

03072

27
2oje.

Modificación de la especificidad de la β -lactamasa por mutagénesis combinatoria

Tesis de Maestría en Biotecnología

presentada por Héctor Viadiu Ilarraza

UACPyP del CCH, Instituto de
Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Mor. Marzo de 1994.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

Indice

Introducción	1
Objetivos	23
Estrategia experimental	23
Metodología	24
Resultados	30
Discusión	41
Referencias	49

Modificación de la especificidad de la beta-lactamasa por mutagénesis combinatoria.

INTRODUCCION

El espacio proteico.

En 1932, Wright creó, un poderoso concepto dentro de la Biología Evolutiva, la noción de superficies adaptativas, con la cual describía un espacio poblado de genotipos, cada uno difiriendo del otro por una sola mutación, que implicaba una adecuación determinada. La distribución de estos valores de adecuación, a lo largo del espacio de genotipos, constituye la superficie adaptativa (1).

Smith usó, en 1970, esta idea para concebir "un espacio proteico" y la probabilidad de realizar recorridos adaptativos sobre éste. Cada proteína posee cierta adecuación con respecto a una determinada función, por ejemplo: afinidad por una molécula o capacidad de realizar una reacción. Un recorrido adaptativo se puede ver como un proceso que inicia con una proteína en el espacio que, por medio de mutaciones sencillas, se mueve hacia puntos con diferente adecuación. De esta forma, concebimos una superficie con valles y crestas que, dependiendo de la secuencia de la proteína, nos habla de su capacidad para llevar a cabo una función (2).

A partir de este espacio de secuencias se puede concebir otro espacio, ahora n-dimensional, en que cada mutación habla de un cambio en la forma de la proteína, su hidrofobicidad, su momento dipolar y, en general, toda aquella propiedad que influya en la adecuación de una proteína para realizar una función; a éste se le conoce como espacio conformacional (*shape space*) (3).

En la actualidad, no se conoce la estructura de este espacio, sea catalítico, de afinidad o de cualquier otra función de interés, pero ya se han iniciado

esfuerzos teóricos y experimentales para describirlo.

En un limitado esfuerzo por describir una superficie catalítica, alrededor de un punto, el grupo de Knowles a mapeado cómo se modifica la actividad de una mutante de la triosafosfato isomerasa. Inician con la mutante E165D, cuya k_{cat}/K_M para interconvertir dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído fosfato es 150 veces menor en comparación con la enzima silvestre, y tratan de recuperar la actividad con mutaciones distintas al glutámico original. Teniendo 6 mutantes sencillas que mejoran la actividad, las combinan en 13 pares y encuentran que no siempre estas combinaciones siguen reglas simples de aditividad de la recuperación, incluso en 7 de ellas la actividad de la doble mutante es menor que, al menos, una de las mutantes sencillas originales. Además nunca recuperan más allá del 20% de la actividad de la triosa fosfato isomerasa con el glutámico en 165 (4).

Kauffmann ha creado un modelo matemático tratando de contestar preguntas interesantes como: ¿cuántos puntos óptimos locales existen en este espacio partiendo de una proteína?, ¿cómo se distribuyen estos óptimos?, ¿están cercanos entre sí o distribuidos azarosamente?, ¿qué tan altos son los óptimos?, ¿qué tan rugosa es la superficie de este espacio?, ¿cuántos óptimos son accesibles desde determinado punto de partida?. Se utiliza un enfoque estadístico que está más interesado en conocer la estructura global de la superficie, que en describir detalles de proteínas individuales. Si bien apenas está en desarrollo, tuvo cierto éxito cuando comparó sus resultados con el conocimiento que se tiene de la estructura de la superficie de afinidad de los anticuerpos y considera que se puede aplicar a describir otras funciones proteicas (5).

Mapeo de la diversidad proteica.

El que Kauffmann seleccionara el sistema inmune para aplicar su modelo no fue fortuito, se debe a que éste es el mejor ejemplo de un proceso natural para crear diversidad molecular (6). En los últimos años se han desarrollado técnicas que rivalizan, e incluso, superan la capacidad del sistema inmune para generar y perfeccionar la diversidad, la cual puede utilizarse no sólo para aumentar la afinidad por una molécula, sino también para obtener moléculas catalíticas o

nuevos fármacos (7).

Todas estas técnicas han recibido un nombre distinto dependiendo del énfasis que quieran dar los autores (evolución molecular dirigida, química combinatoria, genética in vitro , evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, colección de epítopes, evolución no-natural, evolución en un tubo de ensayo o diseño irracional de fármacos). Pero llámensele como se les llame, todas ellas consisten en crear un conjunto, cuanto más grande mejor, de moléculas distintas de las cuales se seleccionarán aquellas que mejor realicen la función deseada. Este enfoque es una forma de darle la vuelta a la incapacidad actual de predecir confiablemente la estructura molecular y su relación funcional, es decir, ahora se busca generar un gran número de moléculas distintas y luego se rescata aquella de interés (8).

Estos esquemas recuerdan el proceso de evolución natural, ya que la molécula final es aquella que mejor se adecuó a las condiciones ambientales impuestas por el experimentador. Si bien podemos aprender mucho de la forma en que la evolución, a través de miles de millones de años, ha dado solución a los problemas a los que se ha enfrentado, también debemos estar concientes de que la evolución darwiniana está prejuiciada o limitada por el punto del que parte y se guía por las mutaciones que han ocurrido, sin haber explorado todas las soluciones, así que no necesariamente a llegado a la mejor, por lo que es susceptible de mejora (7).

Para ejemplificar ésto, podemos tomar el trabajo de Tuerk y Gold, ellos estudiaron la interacción entre la DNA-polimerasa del bacteriofago T4 y las secuencias líderes 5' de sus RNA mensajeros. La DNA-polimerasa T4 controla traduccionalmente su propia síntesis al unirse a una secuencia de 36 nucleótidos que sobrelapa el sitio de unión al ribosoma en el RNA mensajero. En esta secuencia se encuentra una estructura de RNA con un tallo de 5 pares de bases y una asa de 8 nucleótidos. Para averiguar la flexibilidad de esta asa, sintetizaron un conjunto de DNAs complementarios a este RNA, en los cuales los 8 nucleótidos del asa fueron cambiados aleatoriamente. Esta colección de 48 (66,536)

moléculas fue transcrita por la RNA-polimerasa T7 para iniciar el experimento. Después de cuatro rondas de selección y amplificación, dos secuencias con igual afinidad por la DNA-polimerasa T4 predominaron en la población. Una era la secuencia silvestre y la otra difería en 4 bases del asa. La secuencia variante no había aparecido en ninguno de los fagos relacionados a T4 que se han secuenciado y, quizás, no haya podido evolucionar de la secuencia silvestre ya que los intermediarios se unirían con menor afinidad. Así, este método SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) produjo una secuencia que pudo evolucionar, pero no lo hizo (9).

Existen otros ejemplos de cómo estas técnicas permitieron obtener moléculas con propiedades novedosas. Utilizando dos millones de péptidos sintetizados aleatoriamente, se encontraron 6 por medio de un anticuerpo monoclonal contra beta-endorfina, los cuales fueron secuenciados. Entre ellos se aisló un péptido sintético (YGGFQ) con una afinidad ligeramente mayor que la secuencia del epítipo real (YGGPL). Asimismo, el grupo de Szostak seleccionó una molécula entre 1010 RNAs que es capaz de unirse a un colorante orgánico, repitiendo la selección en una columna con el colorante unido, reverso-transcribiendo las moléculas adheridas, amplificando el DNA por PCR y transcribiéndolo, finalmente, con RNA-polimerasa T7 (10 y 11).

Beaudry y Joyce crearon un sistema que simula mejor que ningún otro la evolución darwiniana, ya que no sólo implica selección y amplificación, sino también enriquecimiento por mutaciones. Iniciaron con una ribozima que normalmente se autocorta de un precursor de RNA, dejando un RNA ribosomal maduro; en condiciones normales esta ribozima nunca corta DNA, pero partieron de una mutante que se sabe corta DNA a altas temperaturas, además introdujeron mutaciones extras. Aquellas moléculas capaces de cortar DNA fueron químicamente atrapadas, copiadas a cDNAs y al ser amplificadas por PCR se introdujeron mutaciones azarosas en algunas moléculas; de forma que con cada ciclo hay un aumento de variabilidad. El resultado fue que después de 10 generaciones moleculares, la capacidad de la ribozima para cortar DNA aumentó cerca de 100 veces y funciona a temperaturas fisiológicas (12).

Aunque en general, los esquemas in vivo están más limitados que los in vitro, ya que la selección requiere que el crecimiento del organismo este acoplado a la propiedad funcional de éstas, ha habido desarrollos muy interesantes (13).

Gracias a la fusión de epítopes proteicos con las proteínas de la cubierta de fagos filamentosos como M13, f1 o fd, se ha podido seleccionar entre más de 10⁸ péptidos, aquellos de interés. La colección azarosa de péptidos se genera sintetizando químicamente oligonucleótidos degenerados que se clonan en el vector elegido. Se transforma E. coli con el plásmido y se crece para purificar las partículas virales, las cuales representan la colección de péptidos ya que cada fago expone en su superficie un único miembro de la colección fusionado a la proteína g3p de la cápsula. De esta forma pueden ser seleccionados usando una columna de afinidad con el ligando apropiado. Así los fagos purificados contienen no sólo el péptido de interés sino también la secuencia nucleotídica que codifica para ese péptido en particular. Más tarde, los fagos seleccionados pueden ser propagados al infectar nuevas células huéspedes y producir mayores cantidades del fago con el péptido, y así realizar otro paso de selección más riguroso hasta analizar el péptido, estudiar su afinidad y esclarecer su secuencia (14 y 15).

El grupo donde trabajo estudió la relevancia de tres residuos de la endonucleasa EcoRI en el reconocimiento del DNA, por medio de un esquema que utiliza cadena sencilla, proveniente de M13, para incorporar los oligonucleótidos mutantes, producto final que fue amplificado por PCR. Esta estrategia permitió realizar mutaciones alejadas en secuencia primaria, además que garantizaba la distribución binomial de enzimas silvestres, mutantes sencillas, dobles y triples (16).

En 1992, se propuso un esquema de mutagénesis combinatoria por PCR que simplifica grandemente la tarea y permite la creación de una colección más rica en secuencias mutantes, donde asimismo se tiene control acerca de la distribución de las mismas (17).

Utilizando este esquema nos propusimos mutar combinatoriamente

aquellos residuos de la beta-lactamasa que consideramos involucrados en su especificidad para explorar su superficie de especificidad.

¿Qué es una superficie de especificidad?.

