

00551
15



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

"EVOLUCION PARALELA DE LAS β -LACTAMASAS
TEM1 Y PC1 HACIA LA HIDROLISIS DE
CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACION"

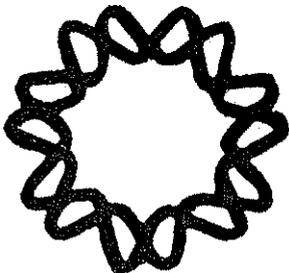
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

JORGE ALBERTO VERDIN RAMOS



CUERNAVACA,

FEBRERO DE 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de México bajo la dirección del Dr. Lorenzo Segovia Forcella. Para el desarrollo del proyecto se contó con la beca CONACYT 144892.

Índice

	página
Resumen	1
Introducción	2
Los anticuerpos catalíticos: convergencia estructural, ¿siempre?	2
La importancia del punto de partida	3
El experimento	4
Antecedentes.	5
Las β -lactamasas	5
La estructura	7
El mecanismo catalítico	8
β -lactamasas de espectro extendido	9
Evolución <i>in vitro</i> de TEM1 hacia la hidrólisis de cefotaxima	11
Objetivos	13
Resultados	14
Las construcciones	14
La evolución dirigida	15
Las responsables del cambio de especificidad	17
La solución de TEM1 en PC1	18
La relación entre las integrantes de la solución	20
Los problemas de la evolución del promotor	21
Discusión	24
Conclusiones.	30
Perspectivas	30
Metodología	31
Bibliografía	34

Resumen

No es obvia la naturaleza y relación de las soluciones resultantes de la evolución hacia el mismo punto de enzimas con actividad y plegamiento homólogos, aunque con secuencias poco similares. Para verificar la influencia de la secuencia de partida en el desarrollo de una nueva especificidad, se dirigió la evolución de la β -lactamasa PC1 hacia el cambio de especificidad de penicilinas a cefotaximas. La solución obtenida en PC1 se comparó con la solución generada para igual cambio en TEM1 [18-21], con quien comparte el mismo plegamiento y actividad, sustentada en maquinarias catalíticas idénticas, pero con una identidad de secuencia del 31%. La serie de sustituciones que en cada caso cambia la especificidad es diferente. En TEM1 la solución está integrada por las sustituciones E104K y G238S mientras que en PC1 está formada por las sustituciones R164G, E168G, S173P, D179G y S216T. La influencia del contexto estructural y, por lo tanto, de la secuencia del polipéptido de partida, es ilustrada por la sustitución S173P de la solución de PC1 quien sólo es funcional después de la integración de las otras cuatro. Aunque de naturaleza distinta, las sustituciones de cada solución sugieren el mismo programa de alteraciones estructurales generales, encaminadas al desplazamiento de la asa Ω y el ensanchamiento de la cavidad catalítica.

Introducción

La manipulación de la estabilidad y especificidad enzimáticas, u objetivos tan ambiciosos como la creación de nuevas actividades catalíticas, no son un propósito reciente. Acometerlo racionalmente implicaría superar el escollo de la todavía oscura relación entre la estructura de una proteína y su función. El establecimiento de esta relación supondría la capacidad de diseñar nuevos polipéptidos con propiedades a gusto o la introducción de modificaciones particulares a una enzima preexistente con conocimiento *a priori* de sus efectos. Esto no es poca cosa, sobre todo si tomamos en cuenta la dificultad de problemas como el de desentrañar qué propiedades tienen en común polipéptidos de secuencias tan disímiles y que, sin embargo, tienen el mismo plegamiento o, en un nivel más local, cómo son las influencias microambientales en relación con las propiedades fisicoquímicas atípicas que presentan grupos catalíticamente importantes y a cuya “anormalidad” se debe su eficiencia¹. No obstante los logros obtenidos, la ingeniería de proteínas, entendida bajo la última de sus pretensiones, sigue siendo un reto intelectual formidable.

Si la ingeniería de proteínas exige información, la evolución dirigida la ofrece. La posibilidad de llevar al laboratorio el proceso de evolución darwiniana - variación y selección - ha permitido la obtención de biocatalizadores más robustos o con nuevas especificidades en tiempos muy cortos y sin requerir información estructural previa. Esta característica de la evolución dirigida hace posible el establecimiento de relaciones estructura-función *a posteriori*, así como el examen del proceso de desarrollo funcional de una enzima y el análisis de los elementos que determinan el curso de ese desarrollo.

Los anticuerpos catalíticos: convergencia estructural, ¿siempre?

La generación de anticuerpos catalíticos ha ofrecido la posibilidad de analizar el desarrollo de biocatálisis en un contexto funcionalmente no comprometido, además de proveer de rutas generales para la construcción de catalizadores enzimáticos [4, 5]. Estas enzimas o abzymas, como se las ha denominado por la peculiaridad de su origen [4], son una derivación conceptual de la termodinámica de la catálisis enzimática. El principio enuncia que la energía de activación para transformar un reactivo en su producto disminuye en la medida que aumenta la complementaridad ambiental de la enzima, en estructura y distribución electrónica, con el estado de transición de la reacción que cataliza, es decir, a mayor afinidad por el estado de transición aumenta la velocidad de la reacción [6, 7]. Esto sugirió que si se generaban anticuerpos contra un hapteno análogo del estado de transición, alguno de ellos sería capaz de catalizar la reacción correspondiente [8]. Con esta estrategia se ha generado gran diversidad de abzymas, aunque con eficiencias catalíticas muy alejadas

¹ Lo más común son conformaciones y geometrías de coordinación anómalas, en el caso de metaloenzimas, que conducen a potenciales atípicos de transferencia de protones y electrones.

de sus contrapartes enzimas [9-11], lo que hace necesario mejorar sus propiedades mediante mutaciones puntuales o bajo esquemas de mutagénesis al azar y selección.

A pesar del gran número de combinaciones potenciales de la región variable de un anticuerpo, se ha visto muy poca variabilidad en las secuencias de sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR) para el mismo epítipo. Para las abzimas las cosas no parecían ser distintas: al caracterizar varias de la misma familia, sus secuencias resultaron muy parecidas y la información bioquímica indicaba que en todos los casos la catálisis se realizaba fundamentalmente mediante el mismo mecanismo [12]. Incluso, el detalle del análisis llegó hasta la determinación de las estructuras cristalográficas de varias de estas abzimas hermanas y la conclusión fue en el sentido de la experiencia previa: convergencia estructural y mecanística [13, 14]. Todo indicaba que sólo existía una manera de catalizar una transformación química: sólo una solución para el mismo problema. Sin embargo, el mismo grupo que demostró la convergencia estructural seleccionó otro anticuerpo de la misma familia pero con una homología de secuencia del 50%, con respecto a los anticuerpos hasta entonces seleccionados, y una eficiencia catalítica del nivel de la de sus pares. La comparación de las estructuras cristalográficas arrojó que el nuevo miembro de la familia unía el sustrato de manera diferente e, incluso, el residuo catalítico y el paso limitante de la velocidad de reacción eran distintos [15]. Esto demostraba que, al menos en ese caso, era posible más que una solución para la misma tarea química pero, sobre todo, conducía a una pregunta importante: ¿cuál de las dos soluciones elegir para mejorarla?

La importancia del punto de partida.

La relevancia del problema planteado por esos anticuerpos radica en el distinto potencial de cada una de las soluciones obtenidas para la optimización de sus eficiencias [15] debido, en primera instancia, a la particularidad de sus características estructurales, pero también - aún reconociendo la indisoluble relación con lo primero- a la singularidad de sus secuencias de nucleótidos.

Abordar cualquier proyecto de evolución dirigida plantea fundamentalmente el mismo problema. Cuando se persigue hacer un cambio de especificidad o una migración catalítica por otra de naturaleza química semejante, la estrategia obvia sería partir de la enzima que en actividad y especificidad esté más cerca del objetivo. Sin embargo, es posible que se pueda disponer de toda una familia enzimática cuyas integrantes se identifiquen por la comunidad de plegamiento, actividad y cierto patrón de especificidad, aunque con notables diferencias en sus secuencias de aminoácidos. De este modo, cualquier integrante de la familia, o al menos varias de ellas, podrían ser los puntos de partida para realizar el cambio de especificidad o la migración catalítica, es decir, *a priori* no sería posible saber si alguna de ellas ofrece más ventajas para emprender el proyecto. Asumiendo que la homología funcional de las integrantes de la familia estuviera sustentada en la misma forma de unir el sustrato y en el empleo de la misma maquinaria catalítica, ¿sería suficiente la divergencia de sus secuencias, tanto de aminoácidos como de nucleótidos, para presumir que una de ellas es más proclive a dar el cambio al que se la quiere conducir? o, por compromiso con el plegamiento y a pesar de las diferencias, ¿todas tienen las mismas facultades potenciales para llegar al mismo sitio?

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TEM1	HPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRPEERFPM	STFK	VLLCGAVLSRID	85
PC1	-----KELNDLEKKNYNAHIGVYALDTKSGKEVK-FNSDKRFAYA	STSK	AINSAILLEQVP	85
TEM1	AGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITM	SDN	TAANLLLTIGGP	145
PC1	YN-KLNKKVHINKDDIVAYSPILEKYVVKDITLKALIEASMTY	SDN	TANNKIIKEIGGI	145
TEM1	KELTAFLHNMGDHYTRLDRW	EPELN	EAIPTNDERDITMPVAMATTLRKLITGELLTLASRQ	205
PC1	KKVKQRLKELGDKVTNPVRY	EIELN	YYSKSKKDTSTPAAPFGKTLNKLIIANGKLSKENKK	205
TEM1	QLIDWMEADKVGPLLRSAIPAGWFIAD	KSG	AG-ERGRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTT	265
PC1	FLLDLMLNKKSGDTLIKDGVPKDYKQVAD	KSG	QAITYASRNDVAFVYKQSQSEPIVLVIFT	265
TEM1			GSQATMDERN-RQIAEIGASLIKH	290
PC1			NKDNKSDKPNKLISETAKSVMKEF	290

Figura A1. Alineamiento de las secuencias peptídicas de las β-lactamasas TEM1 y PC1. Los aminoácidos dentro del recuadro corresponden a las cuatro firmas conservadas en toda la familia de las β-lactamasas clase A.

Sabido es que cada codón sólo puede acceder a un número limitado de aminoácidos bajo una tasa de mutagénesis determinada [16]; entonces, el espacio de secuencia [17] accesible de varias proteínas estructural y funcionalmente homólogas, aunque de secuencias diferentes, es potencialmente distinto y, por lo tanto, el perfil del espacio de adecuación [17] también podría serlo. Sin embargo, las restricciones impuestas por la comunidad de plegamiento y el sesgo inducido por la maquinaria catalítica preexistente, sobre todo cuando se trata de mudar la especificidad, hacen dudar de la inevitable divergencia de soluciones a la misma tarea química.

El experimento

Como consecuencia del claroscuro anterior, se decidió examinar experimentalmente la influencia de la secuencia de partida, en un contexto de plegamientos y mecanismos catalíticos homólogos, en la solución generada por evolución dirigida a un reto químico. Para esto, fue necesario comparar las soluciones al mismo problema evolutivo generadas en dos proteínas estructural y funcionalmente homólogas, pero de secuencias disímiles. Se eligieron dos β-lactamasas de la clase A, TEM1 y PC1, cuya similitud de secuencia es del 31% (figura A1), y se analizaron y compararon sus soluciones evolutivas para el cambio de especificidad de penicilinasasa a cefotaximasasa. Como para TEM1 el cambio de especificidad ya había sido publicado [18-21], sólo hubo que dirigir la evolución de PC1.

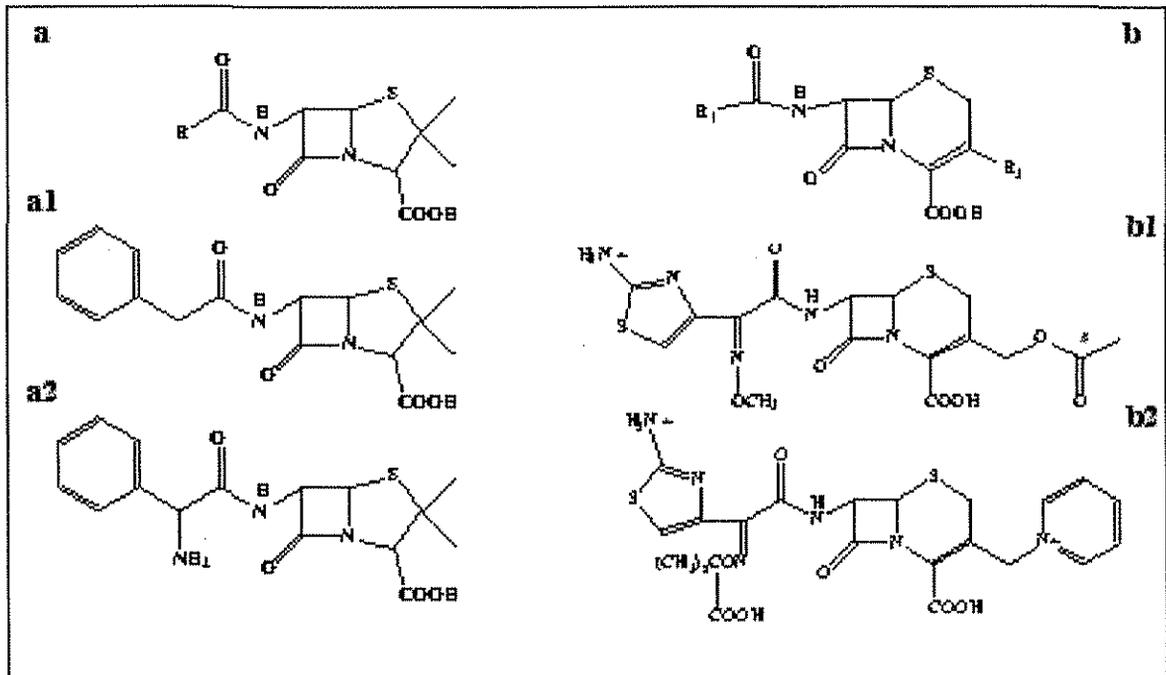


Figura A2. Antibióticos beta-lactámicos: penicilinas (a) y cefalosporinas de tercera generación (b). El corazón de ambos tipos de moléculas es el anillo β -lactámico fusionado a una tiazolidina en el caso de las penicilinas (a) y a una tiazina en el de las cefalosporinas (b). Los residuos sustituyentes de cada sistema dianular son definitorios de la resistencia del compuesto a la apertura enzimática del anillo β -lactámico, a cuya reactivad se debe el poder antibiótico de este tipo de moléculas. Las cefalosporinas de tercera generación, en contraste con las penicilinas, son malos sustratos de las β -lactamasas clase A debido al volumen y cargas de los grupos 2-aminotiazol y oximino presentes en la cadena lateral R₁. a1, benicilpenicilina; a2, ampicilina; b1, cefotaxima; b2, ceftazidima.

