

03072

5  
28  
5

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

FALLA DE ORIGEN

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y  
DE POSGRADO DEL CCH

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ESTUDIO DE REGIONES CONSERVADAS DE LA  
BETA-LACTAMASA CLASE A DE *E. coli*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA  
PRESENTA  
ERNESTO COTA SEGURA

CUERNAVACA, MOR. 1995



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.

**Esta tesis fue realizada en el Laboratorio del Dr. Xavier Soberón Mainero, del  
Instituto de Biotecnología de la UNAM**

# Indice

<b>Introducción</b>	<b>2</b>
Evolución molecular y residuos conservados en proteínas	2
Beta-lactamasas: base de datos de secuencia y estructura	6
Aminoácidos invariantes en beta-lactamasas de clase A	11
Contexto de secuencia y estructura del ácido glutámico 37 de la beta-lactamasa clase A	14
Algunos aspectos metodológicos de la ingeniería de proteínas	19
<b>Objetivos</b>	<b>25</b>
<b>Estrategia experimental</b>	<b>25</b>
Alineamiento de secuencias y árbol filogenético	26
Construcción de mutantes	26
Medición de concentraciones mínimas inhibitorias	31
Inducción de beta-lactamasa recombinante en la cepa <i>E. coli</i> BL21/pLysS y purificación en columnas de afinidad a níquel	31
Caracterización cinética de mutantes	32
Producción de anticuerpos de conejo anti-beta-lactamasa	32
Detección de la expresión de mutantes por inmunoblots (westerns)	33
<b>Resultados</b>	<b>35</b>
<b>Discusión y Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>Referencias</b>	<b>47</b>

# Introducción

## Evolución molecular y residuos conservados en proteínas

Existen evidencias para suponer que las nuevas proteínas han surgido a partir de eventos como la duplicación génica y el intercambio de dominios. Con el paso del tiempo, las proteínas que aparecen de estos eventos divergen a nivel de estructura primaria pero preservan en mayor o menor grado la similitud con la proteína ancestral. En distintos casos se ejemplifica como la estructura terciaria de una proteína se conserva más fielmente que la estructura primaria. En aquellos casos en los que se ha perdido la identidad de secuencia entre dos proteínas, la similitud puede detectarse al comparar la estructura tridimensional de ambas, ya sea que provengan de eventos de divergencia o convergencia. Por ejemplo, en la superfamilia de las enzimas reconocedoras de penicilina (beta-lactamasas, DD-peptidasas, etc.) existen miembros entre los que no hay similitud detectable en secuencia, sin embargo los elementos de estructura secundaria de estas enzimas tienen una disposición general muy semejante (ver más adelante). Esto indica que existe un código degenerado de plegamiento (Creighton, 1993) en el que se presentan formas alternativas de empacar cadenas laterales diferentes en una misma conformación general.

Frecuentemente, las proteínas homólogas descritas conservan la misma función, pero se han encontrado variantes de genes ancestrales que han evolucionado a funciones novedosas. Un ejemplo lo constituyen la racemasa del mandelato y la enzima lactonizante del muconato (Neidhart, et al. 1990). Estas enzimas son necesarias para el catabolismo de ácidos aromáticos en *Pseudomonas putida* y no presentan actividades cruzadas. A nivel de secuencia son 26% idénticas y comparten una gran similitud a nivel de estructura secundaria y terciaria. Este es el primer caso de enzimas que catalizan reacciones mecanísticamente distintas (a diferencia de reacciones idénticas en distintos sustratos) pero con suficiente parecido para suponer que provienen de un ancestro común.

Dada la naturaleza del código genético, las sustituciones más frecuentes en proteínas son de tipo conservativo (químicamente equivalentes), aquellas en las que se mantienen cadenas laterales de la misma carga o volumen: arginina por lisina, ácido aspártico por ácido glutámico, fenilalanina por tirosina, etc. La mayoría de los cambios que se presentan a nivel evolutivo son de naturaleza neutral (funcionalmente equivalentes). La selección natural actúa principalmente para remover mutantes inactivas o incapaces de mantener la adaptación del organismo a su medio. También es importante mencionar que la neutralidad de cada sustitución depende del contexto en el que se encuentre cada residuo. En mucho menor proporción se seleccionan variantes con funciones mejoradas. En general, los residuos con importancia funcional, como los que se presentan en los sitios activos, son los que se conservan más fuertemente. En distintos modelos se ha establecido que aquellas posiciones con requerimientos rígidos por cierta cadena lateral son las que contribuyen de manera más crítica a la estructura y a la función de una proteína, por lo que se consideran posiciones con un alto "contenido informativo" (Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Bowie, et al, 1990, Shortle y Lin, 1985). Las regiones más propensas a cambios están formadas por residuos no relacionados directamente a una función y que están presentes en la superficie de las proteínas. Por el contrario, los núcleos hidrofóbicos (interior de la proteína) presentan un número menor de cambios, presumiblemente porque alteran interacciones de empacamiento que son críticas para la estabilidad conformacional de la molécula. En el caso de la hemoglobina, Kimura y Ohta (1973), han demostrado que la tasa de sustitución de aminoácidos es aproximadamente 10 veces mayor en los residuos expuestos que la de residuos que contactan con el grupo hemo.

A nivel evolutivo, la medida que describe el grado de conservación en proteínas es la tasa aceptada de sustitución de aminoácidos ( $\lambda$ ). Se mide comúnmente por el número de sustituciones (mutaciones fijadas en una secuencia) por aminoácido por año y muestra valores muy distintos al comparar diferentes proteínas (Nei, 1987). La explicación más convincente es que el requerimiento funcional de cada una determina la velocidad de cambio. Por ejemplo, los fibrinopéptidos, que varían a una tasa de 9.0 (9.0 residuos por cada  $10^9$  años, Fig. 1), no parecen tener

