y a través de algoritmos y utilizando como base las redes neuronales predicen por comparación la posible estructura secundaria desde la estructura primaria. [43, 44].

4.2.6 PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA

Finalmente, se realizó una predicción de las estructuras terciarias de la cepa control, de los clones I y II y de RL5. Primero se realizó una búsqueda dentro del “*Protein Data Bank*” para buscar proteínas con la estructura terciaria reconocida similares a nuestras secuencias. Esto dio como resultado las entradas “1XAF” de *Shigella flexneri* para la muestra control, “1Z9T” de *E.*

coli para los clones I y II y “1T8H” de *Bacillus stearothermophilus* como los moldes más adecuados. Se realizó un alineamiento estructural con “GenTHREADER” para poder generar a continuación las hipotéticas estructuras terciarias a través de la herramienta “swiss model server” del instituto suizo de bioinformática [45, 46, 47].

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LACASA

Para comprobar si los clones hospitalarios de *A. baumannii* contenían un gen lacasa funcional, se realizó una prueba de determinación de la actividad lacasa. Para ello se partió de cepas *E. coli* en las que se había introducido previamente el gen en cuestión utilizando como vector un plásmido. Estas cepas stock habían sido preparadas previamente por el grupo de investigación, eran de tres tipos según la cepa de procedencia del gen, clon I (5/A11), clon II (sm-28) y cepa control (19606). Se realizó la expresión heteróloga en *E. coli* debido a la alta virulencia de *A. baumannii*.

Se repitió la prueba de actividad lacasa hasta completar un amplio rango de las combinaciones posibles con los pHs 1-9, los sustratos ABTS y siringaldazina, tampones acetato y fosfato y las cepas control y clones I y II. El resultado fue positivo, lacasa activa funcional, con las siguientes combinaciones: buffer fosfato, pH 1, 2 y 3 en reacción con ABTS en los Clones I y II y buffer fosfato, pH 1 y 2 en reacción con ABTS en la cepa control 19606. El resultado positivo viene determinado por un rápido cambio de color, la muestra pasa de ser incolora a un color azul claro, como se muestra en la **Figura 1**.

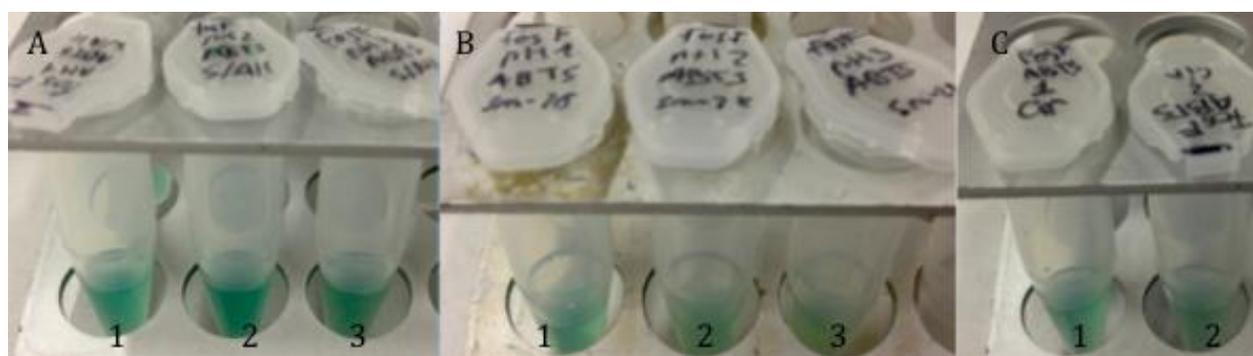


FIGURA 1 Test de actividad lacasa con buffer fosfato y ABTS. El cambio de color de transparente a azulado determina la actividad enzimática. Resultados positivos en A) el clon I (5/A11) a los pH 1, 2 y 3, en B) clon II (sm-28) a los pH 1, 2, y 3. Y en C) la cepa control (19606) a los pH 1 y 2.

Los resultados del gel de acrilamida por otra parte, resultaron no concluyentes. Puede ser debido a la dificultad del sistema de sobreexpresión ya que la cepa BL21 entorpece la sobreexpresión del vector. Actualmente se están realizando estudios sobre esta materia en el grupo de investigación.