Antecedentes

Las β -lactamasas

Las β -lactamasas constituyen el principal mecanismo bacteriano de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, como la penicilina. Estas enzimas inutilizan las β -lactamas al hidrolizar su enlace amida (figuras A2, A3) impidiendo que esos compuestos inactiven irreversiblemente a su blanco fisiológico, las DD-peptidasas. Este grupo de enzimas, genéricamente llamadas PBP's, son responsables de la síntesis y remodelamiento del peptidoglicano, constituyente de la pared celular bacteriana que forma una red tridimensional alrededor de la bacteria y a quien protege de su propia presión osmótica [22].

En función de la similitud de sus secuencias existen cuatro clases de β -lactamasas: A², B, C y D [23]. Las de la clase B son metalo- β -lactamasas, mientras que las de las clases A, C y D, aunque forman grupos evolutivamente distintos, pertenecen a la superfamilia de las peniciloil-serín transferasas, que incluye a las PBP's y con quienes las β -lactamasas comparten ancestro [24].

² Los aminoácidos de las β -lactamasas clase A serán numerados de acuerdo a la convención de Ambler [38].

5

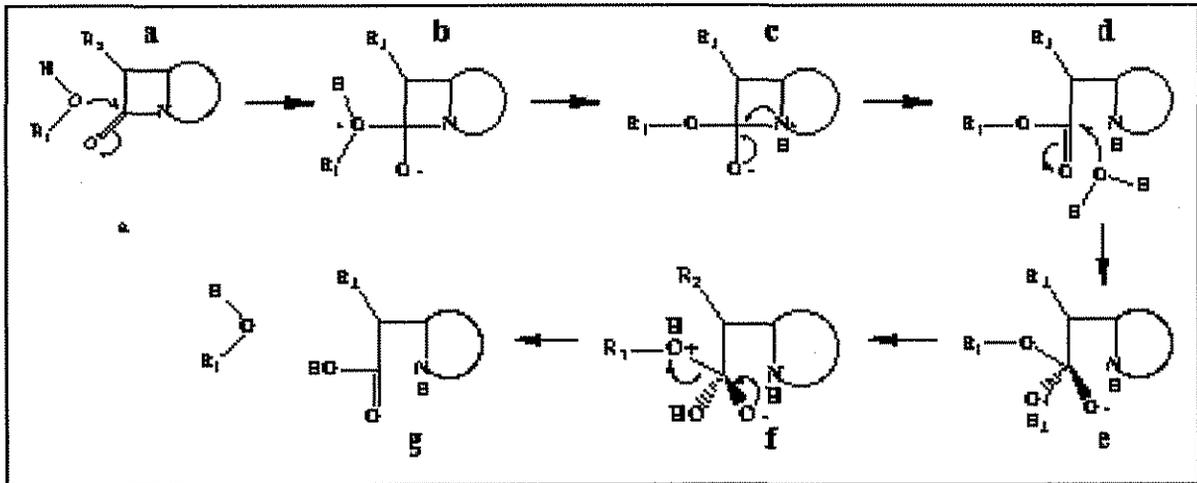


Figura A3. Mecanismo general de la hidrólisis enzimática del enlace amida del anillo β -lactámico. La reacción de una lactama (a) y un alcohol (serina, como se verá después) produce un éster que debe ser hidrolizado para generar un ácido carboxílico (g) y regenerar el alcohol (la serina catalítica). Mediada por una β -lactamasa, la reacción para obtener un ácido carboxílico a partir de una lactama inicia con el ataque nucleofílico de un hidroxilo alcohólico al carbonilo de la β -lactama (a), éste se abre y se produce una transferencia protónica del hidroxilo alcohólico al nitrógeno del anillo - otra posibilidad es la protonación previa del nitrógeno, lo cual facilitaría el ataque nucleofílico - (b y c). La electrofilicidad potenciada del nitrógeno β -lactámico facilita el cierre del carbonilo y la ruptura del enlace C-N, con lo que se estabiliza el nitrógeno y se produce el éster esperado (c y d). Luego, una molécula de agua (necesariamente activada) ataca el centro electrofílico del éster (d), se produce un intermediario tetraédrico (e), se protona y activa el residuo alcóxi (f) y, finalmente, se cierra el carbonilo y se expulsa el alcohol (f) para generar el ácido carboxílico correspondiente (g).

Un gran número de β -lactamasas ha sido descrito con muy diversas secuencias y características catalíticas. Sin embargo, todas las estructuras tridimensionales conocidas de las serín- β -lactamasas muestran el mismo plegamiento y maquinarias catalíticas dispuestas, en lo general, en las mismas posiciones estratégicas [25]. De todas estas enzimas, las de la clase A son las más abundantes y las más ampliamente estudiadas, conociéndose las estructuras cristalográficas de varias de ellas, entre las que se cuentan las de TEM1 [26] y PC1 [28, 29].



Figura A4. Plegamiento y sitio activo de la β -lactamasa, clase A; 1btl [26]. (a) Plegamiento de la β -lactamasa TEM1. El sitio activo se encuentra entre los dominios formadores de la proteína, justo donde el círculo lo indica. (b) Superficie de TEM1 en la zona del sitio activo, las líneas rojas indican la posición de los residuos importantes para el reconocimiento y/o catálisis. Estos residuos no necesariamente están en la superficie. (c) Elementos integrantes del sitio activo característicos de toda la familia. Las figuras y la descripción en el texto del sitio activo fueron hechas tomando como referencia la flecha del Norte.

La estructura

El plegamiento de las β -lactamasas es del tipo $\alpha + \beta$ y consiste básicamente de dos dominios que alojan al sitio activo en la región interdominios. Uno de ellos está formado por una hoja β de cinco bandas antiparalelas y tres hélices que se empaquetan contra una de las caras de la hoja, del otro lado de la misma se empaqueta el segundo dominio que consiste de un arreglo de ocho hélices (figura A4a) [22, 26 - 29].

La cavidad catalítica de las β -lactamasas en realidad es una depresión sobre la superficie de la enzima alrededor y dentro de la cual muchos aminoácidos están conservados en todas las β -lactamasas clase A conocidas. De hecho, cuatro firmas de aminoácidos definen su sitio activo (figura A1), los cuales están involucrados en el reconocimiento del sustrato o en el proceso catalítico. La primera firma contiene a la Ser⁷⁰, que actúa como nucleófilo en la primera parte de la hidrólisis, y a Lys⁷³. La segunda firma se sitúa en una de las hélices del dominio α y forma la pared Occidental del sitio activo. En ella se encuentra el motivo Ser¹³⁰, Asp¹³¹, Asn¹³². Del lado opuesto se encuentra la tercera firma, sobre la banda más interna de la hoja β , que alberga a los residuos conservados Lys²³⁴, Ser/Thr²³⁵, Gly²³⁶. Por último, en la cuarta firma se encuentran Glu¹⁶⁶ y Asn¹⁷⁰, formando parte de una asa Ω que cierra el sitio activo al Sur y que parece estar muy relacionada con el perfil de especificidad (figura A4b, c), [22].

Considerando el tamaño de la depresión catalítica, la disposición de los residuos importantes y las características de un sustrato como la bencilpenicilina (figura A1a1), se determinó la manera como el sustrato se une al sitio activo de una β -lactamasa clase A (figura A5). Para poder formar el complejo tetraédrico (figura A3) es necesario que el carbono carbonílico del anillo β -lactámico se encuentre próximo al nucleófilo que lo ataca, es decir, Ser⁷⁰ [28, 30]. El oxígeno de este mismo carbonilo durante el transcurso de la reacción forma un oxianión cuya carga es estabilizada por dos amidas expuestas de la cadena principal de los residuos Ser⁷⁰ y Gln²³⁷, elemento estructural que ha sido denominado agujero del oxianión [28]. La otra carga que requiere ser estabilizada es la del carbonilo del anillo tiazolidínico, de lo cual se encarga la Lys²³⁴. Fijadas las interacciones de estos puntos queda determinada la orientación del núcleo de la molécula. El perfil de especificidad es probable que lo defina el canal formado por los residuos 104 y 105, junto con otros de la asa Ω y de la zona de la hoja β en interacción con aquella, ya que forman un parche hidrofóbico dispuesto para la estabilización de la cadena lateral del anillo β -lactámico [29]. Dentro de esa cadena lateral existe un enlace peptídico, común a las estructuras tanto de penicilinas como de cefalosporinas, que es estabilizado por la formación de puentes de hidrógeno entre el

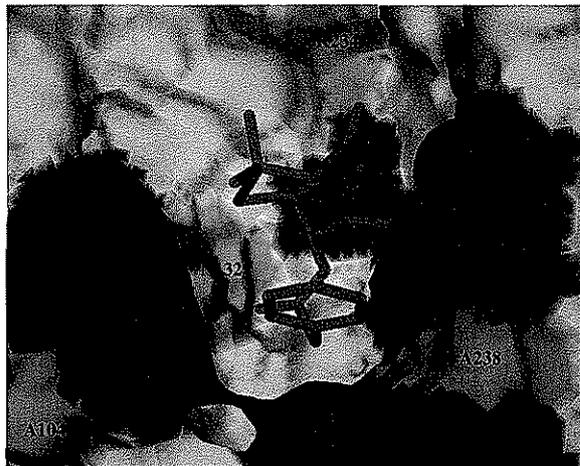


Figura A5. Bencilpenicilina en el sitio activo de β la-PC1. La bencilpenicilina está unida, vía serina 70, en enlace éster con β la-PC1. Mutante a quien le fue eliminada la maquinaria de desacilación, 1GHP [2].

oxígeno carbonílico y la cadena lateral de Asn¹³² y entre el nitrógeno de la amida y el grupo carbonilo de la cadena principal del residuo Gln²³⁷. Esta configuración de unión del sustrato es consistente con la resistencia a la hidrólisis observada en antibióticos con cadenas laterales más grandes, como es el caso de la cefotaxima.

Aún cuando pertenezcan a la misma clase, posean el mismo plegamiento y la misma maquinaria catalítica, TEM1 y PC1 presentan perfiles de especificidad distintos. TEM1 es capaz de hidrolizar tanto penicilinas como cefalosporinas de primera generación mientras que PC1 sólo inutiliza penicilinas, aunque ninguna de las dos confiere resistencia a cefalosporinas de tercera generación [25]. Esta heterogeneidad fenotípica sólo es explicable atendiendo a las no muy sutiles diferencias estructurales que presentan ambas enzimas en regiones catalíticamente importantes y que deben ser tomadas en cuenta para la discusión de los resultados que luego se presentarán.

El epicentro de las diferencias entre TEM1 y PC1 es la zona de la asa Ω . Precisamente en esta región el sitio activo de PC1 es más estrecho que el de TEM1 por efecto de Ile²³⁹, residuo insertado en la secuencia de PC1 y no presente en el resto de las β -lactamasas de la clase [28]. El enlace peptídico en configuración *cis* entre los residuos 166 y 167 parece ser necesario para el correcto posicionamiento de Glu¹⁶⁶, importante en la segunda parte de la hidrólisis. Sin embargo, en PC1 ese enlace une residuos no prolínicos lo que conduce a una asa Ω menos estable que las del resto de las β -lactamasas clase A. Y no sólo eso, en toda la familia está conservado el puente salino entre Arg¹⁶⁴ y Asp¹⁷⁹ que ata el cuello de la asa Ω y la estabiliza; en TEM1, además de ese puente salino, existen otros tres que coadyuvan en la estabilización y unión de la asa al resto de la molécula [26] pero que no están presentes en PC1. Algo muy importante es la diferencia de polaridad en la cercanía de Glu¹⁶⁶, donde se encuentran moléculas de agua catalíticamente importantes. En TEM1 esta zona tiene un claro carácter hidrofóbico conferido por Phe⁷², Leu⁷⁶ y Ala¹³⁵, mientras que en PC1 esas mismas posiciones son ocupadas por serina, asparagina y asparagina, respectivamente, quienes dan al sitio un carácter distinto al de TEM1 [26]. En la interfase de los dominios, Gly²⁴⁵ es reemplazada por Asn²⁴⁵ en PC1 lo que genera problemas estéricos que se resuelven con la presencia de Ala en la posición 69, a diferencia de Met encontrada en TEM1. Sin embargo, Asn²⁴⁵ y Ala⁶⁹ no llenan totalmente el espacio y, para hacerlo, en la posición 238 hay una Ala, en contraste con la Gly presente en el resto de la clase. El que las parejas 69:238 sean distintas en TEM1 y PC1 tiene importancia dado que la modificación de su calidad conduce a la hidrólisis de cefotaxima en TEM1, en particular con la sustitución G238S.

El mecanismo catalítico

Existen dos modelos del mecanismo de catálisis cuyas diferencias se limitan al modo de activación de la serina catalítica: el modelo simétrico y el modelo asimétrico. Ambas propuestas coinciden en el ataque nucleofílico de la Ser⁷⁰ al carbono carbonílico de la β -lactama como primer paso para la formación del complejo acilo-enzima [22, 28, 30]. Sin embargo, el hidroxilo de esa serina por si solo no es suficientemente nucleofílico para realizar con éxito el ataque, por lo que debe ser activado. El modelo simétrico propone que la Ser⁷⁰ es activada por el Glu¹⁶⁶ a través de un puente de hidrógeno mediado por una

molécula de agua [22, 31-33]. De esta manera, la transferencia del protón del hidroxilo de la Ser⁷⁰ al nitrógeno β-lactámico sería inmediatamente posterior al ataque nucleofílico. La principal objeción al modelo es la distancia que separa a Ser⁷⁰ de Glu¹⁶⁶. Por otro lado, el modelo asimétrico asigna el papel de base general a Lys⁷³ quien activaría a Ser⁷⁰ mediante la adopción y transferencia del protón del hidroxilo serínico al nitrógeno de la β-lactama, lo que supondría una lisina sin carga a pH fisiológico [34]. Para evadir este problema se ha sugerido que Lys⁷³ conserva su carga positiva y que actúa como facilitador de la transferencia protónica al generar un gradiente de potencial [28]. Al producirse el ataque nucleofílico por la Ser⁷⁰ contra el centro electrofílico de la β-lactama se genera transitoriamente un oxianión que es estabilizado por la estructura ya descrita e inmediatamente después se desemboca en el complejo acilo-enzima.