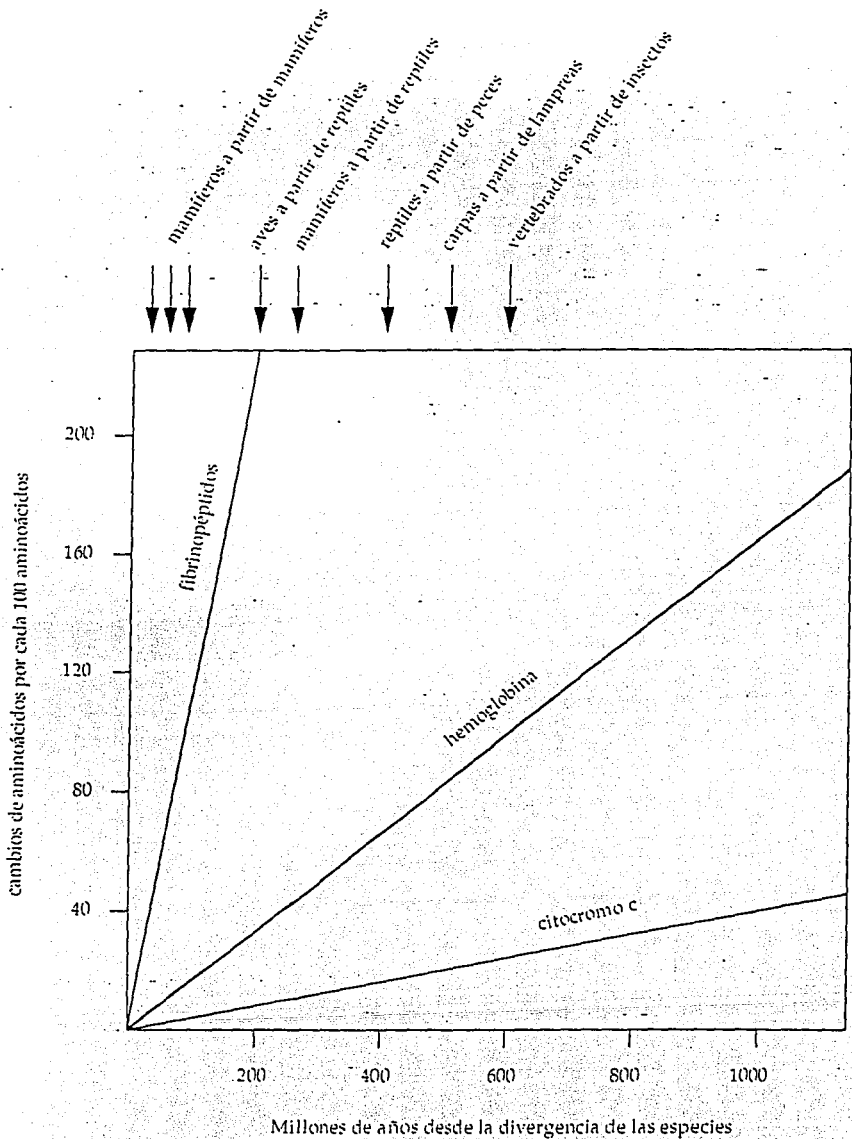


Fig. 1. Comparación de las tasas de cambio de aminoácidos encontradas en la hemoglobina y el citocromo c con la tasa encontrada en los fibrinopéptidos. Las dos primeras han cambiado mucho más lentamente durante la evolución que los fibrinopéptidos. Al determinar las tasas de cambio por año es importante notar que dos organismos que divergieron de un ancestro común hace 100 millones de años, están separados por 200 millones de años en términos evolutivos (tomado de Alberts, et al. 1989).

función particular luego de ser cortados del fibrinógeno para producir fibrina en los coágulos sanguíneos. En esa parte de la proteína, cualquier residuo puede sustituir a otro; casi todas las mutaciones en esa región son neutrales o virtualmente neutrales. Por otro lado, regiones sin función aparente en la ribonucleasa muestran tasas de cambio similares a la de los fibrinopéptidos. En contraste, el citocromo c ( $\lambda = 0.45$ ) parece requerir de un arreglo rígido de aminoácidos para funcionar normalmente. La colocación del grupo hemo y la interacción con otros citocromos hace que solo un número limitado de posiciones sean capaces de aceptar cambios libremente. Las histonas muestran la tasa de cambio más baja que se conoce: H2A, H2B, H3 y H4,  $\lambda = 0.05, 0.09, 0.014$  y  $0.010$ , respectivamente. Esta conservación se explica por la importancia que tienen estas moléculas en la unión y el empacamiento del DNA.

Como prueba experimental para comprobar que residuos conservados son funcionalmente más importantes que los no conservados, Poteete et al. (1992) describen un estudio sistemático de mutantes a lo largo del gen de la lisozima del fago T4. Identifican las posiciones conservadas y no conservadas al alinear dicha secuencia con otras 4 lisozimas virales y analizan el efecto de los cambios en las distintas posiciones. El criterio de funcionalidad de las mutantes es la formación de placas bacterianas de lisis. De 163 posiciones mutadas, solo 74 (45%) son sensibles al menos a una sustitución. Sin embargo, todas las 14 posiciones conservadas son sensibles a las sustituciones.

En un estudio similar, Palzkill y Botstein (1992) mutagenizan regiones contiguas de 3 a 6 codones en el gen de la beta-lactamasa RTEM de *E. coli*. Con este esquema es posible sustituir un residuo determinado por cualquiera de los 19 aminoácidos restantes. En total, analizan el contenido informativo de 66 codones y encuentran que la enzima es extremadamente tolerante a cambios. Según estos autores, 44% de las mutantes funcionan y el 20% de ellas se expresan, se secretan y se pliegan correctamente a niveles similares a los de la enzima silvestre. Sin embargo, encuentran zonas de la proteína donde solo unas cuantas secuencias al



azar son funcionales. Al ubicar estas mutaciones en la estructura de la enzima, observan que las regiones más sensibles a cambios son en la vecindad del sitio activo y aquellas enterradas en agregaciones hidrofóbicas en el interior de la proteína.

Partiendo de análisis como los arriba mencionados, es posible identificar regiones de proteínas relacionadas directamente a una función, principalmente en modelos en los que no se tienen datos de tipo estructural. En el caso de proteínas en las que se ha acumulado información de distintos tipos, se facilita conocer a detalle las interacciones que determinan ciertas funciones (catálisis, estabilidad, plegamiento, etc.) y predecir el efecto de mutaciones. En este sentido, las beta-lactamasas son un excelente modelo de estudio tanto por las ventajas metodológicas que presentan como por los distintos tipos de información que se ha generado de ellas. A continuación se describen algunas de estas características (ver también Herzberg y Moulton, 1991).

### **Beta-lactamasas: base de datos de secuencia y estructura**

Las beta-lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo beta-lactámico de penicilinas, cefalosporinas y otros compuestos relacionados. El uso intensivo de estos antibióticos ha propiciado la aparición constante de cepas resistentes en aislados clínicos. Para enfrentar este problema, se ha producido una gran variedad de beta-lactámicos semisintéticos a partir de la modificación del núcleo básico de penicilinas y cefalosporinas.

A partir de su homología de secuencia, se ha clasificado a estas enzimas en cuatro clases distintas: A, B, C y D (Ambler, 1980, Joris et al., 1988). Las clases A, C y D están relacionadas evolutivamente y contienen la firma Ser-x-x-Lys, en donde la serina es uno de los principales residuos involucrados en la catálisis (ver más adelante). Las de clase B requieren de  $Zn^{2+}$  para ser activas y no son homólogas a las tres clases restantes. Distintos estudios indican que las serin-beta-lactamasas se

derivan evolutivamente de enzimas sintetizadoras de pared celular ('penicillin-binding-proteins' o PBP's). Aunque la similitud de secuencia es muy pobre entre ambos grupos, la disposición general de los elementos de estructura secundaria de las clases A y C es muy similar a los de la carboxipeptidasa R61, de *Bacillus licheniformis* (Kelly, et al. 1986, Samraoui, et al. 1986, ver Fig. 2). Joris et al. agrupan a estos dos grupos en una superfamilia de "enzimas reconocedoras de penicilina". La clasificación se basa en la identificación de 7 'cajas' de residuos homólogos. Mecanísticamente, tanto PBP's como beta-lactamasas catalizan la reacción de apertura del anillo beta-lactámico que involucra la formación de un intermediario acil-enzima (Fig. 3). Sin embargo, solo estas últimas son capaces de desacilarse eficientemente. La larga vida del complejo acil-enzima en las PBP's conduce a su inactivación y explica el efecto antimicrobiano de estos sustratos (Lee, 1971, Kozarich y Strominger, 1978.).

La clase A es la más numerosa y la más estudiada. Se muestra la topología general de una de ellas (la de *S. aureus* PC1, Fig. 4). Se han identificado más de 25 genes de esta clase, tanto en bacterias gram negativas como en gram positivas. Pueden estar unidas a membrana, solubles en periplasma o en forma extracelular. Dada la localización de las enzimas constructoras de la pared celular, solamente la beta-lactamasa en forma periplásmica es capaz de dar resistencia a estos antibióticos. La enzima silvestre puede ser activa en citoplasma, pero con esta ubicación no confiere resistencia contra estos sustratos. Se han resuelto tres estructuras cristalográficas de esta clase: las beta-lactamasas de *Staphylococcus aureus* PC1 (Herzberg, 1991), *Bacillus licheniformis* 749/C (Knox y Moews, 1991) y más recientemente la RTEM-1 de *E. coli* (Jelsch et al., 1993). Adicionalmente se ha resuelto la estructura de la beta-lactamasa de clase C de *Citrobacter freundii* (Oefner, et al. 1990) y la DD-peptidasa R61 de *Bacillus licheniformis* (Kelly, et al. 1986).