Se puede concluir que las secuencias estudiadas en la cepa control (no virulenta) ATCC 19606, en el clon I (5/A11) y en el clon II (sm-28), tienen actividad oxidasa lacasa. El resultado positivo en la prueba de actividad lacasa fue claro y refrendado por las tres cepas. Esto nos permite indicar que los clones hospitalarios cuentan con genes lacasa. Debido a las estrechas condiciones de vida de dichas bacterias, la conservación de genes se prioriza por su utilidad. Es por tanto de prever que si se han mantenido dichos genes en ambos clones es porque resultan beneficiosos para la supervivencia de *A. baumannii*.

5.2 ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA

5.2.1 BÚSQUEDA DE ESTRUCTURAS LACASAS CLÁSICAS EN MUESTRAS HOSPITALARIAS

La secuencia de aminoácidos codificada en los genes lacasa de los clones I y II se obtuvo a partir del análisis de la secuencia de nucleótidos de los hipotéticos genes lacasa obtenida por el grupo previamente. Como control, se utilizó la secuencia de la hipotética lacasa de *A. baumannii* ATCC 19606 obtenida en “*genbank*” del “NCBI”. Tras realizar la traducción de estas secuencias basándose en el código genético se procedió a buscar estructuras que aparecen en la mayoría de lacasas hasta ahora estudiadas. Estas son zonas con alta densidad de metionina y con estos motivos conservados: HXHG, HXH, HXXHXH y HCHXXXHXXXM/L/F (REF). En ninguna de las secuencias se hallaron dichos motivos. Por tanto, las hipotéticas lacasas de los clones I y II no pertenecen a las familias de lacasas más estudiadas de las que ya se conoce su estructura.

Posteriormente se realizó una búsqueda de secuencias similares a nuestros clones utilizando la herramienta “Blast” para buscar otras lacasas que sí se acercaran a nuestra secuencia. Los resultados mostraron similitud a lacasas pertenecientes a la familia “YfiH”, siendo la lacasa RL5 un ejemplo de esta. Con esta familia comparte la secuencia “oxidasa de cobre 4”. Estos resultados demostraron la pertenencia de los clones a la familia “YfiH”, como ya se había descubierto previamente en la cepa control 19606.

5.2.2 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE

En primer lugar se realizó una comparación entre los dos clones hospitalarios virulentos y la cepa control (no virulenta) a través de un alineamiento múltiple, **Figura 2**.

```

5/A11    MEFVQGLPQGQVFGQTRVQHPLALPTELTELTFGNLALHVKDEAQRVQQHRMMLLDEFAQ 60
sm-28    MEFVQGLPQGQVFGQTRVHHPLALPAEQTELTFGNLALHVKDEAQRVQQHRMMLLDEFAQ 60
19606    -----MNLLS----- 5
                                     * * *

5/A11    FGVKKMTWMTQTHSTICHTVNEQIPFTALIGDLITQTKGHALMMMTADCLPVVLGNAEG 120
sm-28    FGVKKMTWMTQTHSTICHTVNEQIPFTALIGDLITQTKGHALMMMTADCLPVVLGNAEG 120
19606    LGLKKMTWMTQTHSTICHTVNEQIPFTALIGDLITQTKGHALMMMTADCLPVVLGNAEG 65
          :*:*****

5/A11    TEIANLHAGWRGLAGGIIENTVVAMQGPPTWAGLGAAISQPCFEIGAEVKTAFCSKYPEL 180
sm-28    TEIANLHAGWRGLPGGIIENTVAEMQNPPTWAWLGAPITQPCFEIGAEVKTAFCSKDPEL 180
19606    TEIVNLHAGWRGLAGGIIENTVAAMQSPPTWAWLGAAISQPCFEIGAEVKTAFCSKYPEL 125
          ***_******_******_*_******_*_*_*:*****

5/A11    ETAFIDGAAPNKFHADLYAIARFILQSLGVEKVLGGDQCSYQQQDEYPSYRRDAKTGRMA 240
sm-28    ETTFIDGAAPNKFHADLYAIARFILQSLGVEKVLGGDQCSYQQQDEYPSYRRDDKRGMA 240
19606    ETAFIDGAAPNKFHADLYAIARFILQSLGVEKVLGGDQCSYQQQDEYPSYRRDAKTGRMA 185
          **:*****

5/A11    TFVFM 245
sm-28    TFVFM 245
19606    TFVFM 190
          *****

