



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ANALISIS DE CONDICIONES ALTERNATIVAS DE PCR SEXUAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A :

VIVIANA ESCOBAR SANCHEZ



MEXICO, D.F.



2004

BIENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



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

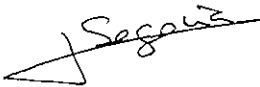
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

JURADO ASIGNADO:

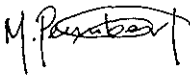
PRESIDENTE Dr. Agustín López-Munguía Canales
VOCAL Dra. Rebecca E. Franco y Bourland
SECRETARIO Dr. Lorenzo P. Segovia Forcella
1ER. SUPLENTE Dra. Amelia Ma. de G. Farrés González Saravia
2º. SUPLENTE Ma. Manuela Nájera Martínez

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en Cuernavaca, Morelos.



Dr. Lorenzo P. Segovia Forcella

ASESOR DEL TEMA



Biol. Mariana Peimbert Torres

SUPERVISOR TÉCNICO



Viviana Escobar Sánchez

SUSTENTANTE

Antes que a nadie a mis papás por su ejemplo, apoyo, amor, paciencia, confianza...por todo y a pesar de todo. A Gon por aguantarme estos años y por los que faltan. A toda mi familia ya en extenso, sin su apoyo estaría muy muy lejos de donde estoy. En especial a mis tías: Paty y Tere y mis tíos: Luis y Enrique...que han sido como otros dos pares de papás...por darme hospedaje durante la realización de este trabajo. A mi abuela Carlota por ser el pilar de lo que somos junto con mi abuelo Gonzalo y que desde lejos vean que vamos progresando. A mis primos Gonzalo, Arlette, Huicho y Pablo con los que crecí. A Alejandro y a Ana María que les prometo ser un buen ejemplo para Natalia. A los Escobar Ibarra por su cariño y atenciones. A toda la variedad de personajes de los Sánchez que con sus locas historias, me han enseñado a disfrutar y a querer la vida...los Carreto, los de Anda y los Fernández que a pesar de la distancia están muy cerca.

A mis amigos de la facultad con los que he compartido de los momentos más chidos y más bizarros de mi vida...me enseñaron que el mundo era mucho más grande y diverso. A Pau por tantos sueños y agobios. A Pollo por su forma de vivir y juntas ser capaces de hacer tantas...idiotecas tan divertidas. A AB por hacer todo tan simple. A la Chofa porque la quiero... amiigaa! Al Virus y al Cat por tanta confianza y buen reven. A Rafa y Lalo con los que nada es imposible o anormal. A la Timbres que todo empezó por tener que compartir la primera gaveta. Al Babe por los aventones, los viajes y estar desaparecido pero cerca. A Pablo y Juan por los vasos vacíos y le tejida de sweaters. Al Fabiux, la Flaca, a Jordi, a Rock, al Oso, a August, a Mariana, al Cachis Boy... por ser distintos, auténticos y siempre pasarla chido. A Berna, al Negro y la Huga por chismositos. A la Cynch, al CERESO por aquella final. A todos lo de la ficha y la jardinera por alivianarme la vida. A los grandes maestros que tuve, pero en especial a los que me enseñaron a cuestionarme y tratar de usar los sesos, aunque a veces no lo logre. A Iñiguez por siempre apoyaronos. A la facultad y a la UNAM.

A todos los de lab EH/LS así como a los vecinos por su disposición, ayuda y tolerancia. A grandes amigos que he encontrado aquí con los que hay que compartir muchas horas, muchas discusiones constructivas y destructivas, siempre algun reven...Beto, Sonia, Fito, Rosy, Vampiro, Barbara, Isa, Cano, Manolo, Fili, Dago, Luisa, Carlitos, Enrique, Renaud, Jorge, Brenda, Lety, Mary, Nelly, Simón, Gloria, Ismael, Mariana, Gus, Selene, Jimena, Ricardo. Gracias por cuidarme y ayudarme siempre académica y anímicamente.

A Lorenzo por darme la oportunidad de trabajar con él, por su enorme paciencia y la motivación para tratar de entender el mundo de la evolución y las proteínas.

A Mariana de forma muy especial por enseñarme a trabajar y a pensar, por contestar mis preguntas, escucharme y platicarme, explicarme con peras y manzanas (llevarme a pasear y a bailar), por ser una guía indispensable no sólo en este trabajo sino en mi formación y por su amistad. Espero no echarme a perder (¿más?) en el camino.

A Paul y Eugenio por la síntesis de oligos. A René y a Mary por las secuencias. A Joel por los vectores. A Rosy por su apoyo técnico y hacer que el laboratorio funcione. Al IBT por el apoyo económico que recibí como tesista.

A quien se me haya pasado...

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS..... | iv |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | v |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | vi |
| | |
| RESUMEN..... | 1 |
| | |
| INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| OPTIMIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS..... | 2 |
| INGENIERÍA DE PROTEÍNAS | |
| EVOLUCIÓN DIRIGIDA | |
| Generación de diversidad | |
| Identificación de variantes | |
| EXPLORACIÓN DEL ESPACIO DE SECUENCIA..... | 7 |
| EL ESPACIO DE SECUENCIA | |
| EL PAISAJE DE ADECUACIÓN | |
| β-LACTAMASAS..... | 10 |
| GENERALIDADES DE LA β-LACTAMASA TEM-1 | |
| EL SITIO ACTIVO DE LA β-LACTAMASA TEM-1 | |
| MECANISMO CATALÍTICO | |
| | |
| ANTECEDENTES..... | 15 |
| EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LA β-LACTAMASA TEM-1 HACIA LA HIDRÓLISIS DE CEFOTAXIMA | |
| PCR SEXUAL DE LA β-LACTAMASA | |
| PCR HIPERMUTAGÉNICA CON ANÁLOGOS DE NUCLEÓTIDOS | |
| EVOLUCIÓN <i>in vivo</i> CON FAGÉMIDOS CON CEPAS MUTADORAS | |
| ESTRATEGIAS DE RECOMBINACIÓN <i>in vitro</i> | 23 |
| LOS BENEFICIOS CLÁSICOS DE LA RECOMBINACIÓN EN LA EVOLUCIÓN | |
| TASA DE MUTAGÉNESIS ÓPTIMA | |
| LA TENDENCIA A LA AUSENCIA DE MUTACIONES Y SUS IMPLICACIONES EN EL MUESTREO | |
| EFECTO DEL NÚMERO DE VARIANTES RECOMBINADAS | |

| | |
|---|----|
| OBJETIVOS | 29 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| CULTIVOS CELULARES | 30 |
| BIOLOGÍA MOLECULAR | 30 |
| PLÁSMIDOS | |
| ELECTROFORESIS | |
| REACCIONES DE PCR | |
| PURIFICACIÓN DE DNA | |
| Purificación de plásmidos | |
| Purificación de productos de PCR | |
| Extracción de DNA de geles de agarosa | |
| PCR SEXUAL | |
| Amplificación de genes parentales | |
| Recombinación y adquisición de mutaciones | |
| Amplificación del banco | |
| CLONACIÓN | |
| Digestión de DNA con enzimas de restricción | |
| Ligación | |
| Transformación de células por electroporación | |
| CLONACIÓN DE BANCOS DE MUTANTES | |
| Digestión | |
| Ligación | |
| Transformación en células electrocompetentes | |
| SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES | |
| Selección de mutantes ganadoras | |
| Determinación de la CMI | |
| Cálculo de la tasa de mutagénesis del banco | |
| Secuenciación de mutantes | |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 38 |
| CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR PT4-B | 38 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 40 |
| OBTENCIÓN DEL BANCO C1 | 41 |
| PRESELECCIÓN | |
| SELECCIÓN | |
| CARACTERIZACIÓN DEL BANCO | |
| CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES GANADORAS | |
| OBTENCIÓN DEL BANCO C2O | 45 |
| PRESELECCIÓN | |
| SELECCIÓN | |
| CARACTERIZACIÓN DEL BANCO | |
| CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES GANADORAS | |
| OBTENCIÓN DEL BANCO C2H | 49 |
| PRESELECCIÓN | |
| SELECCIÓN | |
| CARACTERIZACIÓN DEL BANCO | |
| CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES GANADORAS | |
| PCR SEXUAL | 57 |
| TASA DE MUTAGÉNESIS DEL PCR SEXUAL | 62 |
| LA PRESIÓN SELECTIVA Y LA MULTIPLICIDAD DE LAS MUTANTES aisladas | 62 |
| LA INFLUENCIA DEL NÚMERO DE SECUENCIAS RECOMBINADAS | 64 |
| β-LACTAMASAS TEM CAPACES DE HIDROLIZAR CEFOTAXIMA | 67 |
| CONCLUSIONES | 70 |
| PERSPECTIVAS | 71 |
| REFERENCIAS | 72 |
| APÉNDICE | |

A: Absorbancia

A₆₀₀: Absorbancia a 600 nm

aa: aminoácido

Cf: cefotaxima

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CMI_{Cf}: CMI de cefotaxima

dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (2'-desoxinucleótido 5'-trifosfatos)

EDTA: etilen-diamin-tetracetato

Km: kanamicina

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa

TAE: Tris-Acetato-EDTA

Tr: transiciones

Tv: transversiones

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNasa: desoxirribonucleasa

RNasa: ribonucleasa

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. PCR SEXUAL..... | 5 |
| FIGURA 2. β -LACTAMASA TEM-1..... | 12 |
| FIGURA 3. MECANISMO CATALÍTICO..... | 13 |
| FIGURA 4. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS..... | 16 |
| FIGURA 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE STEMMER..... | 17 |
| FIGURA 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE ZACCOLO..... | 20 |
| FIGURA 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE LONG Mc-GIE..... | 22 |
| FIGURA 8. MODELO DE RECOMBINACIÓN DE ARNOLD..... | 26 |
| FIGURAS 9A, 9B Y 9C. RECOMBINACIÓN DE 5 Y 10 SECUENCIAS PARENTALES..... | 27 |
| FIGURAS 10A Y 10B. MAPA DEL VECTOR DE TRABAJO..... | 39 |
| FIGURA 11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... | 40 |
| FIGURA 12A. RESISTENCIA A CEFOTAXIMA (CMI_{CF})..... | 54 |
| FIGURA 12B. RESISTENCIA A CEFOTAXIMA (ESTRÍAS)..... | 55 |
| FIGURA 13. LOCALIZACIÓN DE MUTACIONES EN TEM-1..... | 58 |
| FIGURA 14. RECOMBINACIÓN Y ADQUISICIÓN DE MUTACIONES DURANTE EL PCR SEXUAL..... | 59 |
| FIGURAS 15A, 15B Y 15C. CMI_{CF} DE LAS CLONAS GANDORAS DE CADA BANCO..... | 61 |
| FIGURA 16. VARIANTES EXPLORADAS CON EL BANCO C1..... | 65 |
| FIGURA 17. POSIBLES VARIANTES ACTIVAS DEL BANCO C1..... | 65 |

| | |
|--|----|
| TABLA 1. NÚMERO DE VARIANTES POSIBLES PARA UNA PROTEÍNA DE 317 AA..... | 9 |
| TABLA 2. OLIGONUCLEÓTIDOS..... | 31 |
| TABLA 3. CLONAS AL AZAR DEL BANCO C1..... | 42 |
| TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DEL BANCO C1..... | 42 |
| TABLA 5. CLONAS GANADORAS DEL BANCO C1..... | 43 |
| TABLA 6. CRACTERÍSTICAS DE LAS CLONAS GANADORAS DEL BANCO C1..... | 44 |
| TABLA 7. CLONAS AL AZAR DEL BANCO C2O..... | 46 |
| TABLA 8. CARACTERÍSTICAS DEL BANCO C2O..... | 47 |
| TABLA 9. CLONAS GANADORAS DEL BANCO C2O..... | 47 |
| TABLA 10. CRACTERÍSTICAS DE LAS CLONAS GANADORAS DEL BANCO C2O..... | 48 |
| TABLA 11. CLONAS AL AZAR DEL BANCO C2H..... | 50 |
| TABLA 12. CLONAS PARENTALES DEL BANCO C2H..... | 51 |
| TABLA 13. CARACTERÍSTICAS DEL BANCO C2H..... | 52 |
| TABLA 14. CLONAS GANADORAS DEL BANCO C2H..... | 52 |
| TABLA 15. CRACTERÍSTICAS DE LAS CLONAS GANADORAS DEL BANCO C2H..... | 53 |
| TABLA 16. FRECUENCIA DE APARICIÓN DE MUTACIONES EN CLONAS DEL BANCO C2O..... | 60 |
| TABLA 17. MUTANTES POSIBLES, ACTIVAS E INACTIVAS..... | 63 |

La evolución dirigida ha permitido novedosos avances en la producción de enzimas con cambio de especificidad, incrementos de actividad y de estabilidad. La ventaja que presenta sobre la ingeniería de proteínas es que no se requiere información *a priori* de la influencia de los componentes estructurales en la función de las proteínas. El objetivo de las técnicas de evolución *in vitro* es imitar los procesos naturales de evolución mediante ciclos de mutagénesis al azar y selección de las proteínas con la función deseada. Entre las estrategias más utilizadas para la generación de diversidad está el PCR sexual (*DNA shuffling*) que permite la recombinación de alelos y la adquisición de nuevas mutaciones.

En los trabajos de evolución dirigida se recombinan no más de diez secuencias ganadoras garantizando la acumulación de mutaciones benéficas y eliminación de las deletéreas. Un modelo teórico [Moore, 1997] de recombinación sugiere que al aumentar la diversidad de secuencias a recombinar aumenta la probabilidad de encontrar una variante con un incremento considerable de la característica seleccionada, dada la combinación de mutaciones neutras o deletéreas que en el caso de pocos alelos recombinados se hubiesen perdido.

Para este trabajo se logró reproducir la técnica de PCR sexual utilizando como modelo la evolución de la β -lactamasa TEM-1 hacia la hidrólisis de cefotaxima. Se realizaron dos ciclos independientes de evolución *in vitro* variando el número de secuencias parentales. En ambos casos se obtienen mutantes capaces de conferir a *E.coli* una resistencia a cefotaxima hasta 250 veces mayor que la secuencia de partida. Sin embargo, para el caso de mayor número de variantes recombinadas se obtienen mutantes con una distribución de resistencia por debajo de dicho límite.

Todas las variantes de TEM-1 capaces de hidrolizar cefotaxima aisladas en el presente trabajo convergen en la solución de resistencia a cefotaxima encontrada en otros trabajos de evolución dirigida y en la naturaleza.

OPTIMIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS

La biocatálisis ofrece grandes ventajas a diversos procesos industriales ya que las enzimas poseen alta actividad y especificidad en condiciones moderadas de temperatura, presión y pH, las reacciones se llevan a cabo en soluciones acuosas sin necesidad de ambientes altamente oxidantes o reductores, permitiendo así incluso procesos no contaminantes. Sin embargo, las propiedades de las enzimas disponibles en la naturaleza no son generalmente las óptimas o las suficientes para los procesos industriales.

INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

A partir del desarrollo de la ingeniería genética, la estrategia que se utilizó para la optimización de propiedades de las enzimas fue la ingeniería de proteínas. Esta estrategia consiste en el diseño y generación de mutaciones en el gene que codifica para la proteína por mutagénesis sitio dirigida, dando lugar a modificaciones en los aminoácidos que se consideran responsables de la propiedad a optimizar. El fin último de la ingeniería de proteínas es el diseño *de novo* de enzimas. Para este tipo de trabajo se requiere el conocimiento previo de la influencia de los componentes estructurales en la función de una proteína. Desafortunadamente hay poca información disponible en comparación a la cantidad de enzimas cuyas propiedades se desean optimizar y los procesos requieren muchas horas de trabajo y de la ayuda de equipo costoso.

EVOLUCIÓN DIRIGIDA

El proceso evolutivo natural ha sido capaz de optimizar macromoléculas. Basado en esta idea, en la década de los noventas surge un nuevo enfoque para la optimización de propiedades de las proteínas opuesto al diseño racional, la evolución dirigida o *in vitro* [Stemmer, 1994 a y b; Chen, 1993]. Las técnicas de evolución dirigida imitan la evolución natural a través de ciclos de generación al

azar de diversidad y selección de las moléculas que tengan un cambio en la propiedad deseada. La presión selectiva se puede aplicar sólo a un tipo de molécula y no necesariamente a todo un organismo vivo, como sucede en la naturaleza. Este proceso no requiere información *a priori* y los resultados obtenidos en trabajos de mutagénesis al azar contribuyen a la base de datos necesaria para el diseño racional. El éxito de los experimentos de evolución *in vitro* depende de la existencia de un método adecuado de selección o tamizaje de la propiedad optimizada a partir de bancos con el mayor número de variantes posibles.

Generación de diversidad

La etapa fundamental de las técnicas de evolución dirigida es la generación de diversidad. La generación al azar de mutaciones múltiples a nivel de DNA se ha logrado a través de técnicas como la mutagénesis química [Sweasy, 1993], la utilización de oligonucleótidos al azar [Dube, 1993], la introducción de la secuencia problema a una cepa mutadora [Greener, 1996], reacciones de PCR con análogos de nucleótidos [Zaccolo, 1999], PCR mutagénica [Cadwell, 1992] y PCR sexual [Stemmer, 1994 a y b]. Las dos últimas técnicas han resultado ser las más efectivas y económicas.

PCR mutagénica

En las reacciones comunes de PCR, la Taq DNAPolimerasa introduce una mutación por cada 10^4 bases amplificadas. Se han diseñado protocolos para modificar la fidelidad de las reacciones alterando las condiciones de la reacción. Para generar diversidad se requiere incrementar la tasa de mutagénesis de la reacción y esto se ha logrado en diversas metodologías como: el incremento de la concentración de $MgCl_2$, la adición de cationes distintos al Mg^{2+} como el Mn^{2+} , el incremento de la concentración de la DNAPolimerasa, mayor tiempo de extensión [Cadwell, 1992], el desbalance de desoxinucleótidos trifosfato e incluso

la adición de compuestos orgánicos como el dimetil sulfóxido y el β -mercaptoetanol [Suzuki, 1997].

PCR Sexual [Stemmer, 1994 a y b]

Una buena estrategia evolutiva es aquella que simule lo que ocurre en los procesos naturales. El PCR sexual introduce un mecanismo que el resto de las técnicas de evolución *in vitro* han dejado fuera, la recombinación de alelos que permite la fijación y combinación de mutaciones benéficas, así como la segregación de las deletéreas.