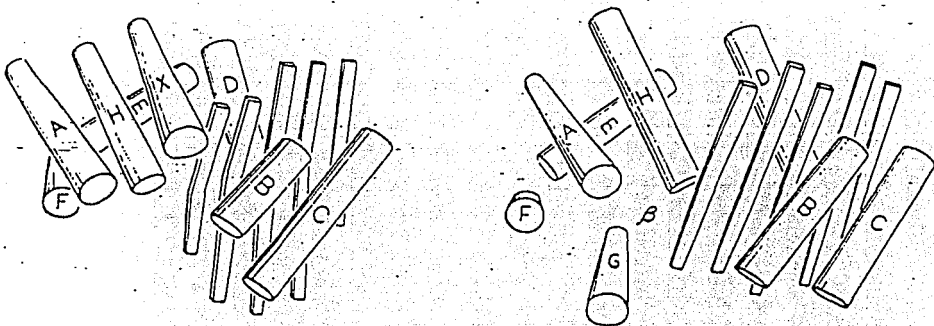


Fig. 2. Comparación de los elementos de estructura secundaria en la beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis* 749/c (izquierda) y la DD-peptidasa de *Streptomyces* R61 (derecha). Los cilindros representan  $\alpha$ -hélices y las bandas  $\beta$ -plegadas (Kelly, et al. 1986):

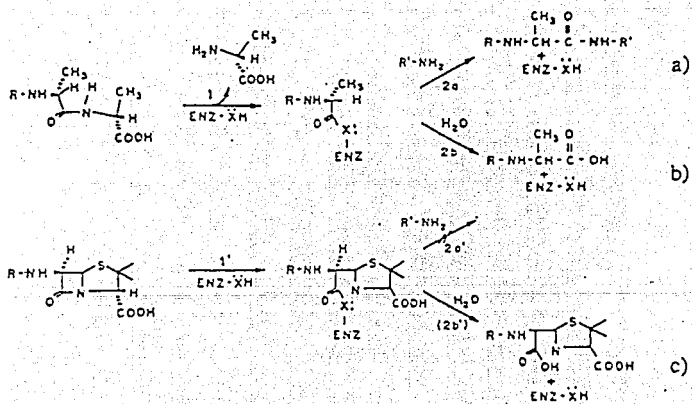


Fig. 3. Reacciones catalizadas por las a) transpeptidasas, b) carboxipeptidasas y c) beta-lactamasas (tomado de Waxman y Strominger, 1983).

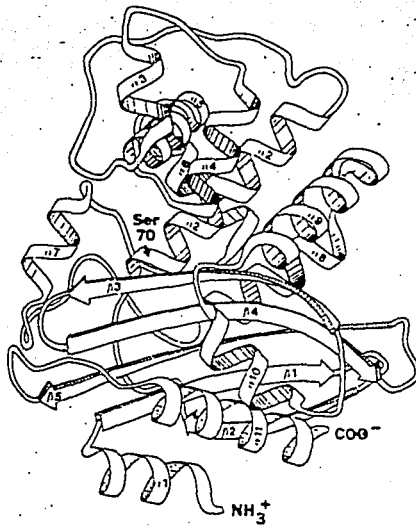


Fig. 4. Plegamiento general de la beta-lactamasa de *S. aureus* PC1 en el que se remarcan los elementos de estructura secundaria. Los cilindros representan  $\alpha$ -hélices y las bandas representan  $\beta$ -plegadas.

Ambler et al. (1991) han propuesto un esquema de numeración que es útil para comparar residuos homólogos de esta clase. El esquema se basa tanto en el alineamiento de secuencias como en la información obtenida de las estructuras cristalográficas resueltas.

El mecanismo catalítico propuesto para estas enzimas consta de dos pasos: la estabilización del sustrato en forma de intermediario activado (formación del complejo acil-enzima, Fisher et al. 1980) y la hidrólisis de este complejo. En el primer paso, un átomo de carbono de la beta-lactama (el del carbonilo que es parte del enlace amídico) adopta una geometría tetrahédrica que caracteriza al intermediario inestable. Esta configuración es consecuencia del ataque nucleofílico de la serina catalítica. Al igual que en las reacciones catalizadas por las serin-proteasas, se postula que este carbono es estabilizado por el "hoyo del oxianión" (Herzberg, 1990), que es la región dada por dos grupos amino adyacentes que forman puentes de hidrógeno con el oxígeno del enlace amídico. En seguida el carbono carbonílico pierde su enlace con el nitrógeno adyacente y éste se protona. Con este enlace covalente y la transferencia del protón recién liberado se completa la formación del complejo. La desacilación o hidrólisis del complejo se da con la entrada de una molécula de agua que sustituye al oxígeno de la serina como aceptor del grupo acilo.

Los modelos de unión y catálisis se sustentan con datos cinéticos de la enzima silvestre y mutantes ensayadas con distintos sustratos. Se han aislado intermediarios de reacción, se ha resuelto la estructura de algunas mutantes afectadas en la catálisis de los complejos enzima-sustrato y enzima-inhibidor. Con esta información ha sido posible caracterizar las interacciones necesarias para la función en la enzima silvestre y nuevas "interacciones funcionales dependientes del sustrato" en distintas mutantes (Viadiú, et al. 1994, Palzkill y Botstein, 1992). En la ingeniería de proteínas es deseable la utilización de modelos de este tipo en los que se cuenta con información de distintos tipos: esta información facilita la comprensión de las características necesarias para la generación de mutantes con nuevas especificidades a sustratos. Diferentes esquemas de mutagénesis han sido

utilizados para este fin (ver aspectos metodológicos en la ingeniería de proteínas, más adelante).

Los genes que codifican para algunas beta-lactamasas han sido ampliamente usados como marcadores de selección en vectores de clonación molecular, ya que pueden usarse como único determinante de resistencia a penicilinas. Una de las beta-lactamasas mejor caracterizadas es la RTEM-1, codificada por el gen *bla* presente en el plásmido pBR322 y sus derivados. En estos plásmidos, la beta-lactamasa se expresa de manera constitutiva bajo los promotores P1 y P3. Se sintetiza en citoplasma en forma de precursor (286aa.) y se procesa en periplasma para dar lugar a la enzima madura. Este procesamiento consta de la liberación de los primeros 23 aminoácidos del extremo amino terminal, o péptido líder. La función del péptido líder es retardar su plegamiento en citoplasma y así facilitar su interacción con proteínas chaperonas (GroEL/ES principalmente) y con el aparato de translocación bacteriano para ser secretada al espacio periplásmico, donde lleva a cabo su función.

### **Aminoácidos invariantes en beta-lactamasas de clase A**

Aproximadamente el 8% de los residuos de las 25 beta-lactamasas clase A de secuencia conocida al inicio de este trabajo son invariantes. A continuación se proponen las razones por las que se conserva cada uno de ellos:

Residuo	Localización	Función
Glu37	1era $\alpha$ -hélice del dominio de la $\beta$ -plegada	Estabilización de la $\beta$ -plegada adyacente.
Gly45	1era hebra $\beta$ de la hoja $\beta$ principal	Requerida para empacamiento. Residuos de cadenas laterales con carbonos $\beta$ chocarían con el CO de Asn61.

Phe66	En el entrecruzamiento del dominio $\beta$ al dominio $\alpha$ .	Requerida para empacamiento. Mismo ambiente que Gly45.
Ser70	Sitio activo	Involucrada en catálisis.
Lys73	Sitio activo	Involucrada en catálisis.
Leu81	En una hélice enterrada del dominio $\alpha$	Requerida para empacamiento. Debe ser reemplazable si la mutación esta acoplada a otras mutaciones compensatorias.
Pro107	N terminal de la $\alpha$ -hélice 3	Estabilización del inicio de una $\alpha$ -hélice
Ser130	Sitio activo	La estructura sugiere relación con la catálisis.
Asp131	Cerca del sitio activo	Carga enterrada que interactúa con 4 nitrógenos de cadena principal, 2 del N terminal de una $\alpha$ -hélice y 2 de una $\alpha$ -hélice 3 <sub>10</sub> , asegurando el posicionamiento de Ser130.
Ala134	$\alpha$ -hélice en el dominio $\alpha$	Requerida para empacamiento. Contacta con el CO de Leu122 y las cadenas laterales de Ala125 y Leu 109. Puede ser reemplazable por un residuo de glicina.
Asn136	Cerca del sitio activo	La cadena lateral interactúa con el Glu 166 catalítico que esta involucrado en un enlace de cis-prolina.
Gly144	En la vuelta del C terminal de una hélice en el dominio $\alpha$	Requerida para plegamiento. Sus ángulos dihedrales $\phi$ y $\psi$ tienen 100° y 161°, respectivamente, una región no común para residuos con carbonos $\beta$ .