```

FIGURA 2 Alineamiento múltiple de la cepa control (19606), el clon I (5/a11) y el clon II (sm-28). En la imagen podemos observar la alta similitud entre dichas secuencias. El asterisco (*) aparece cuando encontramos el mismo residuo en las tres secuencias y el punto (.) y los dos puntos (:) cuando uno de los residuos de las tres secuencias difiere de los otros dos.

Podemos observar una gran similitud entre las tres secuencias comparadas. Sin embargo, vemos como la secuencia control es más corta, 185 residuos frente a los 240 de los clones. La secuencia control obtenida en la base de datos del “NCBI” carece de los residuos iniciales, pero a partir del aminoácido número 60 la similitud es muy amplia. En las imágenes podemos apreciar ciertas mutaciones puntuales en los clones que hacen que se diferencien entre sí mismos y con el control.

A continuación, se realizó un alineamiento múltiple con los clones I y II, la cepa control, RL5 (microorganismo no identificado), cotA (*Bacillus subtilis*) y la oxidasa de cobre putativa de *Acinetobacter baumannii* ACICU. Estas dos últimas son lacasas ya reconocidas y estudiadas. Los resultados dieron una alta similitud (superior al 90%) entre los clones y la cepa control y muy baja (inferior al 7%) con respecto a los clones y las lacasas cotA y ACICU. La lacasa RL5

guarda mayor similitud a los clones hospitalarios y la secuencia control (alrededor del 25%) que respecto a las lacasas tradicionales (inferior al 6%) como se puede observar en la **Tabla 1**.

Tabla 1 **Resultados del alineamiento múltiple entre ATCC 19606, clon I (5/A11), clon II (sm-28), cotA (*B. Subtilis*), ACICU oxidasa putativa de cobre múltiple (*A. baumannii*) y RL5 (organismo no identificado). El “score” indica el grado de similitud entre las distintas secuencias.**

Secuencia A	Nº de residuos	Secuencia B	Nº de residuos	Score
ATCC 19606	190	5/A11 (clon I)	245	94.21
ATCC 19606	190	Sm-28 (clon II)	245	91.05
ATCC 19606	190	<u>cotA</u>	511	4.21
ATCC 19606	190	ACICU	644	3.68
ATCC 19606	190	RL5	262	26.32
5/A11 (clon I)	245	Sm-28 (clon II)	245	94.29
5/A11 (clon I)	245	<u>cotA</u>	511	3.27
5/A11 (clon I)	245	ACICU	644	6.12
5/A11 (clon I)	245	RL5	262	27.76
Sm-28 (clon II)	245	<u>cotA</u>	511	6.53
Sm-28 (clon II)	245	ACICU	644	6.12
Sm-28 (clon II)	245	RL5	262	28.16
<u>cotA</u>	511	ACICU	644	15.07
<u>cotA</u>	511	RL5	262	5.73
ACICU	644	RL5	262	4.2

Por otra parte, se utilizó el método “*neighbour joining*” para crear un árbol filogenético que nos indicó las distancias evolutivas en las diferentes secuencias en base a sus diferencias en sus secuencias. El árbol está organizado en forma de cladograma para identificar de forma más visual las distancias, pero no exponiendo las distancias reales. Los resultados nos indicaron una alta proximidad del control y del clon I. Estando estos muy próximos a su vez al clon II. Estas tres secuencias forman una agrupación enfrentada a la formada por, cotA y ACICU. Encontrándose RL5 entre medio de ambas. **Figura 3**.