Al igual que hablamos de superficies de afinidad o catalítica, podemos hablar de superficie de especificidad hacia un determinado sustrato, es decir, ¿cómo las distintas mutaciones en una enzima afectan su especificidad hacia cierto sustrato?. Pero, ¿qué entendemos por especificidad?.

El significado más importante que se le da al término especificidad enzimática es cuando una enzima discrimina entre diversos sustratos que compiten por un sitio activo. La definición que es importante desde un punto de vista biológico es cuando dos sustratos uno apropiado y el otro no, compiten por una enzima, y nos habla del problema de la velocidad relativa de reacción del apropiado y el inapropiado en una mezcla de ambos. En este sentido, la especificidad es una función de la afinidad por el sustrato y la tasa catalítica: si el sustrato indeseable y la enzima tienen una k_{cat} que es 1000 veces menor que aquella para el sustrato deseable, pero el sustrato indeseable se une 1000 veces más fuertemente, entonces el pegado preferencial compensará la menor velocidad. Por esto, k_{cat}/K_M es la constante cinética importante al determinar la especificidad, ya que combina los términos de velocidad y pegado (18).

No es adecuado hablar de un sustrato pobre tan sólo porque posee una K_M alta o una k_{cat} baja. En sistemas biológicos tanto K_M como k_{cat} son importantes (18).

Cada enzima lleva a cabo una función específica, dependiendo de si actúa sobre diversos sustratos, aunque sean bastante relacionados, o sobre un sustrato en particular, se habla de especificidad grupal o absoluta, respectivamente. Algunas veces esta discriminación es exquisita permitiendo distinguir entre sustratos que difieren en un solo grupo metilo. Sin embargo, las enzimas no

necesitan tener requerimientos precisos para todos los sustituyentes en sus sustratos; normalmente, discriminan a partir de sitios particulares. Así, las enzimas se caracterizan más por perfiles de especificidad amplia o estrecha. Además las enzimas no sólo son sustrato específicas, sino también producto-específicas (19).

La región que contiene el sitio de unión y los residuos catalíticos se le denomina sitio activo de la enzima. Este comprende sólo una pequeña porción del volumen total de la enzima y está en o cerca de la superficie, ya que debe estar accesible a las moléculas del sustrato (19).

El sitio activo tiene una estructura tridimensional que consiste de porciones de una cadena polipeptídica. Los sitios de unión y los catalíticos son residuos de aminoácidos o cofactores, estos últimos unidos, a su vez, a cadenas laterales de aminoácidos. El pegado del sustrato puede involucrar una variedad de interacciones, pero los enlaces formados son relativamente débiles (19).

Aquellos aminoácidos en el sitio activo que no tienen una función de pegado o catalítica pueden, no obstante, contribuir a la especificidad de la enzima. Sus cadenas laterales pueden ser del tamaño, forma y propiedades adecuados para no interferir con el pegado del sustrato, pero si pueden bloquear el pegado de otra molécula químicamente similar (19).

El sitio activo frecuentemente incluye residuos polares y apolares, creando un arreglo de microambientes hidrofílicos e hidrofóbicos que no se encuentran en ninguna otra parte de la enzima. Por lo que la función de una enzima puede depender no sólo del arreglo especial de los sitios de pegado y catálisis, sino también del ambiente en que estos sitios se encuentran (19).

El hacer una clara distinción entre grupos catalíticos y grupos de unión dentro de una enzima implica cierta arbitrariedad. Un buen ejemplo para ilustrar esto es el experimento hecho por Carter y Wells, quienes reemplazaron la triada catalítica de la subtilisina por alaninas en las siete combinaciones posibles. Aún la triple mutante, con ninguno de los residuos catalíticos, realizaba la reacción 1000 veces más rápido que la reacción sin catalizador. Es decir, el resto de la molécula

todavía une al estado de transición mucho más fuertemente que al estado basal, lo que promueve la reacción. Esto mismo se observa con los anticuerpos catalíticos que han sido seleccionados para unir el estado de transición, sin tener ningún residuo catalíticamente competente (20).

¿Cómo se explica la especificidad?

Ya desde 1890, Fisher sugirió que la especificidad enzimática implicaba la presencia de rasgos estructurales complementarios entre la enzima y el sustrato: un sustrato puede acomodarse en su sitio complementario como una llave lo hace en su cerradura. De acuerdo con este modelo todas las estructuras permanecen fijas a lo largo del proceso de unión (19).

Koshland propuso en 1958 su hipótesis de la adecuación inducida para explicar la evidencia proveniente de diversas fuentes espectroscópicas en relación al cambio de la estructura de las proteínas cuando unen al sustrato. Esto no es extraño, ya que cabe esperar que los enlaces entre el sustrato y sus sitios de unión pueden reemplazar enlaces previamente existentes en el sitio de unión consigo mismo o entre éste y grupos aledaños. Asimismo, el sustrato puede excluir moléculas de agua y hacer la región menos polar. Estos factores pueden ser responsables del cambio en la estructura terciaria de la proteína que ocurre con la unión del sustrato (19).

En la hipótesis de la adecuación inducida se sugiere que el sustrato puede ser complementario al sitio activo en el complejo enzima-sustrato, pero no en la enzima libre; ocurre un cambio conformacional en la enzima que resulta en la complementariedad de ambos. Esta hipótesis requiere que el sitio activo sea flexible y el sustrato rígido, de forma que la enzima se pliegue alrededor del sustrato, poniendo en contacto los residuos catalíticos con los grupos reactivos. De cierta forma, la relación entre el sustrato y el sitio activo es similar a aquella entre una mano y un guante de lana: en cada interacción la estructura de un componente (sustrato o mano) permanece fija y la forma del segundo (sitio activo o guante) cambia hasta ser complementaria al primero (19).

Este mecanismo ayuda a explicar la alta especificidad mostrada por las enzimas, ya que sólo aquel sustrato adecuado permitirá que los grupos reactivos alcancen la posición idónea. Por supuesto que puede ocurrir que un grupo de unión similar desate un cambio conformacional, pero, en general, esto no acercara los grupos catalíticos a los reactivos, produciendo lo que se llama un pegado no-productivo (19).

Aunque los modelos anteriores pueden explicar la especificidad enzimática, ninguno sugiere la forma en que la reacción puede llevarse a cabo. La unión del sustrato normalmente requiere el gasto de una considerable cantidad de energía y, aunque sirve para el útil propósito de juntar grupos reactivos y catalíticos, se requiere más energía antes de que la reacción proceda. En 1930, Haldane señaló que si la energía de unión se usara para distorsionar el sustrato de tal forma que se facilitara la reacción subsiguiente, entonces se requeriría menos energía para llevar a cabo la reacción; tomando en cuenta la analogía de la llave y la cerradura dijo: "la llave no entra perfectamente en la cerradura, sino que ejerce cierta tensión en ella". Desde entonces se ha hablado de tensión o distorsión en enzimología (19).

Supongamos que la estructura del sitio activo es casi complementaria a la del sustrato, pero no exactamente. Si la estructura del sitio activo es rígida, el sustrato puede ser distorsionado levemente para unirse a la enzima. Esta distorsión puede resultar en el estiramiento, y por lo tanto debilitamiento, de un enlace que es subsecuentemente roto, ayudando a que se complete la reacción (19).

De hecho, existe poca evidencia clara de que ocurra un pegado distorsionado. Un mecanismo alternativo para que se lleve a cabo la reacción, y quizá más probable, sea la estabilización del estado de transición. Esto asume que el sustrato se une de una forma no distorsionada, pero que el complejo enzima-sustrato posee varias interacciones desfavorables. Estas tienden a distorsionar el sustrato de tal forma que se favorece la siguiente secuencia de

reacciones: complejo enzima-sustrato -> estado de transición -> productos. Según procede la reacción, las interacciones desfavorables disminuyen y desaparecen del estado de transición (19).

En 1946, Pauling fue el primero en sugerir que la capacidad catalítica de las enzimas era el resultado de su alta afinidad específica por el estado de transición. Eyring desarrolló las teorías contemporáneas acerca del complejo activado del estado de transición. Su enfoque considera al complejo del estado de transición en equilibrio con los reactantes. Con este concepto, la noción de tensión del sustrato se convierte en obsoleta, aunque se podría argumentar, según la interpretación, cierta equivalencia. Esta hipótesis ha sido confirmada utilizando análogos del estado de transición, que son compuestos que simulan el estado de transición y se unen muy fuertemente a los sitios activos de las respectivas enzimas, de hecho más fuertemente que el sustrato o productos correspondientes (19 Y 20).

¿Qué interacciones determinan la especificidad?

Nuestra meta última es ser capaces de remodelar los patrones de especificidad racionalmente. Para lograr esto, se debe tratar de entender los orígenes energéticos del perfil de especificidad de la enzima original.

La catálisis es el resultado de la habilidad de la enzima de unir el estado de transición de la reacción más fuertemente que al sustrato. Se deduce que la especificidad es producto de la unión preferente de aquellos estados de transición de sustratos favorables en comparación con los que no lo son. Por lo tanto, para modificar el perfil de especificidad, debemos concentrarnos en las interacciones energéticas que ocurren durante el estado de transición en el complejo enzima-sustrato. El proceso selectivo de sustratos debe resultar del balance entre interacciones intermoleculares energéticamente favorables y aquellas desfavorables. También debemos conocer si el patrón particular de especificidad, reside sólo en aquellos grupos de la enzima que están en íntimo contacto

con el sustrato, o si la especificidad es una propiedad más distribuida a través de la estructura de la enzima. Aunque es claro que las interacciones locales desempeñan un papel en determinar la especificidad de sustrato, no son las únicas determinantes, residuos más distantes pueden desarrollar un rol en posicionar precisamente los residuos claves de la especificidad y afectar propiedades de la enzima que pueden influenciar la especificidad (21).

En la actualidad, la capacidad de manipular estas interacciones intermoleculares para moldear la especificidad enzimática es bastante limitada. Además de la complejidad del problema, existe una falta de datos, sobre todo una detallada caracterización estructural de enzimas mutantes y enzimas mutantes en complejo con sustratos o análogos del estado de transición (21).

El pegado es un balance entre las interacciones intermoleculares favorables y las consecuencias desfavorables de acomodar y restringir el sustrato al sitio activo. Entender estas interacciones se complica al tomar en cuenta por la solvatación de la enzima y el sustrato, además de los cambios en solvatación que ocurren en la formación del complejo enzima-sustrato. Entre las interacciones intermoleculares que fomentan el pegado se incluyen puentes de hidrógeno, efectos hidrofóbicos, fuerzas dispersoras y electrostáticas. Dentro de las desfavorables están las interacciones estéricas erróneas, puentes de hidrógeno distorsionados, cavidades, cambios conformacionales inducidos al unir el sustrato, pérdida de entropía por restringir el número de conformaciones de la enzima y el sustrato, pérdida de entropía por la reducción de libertad rotacional y translacional del sustrato. En el complejo michaeliano, que es relativamente débil, las interacciones moleculares proveen un poco más de energía que el costo de restringir el sustrato al sitio activo (alrededor de 4-9 kcal/mol). Conforme la reacción avanza hacia el estado de transición, las interacciones moleculares aumentan bastante (alrededor de 16-20 kcal/mol) supuestamente debido a la mejora de unas pocas interacciones en el sitio de la reacción (21).