El fundamento del PCR sexual se puede describir de la siguiente forma. Una población de genes con mutaciones puntuales se fragmenta al azar digiriendo con DNAsaI. Posteriormente se aíslan los fragmentos de 100 a 300 pares de bases y se someten a una reacción de PCR sin iniciadores que consiste en las tres etapas de una reacción común de PCR. El primer paso es la desnaturalización del DNA por un incremento de temperatura para obtener fragmentos de cadena sencilla. El segundo paso es la hibridación a baja temperatura de los fragmentos de cadena sencilla que participan como templado e iniciadores a la vez. Finalmente se incrementa la temperatura para activar la DNA-polimerasa que extenderá los extremos 5' del DNA utilizando la otra hebra de DNA como templado, permitiendo la recombinación de alelos y la introducción de nuevas mutaciones preferentemente al inicio de la extensión. Los extremos 3' permanecerán sin cambios. Estos tres pasos se repiten por múltiples ciclos. El tamaño promedio de los fragmentos de DNA se incrementa cada ciclo hasta obtener fragmentos del tamaño original que se amplifican en una nueva reacción de PCR agregando oligonucleótidos específicos. Los genes obtenidos habrán adquirido nuevas mutaciones además de haberse recombinado las mutaciones de los genes parentales. (FIGURA 1)

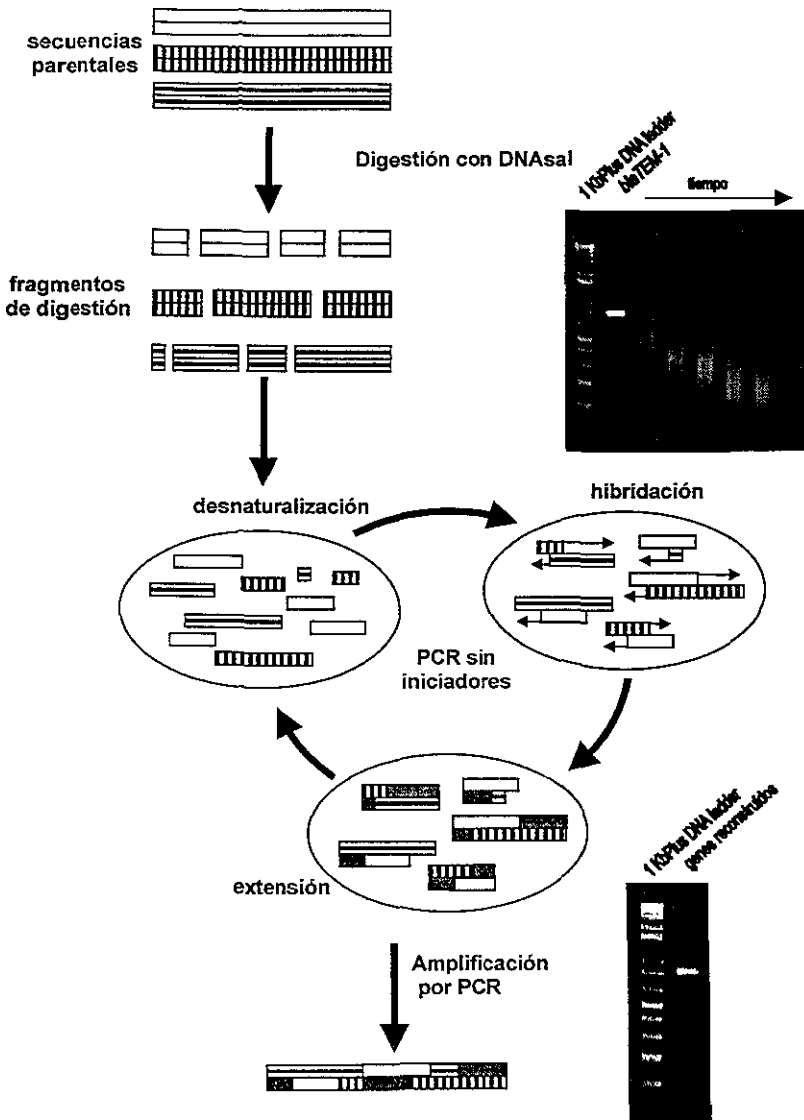


FIGURA 1. Un ciclo de PCR sexual consiste en la digestión con DNAsal de los genes parentales; la extracción de los fragmentos pequeños (100 a 300 pb) de un gel de agarosa, una reacción de PCR sin iniciadores en la que hay recombinación y adquisición de mutaciones puntuales y finalmente la amplificación por PCR de los fragmentos reconstruidos.

La tasa de mutagénesis en un experimento de PCR sexual depende del tamaño de los fragmentos adicionados a la reacción sin iniciadores [Stemmer, 1994a], así como de la fidelidad de la DNAPolimerasa utilizada. Se han diseñado protocolos para controlar la tasa de mutagénesis en los experimentos de PCR sexual que consisten en la adición de Mn^{2+} a la reacción de digestión con DNAsal para obtener fragmentos preferentemente de 50 pares de bases [Lorimer, 1995] así como la utilización de DNA polimerasas de alta fidelidad [Zhao, 1997].

IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES

No siempre resulta fácil implementar un método sensible para la identificación de las variantes generadas. Existen dos tipos de estrategias para realizar esta tarea, el tamizaje y la selección. Los sistemas de selección implican la expresión de la molécula problema en un organismo hospedero. En el caso del tamizaje se han desarrollado sistemas para realizarlo tanto *in vivo* como *in vitro*.

Tamizaje

Se llama tamizaje a aquellos procedimientos en los cuales se examina una propiedad específica a una población de organismos o de moléculas uno por uno [Glazer, 1995]. Existe una gran variedad de métodos de tamizaje desde sencillas reacciones colorimétricas acopladas a la actividad enzimática problema detectables visualmente o con espectroscopios específicos, formación de halo por degradación de componentes del medio de cultivo en placa, hasta la inmunodetección y la unión específica a moléculas inmovilizadas. Recientemente se han diseñado sistemas automatizados de tamizaje, que a pesar de ser muy costosos permiten la identificación un mayor número de variantes en menos tiempo.

Selección

La selección es un procedimiento en el cual únicamente los organismos con una propiedad particular pueden crecer [Glazer, 1995]. Los métodos de selección son útiles únicamente en la *optimización de enzimas directamente relacionadas con la supervivencia de la célula*, como aquellas que confieren resistencia a antibióticos, las involucradas en *vías metabólicas críticas*, las que catalizan la producción de nutrientes esenciales y las que permiten la proliferación en *condiciones hostiles*. *Un buen sistema de selección requiere que la actividad enzimática problema no interfiera con el metabolismo celular y que se pueda distinguir claramente de otras reacciones de la célula*. La selección permite examinar poblaciones mucho más grandes que el tamizaje, sin embargo, es *menos versátil y sensible*.

Constantemente se desarrollan técnicas para sobreponerse a las limitantes de los sistemas vivos, sobretodo el tamaño de los bancos que es posible analizar. *En E.coli se analizan bancos entre 10^5 y 10^8 variantes, sin embargo el sistema de despliegue en fagos filamentosos [Smith, 1985] permite analizar hasta 10^9 y el despliegue en ribosomas [Hanes, 1997] hasta 10^{13}* . Otra alternativa en desarrollo es el despliegue en micelas [Tawfik, 1998].

EXPLORACIÓN DEL ESPACIO DE SECUENCIA

Entre los requerimientos de los experimentos de evolución dirigida se encuentra la necesidad de generar bancos del mayor número de variantes posible para incrementar la probabilidad de encontrar las mutantes ganadoras. En términos más formales lo anterior se define como una mejor exploración del espacio de *secuencia de la proteína problema*.

EL ESPACIO DE SECUENCIA

Una proteína es un polímero lineal de combinaciones de los 20 aminoácidos orientada por sus extremos amino y carboxilo terminales. Todas las combinaciones de mutaciones posibles para una proteína de n residuos de aminoácido es 20^n . Cada posición puede ser mutada a cualquiera de los 19 aminoácidos restantes, por tanto, cada proteína tiene $19n$ proteínas vecinas a una mutación de distancia. El espacio de secuencia de una proteína es entonces un espacio multidimensional donde cada punto representa a una proteína rodeado por $19n$ puntos que representan a todas sus vecinas a una mutación de distancia. [Kauffman, 1993]

El tamaño promedio de las proteínas codificadas por el genoma de *E.coli* es de 317 residuos de aminoácido [Patthy, 1999], es decir su espacio de secuencia equivale a 20^{317} ó 10^{412} variantes. Materialmente es imposible tener tal cantidad de moléculas, y a la fecha se han logrado generar bancos de máximo 10^{13} variantes [Hanes, 1997]. De un banco de tal magnitud con la tasa de mutagénesis correcta podríamos aislar el 100% de las mutantes sencillas dobles y triples, y solamente el 10% de las cuádruples ya que el número de variantes incrementa aceleradamente con la tasa de mutagénesis, es decir, con la multiplicidad según la siguiente ecuación:

$$\text{variantes con } M \text{ mutaciones} = \frac{19^M W!}{(W-M)!M!} \quad \text{ec.1}$$

donde M es el número de mutaciones por secuencia y W el tamaño de la secuencia. Para una proteína de tamaño promedio en *E.coli* ($W= 317$ aa) se observa el siguiente comportamiento (TABLA1):

| TABLA 1. NÚMERO DE VARIANTES POSIBLES DE UNA PROTEÍNA DE 317 AA | |
|--|----------------------|
| MULTIPLICIDAD (M) | VARIANTES |
| 0 | 1 |
| 1 | 6023 |
| 2 | 1.8×10^7 |
| 3 | 7.2×10^{10} |
| 4 | 3.2×10^{14} |
| 5 | 1.5×10^{18} |

Ya que la exploración del espacio de secuencia siempre será parcial se debe de explorar de la forma más amplia e inteligente posible.

EL PAISAJE DE ADECUACIÓN

La relación entre el espacio de secuencia y la función de una proteína se representa en un paisaje de adecuación que se define como la distribución de una propiedad a lo largo de un conjunto [Kauffman, 1993]. El paisaje de adecuación se puede representar tridimensionalmente al graficar todos los puntos del espacio de secuencia de una proteína en un plano (xy) contra la adecuación de cada uno en el eje z. Para el caso de la actividad de una enzima, por ejemplo, observaríamos un paisaje rocoso donde las cimas de las montañas equivalen a una mayor actividad, es decir, a una mejor adecuación y los puntos sin elevación equivalen a enzimas carentes de actividad.

Los ciclos de evolución *in vitro* exploran aleatoriamente el paisaje de adecuación y el área explorada es determinada por la tasa de mutagénesis. Una vez encontrada una variante mejor adaptada, los ciclos sucesivos de evolución simulan un ascenso hacia la cima de una montaña en particular. Mientras se esté seleccionando positivamente nunca se descenderá limitando la exploración a la primera solución encontrada y pudiendo dejar fuera mejores soluciones, es decir, montañas de mayor altura.

β -LACTAMASAS

Por su importancia clínica, las β -lactamasas han sido motivo de amplio estudio generando suficiente información para utilizarlas como modelo en experimentos de evolución dirigida. Adicionalmente los modelos de selección de variantes resistentes a antibióticos resultan muy sencillos experimentalmente.

GENERALIDADES DE LA β -LACTAMASA TEM-1

La principal causa de resistencia bacteriana a antibióticos es la producción de β -lactamasas, enzimas que catalizan irreversiblemente la hidrólisis del enlace amida presente en los antibióticos β -lactámicos formando productos inactivos [Bush,1995]. Entre las β -lactamasas más frecuentes en bacterias gram negativas se encuentra la β -lactamasa TEM-1 capaz de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas, más no antibióticos de amplio espectro [Widemann, 1989]. Las cefalosporinas de amplio espectro no pueden ser inactivadas por la β -lactamasa TEM-1 ya que presentan cadenas laterales más voluminosas. A partir de la introducción de las cefalosporinas de tercera generación al mercado, se aislaron mutantes de la β -lactamasa TEM-1 capaces de conferir resistencia a estos nuevos antibióticos [Knox, 1995] que se han denominado β -lactamasas de amplio espectro o ESBLs (*Extended Spectrum β -lactamases*). Las mutantes resistentes a antibióticos de amplio espectro y a inhibidores aisladas clínicamente se pueden encontrar en una base de datos en la siguiente dirección: www.lahey.org/studies/webt.htm (APÉNDICE)

Las β -lactamasas se han clasificado en cuatro clases (A, B, C y D) de acuerdo a su estructura primaria [Ambler, 1980]. Las enzimas de las clases A, C y D pertenecen a la superfamilia de las peniciloil-serin-transferasas; las enzimas pertenecientes a la clase B se conocen como β -lactamasas metálicas. Las β -lactamasas clase A, clase a la que pertenece TEM-1, son proteínas

monoméricas de alrededor de 29 kDa formadas por dos dominios estructurales entre los que se encuentra el sitio activo. El primer dominio esta formado únicamente por hélices α y el segundo tanto por hélices α como por hojas β . (FIGURA 2)

EL SITIO ACTIVO DE LA β -LACTAMASA TEM-1

Alrededor del sitio activo de TEM-1 se encuentra una serie de elementos conservados en la familia de las peniciloil-serin-transferasas involucrados en el reconocimiento del sustrato y en el proceso catalítico. El primer motivo, SXXK, incluye a la Ser-70 catalítica y a la Lys-73 cuya cadena lateral apunta hacia el sitio activo y está involucrada en la reacción. El segundo motivo, SXN, se encuentra en el dominio α y forma una de las paredes del sitio activo. Tanto la Ser-130 como la Asn-132 apuntan hacia el sitio activo. En el dominio α/β se encuentra el tercer motivo, KTG, que forma la pared opuesta del sitio activo. Existe un puente de hidrógeno entre la Lys-234 del tercer motivo estructural y la Ser-130 del segundo. El cuarto elemento conocido como el asa ω contiene el motivo EXELN. La función del Glu-166 y la Asp-170 es fijar una molécula de agua cerca de la Ser-70 catalítica. Los datos cristalográficos muestran una densa red de puentes de hidrógeno en la cavidad del sitio activo. [Matagne, 1998; Knox, 1995]. (FIGURA 2)

MECANISMO CATALÍTICO

El mecanismo catalítico de las β -lactamasas consta de tres etapas: la formación del complejo no covalente de Michaelis, una reacción de acilación para formar el complejo acilo-enzima, y finalmente una desacilación para liberar el producto y la enzima restituida. (FIGURA 3)

En general, tanto la acilación (k_2) como la hidrólisis del complejo acilo-enzima (k_3) son rápidas, teniendo entonces valores altos de recambio (k_{cat}) y constante

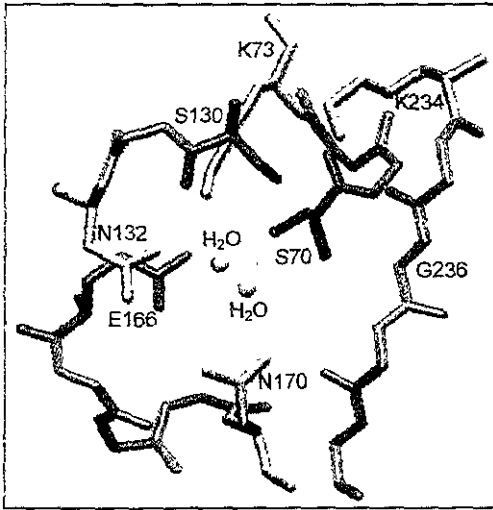
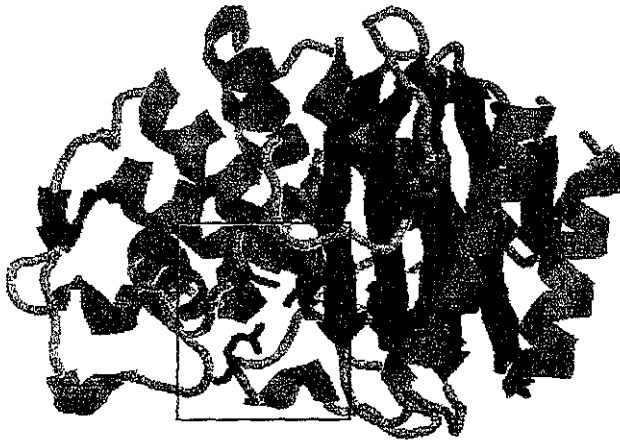


FIGURA 2. Representación de la estructura tridimensional de la β -lactamasa TEM-1 (1XPB) y detalles del sitio activo

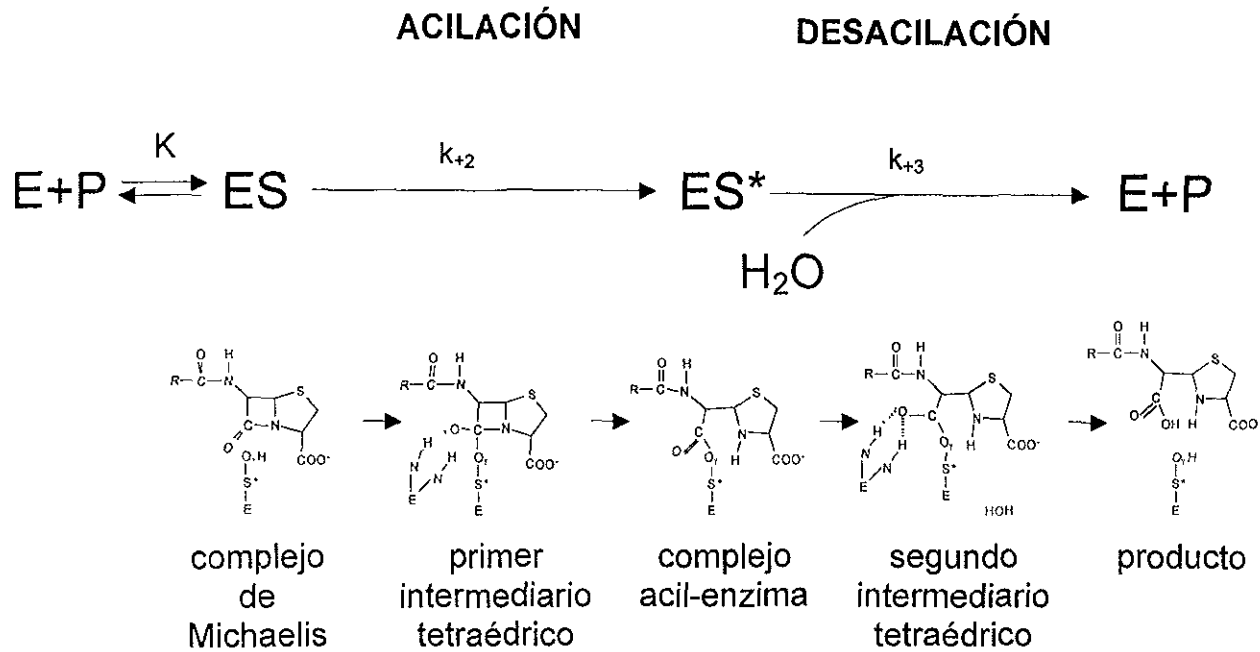


FIGURA 3. Mecanismo catalítico de la hidrólisis de β -lactámicos por las penicilil-serin-transferasas.

de especificidad (k_{cat}/k_m). La eficiencia catalítica de la enzima depende de ambos valores y no solamente de k_{cat}/k_m que representa la constante aparente de acilación y es independiente de la velocidad de desacilación [Matagne, 1998].