No hay controversia en que la base general para la segunda parte de la reacción, la desacilación, sea Glu¹⁶⁶ [35-37]. El proceso de desacilación es análogo al de acilación: una molécula de agua activada por Glu¹⁶⁶ ataca nucleofílicamente el carbonilo acilado a la enzima, se genera un oxianión cuya carga es estabilizada e inmediatamente después se produce la desacilación para regenerar el catalizador y liberar el ácido penicilánico correspondiente

β-lactamasas de espectro extendido

No mucho después de la introducción de las cefalosporinas de tercera generación, que se diseñaron y sintetizaron como solución a la resistencia bacteriana contra penicilinas y cefalosporinas de las primeras generaciones, se aislaron β-lactamasas que hidrolizaban los nuevos antibióticos. La mayoría de las β-lactamasas de amplio espectro son derivados de TEM1 o SHV1 que después de 1 a 4 sustituciones son capaces de conferir gran resistencia a las oximino-cefalosporinas. Hasta la fecha no se han reportado variantes naturales de PC1 de

Bla	6	21	39	42	69	92	104	153	164	182	196	238	240	265	268	276	penG	cer	ctx	caz	penG	cer	ctx	caz	penG	cer	ctx	caz	Ref		
TEM-1	Q	L	Q	A	M	G	E	H	R	M	G	G	E	T	S	N	25	680	6000	4280	1600	1500	9	0.3	6.4	2.2	1.305	0.07	1.005	0.05	50
TEM-3		K				K					S						6	30	100	200	45	43	202	18	7.5	1.4	2	0.1	51,52		
TEM-4	F					K					S																				
TEM-8		K				K				S							9		72	135	100		567	100	11		9.6	10		53	
TEM-15						K					S						6	30	100	80	40	37	180	7	6.7	1.2	1.8	0.1		54	
TEM-19											S																				
TEM-20										T																					
TEM-21		K				K	R				S						9	120	400	ND	50	120	120	4	5.5	1	0.9	0.01		52	
TEM-22		K				K					S																				
TEM-25	F										S	M					9		350	118	100		135	0.5	11		0.4			55	
TEM-42		K	V								S	K	M				1.4	54	124	98	100	160	110	3	7.1	3	0.9			56	
TEM-47											S	K	M																		
TEM-48	F										S	K	M																		
TEM-49	F										S	K	M	G																	
TEM-50			L			K					S			D			17	310	873	ND	110	320	150	3	6.5	1	0.2			54	
TEM-52						K				T	S						5.3	13	30	239	100	130	229	50	1.9	10	8	0.2		51	
TEM-66		K			D	K					S						5		100	450	100		400	40	20		4	0.1		57	
TEM-68											S	K	M																		
TEM-72										T	S	K					1.6	3.7	22	75	13	13	37	6	8.1	3.5	1.7	0.1		58	
TEM-88						K				T	D	S																			
TEM-92	K					K				T	S																				
TEM-93										T	S	K																			
TEM-1	Q	L	Q	A	M	G	E	H	R	M	G	G	E	T	S	N	Km, (uM)				Kcat, (1/s)				Vmax, (%)		Kcat/Km		Vmax/Km, (1/s)		

Tabla A1. Grupo de variantes naturales de TEM1 de espectro extendido caracterizadas por la sustitución G238S. Sólo son presentados los datos cinéticos determinados a pH 7 y a una temperatura entre 30 y 37°C. penG (penicilina G), cer (cefaloridina), ctx (cefotaxima) y caz (ceftazidima).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

amplio espectro. El conjunto de variantes de TEM1 es una magnífica fuente de información que ofrece la posibilidad de establecer relaciones estructura-función; sin embargo, esa posibilidad se anula por la incertidumbre de la presión selectiva que originó esas variaciones. Se ha sugerido que las β -lactamasas obtenidas de aislados clínicos probablemente son la respuesta a una presión selectiva fluctuante y generada por más de un antibiótico [39, 40].

Bla	21	39	51	104	164	182	237	238	240	265	penG	cer	ctx	caz	penG	cer	ctx	caz	penG	cer	ctx	caz	Ref
TEM-1	L	Q	L	E	R	M	A	G	E	T	25	680	6000	4280	1600	1500	9	0.3	64	2.2	1.30E-02	7.00E-05	50
TEM-5				S		T			K														
TEM-6				K	H						6.9	42	18	240	100	26	1.4	57	14	0.7	0.1	0.2	59
TEM-7		K		S							3.1	87	100	1000	40	26	1.5	9	13	0.3	1.60E-02	9.00E-03	43
TEM-8		K		S		S					9		72	135	100		667	1404	11		9.3	10	53
TEM-9	F			S					M														
TEM-10				S					K		2	62	46	150	100	59	6	120	49	1	0.1	0.8	43,59
TEM-11		K		H							6.1	123	122	129	85	160	2.8	18	14	1.3	2.30E-02	1.40E-02	43
TEM-12				S																			
TEM-16		K		K	H																		
TEM-24		K		K	S		T		K		5.5		50	377	100		130	1410	18		2.6	3.7	60
TEM-26				K	S																		
TEM-27				H					K	M													
TEM-28				H					K		5.8	34	31	170	100	3.3	1	25	17	1	0	0.1	59
TEM-29				H								114	39	80		100	3.7	12		0.9	0.1	0.2	61
TEM-43				K	H	T					26	120	33	160	240	170	6.9	43	9.2	1.4	0.2	0.3	62
TEM-46		K		K	S				K		5		50	159	100		13	185	20		0.3	1.2	60
TEM-53	F			S																			
TEM-60		K	P	K	S						9	28	31	59	26	15	1.5	12	2.8	0.5	0.1	0.2	63
TEM-61		K		H					K														
TEM-63				K	S	T																	
TEM-1	L	Q	L	E	R	M	A	G	E	T	Km, (uM)				Kcat, (1/s) Vmax, (%)				Kcat/Km = Vmax/Km				

Tabla A2. Grupo de variantes naturales de TEM1 de espectro extendido caracterizadas por la sustitución R164S/H. Sólo son presentados los datos cinéticos determinados a pH 7 y a una temperatura entre 30 y 37°C. penG (penicilina G), cer (cefaloridina), ctx (cefotaxima) y caz (ceftazidima).

A pesar de esos inconvenientes, dentro del conjunto de TEM's de amplio espectro son claramente distinguibles dos grupos: las que contienen la sustitución G238S (tabla A1) y las que contienen la sustitución R164S o R164H (tabla A2). A excepción de TEM-8, en ningún otro caso G238S y R164S/H se observan juntas, incluso se ha demostrado el efecto nocivo de la combinación de ambas sustituciones con respecto a la resistencia que confiere cada una por separado [41]. La existencia de la mutante TEM-8 podría ser el resultado de condiciones de presión selectiva muy particulares, en consonancia con lo dicho en el párrafo anterior. Las sustituciones características de ambos grupos están casi siempre acompañadas por las sustituciones E104K o E240K. La información cinética disponible de estas β -lactamasas de espectro extendido es muy heterogénea tanto por las condiciones de la medición como por la forma de reportarla, por lo que sólo es útil para distinguir la preferencia de sustrato de una variante dada y no así para hacer comparaciones entre ellas. Aunque a nivel de K_M no hay una clara preferencia por alguna de las cefalosporinas de tercera generación más corrientes (cefotaxima o ceftazidima), las eficiencias catalíticas indican que las del grupo caracterizado por G238S son preferentemente cefotaximasas. En cambio, las del grupo R164S/H tienen claramente mayor afinidad por cefotaxima pero

hidrolizan ceftazidima más rápidamente. Aunque la eficiencia catalítica es mayor para el último antibiótico, la diferencia no es tan abrupta como en el caso del grupo G238S en su preferencia por cefotaxima respecto de ceftazidima.

La mayoría de los derivados de SHV-1 contienen la combinación G238S:E240K (tabla A3), con igual preferencia de sustratos que sus homólogas de TEM, aunque con la novedad que G238 también puede ser sustituida por Ala y Asp. En este grupo no existe la sustitución del residuo R164 pero sí la de D179 por Ala, Asn o Gly. Curiosamente, el efecto de G238S en el incremento de la hidrólisis de cefotaxima es significativamente mayor en SHV1 que en TEM1 [42], a pesar de la similitud de sus secuencias (68 %) y de sus estructuras cristalográficas [27], lo que pone de manifiesto la influencia de las diferencias estructurales, aun cuando son muy sutiles, en el efecto de sustituciones equivalentes.

BLA	8	35	43	48	54	75	80	89	122	130	140	158	173	179	192	193	205	238	240	penG	cer	ctx	caz	penG	cer	ctx	caz	penG	cer	ctx	caz	Ref							
SHV-1	I	L	R	E	G	V	V	E	L	S	A	N	N	D	K	L	R	G	E					100	50	0.1	0.1									64			
SHV-2																				S	3.8	20	7.8	41	100	130	1.9	0.5	26	6.5	2.4	0					65		
SHV-2A																				S																			
SHV-3																				L																			
SHV-4																				L	S	K	12	10	4.6	17	100	5.6	1.1	0.7	8.3	0.6	0.2	0					65
SHV-5																				S	K	15	31	9	24	100	160	1.9	1.0	6.6	5.1	2.1	0.4					66	
SHV-7	F	S																		S	K	6.5	13	1.1	24	100	91	30	13	15	7	2.7	0.5					65	
SHV-9						Del					R				N	V				S	K	18	27	10	21	100	182	24	10	5.5	6.7	2.4	0.5					66	
SHV-10						Del				G	R				N	V				S	K	265	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	0.4								66	
SHV-12			Q																	S	K																		
SHV-13			Q																	A		10	97	52	91	100	176	27	0.4	10	1.8	0.5	0					67	
SHV-15			Q		K		M	M	K											S	K																		
SHV-18	F	S																		A	K	3.2	12	3.5	28	100	200	27	14	32	17	7.8	0.5					68	
SHV-20															F					S																			
SHV-21									F						F					S																			
SHV-22															K					D	K																		
SHV-6																				A																			
SHV-8																				N																			
SHV-24																				G						210	ND	30						69					
BLA	8	35	43	46	54	75	80	89	122	130	140	158	173	179	192	193	205	238	240	Km, (uM)				Vmax, %				Vmax/Km, %											

Tabla A3. Grupo de variantes naturales de SHV1 de espectro extendido. Sólo son presentados los datos cinéticos determinados a pH 7 y a una temperatura entre 30 y 37°C. penG (penicilina G), cer (cefaloridina), ctx (cefotaxima) y caz (ceftazidima).

Evolución *in vitro* de TEM1 hacia la hidrólisis de cefotaxima

Con diversos propósitos y medios, al menos cuatro veces se ha dirigido la evolución de TEM1 hacia la hidrólisis de cefotaxima [18-21]. En todos los casos la mejor solución para el cambio de especificidad ha girado en torno de las sustituciones G238S y E104K (tabla A4), al igual que en las β -lactamasas de espectro extendido naturales, aunque en cada grupo aparecen sustituciones ajenas al otro, seguramente en relación con las diferencias de las presiones selectivas que las generaron. Especialmente interesante es el trabajo de Zacco [19] quien pudo capturar varias soluciones correspondientes a máximos locales antes de arribar a la mejor solución o máximo global en el espacio de adecuación: la solución R164S:E104K, con sus preferencias catalíticas duales, es independiente de la solución G238S:E240K y lo mismo de ésta con respecto a la solución G238S:E104K, la más eficiente y ganadora.

Han sido propuestos dos modelos para explicar el cambio de especificidad después de la introducción de G238S. El primero de ellos supone la formación de un puente de hidrógeno entre la nueva serina de la posición 238 y el grupo oximino de la cadena lateral de las cefalosporinas de ese tipo. Este modelo no implica una alteración estructural mayor de la β -lactamasa, tan solo aumento de la afinidad y, por lo tanto, de la eficiencia catalítica por la adición de una interacción específica con el sustrato [43]. El otro modelo sí sugiere modificaciones estructurales a la enzima por conflictos estéricos entre la Ser²³⁸ y los residuos que la rodean. Este conflicto podría activar uno de dos posibles mecanismos: movimiento de la banda B3, donde se encuentra el residuo 238, o desplazamiento y desestabilización de la asa Ω , que en cualquiera de los dos casos ensancharía el sitio activo y permitiría el mejor acomodo de sustratos con sustituyentes más voluminosos, del tipo de los aminotiazoles [44, 45]. Por análisis más detallado, se ha sugerido que estos modelos no son excluyentes y que si bien la formación de un enlace de hidrógeno es necesario, aunque intramolecular e inespecífico para el cambio de especificidad, también lo es el aumento de tamaño de la cavidad catalítica [45].

Al sustituirse Arg¹⁶⁴ por Ser o His se rompe el puente salino entre ese residuo y Asp¹⁷⁹, la disolución de esta interacción podría liberar a la asa Ω provocando su desplazamiento y el consecuente ensanchamiento de la cavidad catalítica [44, 46]. En particular, la flexibilización de la conformación de la asa Ω influiría en el posicionamiento de Glu¹⁶⁶ y en el reacomodo de los residuos 85-142, que forman una de las paredes del sitio activo [47]. El papel de las sustituciones E104K y E240K en el cambio de especificidad no es claro, parecen ser mutuamente excluyentes [48] y sólo tienen verdadera importancia en combinación de G238S o R164S/H [43]. La Lys²⁴⁰ podría formar un puente salino con una oxima cargada, lo cual sólo tiene sentido en el caso de la ceftazidima [48]. A Lys en 104 se le ha atribuido el papel de estabilizador de la asa 130-132 [49].

	Stemmer	Zaccolo/Gherardi				Long-McGie	Escobar-Sánchez	
Ciclo 1	A18V						H26R	
	E104K	G238S				E104K	E104K	G238S
	M182T	E240G	R164S	R241H	G238S	G238S	Y105H	E240K
	G238S	0.39	0.78	D254G	3.125	T263M	G238S	K256R
	320	6.25				51.2	0.75	1
Ciclo 2	A42G							
	G92S	G238S					E104K	E104K
	E104K	E104K					M182T	G238S
	M182T	R164S					G238S	K256R
	G238S	3.125					3.4	5
Ciclo 3	R241H	D254G						
	640	100						
		G238S						
		E104K						
		M182T						
	G238S							
	800							
	100							

Tabla A4. Resultados de experimentos independientes de evolución *in vitro* de la β -lactamasa TEM1 hacia la hidrólisis de cefotaxima. Los números debajo de cada serie de sustituciones son la concentración mínima inhibitoria expresada en $\mu\text{g/ml}$; estos no son comparables entre experimentos ya que fueron calculados con densidades de inóculo diferentes. Stemmer [18], Zaccolo [19], Long-McGie [20] y Escobar-Sánchez [21].