La especificidad enzimática es tanto el resultado de la selección contra los estados de transición de los sustratos desfavorables como de la selección a favor

de los estados de transición de los sustratos preferidos por la enzima. Por lo que, cuando se trata de modificar un perfil de especificidad particular es importante estimar qué tan efectiva será la estrategia de mutación en seleccionar en contra de los sustratos no deseados. Es más, si la meta es desplazar la especificidad hacia un sustrato desfavorable, uno debe saber qué tanto se gana eliminando interacciones desfavorables. Quizá el factor más poderoso para la selectividad del sustrato es a través de modificar las interacciones estéricas (21).

En general, la enzima y el sustrato interactúan a lo largo de una superficie muy larga que involucra contactos con un gran número de residuos de aminoácidos, cada uno de los cuales es susceptible de ser mutado para diseñar el cambio funcional que uno desee (21).

Actualmente existe un gran número de datos de los cambios de energía libre resultantes de la combinación de mutantes sencillas. Analizando estos datos se observa que los efectos de la estabilización del estado de transición, unión de ligandos y el plegado de proteínas se comportan aditivamente en la mayoría de las circunstancias. Esta observación debe simplificar la tarea de modificar la especificidad enzimática, permitiendo seleccionar de una base de datos de experimentos de mutagénesis todas aquellas mutaciones que desplazan la especificidad hacia el sustrato deseado. Sin embargo, existen ocasiones en que esta aditividad no se cumple y se complica la predicción del comportamiento de la doble mutante, por ejemplo: cuando ambos residuos interactúan y no se comportan independientemente o cuando la mutación causa un cambio en el mecanismo o el paso limitante de la reacción (22).

¿Cómo podemos remodelar la especificidad?

La manipulación de la especificidad de una enzima ejemplifica el entendimiento de la relación entre estructura y función de una proteína.

Si bien la presión evolutiva a la que han estado expuestas las enzimas las ha empujado hacia la optimización de cierto patrón de especificidad, se sabe que

es posible que determinado andamio proteico es compatible con una especificidad alternativa, de forma que ya existen trabajos en que se altera la especificidad de una enzima y, de esta forma, se imita el proceso que, sin duda, ha llevado a cabo la evolución para proveer a los organismos con infinidad de enzimas cada una con una determinada especificidad (23).

Para lograr esto se han utilizado, principalmente, tres enfoques: uno genético, en el que se produce un gran número de variantes y, posteriormente, se selecciona la que presenta las características deseadas, este punto ya lo tocamos extensamente al principio de este trabajo; otro que basa el diseño en las conjeturas hechas a partir de estudiar la estructura y el último trata de predecir, a través de programas computacionales los efectos de las mutaciones (21).

En el enfoque genético que nosotros utilizamos para seleccionar aquellas posiciones en que se iban a probar cambios múltiples, nos basamos en los datos de mutantes clínicas con cambio de especificidad reportadas y en la observación de los residuos que contactan el sustrato en la estructura cristalográfica.

Dentro del renglón de diseño de cambios de especificidad ex profeso, todavía no está dicha la última palabra. Se han probado diversos enfoques, pero se pueden enumerar algunas técnicas que son comunes a todos ellos. Para traer alguna esperanza de ser predictivo se debe partir de la estructura tridimensional en la cual se identifican los residuos que contactan el sustrato y se prueban distintas sustituciones en busca de efectividad potencial. Se consideran factores que pueden influir en el efecto de mutaciones particulares, tales como la pérdida o ganancia energéticas que puedan resultar de la sustitución. Se deben evitar las mutaciones que pudieran ser desestabilizantes. Los factores de temperatura provenientes de la cristalografía, así como los valores de accesibilidad deben tomarse en cuenta como guía de posibles sitios sustituibles. Si la proteína de interés es parte de una familia de proteínas con diferente especificidad, se puede obtener información de la comparación. Como resultado de todo este proceso de sentido común, muchas veces se obtienen resultados completamente inesperados al exhibir la proteína propiedades inesperadas o responder a una mutación en

particular de una forma impredecible (21 Y 24).

Quizás el cambio más radical que se haya reportado de cambio de especificidad sea en la glutatión reductasa. Esta enzima protege a la célula de daños por reducción, manteniendo al glutatión en la forma reducida. Tripanosomas y leishmanias contienen una enzima similar, pero distinta, la tripanotión reductasa, que mantiene el equilibrio redox de la célula reduciendo al tripanotión disulfuro. Ambos sustratos tienen una estructura similar, pero ambos excluyen casi totalmente al otro sustrato. Comparando los residuos que difieren en ambas enzimas, fue posible localizar los aminoácidos determinantes de esta especificidad y construir una mutante múltiple de la glutatión reductasa de *E. coli*, que se comporta casi igual que la tripanotión reductasa, teniendo una K_M 10 veces mayor y una k_{cat} casi idéntica (25).

Aparte del enfoque comparativo de estructuras homólogas, presentado en el ejemplo anterior también se ha intentado la inserción de elementos completos de estructura secundaria como módulos intercambiables que controlan la especificidad. Esto se ha logrado entre la ribonucleasa bovina A y la angiogenina, donde la sustitución de un asa entre ambas ha intercambiado sus actividades catalíticas (25).

Una de las primeras estrategias utilizada para modificar la especificidad fue la permutación entre grupos funcionales que interactuaban entre una proteasa y sus sustratos. Por ejemplo: la subtilisina tiene preferencia por sustratos con residuos terminales con cadenas laterales largas, como la fenilalanina, esto se debe a la presencia de una glicina en el fondo del hueco de especificidad. La conversión de esta glicina por fenilalanina cambia la especificidad hacia sustratos con alanina o glicina en esta posición (21).

Es claro que, el problema de rediseñar la especificidad de sustrato de una enzima es una labor complicada. Hasta la fecha, la mayoría de las modificaciones se han basado más en la intuición química producto de estudiar la imagen cristalográfica de la enzima, que en el análisis cuantitativo de las consecuencias

estructurales y energéticas de la mutación propuesta. Predecir qué mutaciones tendrán el efecto deseado es un reto llamativo que requiere del cálculo de las energías de interacción entre la enzima y el sustrato, así como de modelar correctamente las estructuras de las enzimas mutantes y los complejos enzima-sustrato (21).

El grupo de Wilson predijo que la mutante M192V de la proteasa alfa-lítica hidrolizaría un péptido con leucina en la posición P1, que originalmente era un mal sustrato para la enzima silvestre. El resultado experimental coincidió, admirablemente, en gran medida con la predicción. El programa consistía en evaluar la energía libre de interacción entre el sustrato y cada uno de los rotámeros de los 20 aminoácidos que se fueron sustituyendo en la posición a mutar. Este resultado hace pensar que este tipo de enfoque es promisorio (26).

β -lactamasa como modelo para efectuar un cambio de especificidad.

La β -lactamasa es la enzima responsable de la resistencia que presentan muchas bacterias a la acción, normalmente letal, de los antibióticos β -lactámicos, cuyo representante más famoso es la penicilina G (27).

La β -lactamasa es un buen modelo para efectuar una modificación de su especificidad a través de crear una colección de mutantes por mutagénesis combinatoria. Entre sus ventajas se encuentran: la β -lactamasa de *E. coli* (R-TEM1) que utilizamos en este proyecto es parte de una familia de más de 20 proteínas homólogas, de las que se ha resuelto la estructura cristalográfica de 3 de ellas, incluida la R-TEM1; se conoce con cierto detalle su mecanismo catalítico gracias a gran número de observaciones cinéticas de la enzima silvestre y de algunas mutaciones de los residuos claves; existen cientos de sustratos que comparten el mismo núcleo básico, pero que sus distintas cadenas laterales ocasionan que estos se distribuyan en una gama muy amplia de especificidades, los hay que son excelentes sustratos hasta otros muy pobres; asimismo gracias a datos clínicos como algunas mutantes experimentales se han mapeado los

residuos involucrados en especificidad, la existencias de estas mutantes asegura que es factible el modificar la especificidad de esta enzima.

Familia de β -lactamasas.

La principal división entre las β -lactamasas es en enzimas con serina o zinc; las primeras tienen una serina en el sitio activo y funcionan por un mecanismo con un intermediario acil-enzima, mientras que las otras son metaloenzimas e involucran un intermediario no covalente. La comparación de las secuencias de aminoácidos ha separado las serín enzimas en tres clases, llamadas A, C y D. Todas las enzimas con zinc se han agrupado en la clase B, aunque sólo algunas de ellas presentan similitud de secuencia. La clase A es bastante diversa, cuyas propiedades y secuencias primarias, si bien son homólogas, difieren considerablemente. Por otra parte, los miembros de la clase C son muy parecidas entre sí. Las β -lactamasas de tipo OXA están agrupadas en la clase D; sus secuencias difieren mucho de las demás clases (27 y 28).

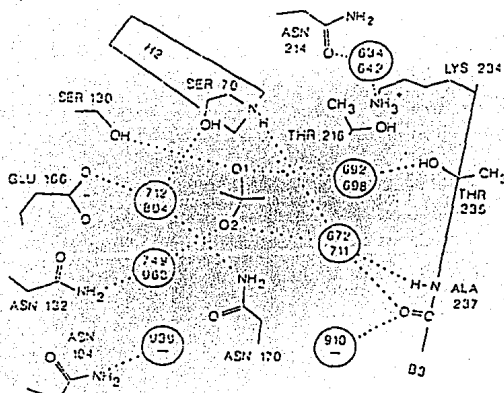
En un alineamiento de 26 secuencias de la clase A, en la cual nos vamos a enfocar, se observaron 24 residuos 100% conservados dentro de la familia (28).

Estructura.

Se conocen las estructuras cristalográficas de tres β -lactamasas de clase A a una resolución de, por lo menos, 2A (PC1 de *Staphylococcus aureus*, 749/C de *Bacillus licheniformis* y R-TEM de *Escherichia coli*), además del complejo del aztreonam con la β -lactamasa de clase C de *Citrobacter freundii* y la D-alanil-D-alanina peptidasa de *Streptomyces R61* (29-34).