Asp157	Vuelta Asx que lleva al con asa $\Omega$ del sitio activo	Expuesta al solvente y no interactúa otras cargas. Puede ser reemplazable al menos por Asn, Ser y Thr.
Arg164	En el asa $\Omega$	Forma puente salino con el Asp179 enterrado para estabilizar al asa $\Omega$ .
Glu166	Sitio activo	La estructura sugiere relación con la catálisis.
Leu169	En el asa $\Omega$ , cerca del sitio activo	Requerida para empacamiento. Puede ser reemplazable.
Asp179	Fin del asa $\Omega$	Como Arg 164.
Thr180	Cerca del asa $\Omega$	Sin requerimientos especiales. Puede ser reemplazable.
Leu199	En el asa que separa a las $\alpha$ -hélices 8 y 9.	Igual que Leu81
Asp233	En el borde de una $\beta$ -plegada cerca del sitio activo	Carboxilato enterrado que interactúa con una molécula enterrada de solvente y un segundo carboxilato. Este arreglo inusual en la vecindad del sitio activo sugiere que este residuo es esencial para la integridad de la estructura.
Gly236	Sitio activo	Requerida para empacamiento. Cerca de la Ser70. Un residuo con carbono $\beta$ chocaría con el residuo de serina.



## Contexto de secuencia y estructura del ácido glutámico 37 de la beta-lactamasa clase A

Como se observa en el inciso anterior, los aminoácidos invariantes pueden asociarse, en la mayoría de los casos, a una función particular. Muchos de ellos rodean la cavidad del sitio catalítico o se encuentran en posiciones que son estructuralmente importantes para la integridad de la molécula (Fig. 5). El ácido glutámico en la posición 37 (E37) se localiza en la primera  $\alpha$ -hélice de la enzima (H1), esta semiexpuesto al solvente y alejado del sitio catalítico. Mutantes en las que se deleta esta  $\alpha$ -hélice se mantienen estables y con la capacidad de ser secretadas pero pierden la actividad enzimática (Pluckthün y Knowles 1987).

Según Knox y Moews (1991), el E37 forma parte de una serie de interacciones importantes que favorecen el posicionamiento de la H2, la  $\alpha$ -hélice en la que se localiza la serina catalítica, S70. La importancia de esta  $\alpha$ -hélice se refleja en el arreglo de los elementos estructurales que están a su alrededor. A pesar de poseer aminoácidos polares o cargados, es prácticamente inaccesible al solvente, por estar rodeada uniformemente de otras 5  $\alpha$ -hélices (Fig. 6). Esta cubierta sirve para aislar el macrodipolo de la hélice, lo que resulta en un pK disminuido para la serina catalítica y que favorece a la catálisis. En su extremo amino terminal, la H2 se conecta a un segmento extendido (residuos 64 a 69) que corre detrás de la hoja beta. Este segmento está formado por dos vueltas de la cadena (como se observa en la Fig. 7), una de las cuales se estabiliza por contactos en la región donde se localiza el E37. Un aspecto notable en la conformación de esa zona es que una de las hebras beta (B2, residuos 56-60) se acorta al formar el par de vueltas que conducen a la H2 (ver Fig. 8). De esta manera, los contactos que se requieren para la estabilización de la beta plegada contigua (en los residuos 43 y 44) tienen que ser donados por residuos que están fuera de la hoja beta. El grupo carboxilo del E37 forma un puente de hidrógeno con la cadena principal de la V44 y la R43 (en la RTEM-1 de *E. coli*) forma un puente salino con el E64. Adicionalmente, el E37 forma un puente salino con la R61 (Fig. 7). En las otras dos estructuras resueltas de esta clase, el E37 mantiene una conformación y patrón de contactos similares a

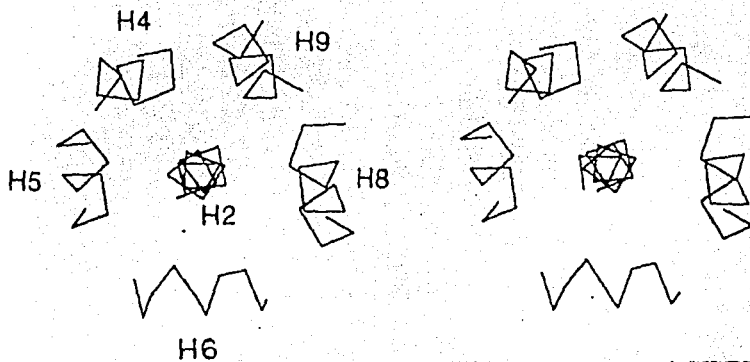


Fig. 6. Par estereoscópico de las 5  $\alpha$ -hélices que rodean a la hélice H2. El extremo amino terminal de la H2 está cerca de la  $\beta$ -plegada y su carboxilo terminal está dentro de una agregación hidrofóbica con 4 residuos de leucina invariantes (tomado de Knox y Moews, 1991).

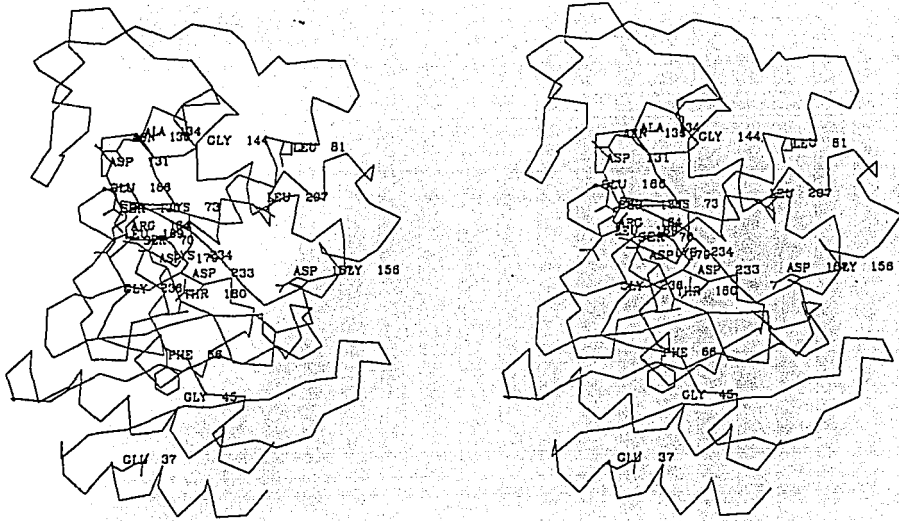


Fig. 5. Par estereoscópico de la estructura de la beta-lactamasa RTEM de *E. coli*. (carbonos  $\alpha$ ). Se muestran las cadenas laterales de los residuos invariantes en las secuencias conocidas al inicio de este trabajo.