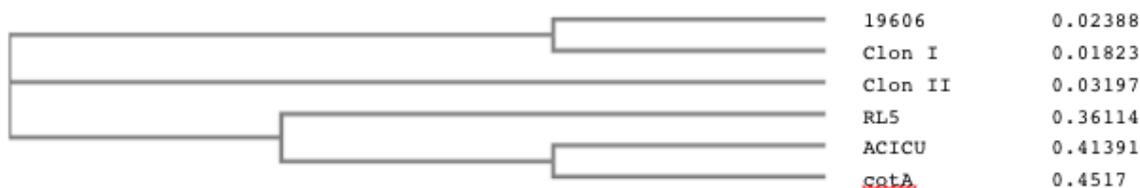


FIGURA 3 Árbol filogenético realizado por “*Neighbour joining*”. Árbol construido a partir de la muestra control 19606, el clon I, el clon II, RL5, oxidasa múltiple de cobre ACICU y cotA. Los valores a la derecha indican proximidad evolutiva, a menor valor mayor cercanía

Los resultados de los alineamientos como del “*neighbour joining*” confirman la amplia distancia entre las muestras hospitalarias con las lacasas clásicas microbianas. Estas últimas acumulan la mayoría de los estudios realizados en los últimos años. También confirman la alta cercanía entre los dos clones y la secuencia control y la relativa cercanía entre estos y la muestra de la familia “YfiH” RL5. Por tanto, todo parece conducir hacia la inclusión de los clones I y II dentro de dicha familia de lacasas.

5.2.3 LOCALIZACIÓN DE LOS CLÚSTER DE COBRE

Los clúster de cobre dentro de la familia “YfiH” se encuentran en posiciones diferentes que en las lacasas microbianas convencionales. En la lacasa RL5 se encontraron ciertos aminoácidos imprescindibles para el funcionamiento de cada uno de estos clúster de cobre, indicando por tanto su localización. Utilizando esto como referencia se buscaron dichos aminoácidos en el control y en los clones I y II, **Figura 4**. Se puede observar que la mayoría de los aminoácidos señalados como importantes se han conservado. De la zona T1 sólo se ha conservado una Asparagina (N), esta no se encuentra presente en la secuencia control. En la zona T2 se han conservado dos Histidinas (H) y una Cisteína (C). En la zona T3 se ha mantenido una Cisteína (C). Sin embargo, otros aminoácidos considerados imprescindible para la actividad lacasa en RL5 no se encuentran en nuestras secuencias.

```

19606 -----MNNLS--- 5
5/A11 -MEFVQGLPQGQVFGQTRVQHPLALPTELTELTGFNLALHVKDEAQRVQQHRMMLLDEFA 59
sm-28 -MEFVQGLPQGQVFGQTRVHHPLALPAEQTELTGFNLALHVKDEAQRVQQHRMMLLDEFA 59
RL5 MIELEKLDFAKSVVEGVEAFSTTRGQVDGRNAYSQVNLCDYVGGDDALRVLDARLTLAMQLG 60
                                         : *

19606 -LGLKKMTWMTQTSTICHTVNEQIPFTALIG-----DGLITQTKGHALMMMTADCL 56
5/A11 QFGVKKMTWMTQTSTICHTVNEQIPFTALIG-----DGLITQTKGHALMMMTADCL 111
sm-28 QFGVKKMTWMTQTSTICHTVNEQIPFTALIG-----DGLITQTKGHALMMMTADCL 111
RL5 -VDLDDLVMRQTSRVAVIDERFRALDIDEQEAALLEGVDALVTRLQGIVIGVNTADGV 119
m..... **** .!!*!! : *.!*!*: !* .! : *****:

19606 PVVLGNAEGTEIVNLHAGWRGLAGGI IENTVAAMQSP-----PTWAWLGAAISQPCFEIG 111
5/A11 PVVLGNAEGTEIANLHAGWRGLAGGI IENTVVAMQGP-----PTWAGLGAAISQPCFEIG 166
sm-28 PVVLGNAEGTEIANLHAGWRGLPGGI IENTVAEMQNP-----PTWAWLGAPITQPCFEIG 166
RL5 PIVLVDSQAGIVAVSHAGWRGTVGRIAKAVVEEMCRQGATVDRIQAAMGPSICQDCFEVG 179
*! ** !!! . !. ***** * * ! . * * * ! * . . * * * * * * * * * * * * * *

19606 AEVKTAFCSKYPELETAFIDGAAPNKFHADLYAIARFILQSLGV--EKVLGGDQCSYQQQ 169
5/A11 AEVKTAFCSKYPELETAFIDGAAPNKFHADLYAIARFILQSLGV--EKVLGGDQCSYQQQ 224
sm-28 AEVKTAFCSKDPELETTFIDGAAPNKFHADLYAIARFILQSLGV--EKVLGGDQCSYQQQ 224
RL5 DEVVEAPKKAHFNLDIVVRNPATGKAHIDLRAANRAVLVAAGVPAANIVESQHCSRCEH 239
** ** . !*! .! ..*..* * ** * * !* ! ** !!! .!!** !!

19606 DEYFSYRRD-AKTGRMATFVFM- 190
5/A11 DEYFSYRRD-AKTGRMATFVFM- 245
sm-28 DEYFSYRRD-DKRGRMATFVFM- 245
RL5 TSFFSARRLGINSGRFTFTGIYRK 262
.!!** ** ! ** * !!