Los esqueletos de las β -lactamasas de clase A son muy parecidos, tienen una estructura alfa más β con 11 hélices y 5 β plegadas separadas en dos dominios. En una visagra entre ambos dominios se encuentra el sitio activo, donde la serina 70, residuo principal en la catálisis, está en el amino terminal de una alfa-hélice y forma un puente de hidrógeno con la K73. Interactuando con K73 están

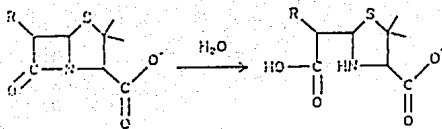
S130, N132 y E166, este último se encuentra en un asa con alfa hélice que puede ser flexible. La estructura sugiere que el pegado de sustratos β -lactámicos puede facilitarse por interacciones con K234, T235 y A237 los que son residuos de una β plegada que delimita un extremo del sitio activo. E166 y N170 forman puentes de hidrógeno con una molécula de agua probablemente importante para el mecanismo catalítico. Los grupos amido del esqueleto de S70 y A237 pueden estar ayudando a estabilizar la carga del oxígeno carbonilo durante la catálisis (30).



Sitio activo de la β -lactamasa.

Mecanismo.

Las β -lactamasas destruyen los antibióticos β -lactámicos catalizando la ruptura del anillo β -lactámico (27).



Reacción llevada a cabo por la β -lactamasa.

Se supo que el residuo más importante para la catálisis era la S70 por medio del marcaje con ácido 6- β -bromopenicilánico, esto se confirmó con experimentos de mutagénesis dirigida (27).

A través de mediciones con espectroscopía de infrarrojo de la hidrólisis del mal sustrato cefoxitina se dedujo que la reacción se llevaba a cabo por medio de un éster como intermediario. El mecanismo acil-enzima consiste de tres pasos. En el primero, la enzima y el sustrato se combinan reversiblemente para dar un complejo enzima-sustrato no-covalente, en el segundo se forma el intermediario covalente acil-enzima y en el tercero se hidroliza (27 y 35).

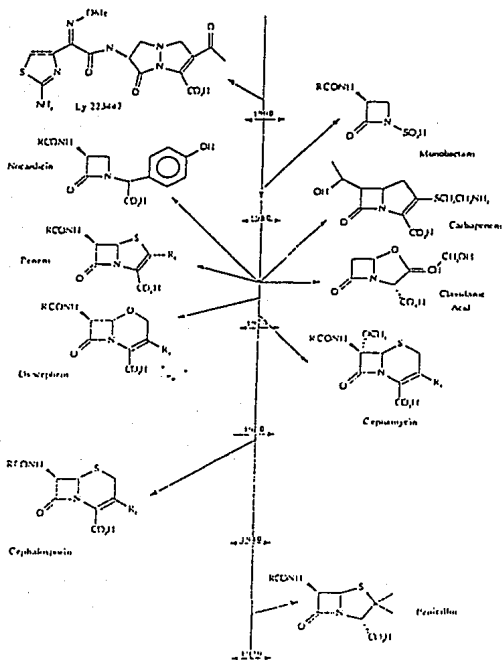
Debido a que las tasas de acilación y desacilación son comparables y a sus altos valores se han considerado a las β -lactamasas como enzimas completamente eficientes. Esto se comprueba con la observación de que para sustratos buenos, el paso limitante de la reacción es la difusión del sustrato, ya que se vio una dependencia de k_{cat}/K_M con la viscosidad del medio (36).

Por medi de estudios cristalográficos y de mutagénesis se han postulado varias hipótesis acerca del papel específico que desempeña cada residuo en la catálisis, sin embargo aún no se llega a un consenso.

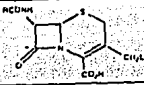
Sustratos.

Desde que Fleming descubrió el efecto antibiótico de la penicilina hace más de 60 años, se han ensayado miles de β -lactámicos distintos, la gran mayoría sintéticos o semisintéticos (27).

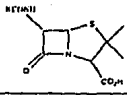
En la actualidad, los β -lactámicos se pueden clasificar en varios grupos acorde con su estructura: penicilinas (penams), cefalosporinas (cefems), cefamicinas, oxacefems, penems, oxapenams, carbapenems, nocardinas y monobactams (27).



Evolución en la síntesis de los antibióticos β -lactámicos.



Cephalosporin		L	
Oral cephalosporins			
cephalopyrin	$\text{PhCH}(\text{NH}_2)-$	$-\text{OAc}$	
cephalexin	$\text{PhCH}(\text{NH}_2)-$	$-\text{Cl}$	
cefadroxil	$\text{PhCH}(\text{NH}_2)-$		
cefprozil	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)-$		
First-generation cephalosporins			
cephalotin		$-\text{OAc}$	
cephaloridine			
cefazolin			
Second-generation cephalosporins			
cefamandole	$\text{PhCH}(\text{OH})-$		
cefuroxime		$-\text{O}-\text{CONH}_2$	
cefprozil	$\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_2)_2-$ NH_2	$-\text{O}-\text{CONH}_2$	
Third-generation cephalosporins			
cefotaxime		$-\text{OAc}$	
cefoperazone			



Penicillin	R	Penicillin	R
Benzyl penicillin (Pen G)	PhCH_2-	Carbenicillin	PhCH_2- CO_2H
Pen F	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CHCH}_2-$	Oxacillin	
Pen X		Pen V	PhOCH_2-
Pen K	$\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2-$	Clavulanic acid	
Pen N	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{CH}_2)_2-$ CO_2	Dicloxacillin	
Propicillin	$\text{PhOCH}_2(\text{Et})-$	Phenoxymethylpenicillin	$\text{PhOCH}_2(\text{H}_2\text{N})-$
Daptenicillin		Nafcillin	
Methicillin		Quinacillin	
Ampicillin	PhCH_2- NH_2	Ticarcillin	

Fórmula de las penicilinas y cefalosporinas más comunes.

En todos ellos es característico el anillo β -lactámico de cuatro miembros. En la mayoría, el anillo β -lactámico está fusionado a través del nitrógeno y el carbono tetrahédrico adyacente a un segundo anillo. En las penicilinas es un anillo tiazolidín y en las cefalosporinas uno dihidrotiazín. Ahora ya hay otras muchas estructuras como las mencionadas anteriormente (27).

Se han sintetizado miles de β -lactámicos con todo tipo de sustituyentes imaginables con el propósito de que presenten una mayor actividad biológica (27).

Modo de acción.

Se sabe que los β -lactámicos inhiben las enzimas transpeptidasas encargadas de sintetizar la pared celular bacteriana (27).

Sin embargo, para saber si un antibiótico va a ser biológicamente activo hay que tomar en cuenta varios factores. Conocer la vía por la cual el fármaco alcanza su blanco; la identidad y estructura del blanco y el mecanismo de inhibición; la respuesta fisiológica de la célula a la inhibición y cómo y por qué la inhibición de esta reacción interfiere en el ciclo de la vida de la célula (27).

Existen tablas que correlacionan la inhibición del crecimiento celular con la concentración de los antibióticos, con esta información se puede conocer la susceptibilidad de una cepa a determinado antibiótico (27).

La forma más común de respuesta a la inhibición del crecimiento por β -lactámicos, es la desactivación del antibiótico por medio de la β -lactamasa. De forma que se han creado antibióticos que son resistentes a la hidrólisis de esta enzima, pero continúan inhibiendo al mismo blanco. En general, las β -lactamasas de clase A degradan más fácilmente penicilinas que cefalosporinas (37).

Surgimiento de resistencia.

Desde 1987, se empezaron a reportar aislados clínicos que eran resistentes a cefalosporinas de tercera generación, antibióticos que no son hidrolizados por la β -lactamasa silvestre. Se encontraron que estos aislados presentaban una β -lactamasa con mutaciones en residuos alrededor del sitio activo, aminoácidos que parecen ser los encargados de discriminar entre los distintos sustratos (38).

A partir de ese momento ha aumentado el interés por entender qué papel desempeñan estos residuos, alrededor del sitio activo, en la discriminación entre penicilinas y cefalosporinas, caracterizando las mutantes clínicas o realizando experimentos de mutagénesis dirigida para estudiar estas regiones. El presente trabajo se une a este esfuerzo (39-42).

Objetivos.

- Establecer un método que permita la modificación combinada de residuos alejados dentro de la secuencia primaria de una proteína.
- Utilizando este método, contribuir al esclarecimiento de los determinantes de especificidad de las β -lactamasas, a través del aislamiento y caracterización de mutantes de especificidad.

Estrategia experimental.

- Crear una colección de mutantes de la β -lactamasa de *E. coli* (R-TEM), a través de mutagénesis combinatoria de nueve residuos alrededor del sitio activo.
- Rastrear este banco en busca de mutantes que presenten resistencia a cefalosporinas de tercera generación.
- Caracterizar las mutantes obtenidas.

Metodología.

Selección de residuos.

Se seleccionaron 9 residuos alrededor del sitio activo de la beta-lactamasa sobre los cuales se efectuó la mutagénesis, estos fueron 104, 105, 167, 168, 170, 216, 237, 238 y 240 (numeración de Ambler). Los criterios considerados fueron elegir: las posiciones aledañas al sitio activo en las cuales se han observado, en reportes clínicos, mutaciones que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación y los residuos que, potencialmente, contactan los grupos radicales R1 y R2 de las cefalosporinas, según se modeló a la cefotaxima en el sitio activo de la beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*.

Síntesis de oligonucleótidos.

Por la técnica de fosforamiditos se sintetizaron 7 oligonucleótidos, gracias a la colaboración de los químicos Paúl Gaytán y Eugenio López. Dos de los oligonucleótidos eran complementarios a regiones en los extremos del gen de la beta-lactamasa R-TEM en el plásmido pBR322, de estos uno contaba con 20 nucleótidos añadidos, que no eran complementarios a ninguna región del plásmido pBR322, y tenía un sitio de corte para BGLII (estas bases extras son muy importantes para el esquema de mutagénesis). Un tercer oligonucleótido era, tan sólo, las 20 bases extras del oligonucleótido descrito anteriormente. Los otros cuatro oligonucleótidos fueron los mutagénicos. Estos últimos eran totalmente complementarios a la secuencia silvestre en las 15-17 bases que flanqueaban el codón a mutar; pero, en la posición deseada, se sintetizaba una colección de oligonucleótidos mutagénicos, la mitad codificaba para el codón silvestre y la otra mitad tenía una mezcla de NNG/C. De esta forma, teóricamente, de las 32⁹ mutantes, se obtenía una distribución binomial de complejidad, resultando un 0.2% del banco la secuencia silvestre, un 1.76% sencillas, un 7.03% dobles, un 16.41% triples, un 24.61% cúadruples, un 24.61% quintuples, un 16.41% séxtuples y así sucesivamente. Con lo cual se buscó rastrear el mayor número

posible de mutantes sencillas, dobles y triples; ya que el número de estas es mucho menor que el de, por ejemplo, las nónuples. Todos los oligonucleótidos fueron purificados por elución de una banda cortada de un gel de acrilamida.