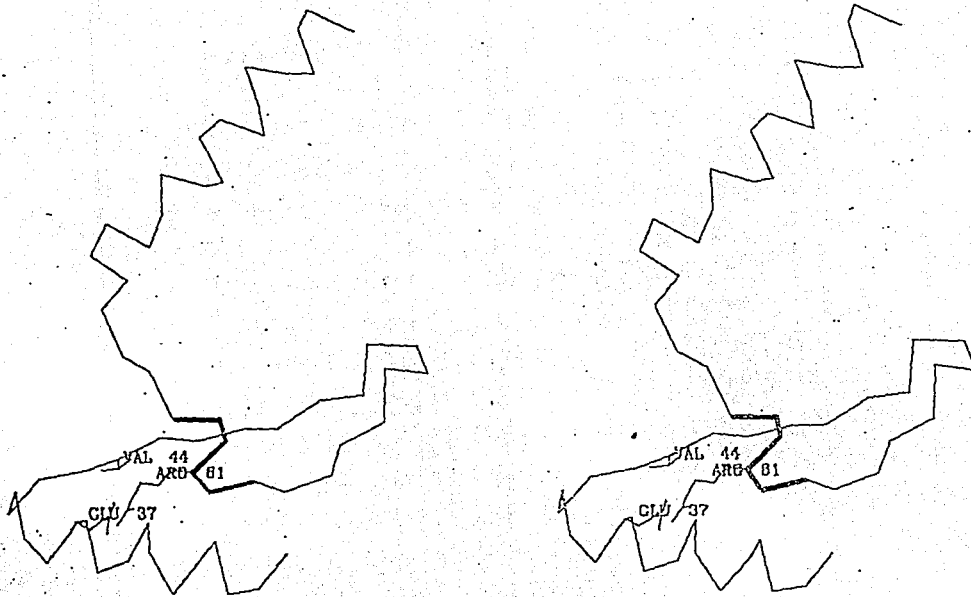


Fig. 7. Par estereoscópico de amino terminal de la V31 al final de la hélice H2 pasando por la doble vuelta (línea gruesa) en los aminoácidos 59 al 64. Se forman tres puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos 37 y 61 y la cadena principal de la V44.

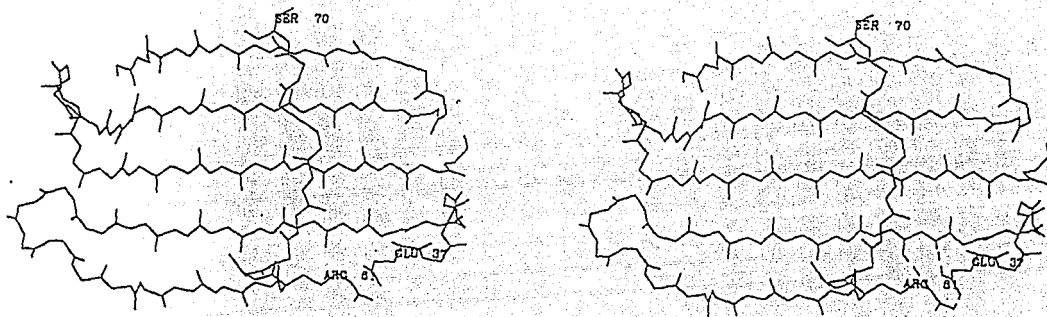


Fig. 8. Par estereoscópico de la cadena principal de la  $\beta$ -plegada. Se muestra también el segmento polipeptídico que cruza la  $\beta$ -plegada en dirección perpendicular y que conduce a la S70 (catalítica). Los puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos E37 y R61 y los átomos de la  $\beta$ -plegada vecina se muestran en líneas cortadas.

los mencionados, a pesar de que las posiciones 44 y 61 no son conservadas. En la estructura de *B. licheniformis*, el E37 forma un puente de hidrógeno con la cadena principal de la L44 y un puente salino con la cadena lateral de la R61. En la beta-lactamasa de *S. aureus* forma dos puentes de hidrógeno con la I44 y la N61.

En este estudio, se busca conocer las limitaciones funcionales que hacen que un residuo alejado del sitio activo y expuesto al solvente, el ácido glutámico 37 (según la numeración de Ambler et al.), se conserve en las secuencias reportadas de beta-lactamasas de clase A. Para esto, se describe el aislamiento y caracterización de distintas mutantes en esta posición. A partir de los datos obtenidos se proponen hipótesis que explican las funciones a las que está asociado.

### **Algunos aspectos metodológicos de la ingeniería de proteínas**

La ingeniería de proteínas es un conjunto de métodos teóricos y experimentales utilizados para rediseñar polipéptidos. El objetivo de esta disciplina es obtener funciones novedosas o mejoradas a partir de la modificación de proteínas aisladas de algún organismo o de genes sintéticos. Para este objetivo es necesario contar con datos estructurales de la proteína que se quiere modificar. La mejor información proviene de la estructura resuelta por medios cristalográficos. Con ésta es posible ubicar las interacciones que determinan una cierta función y así identificar a los residuos que al mutarse pueden rendir moléculas con nuevas propiedades.

En la literatura se encuentran distintos ejemplos de generación de nuevas propiedades a partir de una base racional. Sin embargo, muchas de las mutantes obtenidas por estos métodos afectan de manera inesperada a funciones no contempladas. Esto se debe a que la información que se tiene actualmente sobre las reglas de estabilidad y plegamiento de proteínas, la energética de unión de sustratos y la eficiencia catalítica, es todavía insuficiente. Los métodos computacionales son útiles para el análisis estructural y el modelamiento de nuevas estructuras a partir de modelos conocidos, entre otros. Su objetivo a largo plazo

es la creación de algoritmos para la predicción de estructuras tridimensionales a partir de la información de secuencia. Con el uso de métodos de ingeniería y diseño de proteínas, el conocimiento básico para responder estas interrogantes esta aumentando rápidamente. Por otro lado, la base metodológica más importante ha surgido de las técnicas de biología molecular para la construcción, expresión y purificación de polipéptidos mutantes. Se describen a continuación aquellas que tienen relevancia para el presente trabajo:

**Mutagénesis dirigida.** La mutagénesis dirigida por oligonucleótidos es una de las técnicas más usadas para la modificación de genes en estudios en ingeniería de proteínas. En la literatura existe una infinidad de metodologías de mutagénesis dirigida para la generación de deleciones, inserciones, mutagénesis a saturación, sustitución de uno o más codones, modificación de regiones regulatorias de un gen para adaptar su expresión a una necesidad específica, etc. Entre las metodologías existentes, la mutagénesis por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, ver Fig. 9a) es la más ventajosa, dado que puede obtenerse DNA mutante en cantidades prácticamente ilimitadas. Esto facilita la ejecución de ensayos previos a la clonación, como la caracterización por medio de secuencia o por patrones de restricción cuando se generan nuevos sitios. También se facilita la clonación misma, porque al tener este DNA en grandes cantidades se evita la pérdida en pasos preparativos. Una de las técnicas más eficientes de mutagénesis por PCR es la descrita por Nelson y Long (1989). Su principal virtud es la amplificación selectiva del DNA mutante, con lo que disminuye la proporción del DNA silvestre usado como molde en la PCR. De esta manera, al crear grandes bancos de mutantes, se enriquece la variabilidad al disminuir la proporción del genotipo silvestre. En la Fig. 9b se describen los detalles de este método.

**Mutagénesis por PCR sexual (DNA shuffling).** Este es un método para la recombinación homóloga *in vitro* a partir de la fragmentación azarosa de un gen de DNA y su 're-ensamblamiento' por PCR (Stemmer, 1994 y 1994a). En cuanto a su capacidad como técnica de mutagénesis, tiene varias ventajas en comparación a otras descritas: a) no esta limitada a un cierto 'espacio de secuencia', como en el

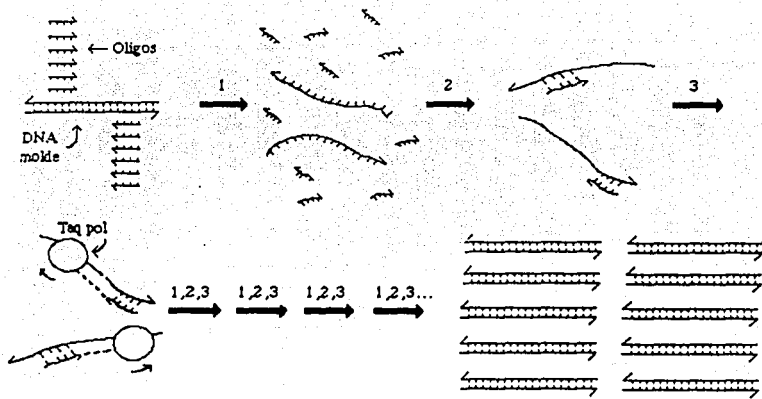


Fig. 9a. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que consiste en la amplificación selectiva de un segmento de DNA de extremos conocidos. Consta de tres pasos: 1) desnaturalización del DNA molde a altas temperaturas en presencia de oligonucleótidos específicos, 2) reasociación de los oligos con la región complementaria del molde. Al estar los oligos en exceso molar en comparación al DNA blanco, compiten contra la reasociación de éste y se posicionan para ser usados como primeros. 3) formación de la cadena complementaria al polimerizar con ayuda de una DNA polimerasa termoestable. Al repetir varias veces este ciclo se logra la amplificación exponencial de un segmento de DNA.