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Objetivos

Para examinar la influencia del punto de partida en la solución generada al mismo problema evolutivo, bajo las premisas ya mencionadas, había que superar al menos los siguientes objetivos:

- a) Exportar PC1 al periplasma de *E. coli*.
- b) Dirigir la evolución de PC1 hacia la hidrólisis de cefotaxima, y
- c) Identificar los determinantes del cambio de especificidad.

Resultados

Las construcciones

La β -lactamasa PC1 se obtuvo del vector pTS32, cedido por Osnat Herzberg [70]; sin embargo, en este vector PC1 se encontraba sin péptido señal y era inútil para nuestros propósitos. Entonces, PC1 fue fusionada al péptido señal de TEM1 precedido del promotor *trc* (figura R2). Esta construcción fue clonada entre los sitios BamHI y XhoI del vector pK que, al igual que pS, fue preparado a partir de pBCSK+ (figura R1).

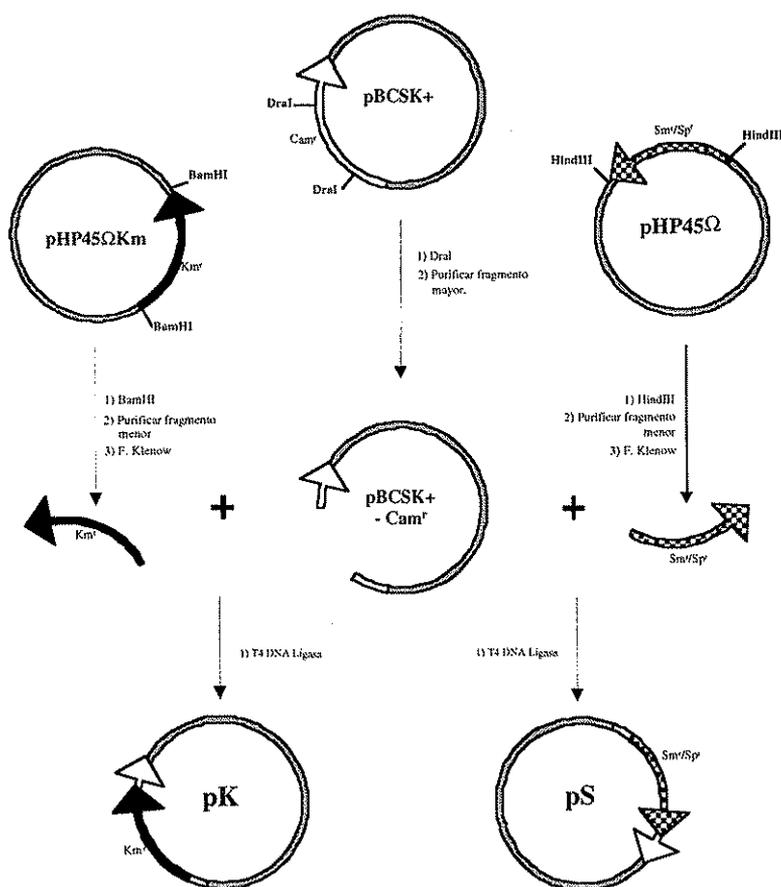


Figura R1. Construcción de los vectores pK y pS. El fragmento de 330 pb entre los sitios DraI del gene *Cam^r* de pBCSK+ fue escindido con esa enzima de restricción. Se purificó el fragmento mayor. Los genes de resistencia a canamicina y espectinomicina se obtuvieron por digestión de pHP45ΩKm y pHP45Ω, con BamHI y HindIII, respectivamente. Después de purificar los fragmentos se rellenaron los extremos cohesivos con el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I. Cada uno de los cassetes Ω se ligó al fragmento de pBCSK+. XL1 Blue MRF^r fue transformada con las ligaciones y seleccionadas las colonias resistentes a canamicina y espectinomicina. Se comprobaron las construcciones mediante digestiones. Rosa Elena Mares construyó pK.

La concentración mínima inhibitoria de ampicilina para *E. coli* transformada con PC1 en su nuevo contexto (pPPCwt) es de 200 $\mu\text{g/ml}$ mientras que la de cefotaxima es de tan solo 0.03 $\mu\text{g/ml}$, mismo valor que el de la cepa sin transformar. La secuencia de la construcción presentó varias discrepancias con las secuencias reportadas: T(-34)C, que aunque se localiza en el operador de *lac* no está reportada entre las que lo vuelven constitutivo [71]. También apareció K158N, sustitución que ya había sido reportada y que por encontrarse expuesta al solvente y en un sitio no crítico no tiene ningún efecto en el plegamiento ni en las propiedades cinéticas de la enzima [28].

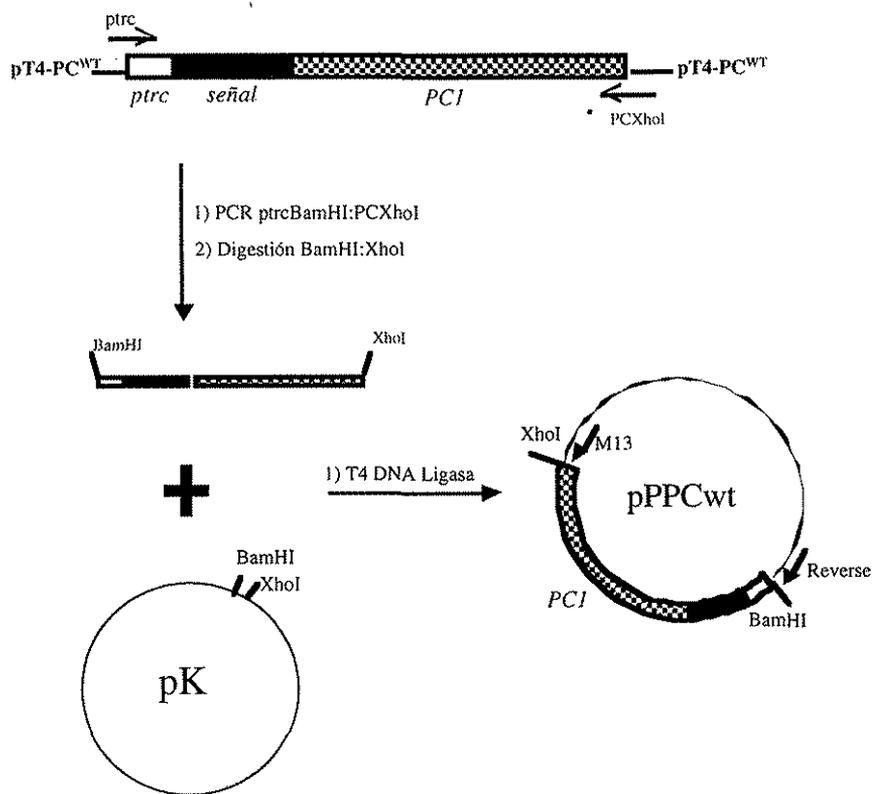


Figura R2. Construcción de pPPCwt. PCI se fusionó al péptido señal de TEM1 y al promotor trc. Esta construcción se clonó entre los sitios BamHI y XhoI de pK para generar pPPCwt.

La evolución dirigida

El primer ciclo. Mediante PCR sexual [18, 72] se construyó el banco PC1S2A sobre el gene silvestre de PC1 que resultó de 6.45×10^4 clonas. Las transformantes de este banco fueron seleccionadas por su resistencia a cefotaxima en un rango creciente de concentraciones del antibiótico entre 0.02 y 0.16 $\mu\text{g/ml}$. Se obtuvieron cuatro clonas que, en combinaciones diferentes, contienen las sustituciones R164G, D179N, D179G y K192R. La mejor de ellas confiere una resistencia a cefotaxima de alrededor de 0.20 $\mu\text{g/ml}$ (tabla R1). Los promotores de estas variantes también contienen mutaciones, todas en el operador de lac y en posiciones cuya mutación resulta en transcripción constitutiva [71]. La comparación de las secuencias de esos promotores con las de clonas no sometidas a la presión selectiva sugiere que probablemente esas mutaciones otorguen alguna ventaja a quien las contenga (tabla R2). La tasa de mutagénesis para este banco fue de 0.45 % (26 mutaciones en 5760 pb secuenciados), distribuida de la siguiente manera: transiciones, 73%; transversiones, 23%; e inserciones, 4%.

El segundo ciclo. Las cuatro ganadoras del primer ciclo se tomaron como parentales para el banco PC1Mn1B, de 2.68×10^5 clonas. Para este banco se decidió utilizar como medio para la introducción de variabilidad a la PCR mutagénica, técnicamente mucho más sencilla que la PCR sexual, aunque con el compromiso de recurrir a las propiedades recombinogénicas de la segunda en el siguiente ciclo evolutivo. Los genes parentales fueron

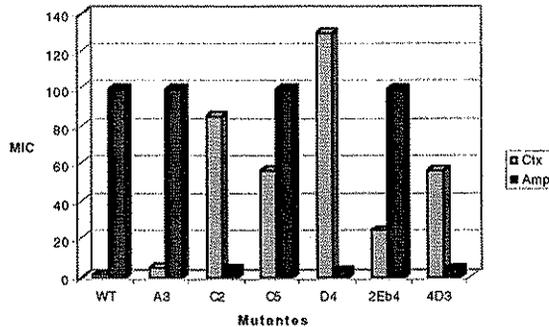
mezclados equimolarmente y de sus secuencias se deriva que la representación del par de sustituciones D179N:K192R, genotipo de A1 y A4, es de 1/2, mientras que la de las soluciones de las otras dos ganadoras es de tan solo 1/4. Seis colonias, transformantes de este banco, fueron seleccionadas entre 0.10 y 2.0 µg/ml de cefotaxima. Todas las nuevas PC1's muestran en sus secuencias la sustitución R164G, encontrándose combinada con D179G en cinco de las seis clonas seleccionadas. Ninguna de las variantes es descendiente de D179N:K192R, a pesar de que estaba sobre-representada. Esto podría sugerir alguna limitación de ese par de sustituciones para desarrollar una mejor solución para el cambio de especificidad. En el contexto de la exitosa combinación R164G:D179G, es interesante la ausencia de una doble mutante R164G:D179N. Las secuencias de los promotores de las siete ganadoras muestra la misma combinación de mutaciones que la encontrada en A3: G(-29)A, A(-32)T y G(-41)A. Dada la ausencia de recombinación en el proceso de obtención del banco, las secuencias de los promotores indican que todas las variantes son descendientes de A3. B1, la mejor de todas ellas, confiere una resistencia a cefotaxima en concentraciones mayores a 0.650 µg/ml, al menos 21 veces la resistencia mostrada por la enzima silvestre.

		24	28	34	52	67	89	96	103	115	117	120	140	147	153	161	164	167	168	173	179	188	192	199	213	216	226	253	257	WT	Ctx
		WT	C	F	N	K	A	N	H	V	K	I	K	K	K	N	R	I	E	S	D	K	K	K	N	S	P	K	E	WT	M = 0.030
CICLO 1	a1																				N		R							a1	M = 0.180
	a2																G				G									a2	M = 0.180
	a3																G													a3	M = 0.150
	a4																					N		R						a4	M = 0.210
CICLO 2	b1		Y		N								R				G		G								T		K	b1	M > 0.650
	b2																G	M			G									b2	M = 0.500
	b3																G				G									b3	M = 0.350
	B4						Y	R								R		G			G				E		Q			B4	M = 0.450
	B6	S									R					R		G		G		G	E							B6	M = 0.550
	B7	S									R					R		G		G		G	E							B7	M = 0.500
CICLO 3	c1																G		G	P	G					T			c1	M > 9.00	
	c2																G		G		G					T			c2	M = 2.66	
	c3																G		G		G				T		K		c3	M = 2.66	
	c4						V						R				G		G		G				S	T			c4	M = 3.00	
	c5																G		G						T				c5	M = 1.74	
	c6			Y													G		G						T				c6	M = 2.00	
	c7				N												G		G		G				T		M		c7	2.00 < M < 2.66	
	c8		Y														G		G		G				T				c8	M = 2.00	
	c9												R	R			G		G		G				T				c9	M = 2.00	
	c10											I	T		E		S	G		G		G	R			T			c10	M = 2.00	
CICLO 4	D3																G		G	P	G				T				D3	M = 3.4	
	D4																G		G	P	G				T				D4	M = 3.8	
	D5																G		G	L	G				T				D5	2.6 < M < 3.0	
	D6																G		G	L	G				T				D6	2.6 < M < 3.0	
	D7																G		G	P	G				T				D7	M = 3.4	
	D8																G		G	P	G				T				D8	3.4 < M < 3.8	

Tabla R1. Evolución de la β-lactamasa PC1 hacia la hidrólisis de cefotaxima. Las clonas con nomenclatura en negativo son las parentales del ciclo evolutivo subsecuente. La concentración mínima inhibitoria está dada en µg/ml de cefotaxima y fue determinada en ausencia de IPTG.

El tercer ciclo. B1, B2 y B3 del ciclo precedente fueron las secuencias parentales para la obtención, mediada por PCR sexual, del banco PC1S2C. Esta vez la selección se hizo entre 0.1 y 6.2 µg/ml de cefotaxima, obteniéndose diez clonas que confieren una resistencia a cefotaxima entre 1.7 y 3 µg/ml. Todas las secuencias del promotor muestran la misma combinación de mutaciones de A3, ninguna mutación adicional. Como era de esperarse, R164G aparece en todas las secuencias ya que las parentales no ofrecían otra posibilidad. Quien se fijó en todas, a pesar de que Thr²¹⁶ sólo estaba representada en 1/3 con respecto a sus contrapartes silvestres, fue la sustitución S216T; de manera semejante, E168G

influencia de la sustitución D179G. De este modo, de la variante A3 se concluye la contribución de la sustitución R164G; comparando C2 y D4 resulta la participación de S173P, mientras que la de D179G se advierte comparando C2 con C5 o, más claramente, D4 con 4D3. La contribución de S216T se deduce de comparar los fenotipos de A3 y 2Eb4, mientras que la de E168G de comparar C5 y 2Eb4 (tabla R3 y gráfica R1).



Gráfica R1. Concentración mínima inhibitoria de cefotaxima (Ctx) y ampicilina (Amp) de las mutantes cuyas sustituciones están involucradas en el cambio de especificidad. Los valores del MIC están normalizados con respecto al MIC de PC1 silvestre y magnificados 100X en el caso de ampicilina.