Mutagénesis por PCR.

La mutagénesis combinatoria se realizó sobre el gen de la beta-lactamasa R-TEM que se encuentra en pBR322. Se hicieron PCRs sucesivas, en cada ronda se iba añadiendo el siguiente oligonucleótido y, después de purificar este producto, se continuaba con la siguiente ronda.

El oligonucleótido no complementario a pBR322 es el ardid más importante para permitir la incorporación de nuevas mutantes a aquellos segmentos que ya llevan algunas, evitando la amplificación de la secuencia silvestre.

Las temperaturas de los ciclos de PCR fueron: 1'30" a 92°C, 1'30" a 55°C y 3' a 70°C por 20 ciclos y 1 ciclo de 15' a 70°C. La reacción se llevó a cabo en 100ul con 5-8ng de vector o templado con mutaciones, 30pmolas de los oligonucleótidos y 2.5mM de NTPs, en un buffer final de 50mM KCl, 10mM TRIS-HCl, pH 9.0 y 0.1% de Tritón X-100 y con una gota de aceite mineral en el tubo de reacción para evitar la evaporación.

Se probaron tres distintas DNA-polimerasas termoestables: Vent, Taq y Pfu.

Además de un producto que incluía las 9 mutaciones, se hicieron 3 subconjuntos de 6 (1: 104, 105, 167, 168, 170 y 216; 2: 104, 105, 216, 237, 238 y 240 y 3: 167, 168, 170, 237, 238 y 240).

La purificación de los fragmentos deseados se realizó cortando la banda de un gel de agarosa, triturándola y extrayendo el DNA con fenol.

Digestiones y ligaciones.

El producto final de la PCR se preparó para la clonación limpiándolo con

Gene-Clean y digiriéndolo con BGLII y HINDIII. El vector de clonación fue pKGS, que se cortó con BGLII y HINDIII, para insertar el gen de la beta-lactamasa, incluido el promotor y demás señales, dentro del gen de la endonucleasa EcoRI. El plásmido se desfosforiló. Se ligaron con la ligasa T4, 100 ng de inserto con 100 ng de vector en 10 μ l totales a 16°C.

Electroporación.

Las células para electroporar se prepararon creciendo, toda la noche, *E. coli* (cepa CMK) a 37°C agitando a 200 rpm. Se pusieron en hielo hasta enfriar y se cosecharon por centrifugación. Se lavaron con agua y se concentraron en una solución final de glicerol al 10%. La concentración de las células fue alrededor de 10^{10} cfu/ml. Esta suspensión se congeló en hielo seco y se guardó a -70°C.

Para transformar se descongelaron las células a temperatura ambiente y se colocaron en hielo. Se agregó 1 μ l de la muestra de ligación, previamente precipitada con etanol para desalificar, a 40 μ l de células, se mezcló y se incubó por 1 min. Se colocó esta suspensión en una cubeta para electroporar de 0.2 cm y se le dió un pulso de 12.5 kV/cm con una constante de tiempo de 3.8 msec. Inmediatamente se agregó 1 ml de medio SOC a temperatura ambiente a la cubeta y se resuspendieron rápidamente las células con una pipeta pasteur. Se incubaron en un tubo a 37°C en agitación constante.

Selección.

Las células, después de la electroporación y recuperación, se platearon en cajas de petri con medio Luria sólido, kanamicina 25 μ g/ml y la concentración específica del antibiótico selector, 2 μ g/ml para cefotaxima, 25 μ g/ml de cefuroxima o 2 μ g/ml de ceftriaxona. Anteriormente, se habían hecho experimentos para conocer a qué concentración de cada antibiótico no crecían las bacterias con la beta-lactamasa silvestre. Las cajas se incubaron toda la noche a 37°C y se observó el surgimiento de mutantes.

Ensayos de concentraciones mínimas inhibitorias.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) es aquella en que es notorio un cambio en la densidad bacteriana de un cultivo. Inicialmente usamos un método de determinación en líquido. Se pusieron 50ul de medio Muller-Hinton con la concentración de antibiótico a probar, en diluciones sucesivas, en los pozos de una placa de ELISA estéril con 50ul de un cultivo con 10^7 ufc/ml. Se crecían toda la noche a 37°C y se determina el MIC.

Los ensayos en sólido se realizaron en cajas de Petri con medio Muller-Hinton y las distintas concentraciones de antibióticos, siempre en diluciones de la mitad. Se hicieron determinaciones a dos densidades celulares 10^7 cfu/ml y 10^4 cfu/ml. Se depositaron 5ul de estas soluciones en las cajas respectivas, se incubaron toda la noche a 37°C y, al otro día, se observó en que concentración se inhibía el crecimiento.

Secuencia.

Se realizó la secuencia del gen de la beta-lactamasa, del aminoácido 100 en adelante, en aquellas colonias que más crecían en cefotaxima, por medio del método de Sequenasa (USB) con S^{35} . Se corrió un gel de acrilamida 7% con 8M de urea, se expuso ante una película sensible a las partículas beta y se reveló para leer la secuencia. Para estos experimentos se contó con la colaboración de la Mtra. Ma. Elena Munguía y el Dr. Joel Osuna.

Mutagénesis adicionales.

Con el mismo esquema de PCR se construyeron las mutantes: G238S y E104K/G238S. Para la E104M se subclonó el fragmento correspondiente a esta mutación, tomado de la E104M/G238S.

Purificación.

Durante el proceso de purificación, la actividad de la beta-lactamasa se midió, cualitativamente, agregando una gota de nitrocefina a 10ul de la fracción a ensayar, si la enzima está presente, el sustrato vira claramente de color de amarillo a rojo intenso. El grado de purificación se fue checando por medio de geles del sistema Phast (Pharmacia), tanto de SDS como de isoelectroenfoque (IEF), considerándose pura cuando la beta-lactamasa era la única banda presente. La actividad de esa banda se midió cubriendo el gel nativo con un papel de nitrocelulosa empapado en nitrocefina, de forma que se observaba un cambio en el color del papel de amarillo a rojo en donde se encontraba la banda.

Para iniciar la purificación, se crecieron, toda la noche, cada célula con el plásmido codificando para la proteína de interés en 6 litros de medio Luria con 25µg/ml de kanamicina y 100µg/ml de ampicilina. El resto del protocolo se realizó a 4°C. Se cosecharon las células centrifugando 10 minutos a 6,000 rpm. Se lavó el precipitado con un buffer (10 mM TRIS-HCl, 30 mM NaCl, pH 8), se volvieron a centrifugar, se agregó una solución hiperosmótica (20% de sacarosa, 30 mM TRIS-HCl y 1 mM EDTA) y se resuspendieron suavemente, después de centrifugar, se dió un choque osmótico con agua para romper la pared celular y liberar las proteínas del periplasma. Se precipitaron las células y se tomó el sobrenadante al cual se le agregó un 10% de acetato de sodio 0.2M pH 4.8, y se dejó, toda la noche, en agitación suave a 4°C. Después de desechar las proteínas precipitadas por centrifugación, se cargó la solución en una columna de CM-Sefarosa, previamente equilibrada con un buffer de acetato de sodio 0.02M pH 4.8. Una vez cargada la proteína, se lavó la columna con el mismo buffer para eluir todas aquellas proteínas no retenidas. Posteriormente, se corrió un gradiente de NaCl, desde 0M hasta 0.4M, y se probaron las fracciones colectadas en búsqueda de actividad. Se juntaron todas las fracciones con alta actividad y menos bandas contaminantes para cargar a una columna de cromatofenofe. Esta estaba equilibrada con un buffer de imidazol 0.025M pH 7. El buffer de corrida fue PBE pH 4. Se probó, de igual forma, la actividad de las fracciones colectadas. En los casos en que estos pasos no fueron suficientes, se corrió una columna de Sephadex G-100 para obtener una sola banda. El pI fue determinado por el desplazamiento en un gel de IEF (4-6.5) con respecto a proteínas con pI conocido.

Ensayos cinéticos de la beta-lactamasa.

La actividad de beta-lactamasa hacia varios sustratos se midió con un espectrofotómetro Perkin-Elmer 320, usando cubetas de 1, 0.4 y 0.1 cm de longitud. La hidrólisis fue monitoreada a 30°C en un buffer 0.5M de KCl y 0.05M de K_2HPO_4 pH 7. Los coeficientes de extinción molar usados fueron: ácido 6-aminopenicilánico (240 nm) $\Delta\epsilon = -455 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, bencilpenicilina (240 nm) $\Delta\epsilon = -570 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ampicilina (240 nm) $\Delta\epsilon = -538 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, cefaloridina (300 nm) $\Delta\epsilon = -518 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, cefuroxima (262 nm) $\Delta\epsilon = 6360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y cefotaxima (282 nm) $\Delta\epsilon = -2000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los $\Delta\epsilon$ fueron calculados midiendo la diferencia de absorbancia de determinada concentración de antibiótico antes y después de hidrólisis enzimática total. Se usó un ϵ de 29400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para medir la concentración de la beta-lactamasa a 280 nm.

Los valores de K_M y k_{cat} se obtuvieron por dos métodos distintos: curvas progresivas completas, usando una concentración de sustrato 5 veces mayor que la K_M y velocidades iniciales, para cefuroxima y cefotaxima, tomando, por lo menos, 15 concentraciones distintas entre 0.5 veces K_M y 5 veces K_M . Para la enzima silvestre, no fue posible obtener el valor de K_M de cefotaxima, debido a que se llegó al límite de sensibilidad del aparato.

Estos datos se analizaron con el paquete KaleidaGraph para Macintosh, ajustándolos a la ecuación de Michaelis-Menten.

Resultados.

PCRs y clonación.

Hubo varios factores que se observó fueron críticos para obtener las bandas deseadas en las PCRs. El purificar los oligonucleótidos a utilizar de los productos abortivos generados durante la síntesis, probablemente, disminuye la probabilidad de encontrar bandas no deseadas. Asimismo, el limitar el número de ciclos a 20, evitó la formación de un barrido continuo de productos, sobretodo en las últimas PCRs, cuando la complejidad de la muestra aumentó; aunque la aparición de bandas no deseadas en las últimas PCRs parece un fenómeno casi inevitable en este esquema. En algunos casos fue necesario disminuir la temperatura de complementación hasta 48°C para obtener la banda deseada. Utilizar un templado lineal o circular fue indistinto.