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$$

$$k_m = \frac{k_{-1} k_3 + k_2 k_3}{k_1 (k_2 + k_3)}$$

$$\frac{k_{cat}}{k_m} = \frac{k_2}{K'}$$

$$K' = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}}$$

Aunque se tiene información de que residuos están involucrados en la catálisis, no se ha logrado definir con precisión en que etapa o de que forma funcionan. La formación del complejo acilo-enzima implica un ataque nucleofílico del hidroxilo de la Ser-70 al carbono del carbonilo del sustrato β -lactámico. Para propiciar dicho ataque se espera que residuos vecinos incrementen el poder nucleofílico de la Ser-70, es decir que la activen. Los dos residuos que se han propuesto como activadores son el Glu-166 sólo o a través de una molécula de agua [Lamotte-Brasseur, 1991; Strynadka, 1992; Juteau, 1992] y en otro caso la Lys-73 [Strynadka, 1992 y 1996]. Para la etapa de desacilación es más clara la activación de una molécula de agua por el Glu-166. Durante las etapas de acilación y desacilación se forman intermediarios tetraédricos en los que el oxígeno del carbonilo del sustrato β -lactámico está cargado negativamente. El oxanión es estabilizado en una cavidad formando puentes de hidrógeno con los grupos NH de la cadena principal de la Ser-70 y la Ala-237 [Lamotte-Brasseur, 1991; Strynadka, 1992; Juteau, 1992].

El grupo del Dr. Lorenzo Segovia está interesado en el estudio de las relaciones estructura-función en proteínas. A través de estrategias de evolución dirigida se tratan de entender los mecanismos y las rutas que operan en la evolución de las proteínas, utilizando como modelo a las β -lactamasas.

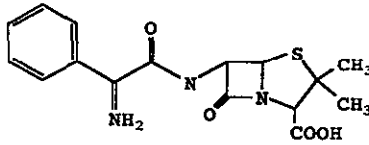
EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LA β -LACTAMASA TEM-1 HACIA LA HIDRÓLISIS DE CEFOTAXIMA

Hasta la fecha se han reportado tres técnicas distintas de evolución dirigida que utilizan como modelo la evolución de la β -lactamasa TEM-1 hacia la hidrólisis de cefotaxima, una cefalosporina de tercera generación no hidrolizable por TEM-1. (FIGURA 4)

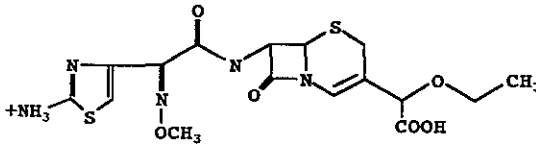
PCR SEXUAL DE LA β -LACTAMASA

En 1994 W. Stemmer publica los primeros resultados de evolución de TEM-1 hacia la hidrólisis de cefotaxima mediante ciclos de PCR sexual [Stemmer, 1994b]. Realiza tres ciclos sucesivos de PCR sexual (descrito en la sección anterior) al gene de TEM-1 con su región promotora seleccionando las variantes, clonadas en el vector p182Sfi y transformadas en *E.coli* XL1-blue, en concentraciones crecientes de cefotaxima hasta obtener una mutante capaz de conferir una resistencia 16000 veces mayor que el gene silvestre. Para el segundo y tercer ciclo de PCR sexual utiliza como templado más de cien colonias resistentes a cefotaxima. El nivel de resistencia al antibiótico se determina *in vivo* mediante un ensayo de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria, ver Materiales y Métodos). Posteriormente realizó dos ciclos de retrocruza por PCR sexual con el gene silvestre obteniendo una mutante 32000 veces más resistente. La tasa de mutagénesis reportada para esta técnica es de 0.7%. (FIGURA 5)

La mutante ST-1 aislada después de tres ciclos de PCR sexual con una CMI de 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima contiene 8 mutaciones de las cuales una se localiza en

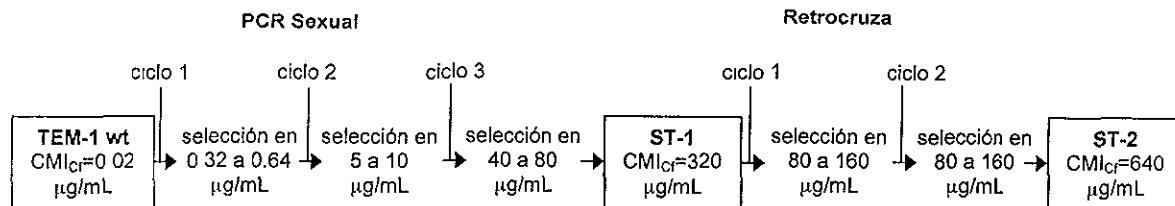


AMPICILINA
(sustrato hidrolizable por TEM-1)



CEFOTAXIMA
(sustrato NO hidrolizable por TEM-1)

FIGURA 4. Antibióticos β-lactámicos. La ampicilina es una penicilina y la cefotaxima es una cefalosponna de tercera generación



| CLONA | GENOTIPO |
|-------|--|
| ST-1 | g4205a , t3959a, g3934a, g3713a, a3689g, A18V, E104K, M182T, G238S |
| ST-2 | g4205a , t3842g, a3767g , A42G, G92S, E104K, M182T, G238S, R241H |

FIGURA 5. Estrategia experimental seguida por Stemmer para la evolución dirigida de la β -lactamasa TEM-1 hacia la hidrólisis de cefotaxima. En la parte inferior se detalla el genotipo de las clonas seleccionadas. En minúsculas se indican las mutaciones silenciosas y en negritas la mutación en la región promotora.

la región promotora, cuatro dan cambio de aminoácido (E104K, G238S, M182T y A18V) y cuatro más son silenciosas.

La mutante ST-2 aislada después de dos ciclos de retrocruza con una CMI de 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima también contiene 9 mutaciones: la misma mutación que ST-1 en la región promotora; seis mutaciones que dan cambio de aminoácido, tres nuevas y tres heredadas de ST-1 (A42G, G92S, E104K, G238S, M182T y R241H) y dos mutaciones silenciosas.

Para determinar cuales mutaciones eran las responsables del fenotipo observado realizó tres construcciones por mutagénesis sitio dirigida. La variante ST-3 carece de las dos mutaciones silenciosas de ST-2 y presenta el mismo fenotipo. La variante ST-4 (equivalente a la secuencia madura de TEM-52) contiene los cambios E104K, G238S, M182T y el de la región promotora, presentando una CMI de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Adicionalmente realiza una construcción equivalente a TEM-15 (E104K, G238S) pero con la mutación en el promotor que también presenta una CMI de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalmente concluye que el fenotipo observado se debe a las seis mutaciones que dan cambio de aminoácido en ST-2 más la mutación en el promotor.

PCR HIPERMUTAGÉNICA CON ANÁLOGOS DE NUCLEÓTIDOS

M. Zaccolo reportó una PCR hipermutagénica con análogos de nucleótidos utilizando el modelo evolutivo de obtención de variantes de TEM-1 capaces de hidrolizar cefotaxima [Zaccolo, 1999]. El número de ciclos de PCR con los análogos de nucleótidos trifosfato determina la tasa de mutagénesis. Inicialmente generó cuatro librerías de alrededor de 10^4 variantes (1A, 1B, 1C y 1D) con tasas de mutagénesis de 0.97%, 2.33%, 2.52% y 3.22%. Las variantes del gene completo de TEM-1 con su promotor fueron clonadas en el vector pBC SK+, transformadas en *E.coli* AceI y seleccionadas en 0.1 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima. De cada librería aisló la variante capaz de conferir la más alta CMI de cefotaxima y realizó dos ciclos adicionales de evolución a las mutantes 1A.1 y 1D.5 seleccionando en 1 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima, para el segundo ciclo, y 20

a 100 µg/mL de cefotaxima para el tercero. Finalmente aisló de los bancos 3A y 3D variantes 2500 y 20000 veces más resistentes a cefotaxima que TEM-1, respectivamente. (FIGURA 6)

Las cuatro variantes aisladas del primer ciclo de mutagénesis a partir de librerías independientes contienen los siguientes cambios:

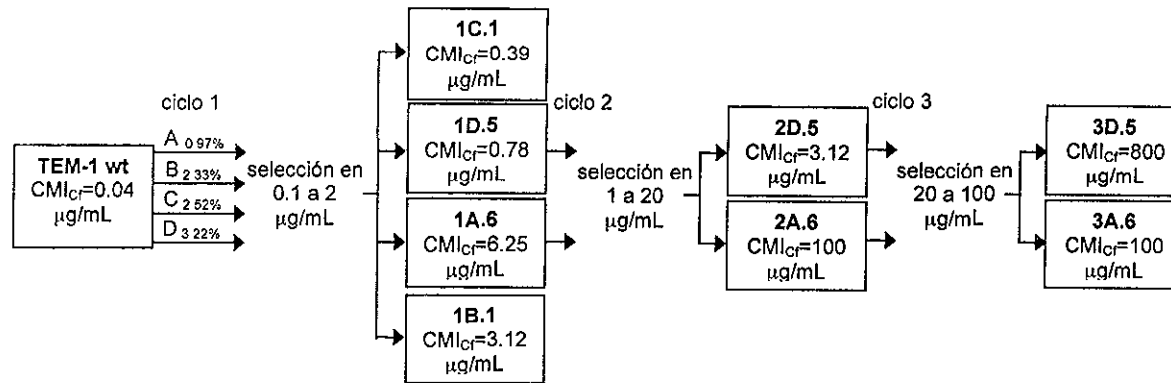
- 1C.1, con CMI de 0.39 µg/mL, posee únicamente la mutación E240G
- 1D.5, con CMI de 0.78 µg/mL, es equivalente a TEM-12 (R164S)
- 1A.6, con CMI de 6.25 µg/mL de cefotaxima, posee una mutación silenciosa y tres que dan cambio de aminoácido (G238S, R241H y D254G)
- 1B.1, con CMI de 3.125 µg/mL sólo contiene un cambio (G238S) y resulta equivalente a TEM-19

Después de someter las variantes 1A.6 y 2D.5 a un segundo ciclo de mutagénesis obtuvo las variantes:

- 2A.6 que adquirió la mutación E240K y conservó todas la de la secuencia parental 1A.6 y
- 2D.5 que adquirió una mutación en el promotor, dos mutaciones silenciosas y el cambio E104K conservando la mutación única de la secuencia parental 1D.5. *Esta variante es equivalente a TEM-26 sin considerar la mutación en el promotor.*

Al someter la mutante 2A.6 al tercer ciclo de mutagénesis se acumuló una mutación en el promotor, distinta a la encontrada en 2D.5, conservándose los cambios de la secuencia parental pero no se obtuvo un incremento de CMI.

La mutante 3D.5 obtenida en el tercer ciclo a partir de 2D.5, presenta una CMI de 800 µg/mL y adquirió las mutaciones M182T y G238S; sin embargo, no conservó todas las mutaciones de la secuencia parental, revirtió el cambio R164S. A pesar de que una reversión es poco probable se ha demostrado que las mutaciones G238S y R164S son dos soluciones distintas y excluyentes durante la evolución hacia la hidrólisis de cefotaxima [Giakkoupi, 2000]. Esta mutante es equivalente a TEM-52 y a la clona ganadora de Stemmer, ST-2, excepto por la mutación en el promotor. Zaccole realizó los ensayos de CMI con gotas de 10⁴ UFCs, obteniendo valores más altos en comparación a la técnica



| CLONA | GENOTIPO |
|-------|--|
| 1C.1 | E240G |
| 1D.5 | R164S |
| 1A.6 | Q90*, G238S, R241H, D254G |
| 1B.1 | G238S |
| 2A.6 | Q90*, G238S, E240K, R241H, D254G |
| 2D.5 | t4216g , V84*, T133*, E104K, R164S |
| 3A.5 | c4210t , Q90*, G238S, E240K, R241H, D254G |
| 3D.5 | t4216g , V84*, T133*, E104K, M182T, G238S |

FIGURA 6 Estrategia experimental seguida por Zaccolo para la evolución de TEM-1 hacia la hidrólisis de cefotaxima. La generación de variantes se realizó con PCR mutagénico con análogos de nucleótidos. En la parte inferior se detalla el genotipo de las clonas seleccionadas. En negritas las mutaciones en el promotor.

utilizada por W.P.C. Stemmer (ver materiales y métodos). Al comparar las dos mutantes M. Zaccolo observó que tienen CMI y parámetros cinéticos comparables, teniendo ST-2 valores ligeramente más altos.

EVOLUCIÓN *in vivo* CON FAGÉMIDOS EN CEPAS MUTADORAS

En el tercer reporte de evolución de TEM-1 hacia la hidrólisis de cefotaxima se utiliza como sistema de mutagénesis al azar la cepa mutadora KH1366 de *E.coli* [Long-McGie, 2000]. Realizaron 23 ciclos de mutagénesis y selección que consistieron en infectar la cepa KH1366 con fagémidos empacados pLITMUS (que contiene a *blaTEM-1* con su promotor) y el fago auxiliar M13, posteriormente se seleccionaron la células infectadas con ambos vectores y finalmente se realizó la selección en cefotaxima. Los fagémidos aislados de los cultivos de alrededor de 10^6 células con mayor concentración de cefotaxima y fago auxiliar fresco se utilizaron para infectar células nuevas, iniciando la siguiente generación. Todos los cultivos se propagaron en medio líquido, por tanto, siempre trabajaron con poblaciones de mutantes. La caracterización de mutantes individuales se realizó aislando 6 UFC de células XL1-Blue infectadas con los fagémidos empacados de las generaciones 6, 11 y 23 a las que posteriormente se les determinó secuencia y CMI de cefotaxima. Para analizar la reproducibilidad de la técnica realizaron la evolución durante 23 generaciones en dos series independientes obteniendo resultados muy similares, es decir, variantes 500 y 1000 veces más resistentes a cefotaxima que TEM-1. (FIGURA 7) Las variantes aisladas de las generaciones 6, 11 y 23 de evolución de pLITMUS28 a pesar de conferir distinta CMI, tienen las mismas mutaciones en *blaTEM-1*. Estas variantes resultan idénticas a TEM-15 y poseen los cambios E104K y G238S.

Durante la evolución de pLITMUS39 se observa con claridad la acumulación de mutaciones benéficas a través de las generaciones. La mutante pLIT39-6, con CMI de 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima presenta el cambio G238S, siendo equivalente a TEM-19. La variante aislada de la generación 11 adquiere el cambio E104K y

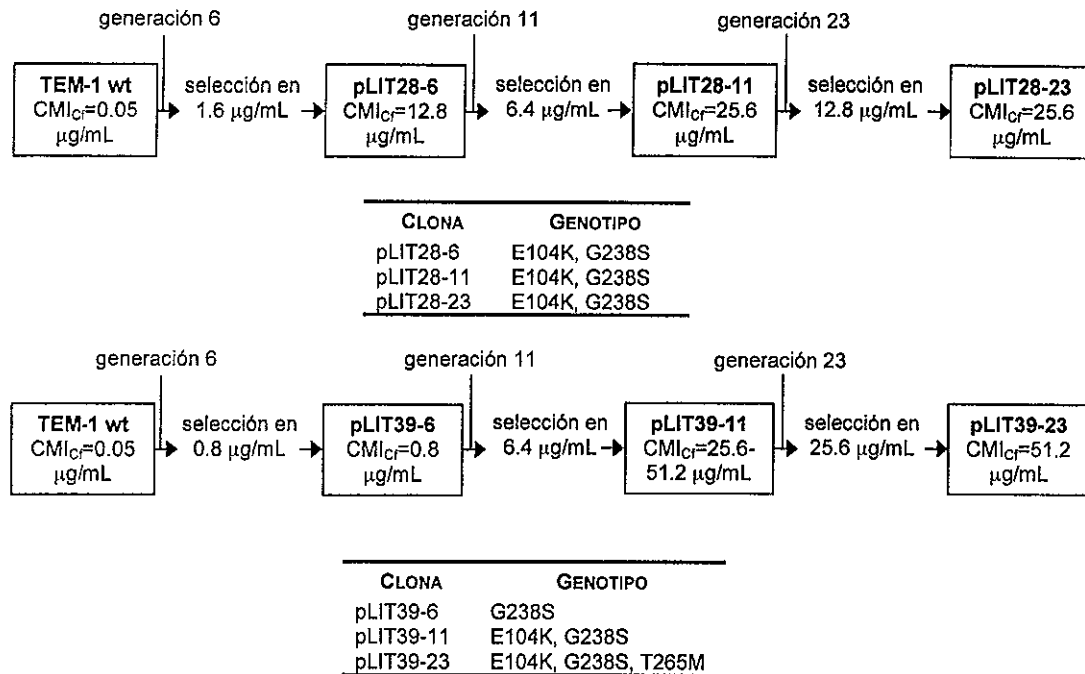


FIGURA 7. Estrategia de evolución *in vivo* utilizada por Long-McGie para la obtención de mutantes de TEM-1 capaces de hidrolizar cefotaxima en dos experimentos independientes. En las tablas se indican las mutaciones encontradas en las variantes seleccionadas de los generaciones 6, 11 y 23

confiere una CMI de 25.6 a 51.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al cabo de 23 generaciones logran aislar una variante equivalente a TEM-4 (E104K, G238S, T265M)^Q con una CMI de 51.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima.

ESTRATEGIAS DE RECOMBINACIÓN *in vitro* [Moore, 1997]

En 1997 se publica un profundo análisis teórico-práctico de las ventajas y desventajas del PCR sexual que sugiere una serie de condiciones bajo las cuales podría ser más exitosa la evolución dirigida de una proteína [Moore, 1997]. A continuación se citan algunas de las indicaciones del grupo de F. Arnold que resultan relevantes para el presente trabajo.

LOS BENEFICIOS CLÁSICOS DE LA RECOMBINACIÓN EN LA EVOLUCIÓN

Utilizar la recombinación durante la evolución dirigida (e.g. PCR sexual) de una proteína permite utilizar más de una variante como secuencia parental para la siguiente generación. Lo contrario sucede durante la evolución en una población asexual (e.g. PCR mutagénica) donde sólo se utiliza la mejor variante, dejando fuera otras soluciones que tendrían que reaparecer en generaciones subsecuentes. Adicionalmente en la evolución de una población asexual se tiende a acumular mutaciones deletéreas que pueden provocar la terminación prematura de un linaje, ya que el único mecanismo para eliminarlas es la reversión de mutaciones. La recombinación, en cambio, permite la acumulación y fijación de mutaciones benéficas así como la eliminación de deletéreas.

^Q Long Mc-Gie, et al reportan como TEM-4 a la variante con los cambios E104K/G238S/T263M, sin embargo en la secuencia corregida con la numeración ABL (Ambler) TEM-4 tiene los cambios E104K/G238S/T265M y el residuo 263 es una isoleucina

TASA DE MUTAGÉNESIS ÓPTIMA

Considerando que la mayoría de las mutaciones son deletéreas, una alta tasa de mutagénesis dará como resultado una librería con un alto porcentaje de variantes inactivas. La resistencia a mutaciones varía de una enzima a otra, entonces se debe adaptar la estrategia en función de la enzima que se esté utilizando. El grupo de F. Arnold [Moore, 1997] encuentra que la tasa de mutagénesis de 0.7% del PCR sexual es demasiado alta para la pNB esterasa ya que obtiene librerías donde el 80% de las variantes son inactivas. Reduciendo la tasa de mutagénesis a 0.04% utilizando una polimerasa de alta fidelidad logra reducir el porcentaje de variantes inactivas a 25%.