La solución de TEM1 en PC1

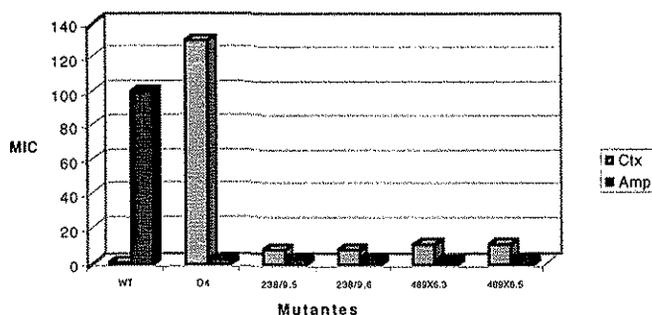
El conjunto de sustituciones que condujeron al cambio de especificidad en PC1 es diferente del generado en TEM1 cuando fue evolucionada *in vitro* y sólo comparte dos elementos, residuos 164 y 179, con algunas variantes naturales de TEM1 y SHV1 que son secundariamente cefotaximasas (ver Antecedentes). Una de las hipótesis del proyecto era la posible obtención de una solución diferente, al menos en términos de sustituciones, de la encontrada en TEM1, en cuyo caso la introducción ingenieril de la solución de una en la otra, además de probar si también generaba el cambio de especificidad, permitiría comprender las razones de la divergencia. El tamaño reducido de los bancos construidos, aunado a las mutaciones en el promotor (ver más adelante *Los problemas de la evolución del promotor*), obligaba a hacer el trasplante ya que la ventaja que daban esas mutaciones a las variantes estructurales que las contuvieran podría haber desviado el curso evolutivo y la solución obtenida haber sido sólo un máximo local. De este modo, fue necesario examinar la competencia de la solución de TEM1 en PC1 para verificar si la mejor solución de ésta era auténticamente distinta.

Tabla R4. Bancos de variantes de PC1 generados por mutagénesis a saturación en los sitios 238 y 239 (banco 238/9X) o 104, 238 y 239 (banco 489X6).

		Bancos	
		238/9X	489X6
Tamaño		2.3×10^4	8.3×10^4
Combinatoria		1×10^5	3.3×10^5

Del análisis de los casos de evolución *in vitro* y del banco de datos de las variantes naturales de espectro extendido se definieron dos “soluciones de TEM1” integradas por las sustituciones G238S y E104K o G238S y E240K, combinaciones que son mutuamente excluyentes y, para cefotaxima, resulta mejor la primera que la segunda. Sin embargo, según el alineamiento de las secuencias de las integrantes de la familia de las β -lactamasas clase A [38], PC1 tiene una inserción en la posición 239, responsable de la mayoría de sus

diferencias estructurales, y posiblemente fenotípicas, con TEM1, por lo que en ésta Gly²³⁸ y Glu²⁴⁰ son residuos consecutivos. PC1 ya había sido ingenierada para cambiar su especificidad [70]. En dicho trabajo se introdujo la sustitución G238S y se eliminó el residuo Ala²³⁹, en un intento por homologar PC1 con TEM1, con lo cual obtuvieron un cambio de especificidad modesto. Estructuralmente, Glu²⁴⁰ de TEM1 e Ile²³⁹ de PC1 comparten aproximadamente la misma posición con respecto a su sitio activo. Entonces, se decidió evadir un esquema totalmente mimético y en su lugar se construyeron bancos donde se variabilizó a saturación las posiciones 238 y 239, y 104, 238 y 239 de PC1, seleccionándose posteriormente las variantes capaces de conferir resistencia a cefotaxima.



Gráfica R2. Comparación de los MIC's de cefotaxima (Ctx) y ampicilina (Amp) de la mejor de las variantes evolucionadas de PC1 (D4) y las ganadoras de la mutagénesis a saturación de los sitios 238-239 y 104, 238, 239. Los MIC's están normalizados con respecto al MIC de la PC1 silvestre y magnificados 100X en el caso de ampicilina.

Los dos bancos construidos son del tamaño suficiente para garantizar la presencia de todas las combinaciones posibles de aminoácidos de los sitios variabilizados (tabla R4). Del primer banco, 238/9X, se obtuvieron dos clonas que confieren una resistencia hasta siete veces la de PC1 silvestre. En ambas se sustituyó Ala²³⁸ por Leu, mientras que la posición Ile²³⁹ fue sustituida por Ser en una, y por Thr en la otra (tabla R5). Los residuos 104 y 239 están uno frente al otro formando un canal al que se le ha atribuido influencia en el perfil de especificidad; como era posible que la calidad del residuo de la posición 104 condicionara el tipo de sustitución seleccionada para la posición 239, la variabilización de ambos residuos y su libre ajuste podría conducir a una combinación de sustituciones con mejor fenotipo. Las dos clonas seleccionadas del banco con las tres posiciones variabilizadas conservan la sustitución A238L, ya vista en las ganadoras del banco doble, aunque contienen Asp y Ser en la posición 239, y Arg y Lys en la posición 104. Ambas clonas fueron mejores que las precedentes con dos sitios variabilizados, confiriendo una resistencia a cefotaxima hasta once veces mayor que la de la enzima silvestre (tabla R5 y gráfica R2).

PC1	104	238	239	PC1	Ctx/IPTG	Amp/IPTG	PC1
WT	A	A	I	WT	M = 0.03	M >1946	WT
238/9.5		L	T	238/9.5	M = 0.228	51 < M < 76	238/9.5
238/9.6		L	S	238/9.6	M = 0.228	51 < M < 76	238/9.6
489X6.3	R	L	D	489X6.3	0.342 < M < 0.512	M = 34	489X6.3
489X6.5	K	L	S	489X6.5	M = 0.342	M = 51	489X6.5

Tabla R5. Secuencias y concentración mínima inhibitoria para cefotaxima y ampicilina de las ganadoras de los bancos de mutagénesis a saturación 238/9X (238, 239) y 489X6 (104, 238, 239). La concentración mínima inhibitoria está dada en µg/ml y fue calculada en presencia de IPTG 0.8 mM.

La relación entre las integrantes de la solución

Por la complejidad de su solución, el análisis de la historia evolutiva de PC1 permite identificar varias etapas en el proceso de desarrollo de la nueva especificidad. Una consecuencia obvia de lo anterior es cuestionar la independencia de la contribución de cada sustitución al cambio de especificidad o, de ser dependientes, quién lo es respecto de quién. Inicialmente se trató de completar el conjunto de las cinco mutantes simples, aunque sólo se han generado cuatro (tabla R6), para identificar las sustituciones capaces de conferir resistencia a cefotaxima individualmente. Solo R164G y D179G generan un claro fenotipo de resistencia a cefotaxima. Aunque S216T, al igual que R164G, independientemente no confieren resistencia a cefotaxima, la de ampicilina no sufre una caída abrupta, a diferencia de S173P, quien tampoco confiere resistencia a cefotaxima.

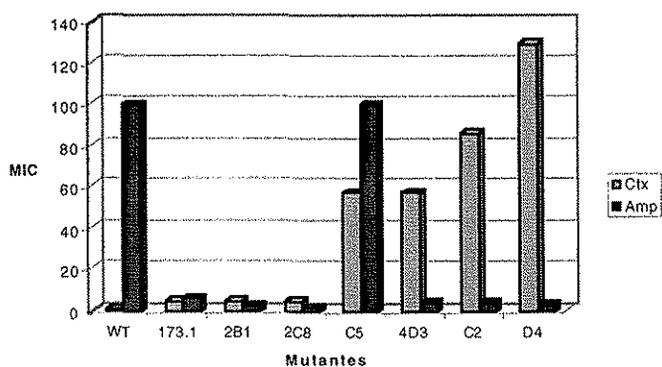
	PC1	164	168	173	179	216	PC1	MIC.Ctx	MIC.Amp	PC1
	WT	R	E	S	D	S	WT	M = 0.03	M >1946	WT
simples	A3	G					A3	0.151 < M < 0.228	M >1946	A3
	173.1			P			173.1	M = 0.03	M = 114	173.1
	179.5				G		179.5	M = 0.151	51 < M < 76	179.5
	216.3					T	216.3	M = 0.03	865 < M < 1298	216.3
dobles	2B1	G		P			2B1	M = 0.151	51 < M < 76	2B1
	2Eb4	G				T	2Eb4	M = 0.769	M >1946	2Eb4
	2D7		G	P			2D7	M = 0.045	22 < M < 34	2D7
	2F1			G		T	2F1	M = 0.045	577 < M < 865	2F1
	2C8			P	G		2C8	0.151 < M < 0.228	34 < M < 51	2C8
	2A1				G	T	2A1	0.228 < M < 0.342	M = 51	2A1
múltiples	C5	G	G			T	C5	1.730 < M < 2.595	M >1946	C5
	C2	G	G		G	T	C2	M = 2595	76 < M < 114	C2
	4D3	G	G	P		T	4D3	1.73 < M < 2.595	76 < M < 114	4D3
	D4	G	G	P	G	T	D4	3.892 < M < 5.838	51 < M < 76	D4
	D5	G	G	L	G	T	D5	M = 3.892	51 < M < 76	D5

Tabla R6. Mutantes que sólo incluyen combinaciones de las cinco sustituciones finales construidas mediante mutagénesis sitiodirigida u obtenidas durante el proceso de evolución dirigida. La concentración mínima inhibitoria para cefotaxima (Ctx) y ampicilina (Amp) está expresada en µg/ml y fue determinada en presencia de IPTG 0.8 mM.

Las mutantes dobles que se han obtenido son pocas. A la luz de los fenotipos de las mutantes simples, las mutantes dobles son interesantes ya que permitirían verificar si la combinación de las sustituciones individualmente independientes con las que no lo son genera, en todos los casos, una mejora del fenotipo o si existe otro nivel de independencia donde la combinación de dos sustituciones inocuas conducen al cambio de especificidad. De las construcciones hechas, las que no reúnen las sustituciones R164G o D179G con cualquier otra no confieren claramente resistencia a cefotaxima. Las que contienen R164G sólo tienen mejora del fenotipo cuando se combina con S216T; mezclada con S173P no sólo no aumenta el MIC para cefotaxima, sino que la resistencia que confiere a ampicilina disminuye bastante. Para las que contienen D179G la situación es semejante, en combinación con S173P no hay un aumento muy grande del MIC para cefotaxima y el de ampicilina no disminuye más; con S216T hay una ligera mejora del fenotipo para cefotaxima pero para ampicilina no hay cambios.

Para las mutantes multisustituidas las observaciones son básicamente las mismas que las hechas durante la dilucidación de la participación de cada una en el cambio de

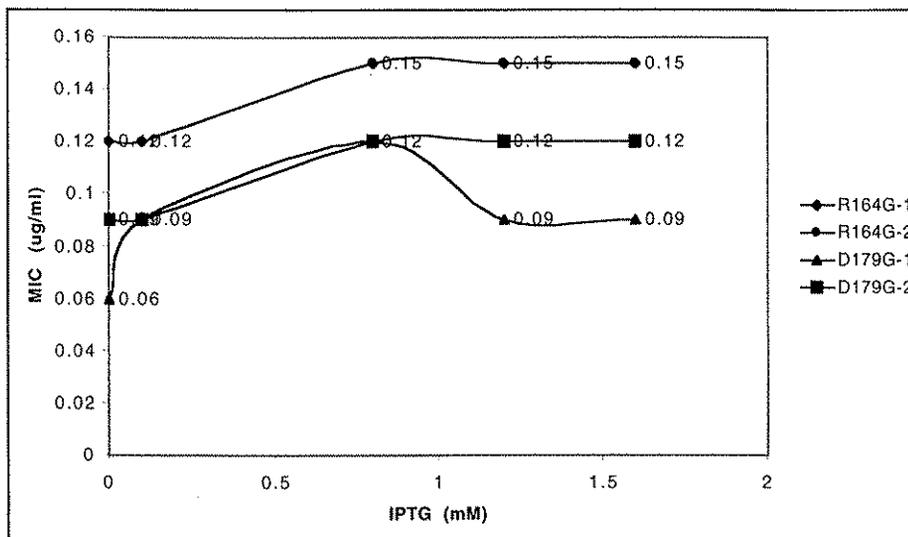
especificidad: la adición de una tercera sustitución o una cuarta siempre mejora el fenotipo; de cualquier modo, la información asequible es poca, sólo se tiene una mutante triple y faltan dos mutantes cuádruples. Sin embargo, el caso de la activación de S173P es interesante. Pro¹⁷³ no genera el fenotipo de cambio de especificidad ni sola ni en combinación con Gly¹⁶⁴ o Gly¹⁷⁹, más bien es deletérea para la actividad de ampicilinas. Ni siquiera su adición a la triple mutante C5 (R164G:E168G:S216T) produce algún cambio en el MIC de cefotaxima, aunque sí disminuye el de ampicilina. La comparación de C2 y D4 justifica la participación de S173P en el cambio de fenotipo pero, a la vez, sugiere la necesidad de un contexto muy particular para que una sustitución, S173P, sea funcional (gráfica R3).



Gráfica R3. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de cefotaxima y ampicilina de las mutantes que contienen la sustitución S173P. Los MIC's están normalizados con respecto al MIC de PC1 silvestre y magnificados 100X en caso de ampicilina.

Los problemas de la evolución del promotor

Como más arriba se mencionó, se analizaron las secuencias nucleotídicas de la región regulatoria de todas las variantes seleccionadas durante la dirección de la evolución y de clonas no seleccionadas del banco de variantes del primer ciclo evolutivo (tabla R2). A excepción de la mutación T34C, que aparece desde la silvestre de partida, en las clonas no seleccionadas no se observó ningún cambio interesante. Sin embargo, a partir de las variantes del primer ciclo aparecen varias mutaciones que se concentran en un segmento de tan solo 12 nucleótidos. Cada una de las cuatro clonas del primer ciclo presenta una combinación diferente de mutaciones, pero sólo la de A3 se fija en la población de los ciclos posteriores. Todas las mutaciones de la combinación fijada se encuentran dentro del operador de *lac* [73, 74] y dos de ellas, G29A y A32T, vuelven constitutiva la expresión [71]. La evolución del operador y la probable modificación de los niveles de transcripción planteó dos problemas casi al final de la etapa experimental del proyecto, cuando ya se habían obtenido la mejor de las mutantes de PC1 y todas las mutantes sitio-dirigidas: cómo comparar las variantes cuyo operador había evolucionado con las que lo tenían silvestre (la mayoría de las mutantes sitio-dirigidas); pero, sobre todo, cuál habría sido el efecto del operador modificado en la solución alcanzada a la luz de un banco, el del primer ciclo, de tamaño reducido e insuficiente para garantizar que contuviera al menos todas las mutantes con una sola sustitución asociadas a un operador con una mutación que lo volviera constitutivo.



Gráfica R4. Concentración mínima inhibitoria de cefotaxima determinada en diferentes concentraciones de IPTG para las mutantes con las sustituciones R164G (A3) y D179G. La medición fue hecha por duplicado. En el caso de la mutante R164G los resultados de las dos mediciones fueron iguales y sus curvas se sobreponen.