Sabiendo que la clonación eficiente era el paso limitante de la riqueza de nuestro banco se intentaron varias estrategias. En primera, todos los sitios de restricción fueron de enzimas con una alta eficiencia de corte y poco sensibles a la pureza del DNA; no obstante, se purificó el DNA con Gene-Clean (Bio-101) lo que aumentó la eficiencia de corte. Para evitar que el vector se ligara sobre si mismo se desfosforiló, además se clonó dentro del gen de la Eco-RI en el pKGS, de forma que aquellas colonias sin inserto morirían, dado que se expresaría la endonucleasa y la cepa CMK es sensible a ella. A pesar de esto, nuestra eficiencia de clonación fue muy baja, alrededor de 5×10^5 ufc/ug de DNA. Las digestiones y ligaciones fueron nuestro factor limitante, ya que la eficiencia de electrotransformación fue muy alta, alrededor de 10^9 ufc/ug de plásmido superenrollado.

Mutagénesis.

Siendo los MICs de la CMK con la beta-lactamasa silvestre para cefotaxima, cefuroxima y ceftriaxona de 0.0625µg/ml, 4µg/ml y 0.125µg/ml respectivamente, se decidió utilizar las siguientes concentraciones, en las cuales nunca crecían las

células silvestres: 2µg/ml para cefotaxima, 25µg/ml para cefuroxima y 2µg/ml para ceftriaxona.

Los resultados de selección obtenidos se presentan en la tabla siguiente:

Tasa de frecuencia de aparición de resistencia.

Colonias	Antibióticos			
	Ampic.	Cefotax.	Cefurox.	Ceftriax.
56,796	4,985 (8.8%)	21 (0.04%)	1 (0.002%)	0 (0%)

La tasa teórica de ocurrencia de la secuencia silvestre es 0.2%, la observada parecería ser mayor, aunque otros experimentos en el mismo laboratorio indican que es menor al 1%. Un 8.8% del banco de mutantes mantuvo la capacidad de crecer en ampicilina, aunque no sabemos qué otro tanto por ciento de ellas son mutantes y qué tanto sólo es contaminación de la secuencia silvestre, excedente al 0.2% esperado.

Los porcentajes de aparición de mutantes a cefalosporinas letales para las células con la beta-lactamasa silvestre, muestra que hacia la cefotaxima fue a la que con mayor facilidad surgieron mutantes (0.04%), después hacia la cefuroxima (0.002%) y no se aislaron mutantes resistentes a la ceftriaxona.

De las 21 mutantes resistentes a cefotaxima, 18 (tres no volvieron a crecer) se transfirieron a placas con ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona y cefuroxima, donde presentaron diversas niveles de resistencia. En general, el comportamiento en cefotaxima y ceftriaxona fue similar y todas las mutantes mantuvieron la resistencia a ampicilina.

De estas mutantes 3 salieron de la mutagénesis con todos los residuos incluidos, 1 cuando se excluyó la región 237, 238 y 240, otra cuando se excluyeron 104, 105 y 216 y 13 excluyendo 167, 168 y 170.

MICs y secuencia.

Se realizaron los MICs en líquido de estas colonias hacia cefotaxima. Y los datos se encuentran en la siguiente tabla, donde se tiene como control positivo a la mutante clínica E104K/G238S, que se sabe hidrolizaba a la cefotaxima.

De aquellas mutantes que muestran un MIC mayor a $512\mu\text{g/ml}$, una es producto de excluir el oligo 237, 238 y 240 y las demás de separar el oligo 167, 168 y 170. El control de E104K/G238S muestra un crecimiento ligeramente menor.

Secuenciando las colonias 9, 11 y 17 se encontró que todas ellas presentaban los cambios E104M/G238S.

Se realizaron MICs más detallados con la cepa sin beta-lactamasa, con la silvestre y las mutantes E104M/G238S, E104M y G238S.

MICs de colonias seleccionadas en cefotaxima (2µg/ml).

Colonia	MIC
E. coli (CMK)	0.5
E. coli + beta-lactamasa	0.5
Mutantes	
1 (124)	128
2 (124)	512
3 (124)	128
4 (1234)	512
5 (1234)	64
6 (1234)	128
7 (124)	128
8 (124)	512
9 (124)	>512
11 (234)	>512
12 (124)	256
13 (124)	512
14 (124)	512
15 (124)	512
16 (124)	512
17 (124)	>512
18 (124)	>512
19 (124)	>512
Control (E104K/G238S)	512

MICs de las bacterias con las enzimas estudiadas.

Alta densidad (10⁷)

	CMK	Silv.	E104M	G238S	E104M/G238S
6-apa	32	>2048	>2048	2048	2048
bpen	64	>8192	>8192	2048	4096
ampi	8	>8192	>8192	4096	4096
cefalor	8	>1024	>1024	1024	>1024
cefurox	4	4	16	4	16
cefotax	0.0625	0.0625	0.125	0.5	16

Baja densidad (10⁴)

	CMK	Silv.	E104M	G238S	E104M/G238S
6-apa	16	2048	2048	1024	1024
bpen	32	8192	8192	1024	2048
ampi	8	8192	8192	4096	4096
cefalor	8	128	512	64	256
cefurox	4	4	8	4	8
cefotax	0.0625	0.0625	0.125	0.25	2

En general, los MICs con una densidad celular de 10^4 resultaron mejores para poder distinguir diferencias de comportamiento.

Se encontró que, para penicilinas, aquellas mutaciones llevando la mutación, G238S presentaban una menor resistencia. Hacia cefaloridina y cefuroxima las enzimas con el cambio E104M tuvieron un valor más alto. Y para cefotaxima, sólo la doble mutante muestra una resistencia claramente más alta que la silvestre.

Purificación.

Se purificaron cuatro proteínas: la silvestre, la E104M/G238S, la E104M y la G238S. La concentración de proteína obtenida fue 10 veces menor para aquellas mutantes que llevaban el cambio G238S. Asimismo, estas proteínas eran más sensibles a mantenerlas a 4°C . Según se observó en un gel de la fracción periplásmica, la beta-lactamasa siempre representaba menos del 5% de proteína periplásmica. El pI de la beta-lactamasa silvestre y la mutante G238S fue 5.4, las mutantes E104M y E104M/G238S presentaron un pI de 5.6.

Cinética.

Las constantes cinéticas obtenidas para la enzima silvestre y las mutantes para tres penicilinas y tres cefalosporinas, de primera (cefaloridina), segunda (cefuroxima) y tercera generación (cefotaxima) se presentan en las tablas siguientes.

Parámetros de pegado.

	ENZIMA			
	TEM-1	E104M	G238S	E104M/G238S
K_M (μM)				
Bencilpen.	33.4	31.9	4.8	20.8
Ampicilina	148	122	11.8	8.3
Ácido 6-amino penicilánico	350	287	66.6	28.7
Cefaloridina	600	432	49.0	160
Cefuroxima	242	272	274	270
Cefotaxima	700	678	577	146
K_M relativa				
Bencilpen.	1.0	0.95	0.14	0.62
Ampicilina	1.0	0.8	0.08	0.06
6-apa	1.0	0.8	0.2	0.08
Cefaloridina	1.0	0.7	0.08	0.3
Cefuroxima	1.0	1.1	1.1	1.1
Cefotaxima	1.0	1.0	0.8	0.2

Parámetros de hidrólisis.

	ENZIMA			
	TEM-1	E104M	G238S	E104M/G238S
$k_{cat}(S^{-1})$				
Bencilpen.	781.9	1199.3	9.7	40.7
Ampicilina	1089	2610	5.13	14
Ácido 6-amino penicilánico	659.4	1060	8.3	10.9
Cefaloridina	570.4	969.2	10.5	70.3
Cefuroxima	10	22.7	0.52	25.9
Cefotaxima	0.25	8.25	7.53	70.29
k_{cat} relativa				
Bencilpen.	1.0	1.5	0.01	0.05
Ampicilina	1.0	2.4	0.005	0.01
6-apa	1.0	1.6	0.01	0.016
Cefaloridina	1.0	1.7	0.02	0.1
Cefuroxima	1.0	2.3	0.05	2.6
Cefotaxima	1.0	33	30.1	281.2

Según se aprecia en la tabla, no hay cambios muy drásticos en K_M , ni tampoco se puede decir que haya una diferencia notable en los cambios de K_M hacia penicilinas en comparación con cefalosporinas!

La E104M muestra valores muy similares de K_M para todos los sustratos con respecto a la silvestre. Las mutantes G238S y E104M/G238S disminuyen la K_M entre 5 y 20 veces, para penicilinas y cefaloridina, siendo los cambios menores en

la doble mutante.

Si bien, nosotros no obtuvimos el valor de K_M de la silvestre para cefotaxima, con respecto a algunos valores reportados (0.45-3 μ M), la K_M de ninguna de las mutantes parece haber cambiado drásticamente para explicar los cambios en k_{cat}/K_M .

Parámetros de eficiencia catalítica.

	ENZIMA			
	TEM-1	E104M	G238S	E104M/G238S
k_{cat}/K_M (s-1mM-1)				
Bencilpen.	23400	37600	2020	1960
Ampicilina	7330	21300	435	1680
Ácido 6-amino penicilánico	1890	3690	125	380
Cefaloridina	952	2240	216	434
Cefuroxima	41.3	83.4	1.9	96
Cefotaxima	1.1	12.2	13	481
k_{cat}/K_M relativa				
Bencilpen.	1.0	1.61	0.09	0.08
Ampicilina	1.0	2.9	0.06	0.23
6-apa	1.0	1.95	0.07	0.2
Cefaloridina	1.0	2.4	0.23	0.46
Cefuroxima	1.0	2.0	0.05	2.3
Cefotaxima	1.0	11.2	11.9	441.3

k_{cat} se afectó en mayor medida que K_M . La E104M muestra un aumento en k_{cat} contra aquellos sustrato que son hidrolizados, ya de por sí, bien por la enzima silvestre. También aumentó con las cefalosporinas de segunda y tercera generación. La k_{cat} de la G238S disminuye, incluso fuertemente (200 veces contra ampicilina), para todos los sustratos, excepto cefotaxima donde debe explicar buena parte del cambio en el cociente k_{cat}/K_M . La doble mutante sigue un perfil similar a la G238S, pero las disminuciones hacia los buenos sustratos no son tan graves y aumenta para cefuroxima y cefotaxima; hacia este último sufre un cambio espectacular de forma que se puedan explicar los drásticos cambios en k_{cat}/K_M .

Con respecto a k_{cat}/K_M , la E104M produjo una subida contra todos los sustratos, en especial hacia cefotaxima, para el cual coincidió el aumento con el de la G238S (alrededor de 11 veces). Sin embargo, para la G238S la eficiencia contra todos los demás sustratos disminuyó entre 12 y 50 veces. Con la doble mutante es donde se observa el cambio de especificidad más importante, ya que la eficiencia disminuyó para penicilinas y cefaloridina y aumentó dos veces para cefuroxima y 441 veces para cefotaxima. Para la enzima silvestre el cociente entre k_{cat}/K_M para bencilpenicilina y cefotaxima era de 21,468 y para la doble mutante es de 4.