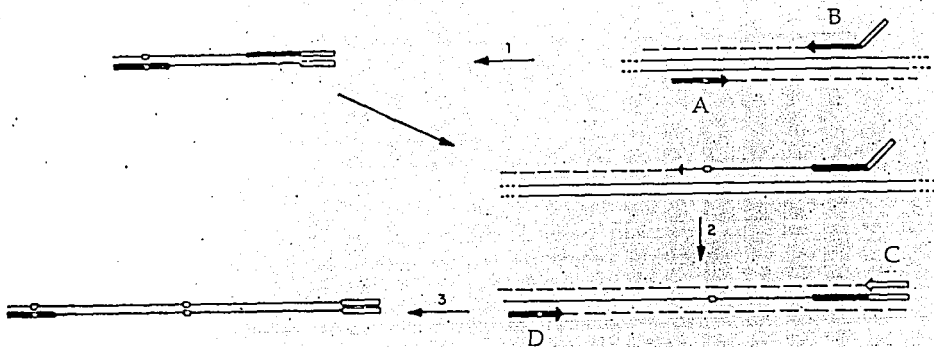


Fig. 9b. Esquema del método de mutagénesis descrito por Nelson y Long (1989). 1) se amplifica un fragmento del gen con un oligo mutagénico A y un oligo combinado B. Este último se compone de un segmento no complementario al DNA molde (región blanca) y un segmento que hibrida con el extremo 3' del gen por amplificar (región negra). Uno de los productos de la amplificación anterior es utilizado como primero para extender el fragmento mutante hasta completar el gen. 3) con ayuda del producto anterior el oligo C 'tapón' (idéntico a la región blanca de B) y el oligo D amplifican selectivamente la región que flanquean. Este último paso asegura que los fragmentos amplificados sean todos mutantes. Las líneas discontinuas representan cadenas recién producidas por la DNA pol. En esta figura solo se presentan las cadenas relevantes producidas durante la reacción.

caso de la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos y b) es capaz de reconstruir fragmentos mayores a 1Kb, lo cual no ha sido posible con otros métodos de mutagénesis localizada, como la PCR 'propensa a error' (error-prone PCR). Solo con la PCR sexual es posible la eliminación de mutaciones indeseables con el 'entrecruzamiento' (backcrossing) de DNAs mutantes con DNA silvestre. La principal aplicación de este método es la recombinación de genes relacionados, como anticuerpos o genes homólogos de distintas especies para la obtención de nuevas funciones. La diversidad que se presenta en tales mezclas puede ser mucho más significativa que la generada por mutaciones azarosas.

**Selección de mutantes.** Al mutagenizar un gen se debe contar con un método para seleccionar las variantes esperadas. Sin embargo, no existen métodos de selección que puedan ser usados de manera sistemática en distintos genes. Estos dependen de cada gen y de la nueva propiedad que se desea obtener. En los casos en que se construyen mutantes únicas (p. ej. para analizar la importancia de posiciones definidas en la secuencia) una estrategia apropiada es la creación de sitios únicos de restricción adyacentes a la mutante deseada. Así, la mutante puede verificarse aún antes de expresar el producto polipeptídico. Para la creación de nuevas propiedades en una proteína (p. ej. mutantes con distintas especificidades a sustratos, de estabilidad aumentada, etc.) se requiere normalmente de bancos de mutantes en una o más posiciones. Una vez introducido el DNA mutante en un sistema de expresión adecuado (vector de expresión-célula huésped), puede diseñarse un medio selectivo en el que solo crezcan aquellas variantes con la función deseada. En los casos en los que no se cuenta con métodos directos de selección es necesario ensayar cada una de las mutantes obtenidas para encontrar la función deseada.

**Purificación de proteínas.** La purificación a homogeneidad de las proteínas mutantes es un requisito para la caracterización fina de nuevas actividades. Los métodos convencionales de purificación se basan en las propiedades fisicoquímicas de cada proteína (peso molecular, punto isoeléctrico, unión de sustratos, etc.). Desafortunadamente, la modificación de uno o más residuos de amino-

ácidos a menudo altera las condiciones de purificación usadas para la proteína silvestre. Por otro lado, se requiere normalmente de más de un paso de purificación antes de obtener la proteína en forma pura. Se han descrito distintas metodologías para evitar estos problemas. La más notable y de mayor uso en la actualidad es la cromatografía de afinidad del metal-quelante inmovilizado (IMAC). Como su nombre lo indica, las proteínas purificadas por este método se unen a un soporte sólido de Sepharosa derivatizado con un complejo formado por un quelante y un átomo metálico. Se sabe de la capacidad de ciertos aminoácidos (ácido glutámico y aspártico, metionina, tirosina, cisteína, arginina, lisina e histidina), de formar enlaces de coordinación con metales de transición. En particular, polipéptidos a los que se ha incorporado una 'cola' de histidinas en el extremo amino o carboxilo terminal, muestran una alta afinidad por estos complejos ( $K_D = 10^{-13}$ , mucho mayor que la afinidad de la mayoría de los complejos antígeno-anticuerpo o enzima-sustrato). Las proteínas adsorbidas a esta resina pueden lavarse de otras unidas inespecíficamente en condiciones relativamente astringentes, para posteriormente eluirse con un gradiente de imidazol. Este método permite la purificación del polipéptido recombinante a más del 95% en un solo paso. Para la caracterización estructural de proteínas con ciertas técnicas se requiere de cantidades de proteína pura que va de varios microgramos (dicroísmo circular, espectroscopía de fluorescencia) a miligramos (cristalografía de rayos X). La combinación de esta técnica de purificación con un sistema eficiente de expresión de proteínas recombinantes permite el aislamiento de grandes cantidades de proteína para distintas técnicas.

## Objetivos:

### General:

Conocer el contenido informativo de residuos conservados en las beta-lactamasas de clase A

### Particular:

A partir del aislamiento y caracterización de mutantes en la posición 37 de la beta-lactamasa de *E. coli*, identificar las funciones relacionadas a su conservación y que no sean evidentes con la inspección del contexto estructural en el que se encuentra.

# Estrategia experimental

## Alineamiento de secuencias y árbol filogenético

Las secuencias de beta-lactamasas enlistadas se obtuvieron de las bases de datos Swissprot y GenBank\* con los siguientes nombres de acceso:

*Actinomadura* R39\*, ACTIBETLC ; *A. pleuropneumoniae* ROB1\*, S51028; *B. cereus* 5/B, BLA1\_BACCE; *B. cereus* 569H, BLAC\_BACCE; *B. cereus* III, BLA3\_BACCE; *B. fragilis*\*, BFU05886; *B. licheniformis*, BLAC\_BACLI; *B. mycoides*, BLA1\_BACMY; *B. uniformis*, BLAC\_BACUN; *B. vulgatus*, BLAC\_BACVU; *C. diversus*, BLAC\_CITDI; *E. cloacae*, AMPC\_ENTCL; *E. coli*R-TEM, BLAT\_ECOLI; *K. oxytoca*, BLAC\_KLEOX; *K. pneumoniae*, BLAC\_KLEPN; *M. fortuitum*\*, MSGBLAF; *P. aeruginosa* PER1, BLE1\_PSEAE; *P. aeruginosa* PSE, BLC3\_PSEAE; *P. haemolytica* ROB1, BLA1\_HAEIN; *P. mirabilis*, BLAC\_PROMI; *P. vulgaris*, BLAC\_PROVU; *R. capsulata*, BLAC\_RHOCA; *S. aureus* PC1, BLAC\_STAAU; *S. aureofaciens*, BLAC\_STRAU; *S. badius*, BLAC\_STRBA; *S. cacaoi* ULg, BLA1\_STRCI; *S. cacaoi* blaU, BLA2\_STRCI; *S. cellulosa*, BLAC\_STRCE; *S. fradiae*, BLAC\_STRFR; *S. lavendulae*, BLAC\_STRLA; *S. marcescens*\*, SMSME1; *S. typhimurium*, BLO2\_SALTY; *Y. enterocolitica*, BLAC\_YEREN.