Con las mutantes simples, de las cuales todas, excepto A3, poseen el operador silvestre, se redeterminó por duplicado la concentración mínima inhibitoria para cefotaxima en distintas concentraciones de IPTG (gráfica R4). La intención era encontrar la concentración de IPTG donde se titulara al inhibidor de la transcripción del operador de *lac*, LacI, y se pudiera observar el fenotipo máximo. Bajo esa concentración de IPTG se esperaba tener niveles similares de transcrito en todas las clonas y sus fenotipos serían comparables. Se determinó el MIC de cefotaxima en presencia de IPTG 0, 0.1, 0.8, 1.2 y 1.6 mM. En todos los casos, las variantes que ya se sabía que no cambiaban la especificidad individualmente (S173P y S216T) no modificaron su perfil de resistencia al ir aumentando la concentración de IPTG, no así para los casos de R164G y D179G. Con R164G, la concentración mínima inhibitoria de cefotaxima pasó de 0.12 $\mu\text{g/ml}$ en IPTG 0 y 0.1 mM a 0.15 $\mu\text{g/ml}$ en IPTG 0.8 mM. La resistencia no aumentó más allá de ese valor en concentraciones superiores de IPTG. Por otra parte, con D179G también se alcanza la resistencia máxima en IPTG 0.8 mM, aunque en una de las mediciones la resistencia decae a 0.09 $\mu\text{g/ml}$ con IPTG 1.2 y 1.6 mM. Se interpretó que a una concentración de 0.8 mM de IPTG se alcanza una resistencia máxima y bajo estas condiciones se determinó y comparó el MIC de las variantes más interesantes de PC1 y se reseleccionó el banco PC1S2A, el del primer ciclo evolutivo, de tal manera que ninguna de las variantes estructurales de dicho banco tuviera alguna ventaja por efecto de las mutaciones en el operador de *lac*.

El banco PC1S2A se reseleccionó bajo las mismas condiciones que la primera vez, salvo que ahora se agregó IPTG 0.8 mM. Las secuencias de las cinco clonas seleccionadas sólo mostraron tres soluciones, de las cuales dos resultaron nuevas: D179G:T240S y D179G:A242G; y la otra ya había sido seleccionada: D179N:K192R (tabla R8). Sus MIC's de cefotaxima son de 0.512 $\mu\text{g/ml}$ en todos los casos y son más competitivos que el de R164G, la otra sustitución seleccionada del mismo banco y que a la postre pudo haber definido la solución final. Fuera de lo que se esperaba, las secuencias de la región

regulatoria de las nuevas variantes, a excepción de la de IPTG.4, contienen la mutación C(-30)T, reportada como una de las que vuelven constitutivo al operador de *lac*.

PC1	10	16	179	192	240	242	PC1	Ctx/IPTG	Amp/IPTG	PC1	C(-30)T
WT	V	F	D	K	T	A	WT	M = 0.03	M >1946	WT	no
IPTG.4	A	L	G		S		IPTG.4	M = 0.512	76 < M <114	IPTG.4	no
IPTG.5			G			G	IPTG.5	M = 0.512	114 < M <171	IPTG.5	sí
IPTG.7			N	R			IPTG.7	M = 0.512		IPTG.7	sí

Tabla R8. Ganadoras de la reselección del banco PC1S2A en presencia de IPTG 0.8 mM. La concentración mínima inhibitoria de cefotaxima (Ctx) y ampicilina (Amp) fue determinada en presencia de IPTG 0.8 mM.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Discusión

La combinación de sustituciones responsable del cambio de especificidad de PC1, la solución de D4, es única entre las β -lactamasas de espectro extendido naturales y las obtenidas *in vitro* (figura D1). La sustitución en la posición 216 es exclusiva de ella y en ningún otro caso R164G ha sido vista en combinación con D179G. La última solución, D4, no necesariamente indica que el resto de las sustituciones aparecidas a lo largo del proceso evolutivo sean neutras o deletéreas, algunas de ellas lo serán, pero las otras pueden ser parte de soluciones que sólo son máximos locales en el espacio de adecuación y que tienen un papel en el cambio de especificidad dentro de ambientes muy particulares. Incluso, alguna sustitución pudo no haberse integrado a la última solución por efecto de las veleidades de la dirección de la evolución, mas no por inutilidad o incompatibilidad.

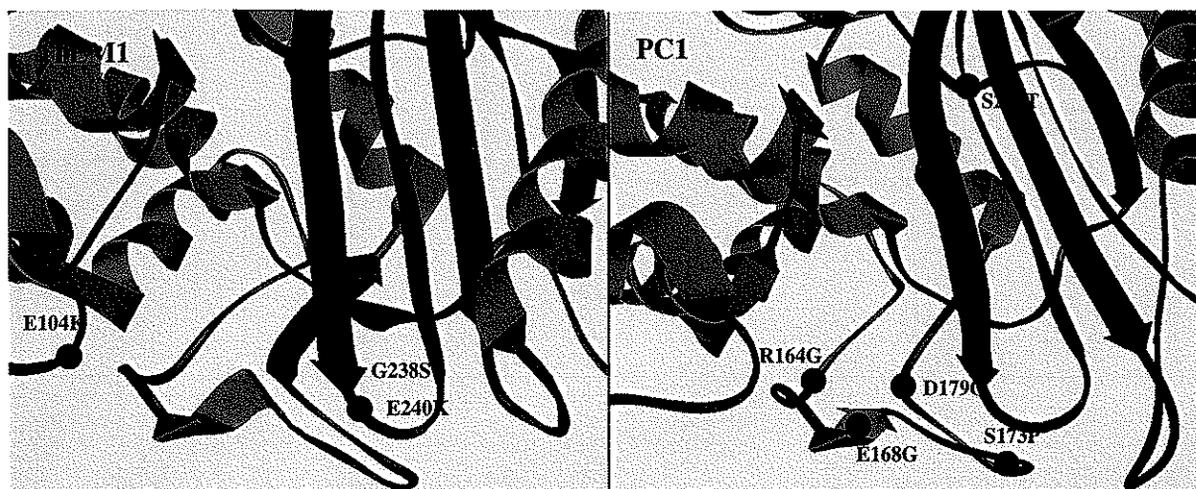


Figura D1. Localización de las sustituciones responsables del cambio de especificidad de penicilinasa a cefotaximasa en TEM1 y PC1.

Un asunto importante es determinar si la solución encontrada en PC1 es la mejor al reto evolutivo impuesto o es un máximo local, y por eso diferente a la de TEM1, producto de una exploración anómala del espacio de secuencia, sugerida por las mutaciones encontradas en el operador de lac y el tamaño reducido de los bancos. La presunta ventaja que puede conferir el operador mutado a las mutaciones estructurales con quien se combine plantea la interrogante de si dentro del banco PC1S2A, el del primer ciclo, puede encontrarse la sustitución principal de la solución de quien se tiene que ser diferente, la de TEM1, A238S en combinación con al menos una de las mutaciones que volvía constitutivo al operador. De estar dentro del banco no habría duda de la supremacía y originalidad de la solución evolucionada en PC1.

Se comenzó circunscribiendo el problema a la sola integración de la sustitución A238S en PC1. Para encontrar ésa mutante se tiene que explorar entre al menos 1920 variantes, lo cual es totalmente asequible desde el banco del primer ciclo, considerando la tasa de mutagénesis del propio banco PC1S2A (0.45%; tr = 0.33%, tv = 0.104 %) y que la distancia del codón de A238 al codón más próximo de serina es de 1 transversión. Las cosas

se complican cuando se toman en cuenta las mutaciones del operador, ya que ahora hay que considerar la probabilidad de encontrar la mutación estructural en el sitio correcto condicionada a la aparición de una mutación que vuelva constitutivo al operador de lac. Suponiendo la transición G→A en el operador, la probabilidad de encontrarla asociada a la transversión de la mutante A238G es de 1/584,592. En un panorama aún más favorable y asumiendo que la sustitución ganadora en la posición 238 es otra que serina y a la cual se puede acceder con una sola transición, la probabilidad de encontrarla asociada a la mutación del operador sería de 1/153,600. El tamaño del banco del primer ciclo (64,500) no es suficiente para garantizar la exploración total de las combinaciones en ninguno de los dos casos (los más favorables) descritos.

Estadísticamente la originalidad de la solución de PC1 quedaría en duda si, y sólo si, se probara la influencia y ventajas proporcionadas por las mutaciones en el operador. En lugar de repetir la evolución se siguieron dos estrategias que podían revelar información sobre la originalidad de la solución. Con un enfoque ingenieril, se introdujo la solución de TEM1 en PC1, es decir, se determinaron los elementos fundamentales de la solución de TEM1 y se identificaron las posiciones estructuralmente equivalentes en PC1, las cuales, en lugar de seguir un enfoque totalmente mimético, fueron mutagenizadas a saturación y los bancos del tamaño correcto (tabla R4) sometidos a selección para hidrólisis de cefotaxima. De este modo se podía examinar si las posiciones características de la solución de TEM1 conducían al cambio de especificidad en PC1 y, si lo hacían mejor que la solución obtenida por evolución y en una forma asequible con un buen banco de los ahora construibles, se confirmaría lo concluido del análisis estadístico: sesgo exploratorio. La otra fue reelegir el banco PC1S2A en condiciones que garantizaran una competencia donde sólo se pusieran en juego las modificaciones estructurales a la enzima y no su expresión. Si fuera cierta la influencia de las mutaciones del operador, bajo las nuevas condiciones de selección aparecerían los mutantes que estuvieron en desventaja en la primera selección y confirmarían la ventaja conferida por el operador mutado.

Las posiciones variabilizadas de PC1, estructuralmente equivalentes a los determinantes del cambio de especificidad en TEM1, fueron sensibles y condujeron a un cambio de especificidad que aún en la mejor de las mutantes seleccionadas confiere un fenotipo mucho menos competitivo que el de la solución obtenida por evolución (tabla R5 y gráfica R2), probando que PC1 no podía seguir el mismo camino que TEM1 para cambiar la especificidad, aunque no prueba que la solución obtenida sea la mejor posible.

Los resultados de la reelección del banco del primer ciclo evolutivo (PC1S2A), si no niegan la superioridad de la solución obtenida por evolución frente a la introducción de la solución de TEM1, arrojaron un par de dobles mutantes en combinación novedosa que, en principio, ponen en duda la supremacía absoluta de la solución evolucionada al sugerir nuevas combinaciones iniciales o puntos de partida que, si se hubieran seleccionado desde la primera vez, pudieron haber conducido a soluciones diferentes y quién sabe si mejores. Aunque estos nuevos puntos de partida no son mejores que los primeramente seleccionados, incluso confieren un fenotipo igual que la mejor de las variantes seleccionadas en el primer ciclo (A1, A4 = IPTG7), la duda se fortalece por la interesante combinación de las sustituciones D179G con T240S (IPTG4, tabla R8) o G242G (IPTG5), la primera

sustitución ya caracterizada como responsable del cambio de especificidad y las segundas ubicadas en un punto crítico, la vuelta entre las hebras β 3 y 4, prueba de que el cambio de especificidad no es estrictamente sitio-específico y que si una posición es crítica para el cambio en un caso, 238 en TEM1, pero inaccesible en otro, PC1, la enzima es suficientemente plástica para conseguir mutaciones, éstas sí accesibles, que perturben la zona, el nivel del que en realidad debemos hablar, y se produzca el cambio. Como ya se había dicho, estos nuevos puntos de partida no son más ventajosos que los inicialmente seleccionados, incluso uno de ellos, IPTG5, fuera de lo esperado, contiene una mutación en el operador que lo vuelve constitutivo (tabla R8), recurso que no necesitaba porque el operador estaba inducido a su máximo lo que lleva a preguntar si esa mutación efectivamente fue seleccionada o está ahí por cualquier otra razón.

La imperturbabilidad del fenotipo en presencia de IPTG de las mutantes que en ausencia del inductor se sabía no conferían resistencia por sí solas a cefotaxima (tabla R7) muestra que la influencia del operador mutado se limita a las sustituciones que independientemente generan el cambio de especificidad, tal como R164G o D179G. Aún cuando la reselección del banco PC1S2A permitía la manifestación de las mutantes hipotéticamente relegadas, estrictamente nada novedoso se seleccionó. Sí, las dos nuevas combinaciones son interesantes y pudieron haber conducido a lugares ignotos, o no; pero las dos contienen D179G, una sustitución ya vista que cambia la especificidad de manera autónoma a la que se pudieron haber asociado las que luego se hallaron. De este modo, es posible que no haya habido más puntos de inicio, más centros directores (ver más adelante) de la evolución que los vistos y aunque estrictamente no se puede asegurar que la solución evolucionada en PC1 para hidrolizar cefotaxima sea la mejor, sí es seguro, en conjunto con las evidencias de la mutagénesis a saturación, que PC1, a nivel de sustituciones, no iba a resolver el mismo reto evolutivo de la misma manera que lo hizo TEM1.

En las β -lactamasas de espectro extendido naturales es tan claro el desarrollo de su solución en torno de una sustitución característica que incluso son clasificables en función de ella (ver Antecedentes). Los casos de evolución *in vitro* de β -lactamasas ha permitido seguir el desarrollo de la nueva especificidad, proceso que siempre se inaugura con una de esas sustituciones características que parecieran dirigir o predeterminar el rumbo que a continuación sigue la evolución. La presunción de una sustitución directora parece coherente si, para empezar, asumimos la existencia de una gran dependencia del contexto estructural para la fijación de una sustitución, es decir, al principio de la evolución, con una tasa de mutagénesis que sólo permita la integración de unas pocas sustituciones – de preferencia solo una –, sólo serán seleccionadas las que modifiquen positiva y suficientemente su contexto estructural como para que permitan detectar el nuevo fenotipo. En este nuevo contexto es donde tiene que fijarse la siguiente sustitución, de modo que ésta nace irremediamente ligada a la primera. Aunque la información obtenida de la disección de la solución de PC1 aun es poca (tabla R6), es suficiente para no descartar los supuestos de la hipótesis. En concordancia con los resultados de las selecciones del banco del primer ciclo, se confirmó la existencia de solo dos sustituciones capaces de generar independientemente el cambio de especificidad: R164G y D179G (falta construir la mutante sencilla E168G pero su dependencia se deduce de la doble mutante E168G:S216T, que no genera cambio de especificidad, al igual que la mutante sencilla S216T, por lo tanto, E168G no cambia la

especificidad por sí sola). ¿Quién es la sustitución directora, R164G o D179G, o la modificación estructural que generan las dos es la conductora del resto de la evolución? Para responder la pregunta hace falta información. S216T es directamente sinérgica con ambas sustituciones, aunque la mejora en el fenotipo es mayor cuando se combina con R164G (2Eb4) que con D179G (2A1). E168G también parece ser sinérgica con R164G (C5) aunque falta la mutante equivalente para D179G. Lo más interesante es el caso de S173P quien no es directamente sinérgica con ninguna de las dos (2B1 y 2C8); incluso, si nos atenemos a su efecto en la resistencia a ampicilina, es deletérea. La adición de S173P solo tiene un efecto claro en el cambio de especificidad en presencia de las otras cuatro sustituciones lo que confirma la habilitación microcontextual de las sustituciones adquiridas y, por lo tanto, se valida la existencia de una o varias sustituciones directoras a las que se subordinan las que luego se adquieren.