Al someter un conjunto de variantes con mutaciones benéficas a un ciclo de PCR sexual, se adquieren nuevas mutaciones además de recombinar las de las secuencias parentales. La tasa de mutagénesis puntual introducida durante el PCR sexual enmascara los efectos de las combinaciones de mutaciones benéficas. Un PCR sexual puramente recombinogénico simplificaría el análisis de combinaciones de mutaciones benéficas.

LA TENDENCIA A LA AUSENCIA DE MUTACIONES Y SUS IMPLICACIONES EN EL MUESTREO

Considerando un sistema de recombinación de N secuencias con un número total de M mutaciones, la probabilidad de obtener secuencias con μ mutaciones equivale al número de formas en que una secuencia con μ mutaciones se puede generar (C_{μ}^M) por la probabilidad de generarla:

$$P_{\mu} = C_{\mu}^M \left(\frac{1}{N}\right)^{\mu} \left(\frac{N-1}{N}\right)^{M-\mu}$$

$$P_{\mu} = \frac{M!}{(M-\mu)! \mu!} \left(\frac{1}{N}\right)^{\mu} \left(\frac{N-1}{N}\right)^{M-\mu} \quad \text{ec.2}$$

Para este modelo se asume que todas las mutaciones son únicas, que se encuentran suficientemente separadas para poderse recombinar y que la mezcla de secuencias parentales es equimolar.

Al analizar con este modelo el comportamiento de la recombinación de secuencias con una sola mutación y con $N=M$ se encuentra que entre el 73 y el 75% de las variantes generadas equivale a las secuencias parentales o a la secuencia silvestre de partida, es decir, sólo el 25% de las mutantes generadas son nuevas. Se hace evidente que la probabilidad de generar secuencias nuevas disminuye al incrementar el número de secuencias parentales.

(FIGURA 8)

Las probabilidades reducidas de generar secuencias nuevas tienen una implicación directa sobre el muestreo, que es una limitante experimental (ver introducción). La probabilidad de generar la secuencia más rara (P_M), es decir, aquella en que se combinen todas las mutaciones ($\mu=M$) es $1/N^M$. Para tener la certeza de encontrar la variante ganadora, debemos estar seguros de haber muestreado a la variante más rara. El tamaño de la muestra requerida para encontrar a la variante más rara es descrita por:

$$S < \frac{\ln(1-i.c.)}{\ln(1-P_M)} \quad \text{ec.3}$$

donde *i.c.* es el intervalo de confianza y *S* es el tamaño de la muestra. El tamaño de la muestra incrementa drásticamente al disminuir la probabilidad de generar la variante más rara (P_M).

EFFECTO DEL NÚMERO DE VARIANTES RECOMBINADAS

F. Arnold [Moore, 1997] realiza una simulación computacional para analizar el efecto del número de secuencias recombinadas en el tamaño de la muestra requerida para aislar variantes más activas que las secuencias parentales. Realiza 15 repeticiones de la simulación de la recombinación de cinco y de diez secuencias con $N=M$ asumiendo que todas las mutaciones son únicas, benéficas y aditivas. Aunque el comportamiento real de un experimento de este tipo resulta mucho más complejo los resultados obtenidos en esta simplificación son muy interesantes. (FIGURAS 9A, 9B Y 9C)

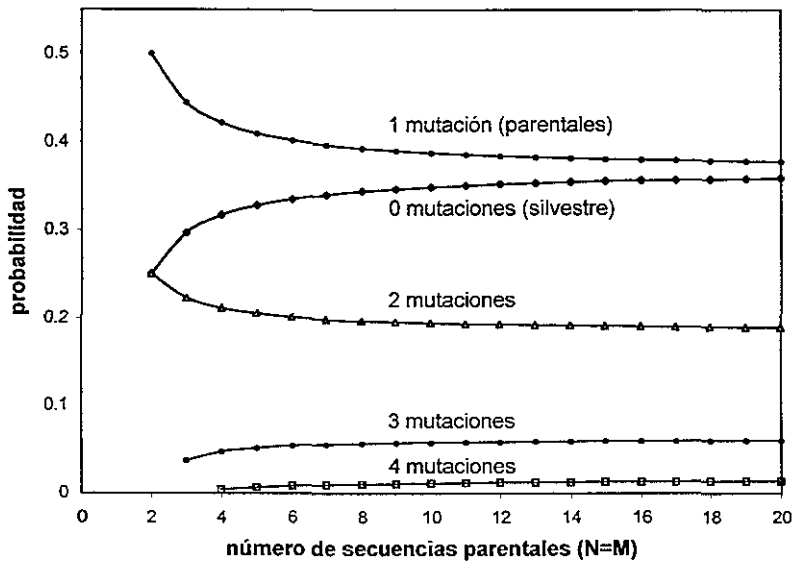


Figura 8. Probabilidad de generar secuencias con distinta multiplicidad mediante la recombinación de secuencias parentales con una sola mutación. Gráfico realizado sustituyendo valores de $N=M$ en la ecuación 2. Figura tomada de [Moore, 1997].

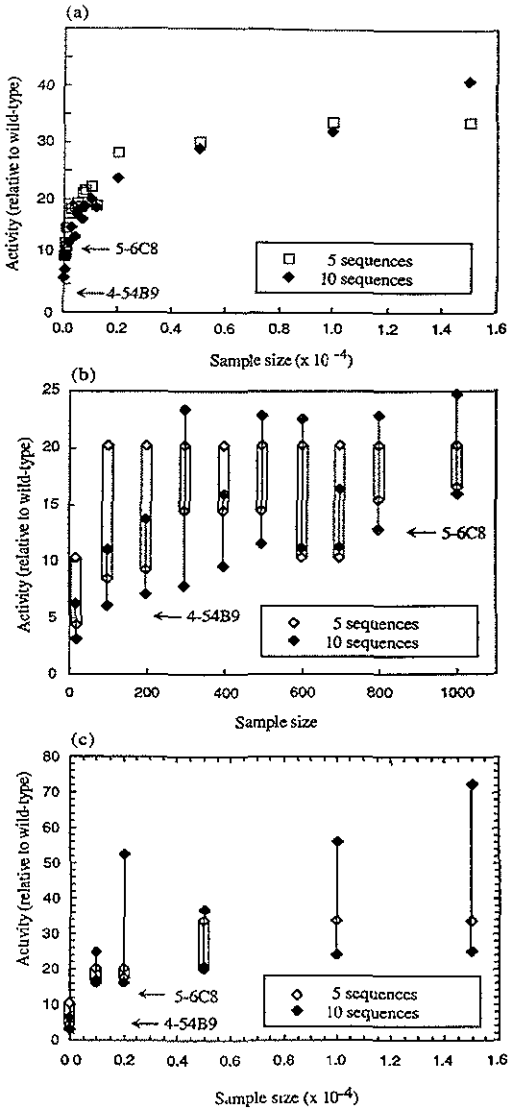


FIGURA 9A. Promedio de los valores más altos de actividad obtenidos mediante la simulación de la recombinación de diez y de cinco secuencias parentales con $N=M$.

FIGURA 9B. Rango de valores de actividad obtenidos mediante la simulación de la recombinación de diez y de cinco secuencias parentales con $N=M$.

FIGURA 9C. Rango de valores de actividad en escala ampliada.

Todas las figuras fueron tomadas de [Moore, 1997]

Resulta evidente que con muestras pequeñas se obtienen mejores resultados recombinando 5 secuencias. Para este estudio se utilizó el tamizaje, pero una estrategia de selección permite analizar muestras de mayor tamaño pudiendo aislar variantes con incrementos más drásticos de actividad resultantes de la recombinación de diez secuencias parentales.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la influencia del número de secuencias parentales en la generación de variantes con una actividad optimizada por PCR sexual.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Reproducir la técnica de mutagénesis al azar y recombinación: PCR sexual (DNA *shuffling*).
- Realizar por lo menos dos ciclos de evolución dirigida a la β -lactamasa TEM-1 hacia la hidrólisis de cefotaxima.

CULTIVOS CELULARES

Para este trabajo se utilizó la cepa de *E.coli* XL1Blue-MRF'. Se prepararon células electrocompetentes [Tung, 1995] con eficiencias superiores a 1×10^8 transformantes por μg de DNA.

Para todos los cultivos en líquido o en placa se utilizó medio LB [Sambrook, 1989] con el antibiótico requerido en el experimento.

Los antibióticos utilizados fueron ampicilina (*Sigma*®) a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kanamicina (*Sigma*®) a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cefotaxima (*Sigma*®) en concentraciones variables.

Todos los cultivos se incubaron a 30 °C.

BIOLOGÍA MOLECULAR

PLÁSMIDOS

pBR322 [Bolívar, 1977]

Vector de clonación de 4361 pb que contiene los marcadores de resistencia a ampicilina y tetraciclina. Contiene el origen de replicación pMB1 para *E.coli*, haciéndolo un plásmido de bajo número de copias.

pT4 [construido en el laboratorio del Dr.Hilvert, ETH, Suiza; donado por J.Osuna]

Vector de expresión en *E.coli* de 2845 pb. Contiene el marcador de resistencia a kanamicina y origen de replicación pUC, siendo un plásmido de alto número de copias. También contiene al promotor transcripcional medianamente fuerte **ptrc**.

ELECTROFORESIS

Se utilizaron geles de agarosa grado DNA (*Bio-Rad*®) al 1% y al 2% en solución amortiguadora TAE [Sambrook, 1989]

REACCIONES DE PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 5 unidades de Taq-DNApolimerasa (*GibcoBRL*®) por cada 100 μL de reacción bajo las

siguientes condiciones: 40 pmol de cada oligonucleótido por cada 100 μ L de reacción, $MgCl_2$ (*GibcoBRL*®) 1.5 mM, dNTPs (*GibcoBRL*®) 2.5 mM, solución amortiguadora (*GibcoBRL*®); 1 ciclo de desnaturalización (94 °C por 5 min), 30 ciclos de amplificación (94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) y 1 ciclo de extensión final (72 °C por 5 min) en un termociclador *Stratagene*®.

Algunas reacciones se realizaron en condiciones distintas que se indicarán posteriormente.

Todos los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

La pareja de oligonucleótidos tapón-sp y endXho permiten amplificar al gene completo de la β -lactamasa adicionando al inicio un sitio de restricción NcoI y al final el sitio XhoI.

Los oligonucleótidos pt4 y pt4-2 se diseñaron para determinar la secuencia de insertos clonados entre los sitios NcoI y XhoI del vector pT-4.

TABLA 2. OLIGONUCLEÓTIDOS

| NOMBRE | SECUENCIA 5'→3' |
|----------|---|
| tapón-sp | GTGGATCGTGGGCC ATG GCTATTCAACATTT C |
| endXho | CCGGCTCGAGTCA TTA CCAATGCTTAAT CAG |
| pt4 | <u>GACATATAAACGGTTCTGGCA</u> |
| pt4-2 | <u>GCCAGTGAATTGTAATACGAC</u> |

Los sitios de restricción se muestran en negritas

Los nucleótidos en cajas representan a los codones de inicio y término

Las nucleótidos subrayados indican las regiones de hibridación con el templado

PURIFICACIÓN DE DNA

Purificación de plásmidos

Se inoculó una colonia aislada en 3 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente y se incubó a 30 °C durante 16 h. Posteriormente se colectaron

las células por centrifugación y se purificó el plásmido por lisis alcalina, con soluciones y columnas de Roche® (*High Pure Plasmid Isolation Kit*).

Purificación de Productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron utilizando soluciones y columnas de Roche® (*High Pure PCR Product Purification Kit*).

Extracción de DNA de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA digerido para clonaciones y para el PCR sexual se extrajeron de geles de agarosa con soluciones y columnas de Qiagen® (*Qiaquick Gel Extraction Kit*).

PCR SEXUAL [STEMMER, 1994B]

Amplificación de genes parentales

Se amplificaron por PCR las secuencias seleccionadas con los oligonucleótidos pt4 y pt4-2.

Digestión con DNAsal

De 2 a 3 µg de una mezcla equimolar de productos PCR purificados se digirieron en solución amortiguadora (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM pH=7.4) con 1 unidad de DNAsal libre de RNAsa (Roche®) en un volumen de 50 µL y se incubaron a temperatura ambiente durante 5, 10 y 15 min para determinar las condiciones en que fragmentos de 100 a 300 pb fueran mayoritarios. Finalmente, los fragmentos se extrajeron de un gel de agarosa al 2%.

Recombinación y adquisición de mutaciones

Con los fragmentos de 100 a 300 pb purificados se realizó una reacción de PCR sin oligonucleótidos bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo (94 °C por 1 min), 40

ciclos(94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s y 72 °C por 30 s) y 1 ciclo (72 °C por 5 min).

Por ser esta la única reacción mutagénica, se utilizó $MgCl_2$ 2.5 mM.

Tanto el exceso como la baja concentración de fragmentos en esta reacción impiden la reconstrucción del gene, por tanto, para determinar las condiciones óptimas de la reacción se efectuaron dos reacciones una con 5 μ L y otra con 20 μ L de templado.

Amplificación del banco

Se amplificaron los fragmentos de 1107 pb en una reacción de PCR con los oligonucleótidos pt4 y pt4-2. Los productos obtenidos se purificaron antes de ser clonados.

CLONACIÓN

Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión con *Nco*I y *Xho*I (*New England Biolabs*®) se incubaron a 37 °C durante 16 h con la solución amortiguadora indicada por el proveedor. Los fragmentos obtenidos correspondientes al vector y al inserto se extrajeron de geles de agarosa.

Ligación

Las ligaciones se realizaron con la enzima T4-DNA ligasa (*Roche*®) incubando a 16 °C por 16 h en la solución amortiguadora (*GibcoBRL*®) para T4-DNA ligasa. Para aumentar la probabilidad de obtener la construcción correcta se adicionaron a las reacciones los fragmentos correspondientes al vector y al inserto en una relación molar 1:4; como aún con este exceso siempre hay una fracción de vector que se liga sobre sí mismo, ésta última se determina en una reacción control en las mismas condiciones pero sin inserto.

Transformación de células por electroporación

Se mezclaron 60 μL de células competentes *E.coli* XL1-blue MRF' con alrededor de 100 ng del DNA que debían incorporar en una celda de 0.1 cm y se sometieron a un choque eléctrico de 1.8 V en un electroporador (*Bio-Rad*®) ajustado a 25 μF y 200 Ω . Se recuperaron las células agitando durante una hora a 37 °C en 1 mL de medio SOC [Sambrook, 1989]. El mismo procedimiento se siguió utilizando la misma cantidad de DNA de la reacción control de autoligación.

Posteriormente se inocularon en placas de medio LB con el/los antibiótico/s correspondiente/s y se incubaron a 30 °C hasta encontrar colonias aisladas. A partir de colonias aisladas se realizaron cultivos en LB con antibiótico del que finalmente se purificó plásmido. El número de UFC de las placas del control de autoligación equivale a la fracción de plásmidos religados sobre sí mismos.

En todas las construcciones nuevas se verificó la presencia de un inserto del tamaño correcto por restricción con *Nco*I y *Xho*I y/o con una reacción de PCR con los oligonucleótidos pt4 y pt4-2.

CLONACIÓN DE BANCOS DE MUTANTES

Fueron necesarias algunas modificaciones al protocolo de clonación descrito anteriormente para poder generar bancos de por lo menos 15000 variantes. Con bancos de 15000 variantes se tendría el 95% de certeza de encontrar por lo menos todas las mutantes sencillas posibles de TEM-1. (ver antecedentes)

Digestión

Los genes mutantes se clonaron entre los sitios *Nco*I y *Xho*I del vector pT4- β (ver resultados) intercambiándose por el gene silvestre. Para reducir la fracción de autoligantes, el vector se digirió adicionalmente con *Pst*I (*New England Biolabs*®) durante 2 h a 37 °C. El sitio de restricción de *Pst*I está localizado aproximadamente a la mitad de *bla*TEM-1.

Ligación

Para la reacción de ligación se utilizaron concentraciones más altas de DNA, se agregaron alrededor de 2 μg de inserto a cada reacción, conservando la proporción vector:inserto 1 a 4. Se incubó la reacción en la solución amortiguadora para T4-DNAligasa (*New England Biolabs®*) con la que se observan mejores eficiencias de ligación. Para concentrar los productos de la reacción y eliminar el alto contenido de sales de la solución amortiguadora se realizó una extracción con butanol [Sambrook, 1989], posteriormente una precipitación con etanol al 70% [Sambrook, 1989] y finalmente se resuspendió en 10 μL de agua tetradestilada.

Transformación en células electrocompetentes

Los 10 μL de reacción de ligación se transformaron en tres partes iguales de forma independiente para reducir la inhibición de la eficiencia electrotransformación por la alta concentración de DNA. La recuperación de las tres alícuotas de células transformadas se realizó en 3 mL de medio SOC.

El tamaño del banco obtenido se determinó contando las UFC de una placa inoculada con 3 μL de las células en medio SOC (1/1000 del banco).

El resto de las células en medio SOC se inocularon en 30 mL de medio LB con kanamicina y se incubaron a 30 °C por 16 h para enriquecer el banco. De este cultivo se purificó el DNA plasmídico.

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES

Selección de mutantes ganadoras

a. Preselección

Se transformaron entre 0.5 y 1 μg del banco y una mutante del ciclo de mutagénesis anterior, como control, en células electrocompetentes. Después de recuperar las células, se hicieron las diluciones pertinentes en LB para inocular en placas de LB con kanamicina y concentraciones crecientes de cefotaxima el equivalente al tamaño del banco y diez veces el banco. El rango de

concentraciones de cefotaxima fue entre diez y cien veces la CMI promedio del ciclo de mutagénesis anterior. En aquellas placas con el banco 10 veces representado la probabilidad de encontrar todas las mutantes generadas es más del 95% [Moore, 1997], sin embargo, fue necesario inocular placas con el banco representado una sola vez ya que en concentraciones superiores a 10^6 células por placa se pueden encontrar falsas positivas.

Adicionalmente se inocularon en placas de LB con kanamicina entre 50 y 500 UFC para calcular con precisión el número de células inoculadas en cada placa de cefotaxima.

Las mutantes ganadoras, es decir, aquellas que hayan crecido en la concentración más alta de cefotaxima, fueron levantadas de la placa con una solución de Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH=8 y se les extrajo el DNA plasmídico.

b. Selección de mutantes ganadoras

Se transformaron 50 ng del DNA aislado de las mutantes ganadoras en células electrocompetentes. Después de recuperar las células transformadas se realizaron diluciones en LB para inocular alrededor de cien y de mil UFC por placa en placas de LB con kanamicina y con kanamicina/cefotaxima. El rango de las concentraciones de cefotaxima va desde la mitad hasta el triple de la concentración de la que se aisló el grupo de mutantes.