Las secuencias fueron alineadas con el programa PILEUP del paquete Wisconsin (Genetics Computer Group, Inc.) versión 8. Se descartaron del alineamiento secuencias de beta-lactamasas de distintas especies que tuvieran una similitud de  $\geq 95\%$  con alguna de las enlistadas. El porcentaje de similitud fue calculado con el programa PROTDIST del paquete PHYLIP (J. Felsenstein), versión 3.5c. Para la construcción del árbol filogenético se usaron los programas FITCH y DRAWTREE de PHYLIP.

## Construcción de mutantes

### Construcción del vector de expresión

Se construyó un vector de expresión de mutantes de la beta-lactamasa basado en el plásmido pBR322. Las modificaciones que se hicieron son las siguientes:

a) generación de un sitio de BglII en la región 3' del gen de la beta-lactamasa en el plásmido pBR322. Este sitio es necesario para la clonación del gen modificado de la beta-lactamasa (ver inciso b). El plásmido pBR322 contiene tres sitios de restricción para la endonucleasa DraI. Dos de ellos se encuentran en la región 3' del gen de la beta-lactamasa y el tercero es interno al gen (región que codifica a los residuos 73 y 74). Para hacer único el sitio interno y sustituir a los dos externos por un sitio de BglII, se digirió pBR322 con DraI de manera parcial y se aisló de gel al DNA lineal de esta reacción. Posteriormente se ligó este DNA con oligos 'adaptadores' de BglII en la siguiente reacción:

‘adaptadores’ de BglII en la siguiente reacción:

oligo bgl1 fosforilado, 50pM (5´ CTAGATCTCCCGGG 3´)  
oligo bgl2 fosforilado, 50pM (5´ CCCGGGAGAT 3´)  
pBR322/DraI lineal, 1µg  
buffer ligasa 10x (Tris-HCl 660mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 50mM, DTT 10mM, ATP 10mM)  
ligasa (0.5 unidades)

a 16°C durante 12h.

El DNA obtenido de esta reacción fue digerido con BglII, purificado de gel y ligado sobre sí mismo. El DNA resultante se electroporó en la cepa JM101 de *E. coli* (según el método descrito en Sambrook, et al.) y se seleccionó en ampicilina a 200µg/ml. De las colonias transformantes se aisló DNA de plásmido y se seleccionaron aquellos que se digirieran de manera total con BglII (sitio no presente en el pBR322 silvestre) y un solo sitio para DraI. El plásmido resultante es el pBR-Bgl.

b) clonación del gen de la beta-lactamasa con promotor pT7 y región codificante de 6 histidinas en el carboxilo terminal de la enzima. Para la construcción de estas señales en el gen de la beta-lactamasa, se amplificó por PCR dicho gen con 4 oligos (ver Fig. 10 en Resultados). Usando estos oligos y el plásmido pBR322 como DNA molde, se generó un fragmento de 980pb. Este fragmento fue clonado con los sitios EcoRI y BglII en el plásmido pBR-Bgl (en sustitución del gen silvestre) para generar el plásmido pBR-T7H.

Los oligos usados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología/UNAM.

oligo t72:

5´ GGGTCTCGAC GAATTC AAATTAATACGACTCACTATAG  
EcoRI promotor de la RNA pol de T7

GGAGACCACACGG 3´  
translape con t71

oligo t71:

5´ GGGAGACCACAACGG TTTCCC TCTAGA ATTGAAAA  
translape con t72 XbaI

AGGAGG AGT ATG 3´  
SD modificado Met

oligo hco:

5' AGCCGATCG AGATCT TTA (ATG)<sub>6</sub> CCAATGCTTAATC  
BglII term. 6x his

AGTGAGG 3'

oligo t20:

5' GGAATAGCCGATCG AGATCT 3'  
BglII

Condiciones de reacción de las PCR's. Los tiempos y las temperaturas de reacción fueron iguales para todas las PCR's:

Desnaturalización:	Reasociación:	Polimerización:
92°C/1.5min.	55°C/1.5min.	72°C/3min.

PCR 1:

Amplificación del fragmento t71-hco:

10µl de buffer de reacción de Taq DNA polimerasa 10x (KCl 500mM, Tris HCl 100mM pH 8.0, NaCl 100mM, EDTA 0.1mM, DTT 1mM y Triton X-100 al 1%).  
6µl de MgCl<sub>2</sub> 10x (15mM)  
10µl de dNTP's 10x (2.5mM)  
1µl de oligo t71 (20pM)  
1µl de oligo hco (20pM)  
1µl de plásmido pBR322 (5ng)  
1u de enzima Taq polimerasa (Promega)  
70µl de agua bidestilada

PCR 2:

Amplificación del fragmento t72-t20

En esta PCR se utiliza como DNA molde al fragmento t71-hco (937pb) y las condiciones del PCR anterior usando los oligos t72 y t20 (20pM de c/u). El fragmento resultante (980pb) fue subclonado en el plásmido pBR-Bgl.

Subclonación de mutantes. Las mutantes construidas en pBR-Bgl en la posición 37 y 61 de la beta-lactamasa (E. Cota, tesis de licenciatura) fueron amplificadas por PCR con los oligos t71 y hco (20pM de c/u) para poder ser subclonadas bajo el promotor de T7 (sitios de restricción DraI-XbaI) en el plásmido pBR-T7H (ver Fig. 11). Se usaron las condiciones de amplificación de la PCR 1.

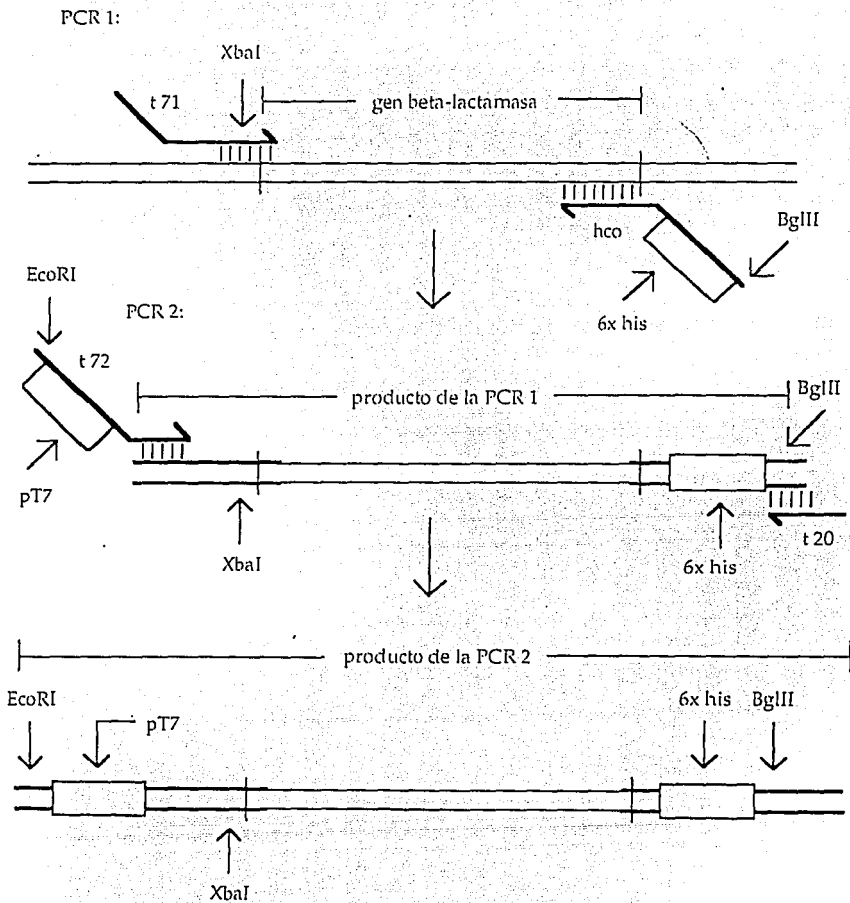


Fig. 10. Sustitución del promotor P3 de la beta-lactamasa de pBR322 por el de la RNA polimerasa del fago T7 (pT7) e inserción de región codificante de poli-histidinas (6x his) en el carboxilo terminal de la enzima. Ver en el texto la secuencia de los oligos t71,t72, hco y t20.