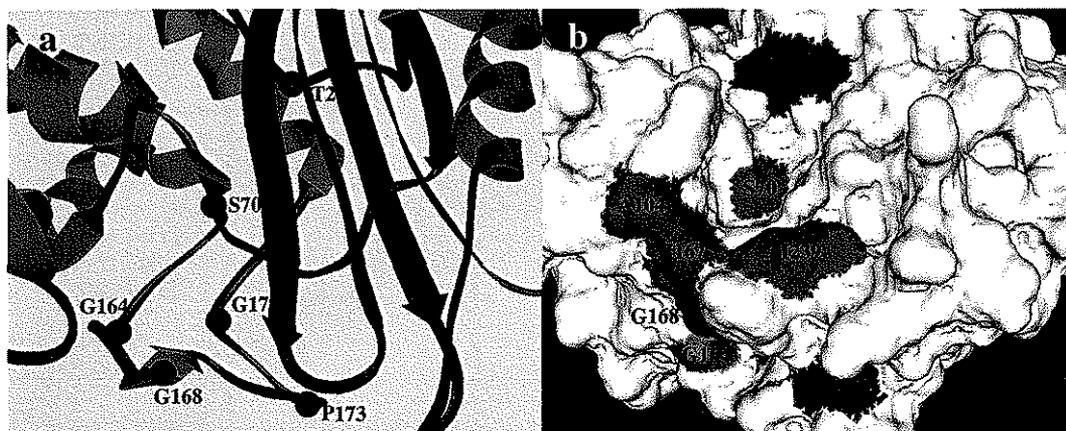


Figura 2D. Modelo de la mutante D4 que contiene las cinco sustituciones responsables del cambio de especificidad. (a) Ubicación de las sustituciones dentro del plegamiento. (b) Superficie de la mutante D4 en la proximidad del sitio activo. Sólo la sustitución S216T está en el borde de la depresión del sitio activo, las demás están más lejos pero en una estructura influyente para la especificidad, la asa Ω . El modelo fue obtenido automáticamente a través del servidor de Swiss- Model.

Lo inmediatamente anterior adquiere importancia después de analizar el efecto estructural de la solución que condujo al cambio de especificidad. Los residuos Arg¹⁶⁴ y Asp¹⁷⁹ en toda la familia de las β -lactamasas clase A están conservados y son responsables de mantener estable la asa Ω - y bien posicionado a E¹⁶⁶- a través del puente salino que forman entre ellos. La sustitución de esos aminoácidos por glicina elimina el puente y compromete la estabilidad de la asa, de por sí marginal (figura 2Da,b). La flexibilización de este elemento estructural posiblemente remodela el canal formado por la propia asa y los residuos 104, 105, 238 y 239, lo que conduciría al ensanchamiento del espacio para permitir la introducción y estabilización del anillo 2-aminotiazol de la cefotaxima. El papel del resto de las sustituciones de la solución es menos claro, tal vez por ser estructuralmente menos drástico. En especial, las sustituciones E168G y S173P podrían tener un papel estabilizador y/o reposicionador de la maquinaria de desacilación, residente de la asa Ω , con lo que se explicaría la mejora del fenotipo al hacerse presentes después de la aparición de las sustituciones directoras (figura 1Dc). En TEM1 está bien documentada la afectación de la estabilidad de la asa Ω y el consecuente movimiento de E¹⁶⁶ que se refleja en la disminución de la velocidad de desacilación por las sustituciones G238S o R164S/H [43]. En PC1, al

modificarse la posición de la asa por la introducción de las sustituciones directoras, el residuo 166 podría estar lejos de su posición óptima y las sustituciones E168G y S173P, vecinas de la región crítica, coadyuvarían al posicionamiento justo para la hidrólisis del nuevo sustrato. El análisis cinético de las mutantes oportunas confirmaría o descartaría lo anterior.

Finalmente, ¿las soluciones de TEM1 y PC1 para el cambio de especificidad de penicilinasa a cefotaximasa son auténticamente diferentes? Aquí es donde se debe distinguir entre varios niveles de diferencia: el de la solución estructural, que incluye las modificaciones a la enzima que permiten el mejor reconocimiento del sustrato y el de la solución entendida como el conjunto de sustituciones que condujeron al cambio de especificidad (acepción que hasta ahora se ha usado) y que no necesariamente se traduce en soluciones estructurales, en lo general, distintas. TEM1 y PC1 reúnen tal cantidad de diferencias, tanto de secuencia como de estructura, aunque no de plegamiento, que esperar una solución distinta no sería lo interesante, sino encontrarlas iguales. Las soluciones - combinación de sustituciones - diferentes para el mismo cambio de especificidad de las dos β -lactamasas era el resultado esperado de genes diferentes, de codones diferentes codificando residuos para la misma posición, siendo distinto, por esa razón, su acceso a los aminoácidos por los que se pueden intercambiar. Además, las diferencias locales en regiones críticas, como la inserción de Ile²³⁹ en PC1, hacían esperar poco la aparición de una sustitución A238S análoga a la G238S que cambió la especificidad de TEM1, menos aún cuando parece tan influyente el ambiente local para la adopción de una sustitución. No. Lo verdaderamente interesante era obtener soluciones iguales, y las estructurales parecen serlo. Todas las β -lactamasas clase A de espectro extendido, específicamente las que reconocen cefalosporinas, cuyo residuo unido al anillo β -lactámico es más voluminoso que el de las penicilinas, cambiaron de especificidad siguiendo el mismo programa general de cambios: G238S empuja el asa Ω y abre espacio [45], E104K estabiliza [49]; R164S/H libera, desata, al asa Ω abriendo espacio [44, 46] y E104K estabiliza. Las sustituciones de SHV1 son de la misma naturaleza. En PC1 R164G y D179G también desatan el asa Ω y quizás E168G y S173P estabilicen, reposicionen finamente.

Pero, ¿cuál es la razón de la convergencia de las soluciones estructurales cuando parece que todo está dispuesto para que sean distintas, como en el caso de PC1 respecto de TEM1? La maquinaria catalítica difícilmente sería cambiada cuando la exigencia evolutiva es sólo un cambio de especificidad. De este modo, el sitio activo sería remodelado sólo dentro de los límites donde se conserva la maquinaria catalítica, reduciéndose drásticamente los grados de libertad y las posibilidades a explorar ya que el nuevo sustrato estaría obligado a pegarse a la enzima de la misma manera como lo hacía el sustrato de la proteína silvestre. Si el problema es el volumen de la cadena lateral del nuevo sustrato, entonces la solución es darle cabida.

La dirección de la evolución de TEM1 hacia la hidrólisis de cefotaxima después de bloquear sus sustituciones directoras seguramente arrojará nuevas soluciones - combinaciones de sustituciones - como lo sugieren otros trabajos [75-77]; sin embargo, aunque no se descarta, la obtención de una solución estructural diferente parece más difícil. Conseguirla tal vez requiera encontrar la forma de fijar la asa Ω para obligar a la enzima a

unir el sustrato de manera distinta o hasta explorar la posibilidad de construir otro aparato catalítico que conduzca al desarrollo de la nueva especificidad prescindiendo del desplazamiento del famoso loop.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Conclusiones

Para conseguir el cambio de especificidad de penicilinas a cefotaximasa, TEM1 y PC1 se proveen de una serie distinta de sustituciones. Aunque no se tiene la certeza de que la solución de PC1 sea un máximo global, es claro que esa enzima no hubiera seguido la misma ruta que TEM1 para cambiar la especificidad.

A pesar de la diferencia de las soluciones, las dos β -lactamasas parecen seguir el mismo programa de cambios estructurales generales, mediados por sustituciones distintas, que conducirían a la desestabilización de la asa Ω y el ensanchamiento del sitio activo.

Las soluciones evolutivas para el cambio de especificidad de enzimas con actividad y plegamiento homólogos, pero de secuencias disímiles, son diferentes al nivel de la naturaleza de las sustituciones. La divergencia de las soluciones – serie de sustituciones- para conseguir el cambio de especificidad podría deberse a la distinta accesibilidad de aminoácidos desde cada uno de los codones de posiciones análogas y a que la adopción de una sustitución depende del microcontexto estructural, diferente para cada polipéptido a pesar de la comunidad de plegamiento. No obstante las diferencias, es posible que la maquinaria catalítica pre-existente haya obligado a generar soluciones estructurales similares.

Perspectivas

La necesidad de la caracterización cinética de las mutantes más importantes para compararlas con pulcritud es obvia.

Un análisis cinético enfocado en el entendimiento del desarrollo de la nueva especificidad sería interesante, además que posible. En particular, el examen del efecto de las sustituciones E168G y S173P en la afinidad y la velocidad de reacción verificaría la hipótesis hecha en torno a esas dos sustituciones. De resultar en el sentido correcto, esa información sería un aliciente para emprender un análisis estructural serio. En este punto y en relación con la flexibilidad ya vista de la ubicación de la maquinaria de desacilación en PC1, se podría verificar si E168G y S173P devuelven a la posición original el aparato de desacilación o afinan una nueva posición.

Metodología

Generales

Todos los cultivos, líquidos o sólidos, fueron hechos en medio LB [78] a 37° C, suplementados con alguno de los siguientes antibióticos: Cloramfenicol (Sigma), 35 µg/ml; Kanamicina (Research Organics) 25 µg/ml; Estreptomycin (Sigma), 30 µg/ml; Espectinomycin (Sigma), 50 µg/ml; y Ampicilina (Sigma), Cefotaxima (Sigma) y el inductor IPTG (Sigma) en concentraciones variables.

Donde se requirió, *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' (Stratagene) fue la cepa utilizada. Los procedimientos básicos de biología molecular se hicieron como se acostumbra [78]. Las enzimas *DraI*, *HindIII*, *BamHI*, *NcoI*, *XhoI* y *EcoRI* fueron provistas por New England BioLabs, al igual que la T4 DNA Ligasa. La DNAsaI, Klenow y TaqDNA polimerasa fueron las de Roche. Se usaron algunos kits de purificación bajo las instrucciones de los proveedores: Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega), High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche), High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) y Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Todos los oligonucleótidos usados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis Química de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología, UNAM, por el método del fosfito-triéster en fase sólida. Las secuencias de nucleótidos fueron determinadas en la Unidad de Secuencia de la misma institución.

PCR sexual

Se realizó como Stemmer [18, 72]. En breve, se amplificó con una PCR de rutina (20 pmol de cada oligonucleótido, dNTP's 0.1 mM (mezcla equimolar de los cuatro), Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), MgCl₂ 1.5 mM y 1 U Taq DNA polimerasa; 94° C, 5 min. 94° C, 50 seg; 56° C, 50 seg; 72° C, 50 seg, 25 ciclos. 72° C, 5 min) el gene bla-PC1, péptido señal y promotor incluidos, con los oligos universales Reverse/M13, que flanquean la construcción. Se utilizó pPPC^wt como templado en el primer ciclo evolutivo y las parentales seleccionadas en los posteriores. El producto purificado se digirió con 1 U de DNAsaI durante 15 min. a temperatura ambiente (~ 25° C) y se purificaron los fragmentos de ~ 100 pb. De 300 a 500 ng/100 µl de esos fragmentos se sometieron a una PCR sin oligos, con MgCl₂ 2.5 mM y el siguiente programa de termociclación: 94° C, 30 seg; 52° C, 30 seg y 72° C, 30 seg, 40 veces; al final 72° C, 5 min. 1/40 de la reacción anterior se utilizó como templado de una PCR de rutina con los oligonucleótidos Ptrc/PCXhoI para amplificar los genes rearmados.

PCR mutagénica [79]

El gene de interés se amplificó con los oligos Ptrc/PCXhoI en una PCR a cuya mezcla de reacción se agregó MnCl₂ 0.5 mM (además del MgCl₂ 1.5 mM del tampón). La mezcla se sometió al siguiente programa: 94° C, 1 min; 58° C, 1 min; 72° C, 3 min, 30 veces y 72° C, 10 min.

Mutagénesis sitiodirigida [80]

En todos los casos el oligo mutagénico se diseñó en la dirección sentido para que hiciera pareja con el oligo PCXhoI (esta opción generaba los megaoligonucleótidos más pequeños). Con una PCR de rutina se generó el correspondiente megaoligo usando como templado lo que más conviniera. Se purificó el producto y se completó el gene con una PCR rutinaria (la temperatura de hibridación puede cambiar a discreción) usando el megaoligo y Ptrc como cebadores. Se purificó la banda del gene completo y se amplificó con Ptrc/PCXhoI. El gene mutado se digirió con BamHI y XhoI, al igual que el plásmido pS. Las dos moléculas se ligaron en una reacción donde la proporción molar inserto:vector fue 5:1. Con la reacción de ligación purificada se electrotransformó *E. coli* y se seleccionaron las colonias resistentes a espectinomicina/estreptomomicina. A algunas se las hizo PCR de colonia para confirmar la presencia e identidad del inserto. Hecho lo anterior se hicieron cultivos de las colonias ganadoras, se purificó el plásmido y se obtuvieron las secuencias.

Mutagénesis sitiodirigida a saturación.

En todos los casos se usó como templado pPPC^w. Cuando se variabilizó las posiciones 238 y 239 de PC1 se diseñó un solo oligonucleótido mutagénico, 89X, también en la dirección sentido, que en los dos codones requeridos está degenerado en la forma NNS. El resto es análogo a lo relatado en el párrafo anterior.

Para variabilizar las posiciones 104, 238 y 239 se construyeron dos megaoligos, el mutagénico para las posiciones 238 y 239, y el mutagénico para la posición 104. Para este último se diseñó un oligo degenerado NNS en el codón 104 en dirección antisentido, que hace pareja con el oligo sentido Ptrc. Los dos megaoligos mutagénicos se utilizaron para cerrar el gene después de PCR. La banda del producto se purificó y amplificó con los oligos Ptrc/PCXhoI.