Se aislaron 10 mutantes ganadoras para cada banco de las que se purificó plásmido. Todas las mutantes fueron retransformadas para garantizar que el fenotipo observado fuera conferido por el plásmido y no por el cromosoma de la célula que lo contuviera.

Determinación de CMI

Se determinará la CMI de las mutantes en placas de LB con concentraciones crecientes de cefotaxima. Se inocularon gotas de 7 μ L de diluciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} de cultivos en LB con kanamicina a una A_{600nm} entre 0.8 y 1.1 de cada mutante en cada placa de cefotaxima. Se incubaron las placas a 30 °C por

24 h. Se consideró como la CMI aquella concentración de cefotaxima en la que desapareciera el crecimiento en una gota de 10 a 50 UFC.

Cálculo de la tasa de mutagénesis del banco

De cada banco se aislaron entre 5 y 10 clones al azar de placas de LB con kanamicina, es decir, sin seleccionar la capacidad de hidrolizar cefotaxima para obtener una muestra de las diversas mutaciones generadas. Posteriormente se purificó plásmido de cada clona, se verificó la presencia de inserto por PCR y se determinó su secuencia. La tasa de mutagénesis se calculó únicamente para el fragmento clonado (857 pb) de la siguiente manera:

$$\text{tasa de mutagenesis} = \frac{\text{pb mutadas}}{\text{pb totales}} \times 100$$

Secuenciación de mutantes

De cada mutante a secuenciar se realizó una reacción de PCR con Pfu-DNApolimerasa, una polimerasa de alta fidelidad, con los oligonucleótidos pT4 y pT4-2 bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo (5 min a 94 °C), 30 ciclos (1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C, 2 min a 72 °C) y 1 ciclo (10 min a 72 °C).

Todas las secuencias fueron determinadas en la Unidad de Secuencia del Instituto de Biotecnología, UNAM, con un secuenciador automático (*Perkin-Elmer*). Para cada reacción de secuencia se utilizaron 110 ng del producto de PCR purificado y 10 pmol de oligonucleótido. Con este sistema de secuenciación se pueden determinar con precisión alrededor de 600 pb por reacción. Para secuenciar completamente los productos de PCR de 1107 pb fueron necesarias dos reacciones de secuencia para cada mutante, en un caso con oligonucleótido pt4 y en el segundo con pt4-2.

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pT4- β

Para la selección de mutantes se requería clonar el gene de TEM-1 en un plásmido que confiriera resistencia a un antibiótico distinto a la ampicilina; con este fin se eligió al plásmido pT4 que contiene el marcador de resistencia a kanamicina.

Se amplificó por PCR únicamente la secuencia codificante para TEM-1 del plásmido pBR322 con los oligonucleótidos endXho y tapón-sp para introducir los sitios de restricción XhoI y NcoI. Se digirieron tanto el producto de PCR de 876 pb purificado como el vector pT4 (2845 pb) con las enzimas de restricción NcoI y XhoI. Los fragmentos de 2055 pb, correspondiente al vector, y 867 pb, correspondiente a *bla*TEM-1, se purificaron de un gel de agarosa al 1%.

Se realizó la ligación de los fragmentos con 4 moles de inserto por cada mol de vector. Se transformó 1 μ L de reacción en 60 μ L de células electrocompetentes XL1-blue. Se aislaron 3 colonias de placas de ampicilina y kanamicina de las que se purificó plásmido.

Para verificar la presencia del inserto en la construcción realizada se diseñaron y sintetizaron los oligonucleótidos pT4 y pT4-2 (TABLA 2). Estos oligonucleótidos hibridan 100pb arriba del codón de inicio y 100 pb debajo del codón de término de *bla*TEM-1, siendo útiles adicionalmente para la determinación de la secuencia completa de todas las variantes clonadas en el vector pT4- β (FIGURA 10).

Se realizaron reacciones de PCR con los nuevos oligonucleótidos así como digestiones con XhoI y NcoI a las tres clonas. En los tres casos se obtuvo la construcción esperada y se eligió una para realizar este trabajo.

En el diseño original del vector se planeaba tener a *bla*TEM-1 bajo su promotor natural, p₃, para evitar tener mutantes con una CMI elevada por una alta producción de la proteína y no necesariamente por una mejoría de actividad. La construcción obtenida posee un sitio de actividad estrella de XhoI que impide la clonación bajo el esquema diseñado. Sin embargo, se obtuvo una construcción exitosa al utilizar el mismo vector pero con el promotor p_{trc}, que es ligeramente más fuerte. Existen evidencias de intoxicación de células por algunas mutantes

de β -lactamasa expresadas bajo el promotor *ptrc*, efecto que se reduce al incubar las mutantes a 30°C [Osuna].

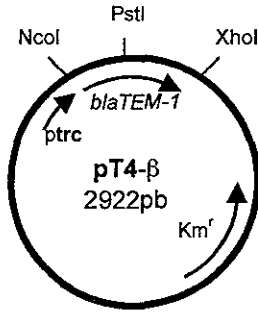


FIGURA 10A. Mapa del vector pT4-β.

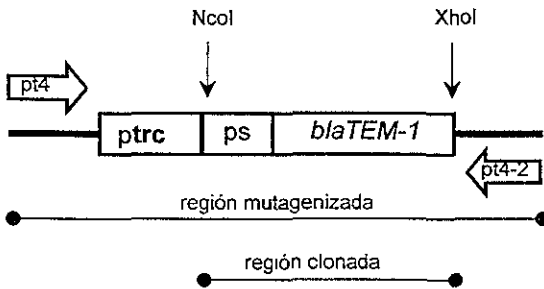


FIGURA 10B. Detalle de la construcción realizada para clonar variantes de bla_{TEM-1} ptrc es el promotor y ps el péptido señal para la exportación de TEM-1 a periplasma.

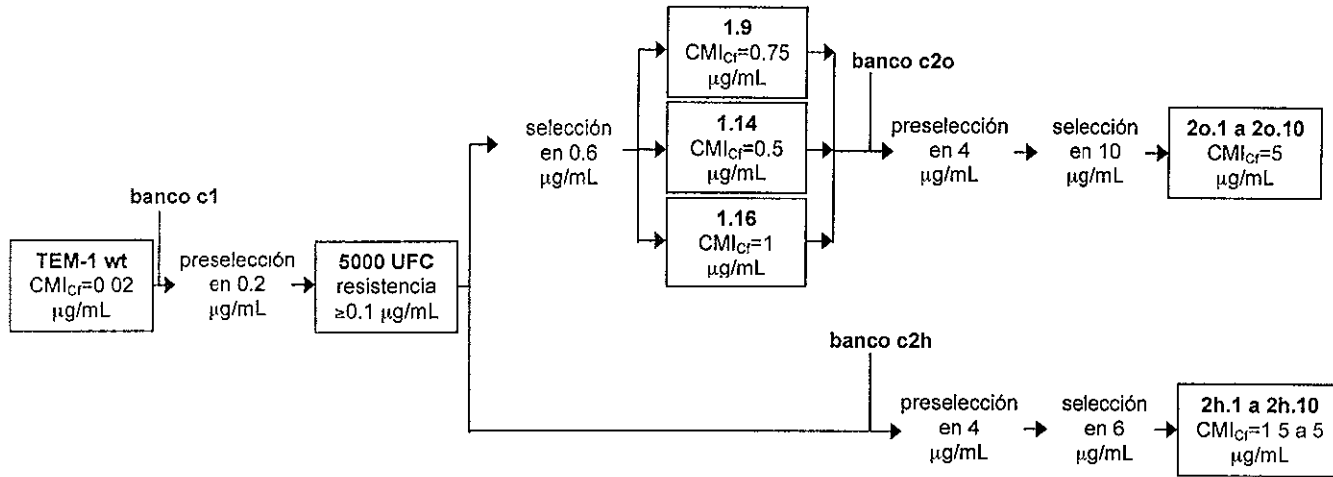


FIGURA 11. Estrategia experimental utilizada para la evolución dirigida de la β -lactamasa TEM-1 hacia la hidrólisis de cefotaxima. Se realizaron tres ciclos de evolución que consisten en la generación de variantes por PCR sexual y la selección en concentraciones crecientes de cefotaxima. Los recuadros señalan las clonas parentales y las clonas ganadoras de cada banco.

OBTENCIÓN DEL BANCO C1

La secuencia de partida para el primer ciclo de PCR sexual fue el gene silvestre *blaTEM-1*. Se obtuvo un banco de 3.5×10^5 mutantes de las cuales el 25.71% contenían el vector ligado sobre sí mismo, por tanto, el tamaño de banco efectivo fue de 2.6×10^5 variantes.

PRESELECCIÓN

La preselección del banco se realizó en placas con kanamicina y $0.2 \mu\text{g/mL}$ de cefotaxima con inóculos de 6.8×10^7 , 6.8×10^6 ó 6.8×10^5 UFC, es decir, que se representó el banco alrededor de 250, 25 y 2.5 veces. Aproximadamente el 0.008% del banco resultó ser resistente a ésta concentración de cefotaxima. Se purificó plásmido de alrededor de 5000 mutantes preseleccionadas en una placa con $0.2 \mu\text{g/mL}$ de cefotaxima

Como control se inocularon en placas con la misma concentración de cefotaxima 4×10^8 , 4×10^7 ó 4×10^6 UFC transformadas con el gene silvestre. En ninguna de estas placas se observó crecimiento.

SELECCIÓN

Se transformaron células frescas con el DNA purificado durante la preselección. Se inocularon 2000, 200 y 20 UFC en placas con kanamicina y 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 ó $2 \mu\text{g/mL}$ de cefotaxima. El 96% de las mutantes resultó resistente a $0.1 \mu\text{g/mL}$ de cefotaxima y el 0.5% a $0.6 \mu\text{g/mL}$, siendo ésta la concentración más alta en la que se observó crecimiento. De una placa con $0.6 \mu\text{g/mL}$ de cefotaxima se aislaron 10 mutantes para caracterizarlas.

Como control se utilizaron células transformadas con el gene silvestre. Se inocularon alrededor de 1600 UFC en placas con las mismas concentraciones de cefotaxima y en ninguna se observó crecimiento.

CARACTERIZACIÓN DEL BANCO

Las mutaciones encontradas en 10 clonas al azar (8610 pb secuenciadas) se presentan a continuación (TABLA 3):

| CLONA | GENOTIPO |
|-------|-----------------------------------|
| 1 1 | P62*/ L102*/ S124R/ A 125*/ A134* |
| 1.2 | V84A/ L122I/ A150T/ L200*/ P252* |
| 1.3 | S53G/ S203P/ R244* |
| 1.4 | L137*/ T140K/ R275N |
| 1.5 | K34E/ T188A |
| 1.19 | S222P |
| 1.20 | D157*/ W164R/ E274G |
| 1.21 | I3T/ del/ E63L |
| 1.22 | wt |
| 1 23 | S98T/ins |

* mutaciones silenciosas

Se encontró una secuencia silvestre (wt) así como una inserción (ins) y una deleción (del). Las tasas de mutagénesis en nucleótidos y en aminoácidos fueron de 0.29% y 0.55% respectivamente. El 84% de las mutaciones fueron transiciones y el 64% produjeron cambio de aminoácido. (TABLA 4)

| | |
|----------------------|-------|
| TASA DE MUTAGÉNESIS | |
| total en nucleótidos | 0.29% |
| total en aminoácidos | 0 55% |
| TRANSICIONES | 84% |
| CAMBIO DE AMINOÁCIDO | 64% |

CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES GANADORAS

En la tabla 5 se muestran los cambios encontrados en las 10 mutantes ganadoras aisladas de una placa con 0.6 µg/mL de cefotaxima, así como su CMI de cefotaxima.

TABLA 5. CLONAS GANADORAS DEL BANCO C1

| CLONA | GENOTIPO | CMI ₅₀ (µg/mL) |
|-------|---|---------------------------|
| 1.9 | E104K/ Y105H/ G238S | 0.75 |
| 1.10 | P27*/ G238S | 0.5 |
| 1.11 | E28*/ I47V/ G238S | 0.75 |
| 1.12 | G41*/ G238S | 0.5 |
| 1.13 | G238S | 0.5 |
| 1.14 | P22*/ S53*/ G238S | 0.5 |
| 1.15 | A17*/ G238S / G283* | 0.75 |
| 1.16 | A17*/ H26R/ G238S / E240K/ K256R | 1 |
| 1.17 | G238S / T265M | 0.75 |
| 1.18 | A17*/ Q90R/ G238S / T265M | 0.5 |

Se encontraron cinco mutantes idénticas en aminoácidos (1.10, 1.12, 1.13, 1.14 y 1.15) y todas, excepto la clona 1.15, presentan la misma CMI de cefotaxima. Esta variación es atribuible al error del experimento o a alguna ventaja conferida por las mutaciones silenciosas en el uso de codones, ya que en ningún caso se encontraron mutaciones en la región promotora.

El fenotipo se puede atribuir a la mutación G238S ya que es común a las 10 clonas ganadoras y es la única mutación de la clona 1.13. Es importante resaltar que esta mutación no se encontró en ninguna de las clonas aisladas al azar (TABLA 4), corroborando que la mutagénesis fue en efecto al azar y el banco no estaba contaminado con dicha mutación.

Las tasas de mutagénesis en nucleótidos y en aminoácidos de las mutantes ganadoras fueron 0.32% y 0.66% respectivamente. El 100% de las mutaciones

fueron transiciones y el 77% de las mutaciones obtenidas produjeron cambio de aminoácido. (TABLA 6)

| TABLA 6. CARACTERÍSTICAS DE LAS CLONAS GANADORAS DEL BANCO C1 | |
|--|-------|
| TASA DE MUTAGÉNESIS | |
| total en nucleótidos | 0.32% |
| total en aminoácidos | 0.66% |
| | |
| TRANSICIONES | 100% |
| CAMBIO DE AMINOÁCIDO | 77% |

OBTENCIÓN DEL BANCO C20

Para este segundo ciclo de mutagénesis se utilizaron como secuencias parentales tres mutantes ganadoras del ciclo anterior, las mutantes 1.9, 1.14 y 1.16. Se obtuvo un banco de 3.4×10^6 mutantes de las cuales el 0.7% contenían el vector ligado sobre sí mismo, por tanto, el tamaño de banco efectivo fue de 3.37×10^6 variantes.

PRESELECCIÓN

La preselección del banco se realizó en placas con kanamicina y 4, 6, 8 ó 10 $\mu\text{g/mL}$ de cefotaxima con inóculos de 4.26×10^6 y 4.26×10^5 UFC respectivamente, es decir, que se representó el banco 1.3 y 0.13 veces. Alrededor del 0.04% del banco resultó ser resistente a 4 $\mu\text{g/mL}$ de cefotaxima y el 0.001% a 10 $\mu\text{g/mL}$. Todas las UFC observadas tenían el tamaño normal. Como control se inocularon en placas con la misma concentración de cefotaxima 1.38×10^7 y 1.38×10^6 UFC transformadas con la mutante 1.16. En todas placas con mayor inóculo se encontraron más de 5000 colonias muy pequeñas. En las placas de menor inóculo se observaron de 1 a 3 manchas de colonias diminutas, excepto en la placa con 10 $\mu\text{g/mL}$ de cefotaxima en la que no hubo crecimiento. La aparición de pequeñas UFC en los controles se debe a la alta densidad de células.

SELECCIÓN

Se realizó la selección de 206 mutantes preseleccionadas en una placa con 4 $\mu\text{g/mL}$ de cefotaxima. Se inocularon 3140 y 314 UFC en placas con kanamicina y 2, 4, 6, 8 ó 10 $\mu\text{g/mL}$ de cefotaxima. El 100% de las mutantes resultó resistente a 2 y a 4 $\mu\text{g/mL}$ de cefotaxima y el 0.95% a 10 $\mu\text{g/mL}$. De una placa con 10 $\mu\text{g/mL}$ de cefotaxima se aislaron 10 mutantes para caracterizarlas. La clona 2o.2 se eliminó, pues tenía un inserto de tamaño superior al clonado.

Como control se utilizaron nuevamente células transformadas con la mutante 1.16. Se inocularon 6800 y 680 UFC en placas con las mismas concentraciones de cefotaxima y en ninguna se observó crecimiento.

CARACTERIZACIÓN DEL BANCO

Se determinó la secuencia de cinco clonas al azar (4305 pb) y se encontraron los siguientes cambios (TABLA 7):

TABLA 7. CLONAS AL AZAR DEL BANCO C20

| CLONA | GENOTIPO |
|-------|---|
| 2o.a | P22* / E37* / G87* / Q207* / A213* / G238S / E240K / G251R |
| 2o.b | S80P/ I95M/ E104K / Y105H / del/ G238S / E240K / K256R |
| 2o.c | A17* / H26R / G238S / R257C |
| 2o.d | P22* / C77* / G156E/ G238S / E240K / R277* |
| 2o.e | A17* / H26R / Y97H/ Y105H / G238S / I280T |

En negritas están indicadas las mutaciones presentes en las tres secuencias parentales. La mutación G238S era común a las tres secuencias parentales, por tanto, aparece en toda la progenie. Si las secuencias parentales fueron mezcladas equimolarmente el resto de las mutaciones deberán aparecer con una frecuencia de 1/3. El tamaño de la muestra es muy pequeño para observar tal efecto con precisión, sin embargo, en 5 clonas tomadas al azar se encuentran 8 de las 9 mutaciones de las secuencias parentales con una frecuencia de aparición de 1/5 a 3/5.

Este banco se generó a partir de una población de secuencias con una tasa de mutagénesis de 0.3% y el banco tiene una tasa total de 0.72%, por tanto, la tasa de mutagénesis introducida durante el PCR sexual fue de 0.42%. La tasa de mutagénesis en aminoácidos fue de 1.46%. El 96% de las mutaciones fueron transiciones y el 67% produjeron cambio de aminoácido (TABLA 8).

TABLA 8. CARACTERÍSTICAS DEL BANCO C20

| TASA DE MUTAGÉNESIS | |
|--------------------------|-------|
| inicial en nucleótidos | 0.30% |
| adquirida en nucleótidos | 0.42% |
| total en nucleótidos | 0.72% |
| total en aminoácidos | 1.46% |
| | |
| TRANSICIONES | 96% |
| CAMBIO DE AMINOÁCIDO | 67% |

CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES GANADORAS

Se determinaron las secuencias y la CMI de cefotaxima de las 9 clonas (7749 pb) aisladas de una placa con 10 µg/mL de cefotaxima que contenían un inserto del tamaño correcto. Se encontraron los siguientes cambios (TABLA 9):

TABLA 9. MUTANTES GANADORAS DEL BANCO C20

| CLONA | GENOTIPO | CMI _{C₂} (µg/mL) |
|-------|--|---|
| 2o 1 | P22*/ G78*/ E104K/ G238S/ K256R | 5 |
| 2o 3 | P22*/ S53*/ E104K/ G238S | 5 |
| 2o.4 | P22*/ E104K/ G238S | 5 |
| 2o.5 | P22*/ E104K/ P145*/ I173V/ P174*/ G238S/ end2* | 5 |
| 2o.6 | A17*/ P22*/ E104K/ H153*/ G238S/ I279* | 5 |
| 2o.7 | A17*/ E104K/ S130*/ G238S | 5 |
| 2o.8 | P22*/ H26*/ E104K/ G238S | 5 |
| 2o.9 | P22*/ P67*/ E104K/ G238S/ A186V | 5 |
| 2o 10 | M1R/ P22*/ E104K/ G238S | 5 |

Todas las mutantes caracterizadas presentan el mismo fenotipo. Aunque todas las mutantes son distintas en nucleótidos seis de ellas tienen la misma secuencia de aminoácidos. La mutación M1R en la 2o.10 no es producto de la mutagénesis del experimento, sino un defecto en la clonación ya que el sitio de

restricción NcoI utilizado para clonar incluye al codón de inicio (TABLA 2). En el caso de clona 2o.10, encontramos que el codón de inicio está mutado por arginina. Posiblemente la traducción de la proteína esté iniciando en el tercer codón, que es AUU y sí se ha reportado como codón de inicio en *E.coli* [www.ncbi.nlm.nih.gov].