```

FIGURA 4 Localización de los clúster de cobre en 19606, los clones I y II y RL5. Las zonas amarillas corresponden a clúster de cobre T1, las verdes al T2 y las azules al T3. Se han conservado aminoácidos clave en todas las secuencias en cada una de las zonas, salvo la secuencia control que carece del aminoácido correspondiente a T1.

El mantenimiento de los aminoácidos clave de los clúster de cobre de RL5 en los dos clones hospitalarios, así como en la secuencia control muestra de nuevo la alta relación entre dichas secuencias. La posibilidad de que la conservación de estos aminoácidos haya sido azarosa es remota, por lo que se reasegura que ambos clones hospitalarios y la secuencia control forman parte de la familia “YfiH” de lacasas bacterianas.

5.3 ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

La predicción de la estructura secundaria de las proteínas sigue siendo muy difícil pese a los grandes avances de la bioinformática en este campo. Sin embargo es interesante observar las diferencias en dicha estructura provocadas por las mutaciones acaecidas en nuestras muestras. Se

Para realizar dicha predicción se tomaron como modelos proteínas ya cristalizadas de secuencias similares a nuestras muestras. Además se señaló los residuos de todos los clúster considerados importantes para el desarrollo de la actividad lacasa. Se puede observar como dichos aminoácidos que interaccionan con el cobre se encuentran próximos físicamente y en el centro de la proteína. En RL5 la Cisteína 75 parece encontrarse alejada del núcleo activo pudiéndose deber este hecho a que los modelos de predicción no son totalmente fiables. Pese a ello hay una similitud visual entre las cuatro estructuras terciarias. **Figura 6 y 7.**