Construcción de los bancos

Invariablemente, los productos del PCR sexual, PCR mutagénica o de la mutagénesis sitiodirigida a saturación se digirieron con BamHI y XhoI, al igual que pK o pS, en el caso de los bancos de mutagénesis a saturación. En cada caso se prepararon reacciones de ligación donde la relación molar inserto:vector fue de 5:1. Después de incubar más de 8 horas a 16° C, se purificó la ligación y con ella se electrotransformó *E. coli*. De la suspensión transformante se tomó una alícuota y ella, o sus diluciones, se plaqueó sobre medio LB suplementado con el antibiótico para el cual confiere resistencia el vector usado en la ligación (Km o Sp/Sm). El resto de la suspensión se inoculó en 10 veces su volumen de LB con el marcador de selección correspondiente. Del cultivo líquido de toda la noche se purificó el plásmido, lo que constituye propiamente el banco.

Para calcular el tamaño del banco se contó las colonias del cultivo en placa. A una muestra representativa de ellas se les hizo PCR de colonia con los oligos Reverse/M13, de tal manera que pueda identificarse, o no, la presencia del inserto, siempre en reacciones positivas. La relación inserto/reacción positiva se aplica a la cuenta inicial de colonias y se tendrá el número real de heteroligantes presentes en la placa. Este nuevo número se multiplicó por el

factor de dilución correspondiente a la alícuota plaqueada y se tuvo, finalmente, el tamaño del banco.

Selección

Se inocularon hasta 1×10^6 transformantes en cada placa de la serie con diferentes concentraciones de cefotaxima. Con los plásmidos de las colonias crecidas en las concentraciones más altas se retransformó *E. coli* para comprobar el fenotipo y se hicieron PCR's específicos de PC1.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

El cultivo de la variante de interés, con el antibiótico correspondiente y en fase exponencial, se diluyó decimalmente y gotas de $7 \mu\text{l}$ de cada una de ellas se inocularon sobre placas con concentraciones crecientes (1.5 veces la concentración de la placa anterior) de cefotaxima. Se incubó hasta 16 horas a 37°C y se hicieron las lecturas en la dilución donde hubiera no más de 40 colonias en la placa control (la que contiene el marcador de selección del plásmido, pero no cefotaxima). Tomando como referencia máxima la lectura en el control, la concentración mínima inhibitoria correspondió a la concentración mínima de cefotaxima donde el número de colonias fuera la mitad o menos de las iniciales.

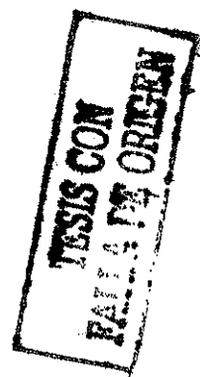
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Bibliografía

- 1.
2. Chen, C y Herzberg, O. (2001). *Structures of the acyl-enzyme complexes of the Staphylococcus aureus β -lactamase mutant Glu166Asp:Asn170Gln with Benzilpenicillin and Cephaloridine*. *Biochemistry*, 40, 2351-2358.
3. Kadonaga, J et al. (1985). *Signal sequence mutants of β -lactamase*. *J. Biol. Chem.* 260, 30, 16192-16199.
4. Tramontano, A et al. (1986). *Catalytic Antibodies*. *Science* 234, 1566-1570.
5. Pollack, S et al. (1986). *Selective Chemical Catalysis by an Antibody*. *Science* 234, 1570 – 1573.
6. Pauling, L. (1948). *Nature of forces between large molecules of biological interest*. *Nature* 161, 707-709.
7. Copeland, R. (2000) *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. 2nd Ed. Wiley-VCH.
8. Jencks, W.P. (1969). *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. McGraw-Hill, New York.
9. Wade, H y Scanlan, T. (1997). *The structural and functional basis of antibody catalysis*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 461-493.
10. Hilvert, D. (2000). *Critical Analysis of Antibody Catalysis*. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 751-793.
11. Liu, R y Schultz, P. (1999). *Generating New Molecular Function: A Lesson from Nature*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 36-54.
12. Angeles, T et al. (1993). *Isoabzymes: Structurally and Mechanistically similar Catalytic Antibodies from the Same Immunization*. *Biochemistry* 32, 12128-12135.
13. Charbonnier, JB et al. (1997). *Structural Convergence in the Active Site of a Family of Catalytic Antibodies*. *Science* 275, 1140-1142.
14. Charbonnier, JB et al. (1997). *Similarities of hydrolytic antibodies revealed by their X-ray structures: A review*. *Biochimie* 79, 653-660.
15. Gigant, B et al. (1999). *Diverse structural solutions to catalysis in a family of antibodies*. *Structure* 7, 1385-1393.
16. Patthy, L. (1999). *Protein evolution*. Blackwell Science.
17. Kauffman, S. (1993). *The Origins of Order*. Oxford. New York.
18. Stemmer, W. (1994). *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*. *Nature*, 370, 4, 389-391.
19. Zacco, M; Gherardi, E. (1999). *The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM1 β -lactamase*. *J. Mol. Biol.*, 285, 775-783.
20. Long-McGie, J; Liu, A; Schellenberger, V. (2001). *Rapid in vivo evolution of a β -lactamase using phagemids*. *Biotech. Bioeng.*, 68, (1), 121-125.
21. Escobar, V. (2001). *Análisis de condiciones alternativas de PCR sexual*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
22. Matagne, A et al. (1998). *Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity*. *Biochem J.* 330, 581-598.
23. Ambler, RP. (1980). *The structure of β -lactamases*. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 289, 321-331.

24. Knox, J *et al.* (1996). *Molecular evolution of bacterial β -lactam resistance*. *Chemistry & Biology*, 3, 937-947.
25. Philippon, J *et al.* (1998). *The diversity, structure and regulation of β -lactamases*. *Cell. Mol. Life Sci*, 54, 341-346.
26. Jelsch, C *et al.* (1993). *Crystal Structure of Escherichia coli TEM1 β -lactamase at 1.8 Å resolution*. *Proteins*, 16, 364-383.
27. Kuzin, A *et al.* (1999). *Structure of the SHV-1 β -lactamase*. *Biochemistry*, 38, 5720-5727.
28. Herzberg, O y Moulton, J. (1987). *Bacterial Resistance to β -lactam Antibiotics: Crystal Structure of β -lactamase from Staphylococcus aureus PCI at 2.5 Å resolution*. *Science*, 236, 694-701.
29. Herzberg, O. (1991). *Refined Crystal Structure of β -lactamase from Staphylococcus aureus PCI at 2 Å resolution*. *J. Mol. Biol.*, 217, 701-719.
30. Chen, C *et al.* (1996). *Structure and Kinetics of the β -lactamase Mutants S70A and K73H from staphylococcus aureus PCI*. *Biochemistry*, 35, 12251-12258.
31. Gibson *et al.* (1990). *Site-directed mutagenesis of beta-lactamase I. Single and double mutants of Glu-166 and Lys-73*. *Biochem. J.*, 272, 613-619.
32. Delaire, M *et al.* (1991). *Site-directed mutagenesis on TEM1 β -lactamase: role of Glu166 in catalysis and substrate binding*. *Protein Engineering*, 4, 805-810.
33. Leung, Y *et al.* (1994). *Site-directed mutagenesis of β -lactamase I: role of Glu-166*. *Biochem. J.*, 299, 671-678.
34. Strynadka, N *et al.* (1992). *Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution*. *Nature*, 359, 700-705.
35. Adachi, H *et al.* (1991). *Site-directed mutants, at position 166, of RTEM1 β -lactamase that form a stable acyl-enzyme intermediate with penicillin*. *J. Biol. Chem.*, 266, 3186-3191.
36. Knox, J *et al.* (1993). *A catalytic-impaired class A β -lactamase: 2 Å crystal structure and kinetics of the Bacillus licheniformis E166A mutant*. *Protein Engineering*, 6, 11-18.
37. Zawadzke, L *et al.* (1996). *Elimination of the hydrolytic water molecule in a class A β -lactamase mutant: crystal structure and kinetics*. *Biochemistry*, 35, 16475-16482.
38. Ambler, R.P. *et al.* (1991). *A standard numbering scheme for the class A β -lactamases*. *Biochem. J.* 276, 269-272.
39. Blázquez, J *et al.* (2000). *Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM β -lactamase variants by fluctuating β -lactam pressure*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2182-2184.
40. Petrosino, J *et al.* (1998). *β -lactamases: protein evolution in real time*. *Trends in Microbiology*, 6, 323-327.
41. Giakkoupi, P *et al.* (2000). *Detrimental effect of the combination of R164S with G238S in TEM1 β -lactamase on the extended-spectrum activity conferred by each single mutation*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 101-104.
42. Rasheed, JK. *et al.* (1997). *Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of Escherichia coli during multiple episodes of bacteremia*. *Antimicrob. Agents chemother*, 41, 647-653.
43. Raquet, X *et al.* (1994). *TEM β -lactamase mutants hydrolysing third-generation cephalosporins*. *J. Mol. Biol.*, 244, 625-639.

44. Knox, J. (1995). *Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39, 2593-2601.
45. Cantú, C. y Palzkill, T. (1998). *The role of residue 238 of TEM-1 β -lactamase in the hydrolysis of extended-spectrum antibiotics*. Journal of Biological Chemistry, 273, 26603-26609.
46. Herzberg, O et al. (1991). *Structural Basis for the Inactivation of the P54 Mutant of β -lactamase from Staphylococcus aureus PC1*. Biochemistry, 30, 9503-9509.
47. Maveyraud, L et al. (1996). *Structural Basis of extended spectrum TEM β -lactamses*. Journal of Biological Chemistry, 271, 10482-10489.
48. Soweck, J et al. (1991). *Substitution of Lysine at Position 104 or 240 of TEM-1_{PTZ18R} β -lactamase Enhances the Effect of Serine-164 Substitution on Hydrolysis or Affinity for Cephalosporins and the Monobactam Aztreonam*. Biochemistry, 30, 3179-3188.
49. Orenca, C et al. (2001). *Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis*. Nature, 8, 238-242.
50. Perilli, M et al. (1997). *Characterization of a new TEM-derived β -lactamase produced in a Serratia marcescens strain*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41, 2374-2382.
51. Poyart, C et al. (1998). *A novel extended-spectrum TEM-type β -lactamase (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42, 108-113.
52. Neuwirth, C et al. (2000). *Characterization of TEM-56, a novel β -lactamase produced by a Klebsiella pneumoniae clinical isolate*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 453-455.
53. Scanvic, A. et al. (1997). *TEM-8: a paradoxical ceftazidimase that owes its uniqueness to the presence of serine residues at position 164 and 238*. J. Antimicrob. Chemother., 40, 303-309.
54. Sirot, D. et al. (1997). *A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an Escherichia coli clinical isolate*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41, 1322-1325.
55. Poupard, MC et al. (1991). *Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from a Salmonella mbandaka isolate*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 35, 1498-1500.
56. Mugnier, P et al. (1996). *A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40, 2488-2493.
57. Bonnet, R et al. (1999). *Diversity of TEM mutants in Proteus mirabilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43, 2671-2677.
58. Perilli, M et al. (2000). *TEM-72, a new extended-spectrum β -lactamase detected in Proteus mirabilis and Morganella morgani in Italy*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 2537-2539.
59. Bradford, P et al. (1996). *TEM-28 from an Escherichia coli clinical isolate is a member of the His-164 family of TEM-1 extended-spectrum β -lactamases*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40, 260-262.



60. Chanal-Claris, C *et al.* (1997). *Novel extended-spectrum TEM-type β -lactamase from an Escherichia coli isolate resistant to ceftazidime and susceptible to cephalotin.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41, 715-716.
61. Bou, G *et al.* (1999). *Biochemical and genetic characteristics of TEM29B, a novel extended spectrum β -lactamase.* FEMS Microbiology Letters, 174, 185-190.
62. Yang, Y *et al.* (1998). *Ceftazidime-resistant Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates producing TEM-10 and TEM-43 β -lactamases from St Louis, Missouri.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42, 1671-1676.
63. Franceschini, N *et al.* (1998). *Ceftazidime and Aztreonam resistance in Providencia stuartii: characterization of a natural TEM-derived extended-spectrum β -lactamase, TEM-60.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42, 1459-1462.
64. Ahamed, J y Kundu, M. (1999). *Molecular characterization of the SHV-11 β -lactamase of Shigella dysenteriae.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43, 2081-2083.
65. Bradford, P *et al.* (1995). *SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in Escherichia coli isolates from hospitalized nursing home patients.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39, 899-905.
66. Prinarakis, E *et al.* (1997). *Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41, 838-840.
67. Yuan, M *et al.* (2000). *SHV-13, a novel extended-spectrum β -lactamase, in Klebsiella pneumoniae isolates from patients in an intensive care unit in Amsterdam.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 1081-1084.
68. Rasheed, K *et al.* (2000). *Characterization of the extended spectrum β -lactamase reference strain, Klebsiella pneumoniae K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 2382-2388.
69. Kurokawa, H *et al.* (2000). *A new SHV-derived extended-spectrum β -lactamase (SHV-24) that hydrolyses ceftazidime through a single-amino-acid substitution (DI79G) in the Ω -loop.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 1725-1727.
70. Zawadzke, L *et al.* (1995). *An engineered Staphylococcus aureus PC1 β -lactamase that hydrolyses third-generation cephalosporins.* Protein Engineering 8, 12, 1275-1285.
71. Lewin, B. (1997). *Genes VI.* Oxford.
72. Stemmer, W. (1994). *DNA Shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution.* Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 10747-10751.
73. Amann, E *et al.* (1983). *Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in Escherichia coli.* Gene, 25, 167-178.
74. Amann, E *et al.* (1985). *ATG vectors for regulated high-level expression of cloned genes in escherichia coli.* Gene, 40, 183-190.
75. Palzkill, T y Botstein, D. (1992). *Identification of Amino Acid Substitutions That Alter the Substrate Specificity of TEM-1 β -lactamase.* J. Bacteriology, 174, 5237-5243.
76. Palzkill, T *et al.* (1994). *Evolution of antibiotic resistance: several different amino acid substitution in an active site loop alter the substrate profile of β -lactamase.* Molecular Microbiology, 12, 217-229.

77. Petrosino, J y Palzkill, T. (1996). *Systematic Mutagenesis of the Active Site Omega Loop of TEM-1 β -Lactamase*. J. Bacteriology, 178, 1821-1828.
78. Sambrook, J et al.(1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*. 2nd edition. CSH, New York.
79. Cadwell, R y Joyce, G. (1992). *Randomization of genes by PCR mutagenesis*. PCR Methods Appl 2, 28-33.
80. Merino, E et al. (1992). *A general, PCR-based method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on pUC/M13 vectors*. Biotechniques 12, 508-510.