La combinación de las mutaciones E104K y G238S son las responsables del fenotipo observado ya que están presentes en todas las mutantes. A pesar de que la mutación E104K se encontraba en la secuencia parental 1.9, debió de generarse una vez más en el último ciclo de mutagénesis ya que en 1.9 se encontraba acompañada una mutación en el siguiente codón (Y105H) y resulta improbable haberlas segregado.

Las tasas de mutagénesis en nucleótidos y en aminoácidos para las mutantes ganadoras son 0.54% y 0.85% respectivamente, ambas están por debajo del promedio del banco (0.72% y 1.46%). Lo anterior coincide con la observación de que solamente dos mutaciones eran necesarias para el fenotipo observado.

El 52% de las mutaciones produjeron cambio de aminoácido y el 97% fueron transiciones. (TABLA 10)

| TABLA 10. CARACTERÍSTICAS DE LAS CLONAS GANADORAS DEL BANCO C20 | |
|--|-------|
| TASA DE MUTAGÉNESIS | |
| total en nucleótidos | 0.54% |
| total en aminoácidos | 0.85% |
| TRANSICIONES | 97% |
| CAMBIO DE AMINOÁCIDO | 52% |

OBTENCIÓN DEL BANCO C2H

Las 5000 clonas preseleccionadas en el ciclo anterior (banco c1) se utilizaron como secuencias parentales para un segundo ciclo de mutagénesis. Estas clonas fueron aisladas de una placa con el banco c1 representado 250 veces, por tanto, se utilizaron como secuencias parentales alrededor de 20 clonas distintas.

Se obtuvo un banco de 1.08×10^6 mutantes de las cuales el 8% contenían el vector ligado sobre sí mismo, por tanto, el tamaño de banco efectivo fue de 9.93×10^5 variantes.

PRESELECCIÓN

La preselección del banco se realizó en placas de kanamicina y 2, 4 ú 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima con inóculos de 3×10^6 y 6.6×10^5 UFC respectivamente, es decir, que se representó el banco 3 y 0.6 veces. Alrededor del 0.002% del banco resultó ser resistente a $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima, el 0.0005% a $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ y no hubo crecimiento en $8 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Como control se inocularon en placas con las mismas concentraciones de cefotaxima 3.6×10^7 UFC transformadas con la mutante 1.16. En todas las placas se encontraron más de 5000 colonias muy pequeñas, por la alta densidad celular del inóculo.

SELECCIÓN

Se realizó la selección de 39 mutantes preseleccionadas en una placa con $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima. Se inocularon 3860 y 386 UFC en placas con kanamicina y 2, 4, 6, 8 ó $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima. El 100% de las mutantes resultó resistente a $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima y el 0.6% a $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. De una placa con $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima se aislaron 10 mutantes para caracterizarlas.

Como control se utilizaron nuevamente células transformadas con la mutante 1.16. Se inocularon 6800 y 680 UFC en placas con las mismas concentraciones de cefotaxima y en ninguna se observó crecimiento.

CARACTERIZACIÓN DEL BANCO

Se determinó la secuencia de 10 mutantes al azar (8610 pb) y se encontraron los siguientes cambios (TABLA 11):

| TABLA 11. CLONAS AL AZAR DEL BANCO C2H | |
|--|----------------------------------|
| CLONA | GENOTIPO |
| 2h.a | L30*/ V103F/ T141A/ T200*/ I229* |
| 2h.b | wt |
| 2h.c | Y97H/ A172V/ G238S |
| 2h.d | V159I |
| 2h.e | V8* |
| 2h.f | E63L |
| 2h.g | T71*/ H96R/ Y158*/ G238S |
| 2h.h | L21*/ L49P/ E63D/ A184V |
| 2h.i | wt |
| 2h.j | G238S |

La aparición de dos secuencias silvestres (wt) concuerda con las predicciones del modelo de Arnold (antecedentes) para la recombinación de múltiples secuencias.

La tasa de mutagénesis total en nucleótidos para este banco fue de 0.23%, a pesar de esperar una tasa similar a la del banco c20 que fue de 0.72%. A diferencia del banco c20 en donde se conoce la tasa de mutagénesis de las secuencias parentales, para la generación de este banco se partió de un grupo de clonas sin caracterización individual. Para hacer un estimado de la tasa de

mutagénesis introducida durante este ciclo de mutagénesis fue necesario determinar la secuencia de 8 clonas de las 5000 parentales. (TABLA 12)

TABLA 12. CLONAS PARENTALES DEL BANCO c2H

| CLONA | GENOTIPO |
|-------|---------------------|
| pre1 | L113H |
| pre2 | G238S/ S243* |
| pre3 | K111R/ L137*/ G238S |
| pre4 | G238S |
| pre5 | G238S |
| pre7 | wt |
| pre8 | P107*/ L137S |
| pre9 | L30*/ G238S |

La tasa de mutagénesis de las secuencias parentales es de 0.17%, por tanto el ciclo 2h tuvo una tasa de 0.06%.

La tasa de mutagénesis de las secuencias parentales de c2h (0.17%) resulta muy baja al compararla con el promedio del banco del que provienen (c1 con tasa de 0.29%) e incluso con la de las 10 mutantes ganadoras de dicho banco (0.32%, TABLA 6). Fue necesario verificar el fenotipo de las 5000 clonas parentales aisladas de una placa con 0.2µg/mL de cefotaxima, transformando en células frescas, para garantizar que en efecto fueran mutantes resistentes a cefotaxima. Utilizando inóculos de 60 y 600 UFC por placa se observó que el 100% de las variantes conferían resistencia a 0.1µg/mL de cefotaxima y únicamente el 30% era realmente resistente a 0.2µg/mL de cefotaxima. En placas con 0.1 µg/mL de cefotaxima y con inóculos de 5000 UFC no hay crecimiento de la cepa transformada con el gene silvestre. Sin embargo, de 8 clonas secuenciadas aparece una con el genotipo silvestre que presumiblemente sea una contaminación.

El 50% de las secuencias parentales contienen la mutación G238S que sabemos que es responsable del fenotipo y hay una fuerte tendencia a

seleccionarla. Ninguna de las otras mutaciones se ha reportado como responsable de resistencia a cefotaxima.

Finalmente, las características del banco c2h se resumen en la tabla 13:

| TABLA 13. CARACTERÍSTICAS DEL BANCO C2H | |
|---|-------|
| TASA DE MUTAGÉNESIS | |
| inicial en nucleótidos | 0.17% |
| adquirida en nucleótidos | 0.06% |
| total en nucleótidos | 0.23% |
| total en aminoácidos | 0.45% |
| TRANSICIONES | 90% |
| CAMBIO DE AMINOÁCIDO | 65% |

CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES GANADORAS

Se determinó la CMI de cefotaxima y la secuencia de 10 clonas (8610 pb) aisladas de una palca con 10 µg/mL de cefotaxima. Los resultados se resumen en la tabla 14:

| TABLA 14. CLONAS GANADORAS EL BANCO C2H | | |
|---|---|---------------------------|
| CLONA | GENOTIPO | CMI _{cf} (µg/mL) |
| 2h.1 | P27*/ Y46*/ E104K/ R191H/ T200*/ G238S/ P252* | 3.4 |
| 2h.2 | L21P/ N52S/ E104K/ G238S | 3.4 |
| 2h.3 | E104K/ Y105H/ G238S/ N276* | 2.25 |
| 2h.4 | Q88H/ G92S/ E104K/ T200*/ G238S/ A284* | 3.4 |
| 2h.5 | G238S/ E240K | 1.5 |
| 2h.6 | E104K/ G238S | 3.4 |
| 2h.7 | L21P/ T29*/ E104K/ G238S | 5 |
| 2h.8 | P62*/ G78*/ E104K/ T114*/ G238S/ M182T | 3.4 |
| 2h.9 | E37*/ E104K/ T195*/ L207*/ G238S | 3.4 |
| 2h.10 | R93*/ E104K/ G238S | 3.4 |

Las mutaciones obtenidas son equivalentes a las del ciclo c2o, sin embargo, variantes con las mismas mutaciones (E104K y G238S) no dan exactamente la misma resistencia. Incluso al realizar el ensayo de CMI simultáneamente (FIGURAS 12A Y 12B) se puede observar una ligera diferencia. No hay mutaciones en la región promotora, entonces no se puede descartar alguna ventaja conferida por las mutaciones silenciosas en el uso de codones. No se consideró necesario reclonar las mutantes ya que la diferencia no es muy drástica.

Las mutaciones Y105H y E240K habían aparecido en el ciclo anterior (en las clonas 1.9 y 1.16 respectivamente), sin embargo, no se podía esclarecer su efecto ya que estaban acompañadas de otros cambios. La mutación Y105K tiene un efecto negativo posiblemente por su cercanía al residuo 104. Este es un ejemplo del tipo de mutaciones que no se pueden segregar mediante PCR sexual.

E240K, al contrario, tiene un efecto positivo. Siempre se encuentra esta mutación junto con G238S y nunca con E104K. Posiblemente E104K/G238S y E240K/G238S sean soluciones excluyentes, siempre siendo mejor la primera.

La tasa de mutagénesis, el porcentaje de transiciones y el número de mutaciones que dan cambio de aminoácido de las mutantes ganadoras del banco c2h se resumen a continuación (TABLA 15):

| | |
|----------------------|-------|
| TASA DE MUTAGÉNESIS | |
| total en nucleótidos | 0.49% |
| total en aminoácidos | 0.97% |
| TRANSICIONES | 95% |
| CAMBIO DE AMINOÁCIDO | 65% |

Contrario al caso de la baja tasa de mutagénesis en las secuencias parentales, para las mutantes ganadoras encontramos que la tasa de mutagénesis es

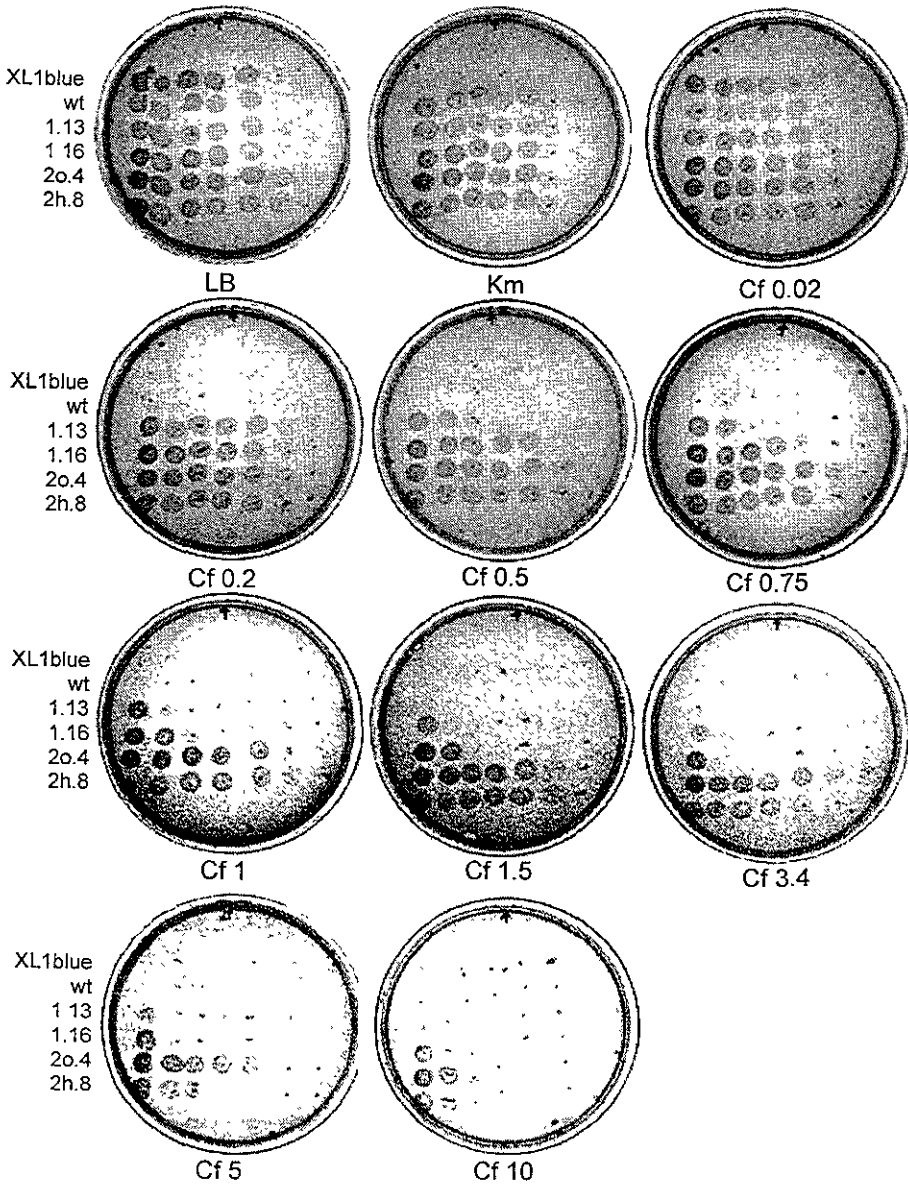


FIGURA 12A. Determinación de CMI de cefotaxima. En cada placa se inocularon gotas de 7 μ L de diluciones de cultivos en LB con A₆₀₀ entre 0.8 y 1.1. Como controles se utilizaron la cepa (XL1-Blue) sin plásmido y la cepa transformada con el plásmido resistente a Km que contiene al gene silvestre (wt). En la parte inferior de cada placa se indica el antibiótico utilizado en μ g/mL. Las clonas 2o.4 y 2h.8 tienen el mismo genotipo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

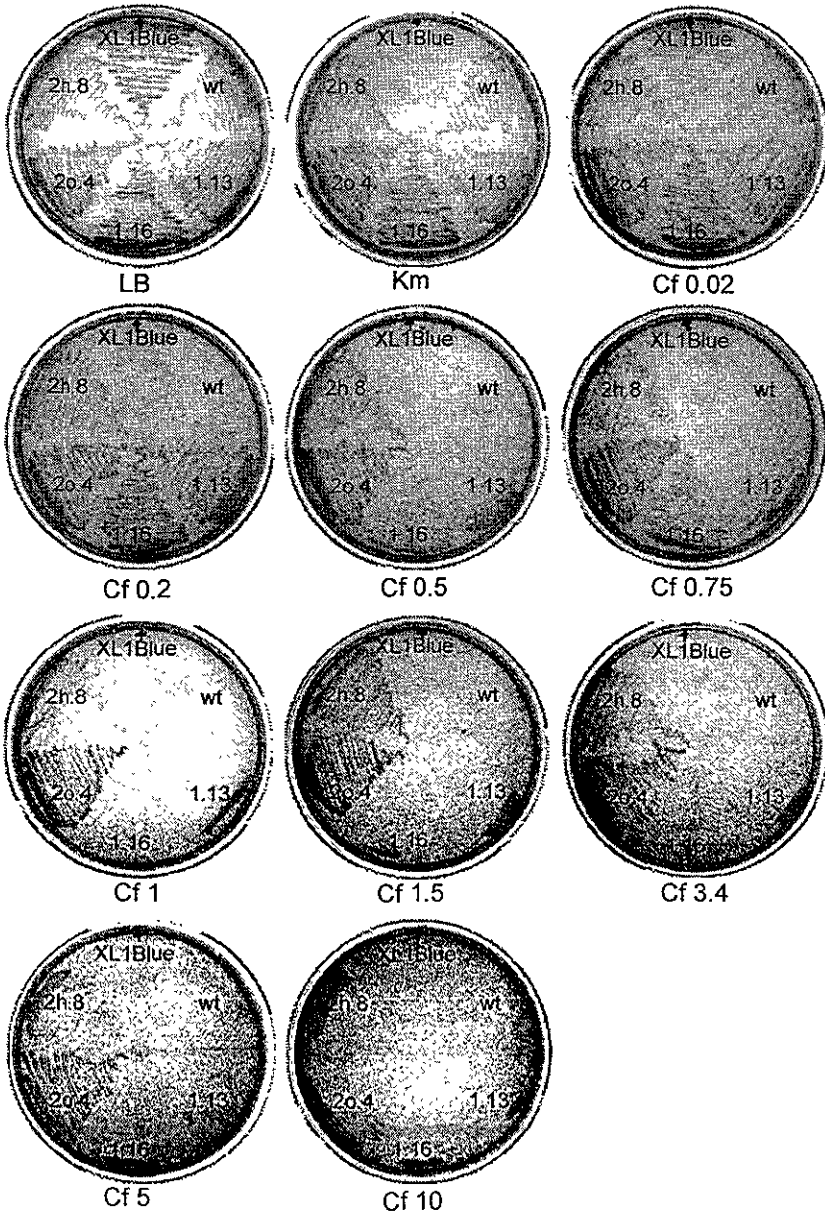


FIGURA 12B. Mutantes ganadoras de los bancos c1, c2o y c2h en concentraciones crecientes de cefotaxima. Como controles se utilizaron la cepa (XL1-Blue) sin plásmido y la cepa transformada con el plásmido resistente a Km que contiene al gene silvestre (wt). En la parte inferior de cada placa se indica el antibiótico utilizado en $\mu\text{g/mL}$. Al igual que en la figura anterior, se puede apreciar que la resistencia a cefotaxima es dependiente de la densidad celular.

mucho más alta que la tasa del banco. Sin embargo, la tasa de mutagénesis representa únicamente el promedio de la multiplicidad. Se puede observar entonces, que la magnitud de la presión selectiva determina que porción de la distribución se aísla. La presión selectiva en el caso de las 5000 clonas parentales era superable por un solo cambio de aminoácido. Y si bien, el banco c2h tiene en promedio una mutación por gene, se requerían por lo menos dos cambios para superar la presión selectiva.

Una tasa de mutagénesis en nucleótidos de 0.49% implica cuatro cambios por gene y una tasa de 0.97% en aminoácidos implica de dos a tres cambios, los necesarios para conferir la resistencia a 10 $\mu\text{g/mL}$ de cefotaxima.