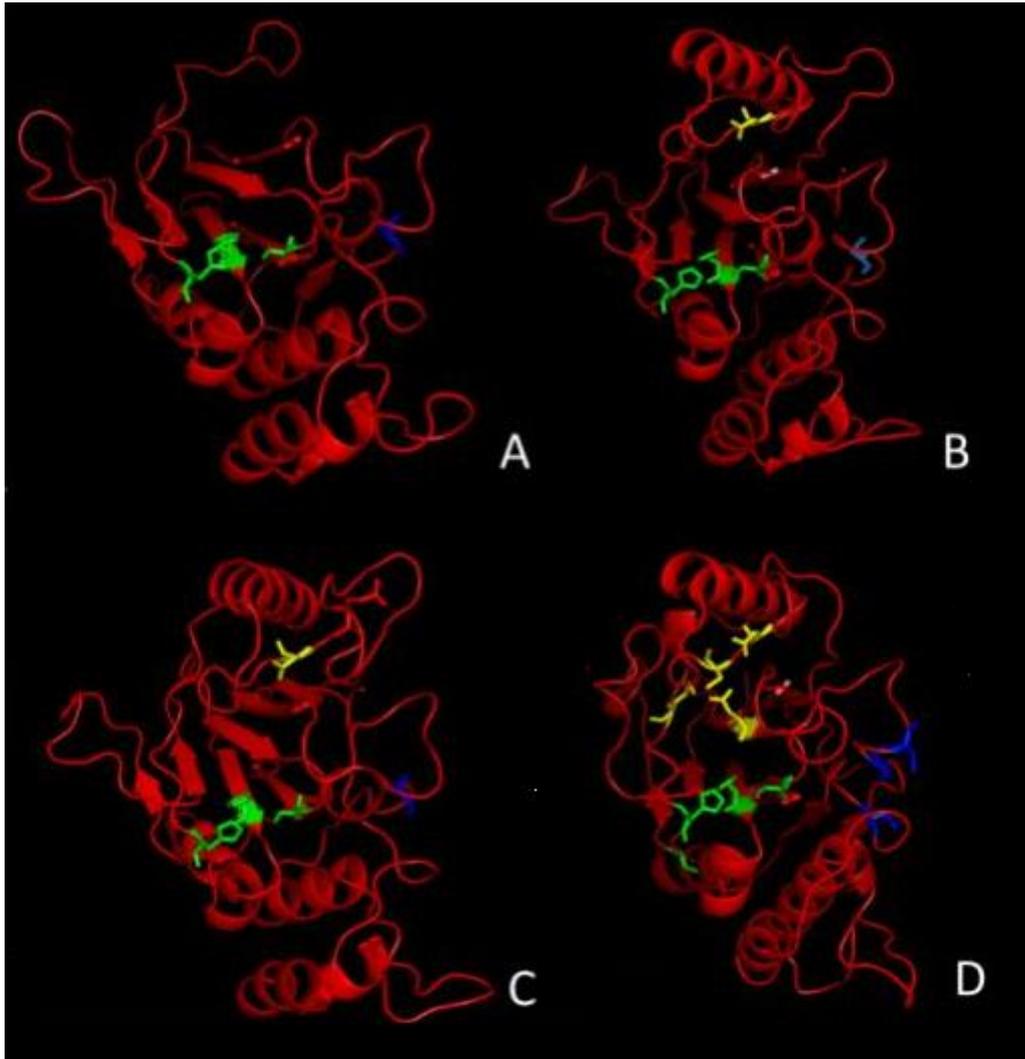


FIGURA 6 Predicción de la estructura terciaria en las muestras analizadas. Se ha marcado con color amarillo los aminoácidos correspondientes a T1, con verde a T2 y con azul a T3. A) cepa control 19606. B) clon I (5/A11), c) clon II (sm-28), d) RL5