Correlación de MICs y k_{cat}/K_M .

Si se comparan los MICs y la k_{cat}/K_M de las diferentes enzimas y se ordenan del 1 al 4 según su mayor o menor eficiencia para cada antibiótico, se obtienen las siguientes matrices que muestran un buen grado de similitud.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

	MICs					k_{cat}/K_M			
	1-2	1-2	3-4	3-4		2	1	4	3
6-apa	1-2	1-2	3-4	3-4	2	1	4	3	
bpen	1-2	1-2	4	3	2	1	3	4	
ampi	1-2	1-2	3-4	3-4	2	1	4	3	
cefalor	3	1	4	2	2	1	4	3	
cefurox	3-4	1-2	3-4	1-2	3	2	4	1	
cefotax	4	3	2	1	4	3	2	1	

Discusión.

El sistema de mutagénesis quedó bien establecido, si bien hace falta un trabajo en que se demuestre cuantitativamente la diversidad que produce. La contaminación con enzima silvestre puede ser eliminada usando un templado con los codones a mutar deletados, de forma que sólo el oligonucleótido mutagénico incluya ese codón.

Para aumentar la eficiencia de ligación podrían intentarse reacciones con mayores concentraciones, por ejemplo: 1 µg de inserto y 1 µg de vector.

Este banco de mutantes fue útil para conocer la frecuencia de aparición de mutantes hacia antibióticos normalmente letales para la beta-lactamasa silvestre. Se encontró que hacia cefotaxima es más fácil el surgimiento de mutantes, en comparación con cefuroxima y aún más que para ceftriaxona. Este tipo de información es de gran utilidad médica ya que permite recomendar el uso de un antibiótico sobre otro.

El alto número de mutantes que conservan la actividad hacia ampicilina nos dice que las regiones mutageniadas permiten muchos cambios conservativos, lo cual era de esperarse ya que el alineamiento de la familia de beta-lactamasas muestra que todas las posiciones mutadas, excepto la N170, son posiciones variables.

Estos resultados también sugieren que las regiones 104-105 y 237-240 son las más importantes en la especificidad y que, especialmente, la región 167, 168 y 170 no parece desempeñar un rol destacado en el surgimiento de mutantes de especificidad. Debe hacerse notar que todas aquellas mutante con una especificidad cambiada, más bien presentaron una ampliación de ella ya que mantienen su capacidad de degradar ampicilina.

El método produjo mutantes con una amplia gama de capacidad hidrolítica hacia cefotaxima, la amplitud de este rango es indirectamente proporcional a la

concentración de antibiótico utilizada para seleccionar. Se obtuvieron algunas mutantes, por lo menos, con la misma especificidad hacia cefotaxima que la más activa de los reportes clínicos.

Se encontró que los MICs fueron capaces de predecir diferencias cualitativas entre las eficiencias catalíticas de las enzimas.

El nivel de expresión de la beta-lactamasa en el pKGS fue bajo. La mutación G238S parece afectar la estabilidad de la enzima.

Las mutaciones E104M y G238S tienen un efecto sinérgico en la hidrólisis de cefotaxima. Ambas mutaciones afectan más la estabilización del estado de transición, más que el reconocimiento del estado basal. La M104 estabiliza el estado de transición de penicilinas y cefalosporinas, mientras que la S238 estabiliza tan sólo el estado de transición de la cefotaxima. Ninguno de estos residuos parece establecer contactos directos con el sustrato. Se ha propuesto que la S238 al estar enterrada en el sitio activo distorsiona la beta-plegada con efectos, difíciles de predecir, que estabilizan el estado de transición de la cefotaxima. El efecto más general de la M104, tampoco se explica por un contacto directo con el sustrato ya que está muy alejado; más bien pudiera afectar la distribución de cargas alrededor del sitio activo evitando la desestabilización del estado de transición que produciría el E104.

Es difícil explicar porque estas mutaciones, que no interactúan entre sí, no siguen la regla de la aditividad, de alguna manera están conjuntándose para acelerar la tasa de acilación o desacilación de la enzima cuando se usa cefotaxima como sustrato.

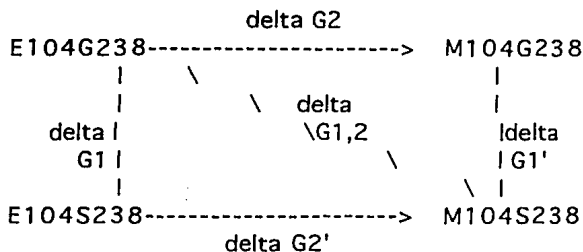
Si bien este trabajo aporta algunos datos más a la caracterización de la interacción de la beta-lactamasa con sus sustratos, estamos convencidos que hacen falta más estudios mecanísticos y estructurales antes de ser capaces de diseñar un inhibidor irreversible para las beta-lactamasas. Habrá que entender qué factores estabilizan el intermediario tetrahédrico e impiden su desacilación, es

decir, cómo el inhibidor puede contrarrestar la maquinaria de desacilación del sitio activo, quizás uniéndose covalentemente a algún grupo de la enzima. Muy probablemente entender que evita la desacilación de los beta-lactámicos en las D-D-peptidasas dé alguna luz a este punto.

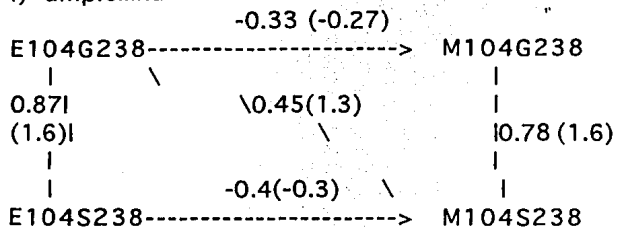
Tan sólo un grupo (Palzkill and Botstein, 1992), ha intentado una mutagénesis generalizada sobre distintas regiones del sitio activo de la β -lactamasa. En este artículo se reportan diversas mutantes que confieren resistencia a cefotaxima y ceftazidima, esto se deduce del limitado aumento en los MICs. Varios factores limitan las posibles conclusiones que se pueden obtener de él, por ejemplo: por el esquema de mutagénesis utilizado las mutaciones en posiciones que contactan el sitio activo se encuentran presentes con mutaciones en otras posiciones, algunas de estas mutantes presentan resistencia aún cuando está deletada toda una región que se ha demostrado esencial para la catálisis (lo cual resulta muy poco factible), además que el banco de mutantes se seleccionó con una concentración tan sólo 20% mayor que el MIC de la enzima silvestre, lo que muy probablemente entra en el nivel de ruido, nosotros seleccionamos con una concentración 4 veces mayor.

Como ya mencionamos en la introducción la selección de residuos a mutagenizar fue basada en los diversos reportes clínicos y en las estructuras tridimensionales a disposición.

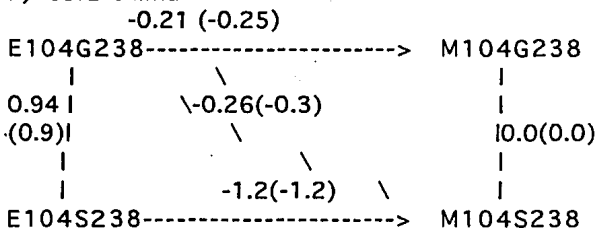
Siguiendo el ejemplo de Carter et al. (1984), decidimos analizar nuestros resultados usando el ciclo de mutantes que se muestra en la siguiente figura.



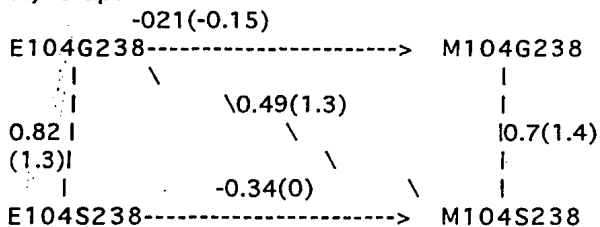
i) ampicilina



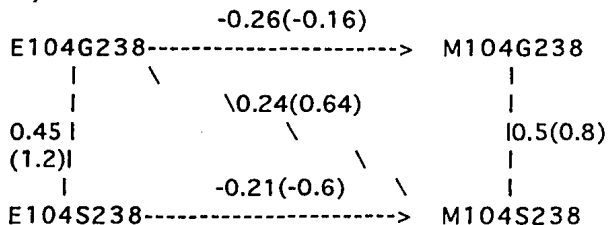
ii) cefuroxima



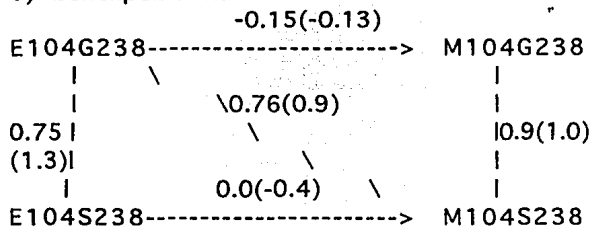
iii) 6-apa



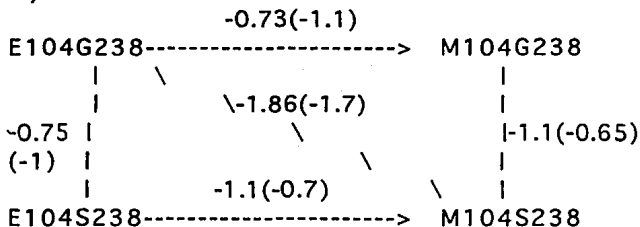
iv) cefaloridina



v) bencilpenicilina



vi) cefotaxima



La cinética de las enzimas puras, con ampicilina como sustrato, sugiere que las mutaciones individuales son independientes. Por lo que tanto, la pérdida en energía de interacción de la doble mutante con el estado de transición es similar a la suma algebraica de las energías de una mutante sencilla. Este efecto se observa usando los valores de k_{cat} o k_{cat}/K_M para el análisis. Es interesante hacer notar que el valor de K_M para la doble mutante proviene principalmente de la mutación G238S. Este resultado quizás sugiera que la segunda alteración E104M no altera sustancialmente la conformación del sitio activo, al menos para la interacción con este sustrato.