PCR SEXUAL

En el presente trabajo, se obtienen diversas evidencias experimentales de la reproducibilidad y utilidad del PCR sexual como estrategia de evolución *in vitro*, como son: la generación de diversidad al azar; la recombinación eficiente de las secuencias parentales, así como la adquisición de nuevas mutaciones; la fijación de mutaciones benéficas y la eliminación de deletéreas; y finalmente los incrementos graduales de mejoría en la función seleccionada.

La figura 13 ilustra en que regiones de TEM-1 cayeron las mutaciones tanto de las clonas aisladas al azar como en las ganadoras de los tres bancos (c1, c2o y c2h). Se puede observar con total claridad que la distribución de mutaciones en las clonas aisladas al azar del banco c1 es uniforme a lo largo de TEM-1. En los otros dos grupos se observan zonas preferenciales de mutación, más no resulta extraño ya que son variantes generadas a partir de secuencias parentales que superaron una etapa de selección.

A pesar de que la muestra de variantes aisladas al azar del banco c2o es pequeña, nos permite visualizar los eventos de recombinación y mutagénesis ocurridos durante el PCR sexual. En la figura 14 se señalan las mutaciones tanto de las tres secuencias parentales como de las cinco clonas aisladas al azar del banco c2o. Es posible observar que mutaciones muy cercanas no logran ni recombinarse ni segregarse. Por ejemplo, no se encuentra ninguna secuencia en que se combinen las mutaciones en las posiciones 22 (de 1.14), 17 y 26 (de 1.16); ni tampoco secuencias en que sólo esté mutado el residuo 104 más no el 105 y viceversa.

El evento más obvio es la fijación de E104K, presente únicamente en una de las secuencias parentales, en el 20% de la población pero que aparece en el 100% de las variantes sujetas a selección. Podemos considerar como mutaciones deletéreas a Y105H, H26R y E240K ya que no se encuentran en ninguna de las

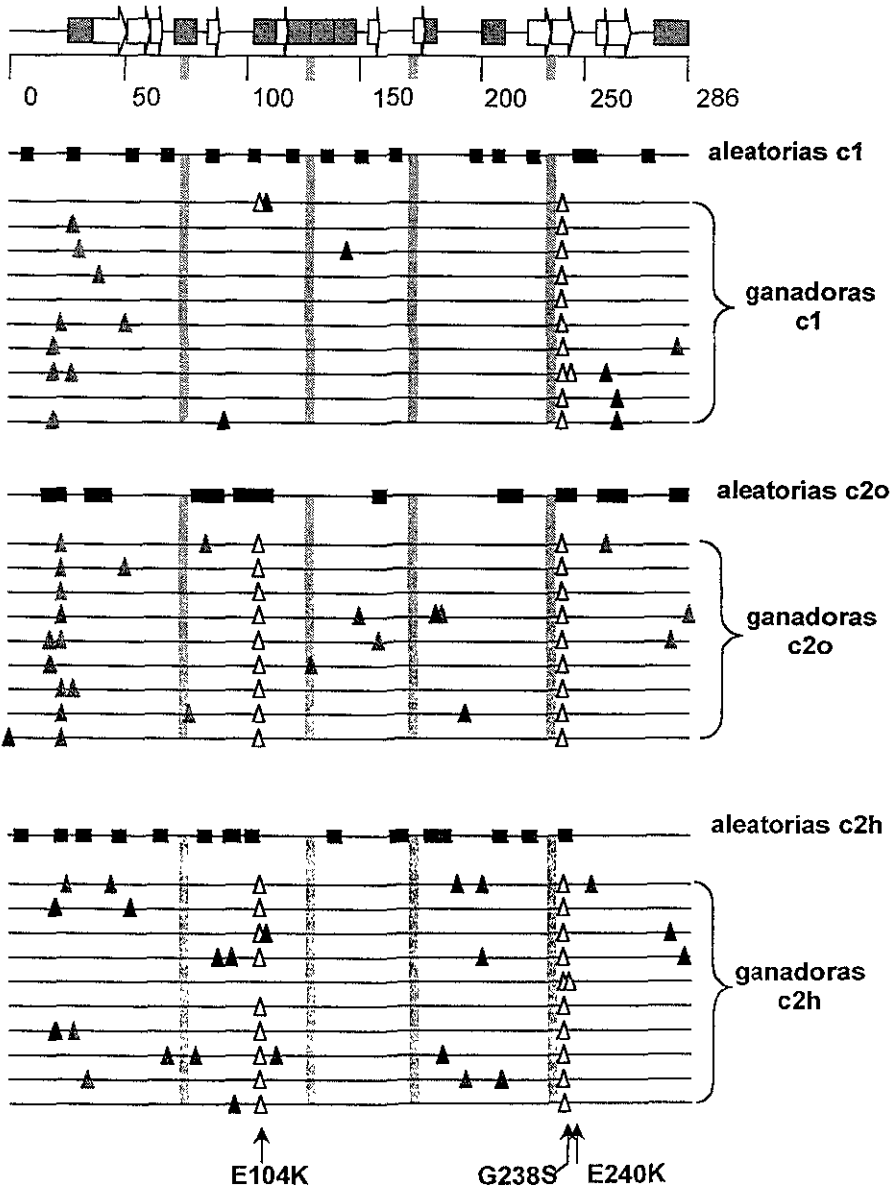


FIGURA 13. Localización de las mutaciones a lo largo de TEM-1. Para cada banco se indican las mutaciones encontradas en todas las variantes secuenciadas al azar y en detalle las encontradas en las mutantes seleccionadas \square paredes del sitio activo \blacktriangle mutaciones que dan cambio de aminoácido \blacktriangle mutaciones silenciosas \triangle mutaciones responsables del fenotipo.

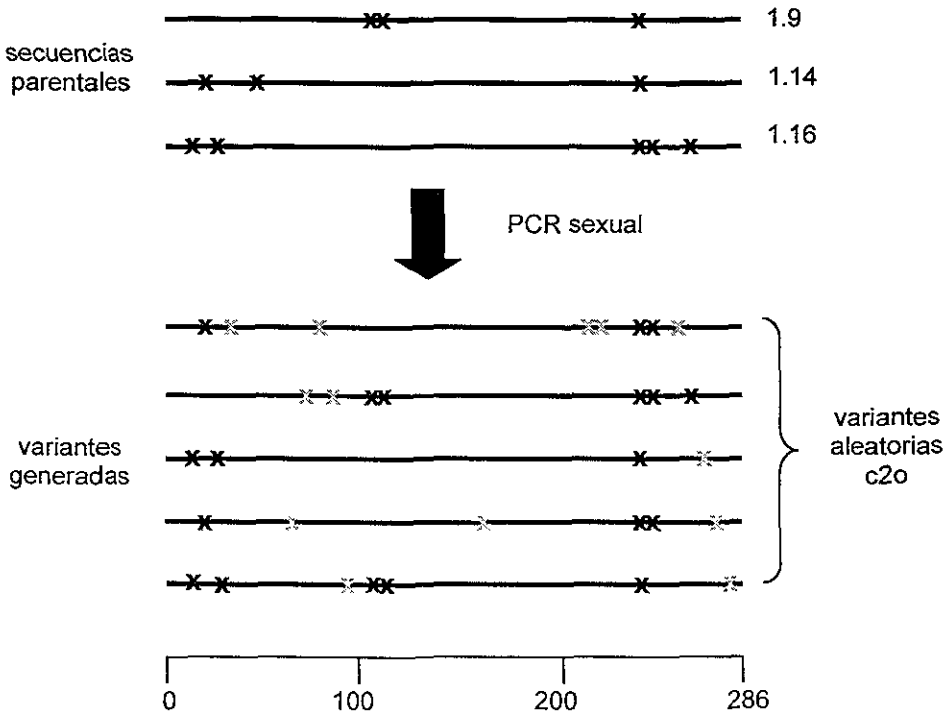


FIGURA 14. Recombinación de las mutaciones de las secuencias parentales y adquisición de mutaciones en un ciclo de PCR sexual. En gris se indican las mutaciones puntuales adquiridas durante el PCR sexual.

clonas ganadoras a pesar de estar presentes en las aisladas al azar. Sin embargo, como se señaló en la sección anterior y cuyo efecto se discutirá posteriormente; E240K es deletérea sólo en este contexto (acompañada de E104K) pues tiene un efecto positivo al estar en combinación con G238S (clona 2h.5). (TABLA 16)

TABLA 16. FRECUENCIA DE APARICIÓN DE MUTACIONES EN CLONAS DEL BANCO c20

| MUTACIÓN | SECUENCIA | FRECUENCIA DE APARICIÓN | | |
|----------|-----------|-------------------------|------------|-----------|
| | PARENTAL | PARENTALES | ALEATORIAS | GANADORAS |
| E104K | 1.9 | 0.33 | 0.20 | 0.88 |
| Y105H | 1.9 | 0.33 | 0.40 | 0.00 |
| P22* | 1.14 | 0.33 | 0.40 | 0.66 |
| S53* | 1.14 | 0.33 | 0.00 | 0.11 |
| A17* | 1.16 | 0.33 | 0.40 | 0.22 |
| H26R | 1.16 | 0.33 | 0.40 | 0.00 |
| E240K | 1.16 | 0.33 | 0.60 | 0.00 |
| K256R | 1.16 | 0.33 | 0.20 | 0.11 |
| G238S | todas | 1.00 | 1.00 | 1.00 |

Finalmente, como evidencia de la utilidad del PCR sexual como estrategia de evolución *in vitro*, tenemos los incrementos secuenciales de resistencia a cefotaxima. Durante el primer ciclo de evolución dirigida se obtuvieron mutantes con una CMI de cefotaxima 32 veces mayor, en promedio, que la secuencia de partida, TEM-1. Se realizaron de manera independiente, dos ciclos adicionales de evolución, c2h y c2o, de los que se aislaron mutantes con CMI de cefotaxima en promedio 160 y 250 veces mayores que la cepa transformada con la secuencia silvestre (FIGURA 15A). Como límites superiores de resistencia para cada ciclo se encuentran: 1.16 del ciclo c1 con CMI 50 veces mayor, 2h.7 del ciclo c2h con CMI 250 veces mayor y a todas las clonas ganadoras del ciclo c2h con un incremento de 250 veces la CMI de cefotaxima de la secuencia silvestre (FIGURA 15B)

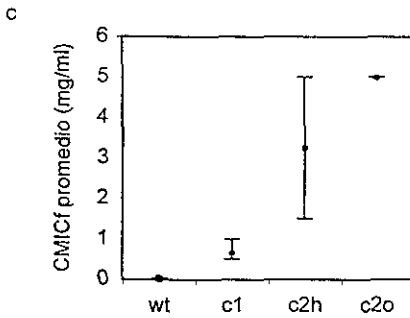
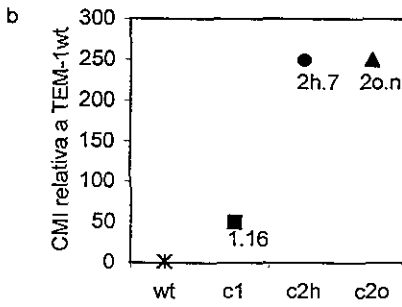
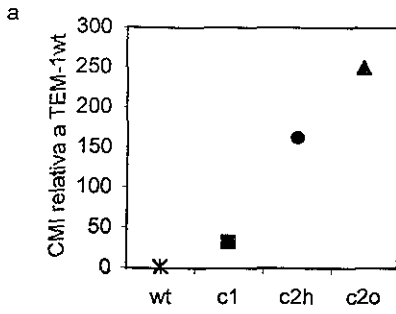


Figura 15a CMI_{Cr} relativa promedio de las 10 clonas ganadoras de cada banco

Figura 15b. CMI_{Cr} relativa máxima para cada banco

Figura 15c. Rango de CMI_{Cr} de las 10 clonas ganadoras de cada banco

TASA DE MUTAGÉNESIS DEL PCR SEXUAL

La tasa de mutagénesis en nucleótidos que Stemmer reportó para el PCR sexual es de 0.7% [Stemmer 1994a]. A pesar de haber utilizado condiciones experimentales muy semejantes a las reportadas durante las reacciones realizadas para el presente trabajo, se obtienen bancos con tasas más bajas. La tasa de mutagénesis de los bancos obtenidos, c1, c2o y c2h, varía considerablemente (0.29, 0.42 y 0.06% respectivamente) a pesar de haberse realizado bajo las mismas condiciones.

Como se mencionó en la introducción, la tasa de mutagénesis en la reacción de PCR sexual depende del tamaño de los fragmentos recombinados, de la concentración de cationes y de la fidelidad de la polimerasa utilizada. La digestión con DNAsaI genera una distribución de fragmentos de diferentes tamaños cuya media no es resoluble en un gel de agarosa, por tanto, se desconoce el número de fragmentos (de sitios de inicio) introducidos a la reacción de PCR sin oligonucleótidos. Con el sistema experimental utilizado, no es posible conocer ni controlar la distribución de tamaño de los fragmentos.

LA PRESIÓN SELECTIVA Y LA MULTIPLICIDAD DE LAS MUTANTES AISLADAS

La tasa de mutagénesis de un banco indica la multiplicidad promedio de las variantes y resulta natural suponer que variantes seleccionadas de dicho banco tendrán la multiplicidad correspondiente a la media. Sin embargo, se puede observar que la multiplicidad de las variantes seleccionadas de los bancos aquí descritos no corresponde a la tasa de mutagénesis del banco.

Las diez mutantes ganadoras del banco c1 tienen en promedio las tres mutaciones correspondientes a la tasa de mutagénesis del banco, a pesar de haber sido seleccionadas de una población de 5000 clonas preseleccionadas en 0.2 $\mu\text{g/mL}$ de cefotaxima con un promedio de 1.5 mutaciones por gene. El banco c2h tiene un comportamiento similar ya que las variantes ganadoras tienen en promedio 4 cambios y la en población total se observa una media de

dos. Finalmente las secuencias ganadoras del banco c2o tienen dos mutaciones menos que el promedio del banco.

Una explicación para este fenómeno es que se requiere un mínimo de mutaciones para superar una etapa de selección, pero el exceso de mutaciones tendrá el efecto contrario. No todas las proteínas son igualmente mutables y sus residuos tienen una tolerancia diferencial a las mutaciones. Después de mutar los 267 residuos de la secuencia madura de TEM-1 y seleccionar resistencia a ampicilina, T. Palzkill [Huang, 1996] encontró que 43 residuos no resistían sustituciones. En las 220 posiciones mutables, sólo encontró en promedio 4 aminoácidos permitidos. Con los datos reportados por Palzkill, se puede estimar que únicamente el 18% de las mutantes sencillas posibles para la secuencia madura de TEM-1 serán capaces de hidrolizar ampicilina. El ejercicio se puede continuar para las variantes posibles con mayor multiplicidad suponiendo que no hay mutaciones supresoras y los resultados se encuentran en la tabla 17.

TABLA 17 MUTANTES: POSIBLES, ACTIVAS E INACTIVAS

| MULTIPLICIDAD | MUTANTES POSIBLES | MUTANTES INACTIVAS | MUTANTES ACTIVAS | % |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0 | 1 | 0 | 1 | 100 |
| 1 | 5.07×10^3 | 4.18×10^3 | 8.96×10^2 | 17.66 |
| 2 | 1.28×10^6 | 1.24×10^7 | 4.00×10^5 | 3.11 |
| 3 | 2.15×10^{10} | 1.14×10^{10} | 1.19×10^8 | 0.55 |
| 4 | 2.70×10^{13} | 2.70×10^{13} | 2.62×10^{10} | 0.09 |
| 5 | 2.70×10^{16} | 2.70×10^{16} | 4.63×10^{12} | 0.01 |
| 6 | 2.24×10^{19} | 2.24×10^{19} | 6.79×10^{14} | 3.03×10^{-3} |
| 7 | 1.58×10^{22} | 1.58×10^{22} | 8.49×10^{16} | 5.36×10^{-4} |
| 8 | 9.79×10^{24} | 9.79×10^{24} | 9.26×10^{18} | 9.46×10^{-5} |
| 9 | 5.35×10^{27} | 2.35×10^{27} | 8.94×10^{20} | 1.67×10^{-5} |
| 10 | 2.62×10^{30} | 2.62×10^{30} | 7.74×10^{22} | 2.95×10^{-6} |

Se observa una disminución dramática de la fracción de variantes activas al incrementar el número de mutaciones y aunque el número de variantes activas es de varios ordenes de magnitud debemos recordar que hasta el momento no

hay sistema capaz de generar librerías de más de 10^{13} variantes. Los bancos descritos en este trabajo son de alrededor de 10^6 variantes únicamente, lo que implica una exploración muy limitada en comparación al número de variantes posibles.

Suponiendo que el banco c1 es descrito por una función normal de probabilidad, es posible calcular cuantas variantes de cada multiplicidad contiene y analizar que fracción del espacio de secuencia de TEM-1 permite explorar. En la figura 16 se observa que con un banco de tales características sólo se exploran completamente las mutantes sencillas y al aumentar la multiplicidad es más pobre la exploración, disminuyendo también la probabilidad de encontrar variantes activas. Suponiendo ahora, que el fenómeno observado por Palzkill es similar al estar seleccionando actividad contra cefotaxima, de un banco con las características del banco c1 se podrán seleccionar variantes activas con máximo 4 mutaciones y con una probabilidad muy baja de encontrarlas (FIGURA 17).

LA INFLUENCIA DEL NÚMERO DE SECUENCIAS PARENTALES RECOMBINADAS

Los bancos c2o y c2h fueron generados a partir de mutantes ganadoras del primer ciclo de evolución pero de distintos cortes de selección. El objetivo de generar el banco c2o era realizar un ciclo de evolución de la forma en que se hace comúnmente en este tipo de trabajos, es decir, recombinando pocas mutantes que hayan superado las etapas más fuertes de selección. De esta forma se eligieron a las clonas 1.9, 1.14 y 1.16 como secuencias parentales del banco c2o. Esta podría considerarse una ruta segura de evolución a expensas de perder diversidad ya que dichas clonas tenían las mutaciones responsables del fenotipo observado por Stemmer, Zacco y Long-Mc-Gie (Antecedentes).

El banco c2h fue generado de forma opuesta, es decir, evitando la pérdida de diversidad. Stemmer utilizó como secuencias parentales del siguiente ciclo de evolución, cientos de clonas y tuvo éxito. De forma similar se utilizaron como secuencias parentales todas las clonas (>5000) que superaron la primera etapa de selección (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima).

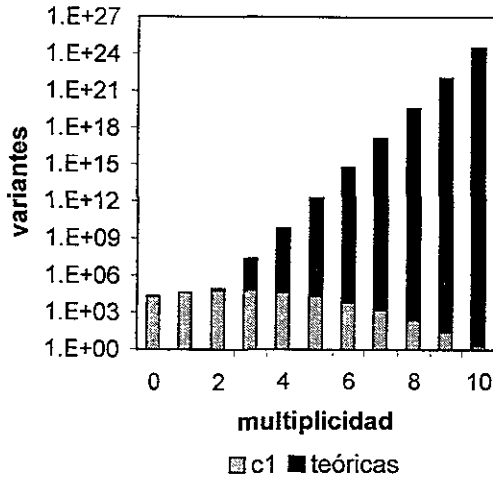


FIGURA 16. Variantes exploradas con el banco c1.