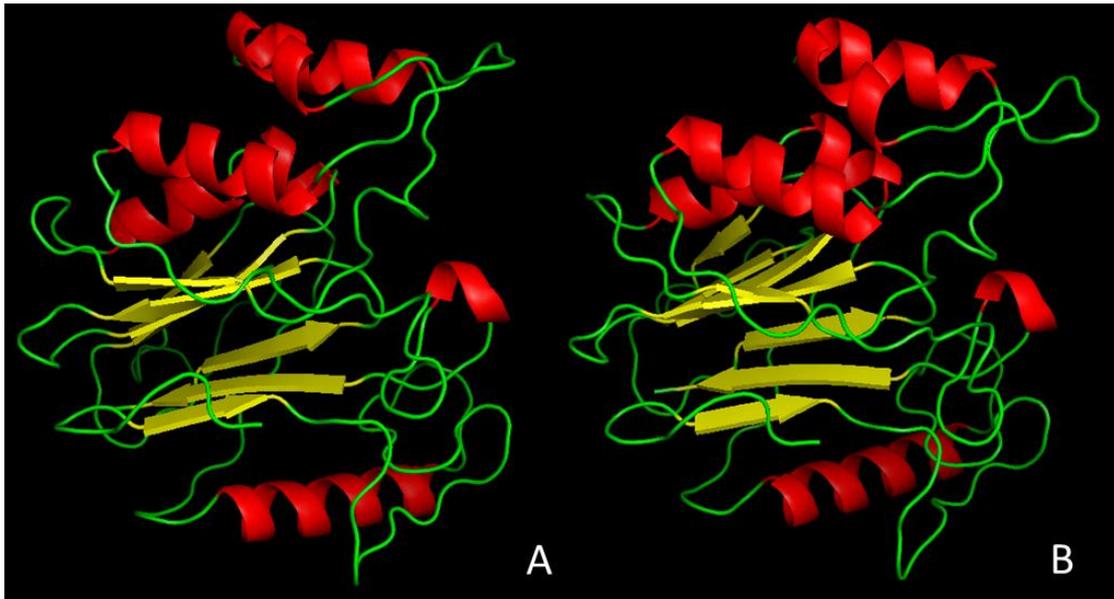


FIGURA 7 Predicción de la estructura terciaria de los clones i y ii. Se puede observar en rojo las hélices alfa y en amarillo las hojas beta plegadas de la estructura secundaria. A) clon I B) clon II

Las predicciones de las estructuras secundaria y terciaria apoya la posible integración de los clones I y II dentro de la familia “YfiH”. Estas estructuras mantienen una alta similitud entre los clones, la cepa control y el ejemplar de la familia “YfiH” (RL5). Estas estructuras sirven como aproximación a la estructura terciaria, no obstante, si se quiere ahondar en el conocimiento de esta familia de lacasas así como de las lacasas de *A. baumannii*, se hace necesaria la cristalización de dichas proteínas para poder conocer en profundidad su estructura.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha conseguido:

- Demostrar actividad lacasa en los aislamientos estudiados del clon I y clon II de las cepas virulentas *A. baumannii* y establecer la distancia genética y evolutiva de estos con los de las lacasas mejor caracterizadas hasta el momento
- Confirmar que estas lacasas pertenecen a la familia “YfiH” y que tienen una cercanía genética importante con la lacasa RL5.
- Predecir las estructuras secundarias y terciarias de las lacasas del clon I y II demostrando el mantenimiento en ambas de aminoácidos clave en los clúster de cobre y confirmando ese parecido a la RL5

Estos hechos abren una nueva vía para la lucha contra la persistencia de dicha bacteria en el medio ambiente hospitalario, lo que reduciría las infecciones nosocomiales graves ocasionadas por este microorganismo. Una vez conocida la actividad de su e estas lacasas y mecanismo de actuación se podrían diseñar inhibidores y evitar que este microorganismo resista la acción de los productos tóxicos de los desinfectantes. Sin embargo, se necesitan más estudios tanto genéticos como estructurales y de actividad para que esto sea posible. En conclusión, es posible que en el futuro, la creación de nuevos métodos de control de *A. baumannii* utilizando como base la actividad de sus lacasas para crear inhibidores, permita la erradicación de este patógeno de los hospitales.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Thurston, C. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140: 19-26.
2. Mayer, A.M., and Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60: 551-565.
3. Yoshida, H. 1883. Chemistry of lacquer (urushi). Part I. *Journal of the Chemical Society*. 43: 472-486.
4. Santhanam N., Vivanco JM, et al. 2011. Expression of industrially relevant laccases: Prokaryotic style. *Cell Press*.10: 480-489.
5. Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K., Cavaco-Paulo, A., and Gubitz, G.M. 2000. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 3357-3362.
6. Breen, A., and Singlston, F.L. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 252-258.
7. Collins, P.J., Kotterman, M., Field, J.A., and Dobson, A. 1996. Oxidation of Anthracene and Benzo[a]pyrene by Laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4563-4567.
8. Reid, I.D. 1998. Fate of Residual Lignin during Delignification of Kraft Pulp by *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 2117-2125.
9. Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P., and Kumar, A. 2011. Structure- function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68: 117-128.
10. Xu, F. 1999. Laccase. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, pp.1545-1554. Edited by M. C. Flickinger & S. W. Drew. New York: Wiley.
11. Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., and Yaropolov, A. I. 2007. "Blue" laccases. *Biochemistry (Moscow)*. 72:1136-1150.
12. Quintanar, L., Stoj, C., Taylor, A. B., Hart, P. J., Kosman, D. J., and Solomon, E. I. 2007. Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner. *Accounts of chemical research*. 40: 445-452.
13. Dubé E., Shareck F., Hurtubise Y., Daneault C., Beauguard M. 2008. Homologous cloning, expression and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and

- enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79:597–603
14. Thurston, C. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140: 19-26.
 15. Viswanath, B., Chandra, M.S., Pallavi, H., and Rajasekhar-Reddy, B. 2006. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples *African Journal of Biotechnology*. 7: 1129-1133.
 16. Xu, F. 1996. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*. 35: 7608-7614.
 17. Rodgers, C. J., Blanford, C. F., Giddens, S. R., Skamnioti, P., Armstrong, F. A., and Gurr, S. J. 2010. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?. *Trends in Biotechnology*. 28: 63-72.
 18. Alexandre, G., and Zhulin, I. B. 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends in Biotechnology*. 18: 41-42.
 19. Beloqui A, Pita M, Polaina J, Martínez-Arias A, *et al.* 2006. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 22933–22942.
 20. Kumar, S. V., Phale, P. S., Durani, S., and Wangikar, P. P. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*. 83: 386-394.
 21. Skálová, T., Dohnálek, J., Østergaard, L. H., Østergaard, P. R., Kolenko *et al.* (2009). The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. *Journal of Molecular Biology*. 385: 1165-1178.
 22. Duraõ, P., Bento, I., Fernandes, A. T., Melo, E. P., Lindley, P. F., & Martins, L. O. 2006. Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 11: 514-526.
 23. Xu, F., Berka, R., Wahleithner, J., Nelson, B., Shuster, J. *et al.* 1998. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemical Journal*. 334: 63-70.
 24. Alcalde, M. 2007. Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. *Industrial enzymes*, pp. 461-476. Springer (Netherlands)

25. Xu, F., Kulys, J. J., Duke, K., Li, K. et al. 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and environmental microbiology*. 66: 2052-2056.
26. Palonen, H., and Viikari, L. 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and bioengineering*. 86: 550-557.
27. Eveillard, M., Kempf, M., Belmonte, O., Pailhoriès, H., and Joly-Guillou, M. L. 2013. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *International Journal of Infectious Diseases*. 17: e802-e805.
28. Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., and Benade, S. 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes and environments*. 26: 101-112.
29. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51:3471–3484
30. Towner KJ. 2009. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*. 73: 355-363
31. Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E. 2011. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37:102- 109.
32. Antunes, L., Visca, P., & Towner, K. J. 2014. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and disease*. 71; 292-301.
33. Gerischer U. 2008. *Acinetobacter*: Molecular biology. Book review *international microbiology*. 11:147-148.
34. Weber, D. J., Rutala, W. A., Miller, M. B., Huslage, K., and Sickbert-Bennett, E. 2010. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of infection control*. 38: S25-S33.
35. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 16: 6-130.
36. Otter JA, Yezli S, French GL. 2011. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 32:687-99.

37. Zapata P., Villalonga M.L., Tamayo J., Rivera G., Solís S. 2012. Purification and characterization of laccase from *Trametes hirsute* Bm-2 and its contribution to dye and effluent decolorization. *African Journal of Biotechnology*. 11:3603-3611.
38. Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. 2003. *ExPASy*: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*. 31:3784-3788
39. Reiss, R., Ihssen, J., Richter, M., Eichhorn, E., Schilling, B., and Thöny-Meyer, L. 2013. Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *PLoS One* 8:e65633
40. Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. 1996 Applications of network BLAST server *Methods in Enzymology*. 266:131-141
41. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23:2947–2948.
42. Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*. 38(Suppl):W695–9.
43. Buchan DWA, Minnici F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT. 2013. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench . *Nucleic Acids Research* . 41 (W1): W340-W348.
44. Jones DT. 1999 Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*. 292: 195-202.
45. Jones, D. T. 1999. GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *Journal of Molecular Biology*. 287: 797-815
46. Guex N, Diemand A, Peitsch MC. 1999. Protein modelling for all. *Trends in Biochemical Sciences*. 24:364–7
47. Guex, N. And Peitsch, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PDBviewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 18: 2714-2723.