Con cefuroxima como sustrato, la capacidad hidrolítica de las mutantes está dada por la modificación E104M. Cuando el cambio G238S es adicionado, en el contexto de la mutante sencilla E104M, no se observa ningún efecto. Inesperadamente, el efecto favorable mostrado por la mutante sencilla E104M en el contexto de la enzima silvestre es aún mayor cuando esta alteración se realiza en el contexto de la G238S. Este tipo de comportamiento se observa cuando k_{cat} o k_{cat}/K_M se usan para el análisis. La ganancia en energía de interacción observada

para la doble mutante contrasta con la disminución del valor esperado de las mutantes sencillas por separado. El análisis de los valores de K_M de las mutantes sencillas y doble con este sustrato revela que la unión de este con el sitio activo es muy similar con la enzima silvestre. Este resultado contrasta con el efecto estructural propuesto para la mutación G238S (Huletsky et al., 1993) y observado en este trabajo con las penicilinas probadas y la cefaloridina. Este hecho y otros, mencionados posteriormente, señalan las dificultades en predecir el efecto de algunas mutaciones al interactuar con diferentes sustratos.

Con otros sustratos, el análisis de las contribuciones individuales de las mutaciones sencillas es más complicado. Con algunos sustratos (6-apa, cefaloridina y bencilpenicilina), se observa un comportamiento relativamente independiente de las mutaciones sencillas. La pérdida en energía de interacción de la doble mutante con el estado de transición se desvía ligeramente del valor esperado para las mutantes independientes. Con 6-apa como sustrato y usando los valores de k_{cat} en el análisis, los resultados sugieren que las mutaciones sencillas son independientes. Con cefaloridina como sustrato y usando los valores de k_{cat}/K_M , el análisis sugiere que las mutantes sencillas son independientes, pero usando los valores de k_{cat} la pérdida en energía de interacción mostrada por la doble mutante se desvía poco de los valores esperados de las mutantes independientes. Con bencilpenicilina como sustrato, los resultados muestran que no hay efecto al añadir la modificación E104M en el contexto G238S. Este resultado puede sugerir severas alteraciones (desde el punto de vista de la bencilpenicilina) del sitio activo en respuesta de la modificación G238S. En contraste con los resultados obtenidos cuando se usan los valores de k_{cat}/K_M , hay una mejora substancial del parámetro k_{cat} cuando el cambio E104M se añade en el contexto de la mutación G238S según se compara con el efecto de la variante sencilla en el contexto de la enzima silvestre. Con todos los sustratos arriba mencionados en los que la independencia de las mutaciones sencillas no es clara, hay variaciones adicionales en los valores de K_M mostrado por las mutaciones sencillas según se compara con la doble mutante. El otro caso mostrado se discute más abajo.

Con cefotaxima como sustrato ninguna mutante sencilla altera

significativamente el valor de K_M cuando se compara con el valor reportado para la enzima silvestre. Sin embargo, existe una mejora en el valor de K_M en la doble mutante. El análisis de las contribuciones individuales usando los valores de k_{cat}/K_M muestran que la ganancia en la energía de interacción de la doble mutantes es un poco más que el valor esperado de las mutantes independientes. Es claro, de la figura vi, que al añadir cualquier mutación en el contexto de las otras produce una mejora idéntica y más favorable mejora en el parámetro k_{cat}/K_M según se compara con el efecto de ambas mutaciones sencillas en el contexto silvestre. Esto parece indicar algún tipo de interdependencia de ambas mutaciones que puede explicar la poca mayor energía de interacción mostrado por la doble mutante.

Nuestros datos sugieren que la mutación sencilla G238S tiene un papel estructural como proponen Huletsky et al. (1993). Para la mayoría de β -lactámicos se ha sugerido una menor K_M y, en algunos casos, un menor valor de V_{max} como resultado de la mutación G238S. Nuestros resultados van acordes con esta idea. Sin embargo, presentamos información significativamente nueva: la G238S no mejora la K_M contra las cefalosporinas de segunda y tercera generación como se muestra por los resultados obtenido con los antibióticos cefuroxima y cefotaxima. Nuestra doble mutante muestra una mejora en la K_M para cefotaxima a pesar que las variantes sencillas no modifican ese parámetro. Con cefuroxima, el parámetro K_M mostrado por la doble mutante es el mismo que el observado por las variantes sencillas. La variante G238S muestra valores de k_{cat} drásticamente reducidos contra todos los sustratos probados exceptuando cefotaxima donde se observa un aumento. Con este último sustrato es claro que la capacidad de la mutante sencilla para hidrolizar se debe a la mejora en los parámetros catalíticos pero la combinación de los resultados de ambas mutantes sencillas también resulta en una mejora del parámetro de pegado. La capacidad de hidrólisis hacia la cefuroxima se debe enteramente a la modificación E104M. En contraste, el cambio G238S daña la enzima silvestre disminuyendo los parámetros de k_{cat} y k_{cat}/K_M hacia este mismo sustrato. La variante sencilla E104M y la doble mutante muestran la misma mejora en la capacidad de hidrolizar cefuroxima.

Los datos obtenidos para las variantes con la mutación E104M son más difíciles

de interpretar en términos estructurales. Soweck et al. (1991), sugieren que la hidrólisis de la ceftazidima en la variante E104K puede explicarse por una interacción entre la nueva carga positiva de la K104 y el carboxilato de la cadena lateral aminotiazol-oxima del sustrato. Sin embargo, debido a que la misma variante muestra una mayor actividad contra sustratos sin grupo carboxilo en la cadena lateral, tales como cefotaxima, los autores proponen la formación de nuevos puentes de hidrógeno favorables entre la cadena lateral de la K104 y el sustrato. Con

nuestra variante, debido a la larga cadena hidrofóbica de la M104, necesitamos basarnos en distintas suposiciones, que las citadas anteriormente, para explicar el aumento en la capacidad hidrolítica de esta mutante con todos los sustratos probados.

En resumen, nuestros resultados sugieren la importancia de diferentes partes del sitio activo en la mejora de la discriminación de los diferentes sustratos incluyendo las cefalosporinas de segunda y tercera generación. Parece que cualquier cambio de un conjunto complejo de interacciones entre los diferentes residuos y el sustrato, probablemente junto con sutiles cambios conformacionales puede resultar en alteraciones en la especificidad. Nuestros resultados se suman a una base de datos que debe resultar de utilidad una vez que se obtengan datos estructurales. Esto, junto con simulaciones detalladas puede ayudar a clarificar la base molecular de la interacción de la β -lactamasa con sus sustratos.

REFERENCIAS.

1. Futuyma, D.Y. *Evolutionary Biology*. Ed. Facultad de Ciencias. 1987. p. 172.
2. Maynard Smith, J. *Nature*, Lond. 225:563, 1970.
3. Edgington, S. *Biotechnology*. 11:285-289, 1993.
4. Knowles. P.N.A.S.
5. Kauffman, S.A., Weinberger, E.D. *J. Theor. Biol.* 141:211-245, 1989.
6. Wetzel, R. *Prot. Eng.* 4:371-374, 1991.
7. Joyce, G.F. *Sc. Am. Dec.* 1992. p. 90-97.
8. Hodgson, J. *Biotech.* 10:1433-1434. 1992.
9. Tuerk, C., Gold, L. *Science*. 249:505-510. 1990.
10. Birnbaum, S., Mosbach, K. *Curr. Op. Biotech.* 3:49-54. 1992.
11. Szostak, J.W. *TIBS*. 17:89-93. 1992.
12. Beaudry, A.A., Joyce, G.F. *Science*. 257:635-641. 1992.
13. Wells, J.A., Lowman, H.B. *Curr. Op. Biotech.* 3:355-362. 1992.
14. Brenner, S., Lerner, R.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:5381-5383. 1992.
15. Scott, J.K., Smith, G.P. *Science*. 249:386-390. 1990.
16. Osuna, J., Flores, H., Soberón, X. 106:7-12. 1991.
17. Merino, E., Osuna, J., Bolívar, F., Soberón, X. *BioTechniques*. 12:508-509. 1992.
18. Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism*. Freeman. 1985.
19. Palmer, T. *Understanding Enzymes*. Halsted. 1985.
20. Kraut, J. *Science*. 242:533-540. 1988.
21. Bone, R., Agard, D.A. *Methods in Enzymology*. 202:643-671. 1991.
22. Wells, J. *Biochemistry*. 29:8509-8517. 1990.

23. Wilson, C., Agard, D. *Curr. Op. Struc. Biol.* 1:617-623. 1991.
24. Hedstrom, L., Graf, L., Stewart, C.B., Rutter, W.J., Phillips, M.A. *Methods in Enzymology.* 202:671-687. 1991.
25. Douglas, K.T. *Curr. Op. Biotech.* 3:370-377. 1992.
26. Wilson, C., Mace, J.E., Agard, D.A. *J. Mol. Biol.* 220:495-506. 1991.
27. Page, M.I. *The Chemistry of Beta-Lactams.* Blackie. 1992.
28. Coutere, F., Lachapelle, J., Levesque, R.C. *Mol. Microbiol.* 6:1693-1705. 1992.
29. Herzberg, O. *J. Mol. Biol.* 217:701-719. 1991.
30. Knox, J.R., Moews, P.C. *J. Mol. Biol.* 220:435-455. 1991.
31. Strynadka, N.C.J., Adachi, H., Jensen, S.E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutoh, K., James, M.N.G. *Nature (Lond.)*. 359:700-705. 1992.
32. Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J.M., Samama, J.P. *Proteins.* 16:364-383. 1993.
33. Oefner, G., D'Arcy, A., Daly, J.J., Gubernator, K., Charnas, R.L., Heinze, I., Hubschwerlen, C., Winkler, F.K. *Nature (Lond.)*. 343:284-288.
34. Kelly, J.A., Knox, J.R., Moews, P.C., Hite, G.J., Bartolone, J.B., Zhao, H., Joris, B., Frère, J.M. *J. Biol. Chem.* 248:181-188. 1985.
35. Fisher, J., Belasco, J.G., Khosla, S., Knowles, J.R. *Biochem.* 19:2895-2901, 1980.
36. Christensen, H., Martin, M.T., Waley, S.G. *Biochem. J.* 266:853-861. 1990.
37. Matagne, A., Messelyn-Bauduin, A.M., Joris, B., Erpicu, M. T., Granier, B., Frère, J.M. *Biochem. J.* 265:131-146. 1990.
38. Phillippon, A., Labia, R., Jacoby, G. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1131-1136. 1989.
39. Palzkill, T., Botstein, D. *Proteins.* 14:29-44. 1992.
40. Lee, K.Y., Hopkins, J.D., O'Brien, T.F., Syvanan, M. *Proteins.* 11:45-51. 1991.
41. Soweck, J.A., Singer, S.B., Ohringer, S., Malley, M.F., Dougherty, T.J., Gougoutas, J.Z., Bush, K. *Biochem.* 30:3179-3188. 1991.

42. Huletsky, A., Knox, J.R., Levesque, R.C. J. Biol. Chem. 268:3690-3697. 1993.