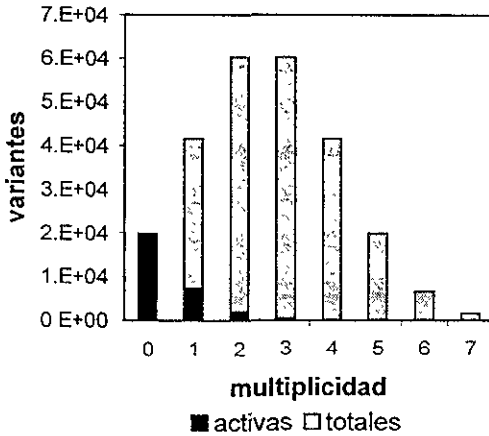


FIGURA 17. Posibles variantes activas del banco c1.

Al comparar la CMI de cefotaxima de las mutantes ganadoras de ambos bancos encontramos que en efecto el ciclo c2o era una ruta segura de evolución y aunque con el ciclo c2h se alcanza el límite superior de resistencia la mayoría de las mutantes están por debajo de este límite. (FIGURA 15C)

Recombinar un número alto de secuencias no permitió encontrar clonas con mayor resistencia a cefotaxima. El modelo de recombinación de Arnold es muy simple y tiene consideraciones alejadas de la realidad, pero permite analizar los datos experimentales obtenidos considerando exclusivamente los eventos de recombinación.

Para generar el banco c2o se utilizaron 3 secuencias con seis mutaciones diferentes que dan cambio de aminoácido, sin embargo, G238S era común a los tres genes y se puede eliminar del análisis. Según la ecuación 3 para poder encontrar la variante ganadora debemos tener una certeza del 95% de haber muestreado la variante más rara, es decir, aquella que contuviera las 5 mutaciones recombinadas. Para encontrar la variante ganadora del banco c2o se requería una muestra de 727 clonas y tanto el tamaño el banco (3.37×10^6) como su muestreo superan esta cifra.

Para generar el banco c2h se utilizaron 5000 clonas que representaban 250 veces el banco, por lo tanto, se recombinaron alrededor de 20 secuencias diferentes. Para estimar el número de mutaciones que se recombinaron podemos tomar los datos de las ocho clonas secuenciadas (tabla 12) en las que se encontraron 4 mutaciones diferentes que dan cambio de aminoácido. En este caso G238S no es común a todas las clonas y se debe considerar en el análisis. Sin embargo, tiene más probabilidades de aparecer que el resto de las mutaciones recombinadas. Podemos suponer que se recombinaron 20 clonas con 10 mutaciones distintas para lo que requeriríamos muestrear alrededor de 10^{14} variantes para garantizar la aparición de la mutante ganadora. En este caso el tamaño del banco (9.93×10^6) es ocho ordenes de magnitud menor.

No todas las mutaciones recombinadas en un caso real son benéficas, aditivas de manera lineal, ni independientes. En este trabajo solo existen dos soluciones que superan la selección de un segundo ciclo de evolución y son G238S/E104K ó G238S/E240K, pudiendo estar acompañadas de mutaciones neutras. Las mutantes funcionales tendrán necesariamente una multiplicidad mayor o igual a dos. Utilizando la ecuación 2 es posible calcular que la probabilidad de aislar al conjunto de mutantes en las que están incluidas las variantes funcionales del banco c2o es de 0.55 y de 0.1 para el banco c2h. De haber tenido un caso cercano al modelo como serían 3 secuencias con tres mutaciones y 20 secuencias con 20 mutaciones la probabilidad de aislar las variantes con multiplicidad mayor o igual a dos sería de 0.27 y 0.26 respectivamente. Las cifras anteriores sugieren poco éxito para el banco, c2h sin embargo, se obtuvieron mutantes muy similares al banco c2o.

β -LACTAMASAS TEM CAPACES DE HIDROLIZAR CEFOTAXIMA

Los modelos de evolución dirigida tratan de imitar la evolución natural de una enzima ante una determinada presión selectiva y el modelo de evolución dirigida de TEM-1 hacia la hidrólisis de cefotaxima resulta particularmente reproducible. Las soluciones encontradas naturalmente, es decir, aisladas clínicamente de pacientes tratados con cefotaxima coinciden por completo con las obtenidas por distintas estrategias de evolución *in vitro*.

Dos mutaciones que confieren un incremento considerable de resistencia a cefotaxima, E104K y G238S, resultan comunes a este trabajo y a los reportes referidos en los antecedentes, donde también se compararon con mutantes aisladas clínicamente. Existen dos soluciones muy populares pero independientes [Giakkoupi, 2000] en los aislados clínicos que son las que incluyen a G238S y las que incluyen a R164S. Aparentemente con evolución dirigida se llega preferentemente a la primera solución, a pesar de que ambas están a una mutación de distancia de *blaTEM-1*.

La mayoría de las mutantes discutidas en el presente trabajo han sido caracterizadas a nivel tanto estructural como cinético y a continuación se describan las más importantes.

G238S

El residuo 238 se encuentra en una hoja beta que forma una pared del sitio activo (FIGURA 2). Recientemente se ha demostrado que la presencia de un aminoácido más voluminoso en esta posición, produce un ensanchamiento del sitio activo y efectivamente se observa una reducción en la k_m al medir la actividad de la mutante contra cefotaxima. Estructuralmente se propone que la serina en la posición 238 forma un puente de hidrógeno, ausente en la proteína silvestre, con la asparagina 170 del asa ω generando un desplazamiento que finalmente perturba la posición del residuo responsable de la desacilación (E166) y esto explica la reducción en k_{cat} [Cantú, 1998].

E104K y E240K

Estos dos residuos tienen interacciones electrostáticas con el sustrato y al ser mutados a lisina provocan un incremento en k_{cat} sin tener efecto sobre k_m . Se propone que E104K altera la interacción entre el sustrato y el motivo SDN del sitio activo. [Knox, 1995; Viadiu, 1995]. E104K se encuentra con mucha mayor frecuencia en las mutantes aisladas clínicamente y nunca acompañada por E240K (APÉNDICE).

M182T

Por último es importante mencionar a M182T que aunque en este trabajo no son obvios sus efectos benéficos, es común a los trabajos de Stemmer y Zacco. El residuo 182 no se encuentra en la vecindad del sitio activo haciendo difícil la determinación del efecto de mutarlo por treonina y obtener mayores niveles de resistencia a cefotaxima. Originalmente se proponía que M182T suprimiera los efectos desestabilizantes de otras mutaciones que promovieran la hidrólisis de cefotaxima [Huang, 1997] Este cambio nunca aparece sólo y recientemente se

demonstró que facilita el plegamiento sin tener efecto en la estabilidad termodinámica de TEM-1 [Palzkill, 2001].

Los efectos de las mutaciones anteriormente descritas son distintos en la evolución hacia otros ligandos de β -lactamasas TEM, ya sean antibióticos o inhibidores. Aunque se pueden tener puntos en común, para cada tipo de ligando existe una solución particular. El paisaje de adecuación es específico para cada variable y en este trabajo sólo se ha explorado una pequeña región del paisaje de adecuación de TEM-1 a la hidrólisis de cefotaxima.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Se corroboró la eficacia del PCR Sexual como estrategia de generación de diversidad al azar y de recombinación que permite mejoras sucesivas durante la evolución de la función de una proteína, teniendo como ventaja la fijación rápida de mutaciones benéficas y la eliminación de deletéreas.
- La tasa de mutagénesis del PCR Sexual no es constante.
- La recombinación de múltiples secuencias mediante PCR sexual permite analizar variaciones de la misma solución encontrada por una proteína sujeta a evolución dirigida.
- Las mutantes de TEM-1 capaces de hidrolizar cefotaxima obtenidas mediante estrategias distintas de evolución *in vivo* e *in vitro* son equivalentes a las soluciones encontradas por la Naturaleza.

Independientemente de la estrategia evolutiva seguida, las limitaciones experimentales resultan en una exploración parcial del espacio de secuencia de una proteína. A pesar de tener una exploración tan pobre, en experimentos independientes como los de Stemmer, Zacco, Long Mc-Gie y el presente trabajo se encuentra la misma solución para el cambio de especificidad de sustrato (G238S). Naturalmente se ha aislado por lo menos otra solución (R164S) por lo que es factible creer que existan otras.

Para forzar experimentalmente rutas evolutivas distintas se podría construir una mutante silenciosa del residuo 238 de TEM-1, que ubique a la solución G238S a más una mutación de distancia. Los resultados de someter este tipo de mutante silenciosa a un ciclo de evolución dirigida demostrarían la existencia de otras soluciones. De modo similar se puede bloquear la ruta de R164 ya sea de forma independiente o simultánea con la ruta seguida por G238.

- AMBLER R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* [289](1036): 321-31.
- BOLIVAR F., RODRIGUEZ R. L., GREENE P. J., BETLACH M. C., HEYNEKER H. L. y BOYER H. W. (1977). "Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system." *Gene.* 2: 95-113.
- BUSH K., JACOBY G. A. y MEDEIROS A. A. (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." *Antimicrob Agents Chemother.* [39](6): 1211-33.
- CADWELL R. C. y JOYCE G. F. (1992). "Randomization of genes by PCR mutagenesis." *PCR Methods Appl.* [2](1): 28-33.
- CANTU C. R. y PALZKILL T. (1998). "The role of residue 238 of TEM-1 beta-lactamase in the hydrolysis of extended-spectrum antibiotics." *J Biol Chem.* [273](41): 26603-9.
- CHEN K. y ARNOLD F. H. (1993). "Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide." *Proc Natl Acad Sci U S A.* [90](12): 5618-22.
- DUBE D. K., BLACK M. E., MUNIR K. M. y LOEB L. A. (1993). "Selection of new biologically active molecules from random nucleotide sequences." *Gene.* [137](1): 41-7.
- GIAKKOUPIS P., TZELEPI E., TASSIOS P. T., LEGAKIS N. J. y TZOUVELEKIS L. S. (2000). "Detrimental effect of the combination of R164S with G238S in TEM-1 beta-lactamase on the extended-spectrum activity conferred by each single mutation." *J Antimicrob Chemother.* [45](1): 101-4.
- GLAZER A. N. y NIKAIIDO H. Microbial Biotechnology. New York, 1995. W.H. Freeman and Company.
- GREENER A., CALLAHAN M. y JERPSETH B. (1996). "An efficient random mutagenesis technique using an E. coli mutator strain." *Methods Mol Biol.* [57]: 375-85.
- HANES J. y PLUCKTHUN A. (1997). "In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display." *Proc Natl Acad Sci U S A.* [94](10): 4937-42.
- HUANG W., PETROSINO J., HIRSCH M., SHENKIN P. S. y PALZKILL T. (1996). "Amino acid sequence determinants of beta-lactamase structure and activity." *J Mol Biol.* [258](4): 688-703.

- JUTEAU J. M., BILLINGS E., KNOX J. R. y LEVESQUE R. C. (1992). "Site-saturation mutagenesis and three-dimensional modelling of ROB-1 define a substrate binding role of Ser130 in class A beta-lactamases." *Protein Eng.* [5](7): 693-701.
- KAUFFMAN S. A. The Origins of Order. New York, 1993. Oxford University Press.
- KNOX J. R. (1995). "Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure." *Antimicrob Agents Chemother.* [39](12): 2593-601.
- LAMOTTE-BRASSEUR J., DIVE G., DIDEBERG O., CHARLIER P., FRERE J. M. y GHUYSEN J. M. (1991). "Mechanism of acyl transfer by the class A serine beta-lactamase of *Streptomyces albus* G." *Biochem J.* [279](Pt 1): 213-21.
- LONG-MCGIE J., LIU A. D. y SCHELLENBERGER V. (2000). "Rapid in vivo evolution of a beta-lactamase using phagemids." *Biotechnol Bioeng.* [68](1): 121-5.
- LORIMER I. A. y PASTAN I. (1995). "Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNaseI in the presence of Mn²⁺." *Nucleic Acids Res.* [23](15): 3067-8.
- MATAGNE A., LAMOTTE-BRASSEUR J. y FRERE J. M. (1998). "Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity." *Biochem J.* [330](Pt 2): 581-98.
- MOORE J. C., JIN H. M., KUCHNER O. y ARNOLD F. H. (1997). "Strategies for the in vitro evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences." *J Mol Biol.* [272](3): 336-47.
- OSUNA J. Comunicación Personal
- PATTHY L. Protein Evolution. Oxford, 1999. Blackwell Science.
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F. y MANIATIS T. Molecular Cloning A Laboratory Manual. New York, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SIDERAKI V., HUANG W., PALZKILL T. y GILBERT H. F. (2001). "A secondary drug resistance mutation of TEM-1 beta-lactamase that suppresses misfolding and aggregation." *Proc Natl Acad Sci U S A.* [98](1): 283-8.
- SMITH G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science.*[228](4705):1315-7.

- STEMMER W. P. (1994a). "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A*. [91](22): 10747-51.
- STEMMER W. P. (1994b). "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling." *Nature*. [370](6488): 389-91.
- STRYNADKA N. C., JENSEN S. E., ALZARI P. M. y JAMES M. N. (1996). "A potent new mode of beta-lactamase inhibition revealed by the 1.7 Å X-ray crystallographic structure of the TEM-1-BLIP complex [see comments]." *Nat Struct Biol*. 3: 290-7.
- STRYNADKA N. C., ADACHI H., JENSEN S. E., JOHNS K., SIELECKI A., BETZEL C., SUTOH K. y JAMES M. N. (1992). "Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution." *Nature*. [359](6397): 700-5.
- SUZUKI M., AVICOLA A. K., HOOD L. y LOEB L. A. (1997). "Low fidelity mutants in the O-helix of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I." *J Biol Chem*. [272](17): 11228-35.
- SWEASY J. B. y LOEB L. A. (1993). "Detection and characterization of mammalian DNA polymerase beta mutants by functional complementation in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A*. [90](10): 4626-30.
- TAWFIK D. S. y GRIFFITHS A. D. (1998). "Man-made cell-like compartments for molecular evolution." *Nat Biotechnol*. [16](7): 652-6.
- TUNG W. L. y CHOW K. C. (1995). "A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*." *Trends Genet*. [11](4): 128-9.
- VIADIU H., OSUNA J., FINK A. L. y SOBERON X. (1995). "A new TEM beta-lactamase double mutant with broadened specificity reveals substrate-dependent functional interactions." *J Biol Chem*. [270](2): 781-7.
- WIEDEMANN B., KLIEBE C. y KRESKEN M. (1989). "The epidemiology of beta-lactamases." *J Antimicrob Chemother*. [24](Suppl B): 1-22.
- ZACCOLO M. y GHERARDI E. (1999). "The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase." *J Mol Biol*. [285](2): 775-83.
- ZHAO H. y ARNOLD F. H. (1997). "Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination." *Nucleic Acids Res*. [25](6): 1307-8.

www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/wprintgc?mode=c
The Genetic Codes. NCBI. 05-10-00.

www.lahey.org/studies/webt.htm
Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and
Inhibitor Resistant β -Lactamases. JACOBY G. A. y BUSH K. 05-23-01.

TEM Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases

| β -lactamase | Alternate Names(s) | Amino Acid ^a at position | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|---------------------------|-------------------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| | | 6 | 21 | 39 | 42 | 51 | 69 | 92 | 104 | 115 | 127 | 130 | 153 | 164 | 165 | 182 | 196 | 204 | 218 | 237 | 238 | 240 | 244 | 262 | 265 | 268 | 275 | 276 | pl |
| TEM-1 | RTEM-1 | Q | L | Q | A | L | M | G | E | D | I | S | H | R | W | M | G | Q | G | A | G | E | R | V | T | S | R | N | 5.4 |
| TEM-2 | | | | K | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 5.6 | |
| TEM-3 | CTX-1 TEM-14 | | | K | | | | | K | | | | | | | | | | | | S | | | | | | | 6.3 | |
| TEM-4 | | | F | | | | | | K | | | | | | | | | | | | S | | | | | M | | 5.9 | |
| TEM-5 | CAZ-1 | | | | | | | | | | | | S | | | | | | | T | | K | | | | | | 5.55 | |
| TEM-6 | | | | | | | | | K | | | | H | | | | | | | | | | | | | | | 5.9 | |
| TEM-7 | | | | K | | | | | | | | | S | | | | | | | | | | | | | | | 5.4 | |
| TEM-8 | CAZ-2 | | | K | | | | | K | | | | S | | | | | | | | S | | | | | | | 5.9 | |
| TEM-9 | RHH-1 | | F | | | | | | K | | | | S | | | | | | | | | | | | M | | | 5.5 | |
| TEM-10 | MGH-1 TEM-E3 TEM-23 | | | | | | | | | | | | S | | | | | | | | | K | | | | | | 5.6 | |
| TEM-11 | CAZ-1b | | | K | | | | | | | | | H | | | | | | | | | | | | | | | 5.6 | |
| TEM-12 | YOU-2 CAZ-3 TEM-E2 | | | | | | | | | | | | S | | | | | | | | | | | | | | | 5.25 | |
| TEM-13 | | | | | | | | | K | | | | | | | | | | | | | | | | | M | | 5.6 | |
| TEM-15 | | | | | | | | | K | | | | | | | | | | | | S | | | | | | | 6.0 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|------------------|---|---|---|--|---|---|--|---|---|--|--|--|--|---|---|---|---|-----|-----|-----|
| TEM-53 | | F | | | | | | | S | | | | | | | | | | | | |
| TEM-54 | | | | | | | | | | | | | | | | L | | | | | |
| TEM-55 | | | | | | | | | | | | | | | E | | | | 5.2 | | |
| TEM-56 | | | K | | | K | | | R | | | | | | | | | | 6.4 | | |
| TEM-57 | | | | | | D | | | | | | | | | | | | | 5.2 | | |
| TEM-58 | | | | | | | | | | | | | | | | S | I | | 5.2 | | |
| TEM-59 | IRT-17 | | K | | | | | | G | | | | | | | | | | 5.6 | | |
| TEM-60 | | | K | P | | K | | | S | | | | | | | | | | 6.4 | | |
| TEM-61 | CAZ-hi | | K | | | | | | H | | | | | | | K | | | 6.5 | | |
| TEM-62 | Reserved | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TEM-63 | TEM-64 | F | | | | K | | | S | T | | | | | | | | | 5.6 | | |
| TEM-65 | IRT-16 | | K | | | | | | | | | | | | | | | C | 5.4 | | |
| TEM-66 | | | K | | | D | K | | | | | | | | | S | | | 6.0 | | |
| TEM-67 | Not yet released | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TEM-68 | | | | | | | | | | | | | | | | S | K | M | L | 5.7 | |
| TEM-69 | Not yet released | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TEM-70 | | | | | | | | | | | | | | | | | | R | 5.2 | | |
| TEM-71 | Not yet released | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TEM-72 | | | K | | | | | | | | | | | | | | | T | S | K | 5.9 |