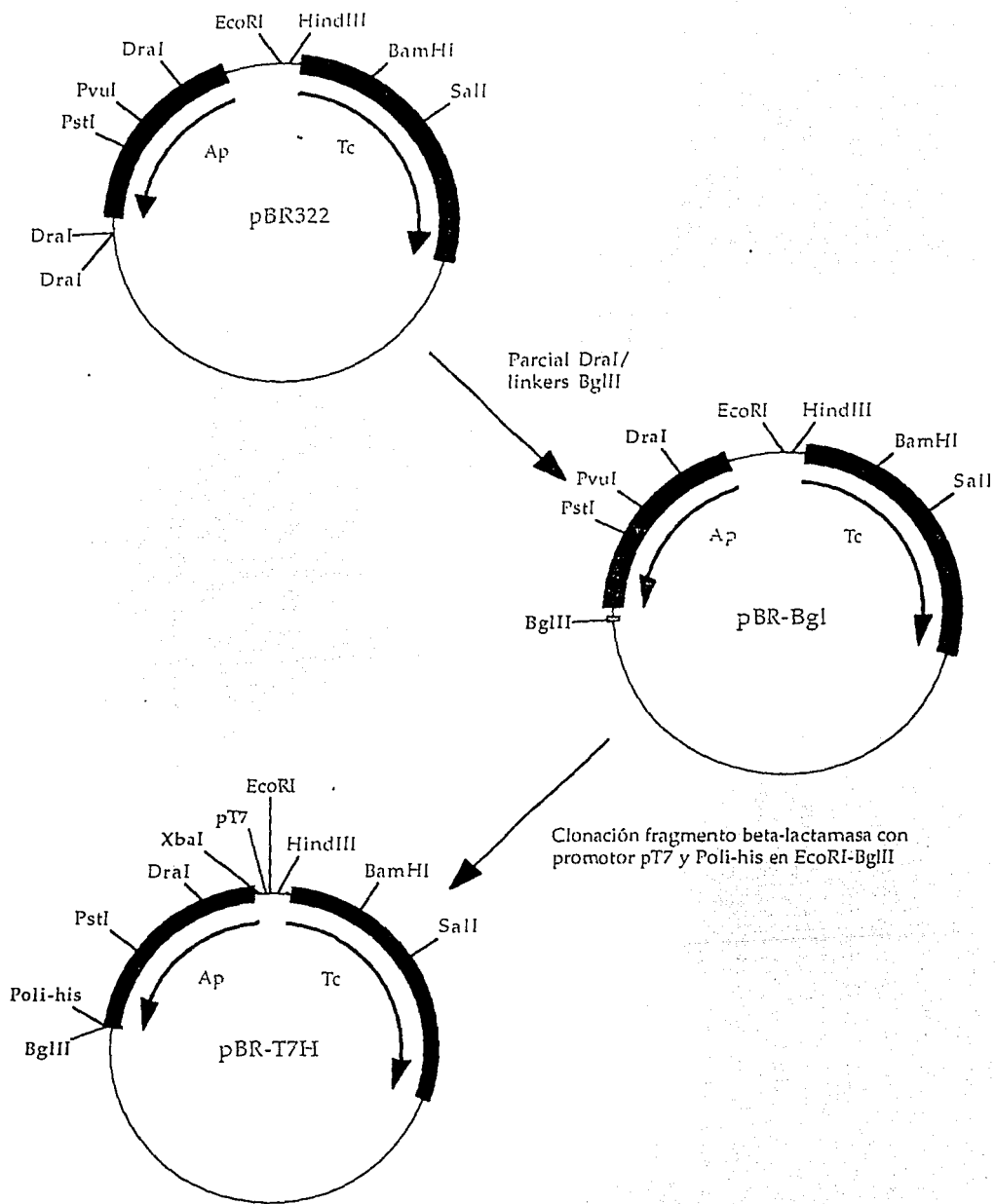


Fig. 11. Construcción de plásmido pBR-T7H. Ver texto.

### Medición de concentraciones mínimas inhibitorias (modificación a la técnica descrita por Viadiú, et al. 1995).

- Se dejó crecer durante toda la noche el cultivo bacteriano a 37°C en medio LB.
- Se diluyó el cultivo bacteriano y se platearon aproximadamente  $1 \times 10^3$  células por caja de Petri en medio LB sólido y antibiótico con concentraciones crecientes de ampicilina y tetraciclina a 5µg/ml (un cultivo crecido durante toda la noche contiene aproximadamente  $1 \times 10^9$  células).
- Se dejaron crecer durante 24h a 37°C.

La concentración mínima inhibitoria de antibiótico es aquella a la que no aparecen unidades formadoras de colonias (CFU's) a 37°C a las 24 horas.

### Inducción de beta-lactamasa recombinante en la cepa E. coli BL21/pLysS\* y purificación en columnas de afinidad a níquel

- El cultivo celular de la cepa BL21/pLysS (*hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gen 1)* transformada (plásmidos pBR-T7H con el gen de la beta-lactamasa silvestre y mutantes) fue crecido durante toda la noche en 20ml de LB con tetraciclina a 10µg/ml.
- Se centrifugó este cultivo a 10,000g durante 5min. y transfirió el pellet bacteriano a 1l de TB con tetraciclina a 20µg/ml.
- Posteriormente, se creció a una DO  $abs_{600}$  de 0.6 a 30°C. Para el control sin inductor (IPTG), se pusieron 2ml del cultivo en un tubo de 15ml a 30°C.
- Se agregó IPTG fresco a una concentración final de 1mM y se añadió antibiótico nuevamente (20µg/ml).
- Se incubó durante 4-5h a 30°C.

Para verificar la inducción:

- Se tomó 1ml de cada cultivo con y sin IPTG en un tubo Eppendorf, se centrifugaron y los pellets fueron resuspendidos en 100µl de buffer de muestra de proteínas (Tris pH 6.8, 0.125M, beta-mercaptoetanol al 10%, SDS al 4%, azul de bromofenol al 0.1% y glicerol al 20%). Se sonicaron 2 veces durante 30 segundos y se hirvieron las muestras durante 4min. y se corrieron en un gel de proteínas.

- Se centrifugó el resto del cultivo 10min. a 8,000g y se resuspendió el pellet en 10ml de buffer de lisis (Tris-HCl 40mM pH 7.4, KCl 100mM, glicerol al 10% y PMSF fresco 0.5mM). Se hicieron alícuotas de 1ml para sonicar cada una tres veces durante 30seg. en baño de hielo.

- El lisado se centrifugó a 15,000xg durante 15min. y el sobrenadante fue filtrado con membrana Millipore de 0.45µm.

- Se lavaron 4ml de volumen empacado de resina Ni-agarosa (Qiagen cat. no. 30210) en el buffer de lisis (4 lavados de 10ml c/u)

- El sobrenadante del lisado bacteriano fue transferido a un matraz pequeño y se agregó la resina lentamente.

- La mezcla se mantuvo en agitación a 4°C durante 1h y posteriormente se transfirió a una columna (Qiagen cat. no. 34924). Se recicló la primera elución en

la columna.

-Se lavó con 200ml de buffer de lisis y posteriormente con 100 y 20ml de este buffer con imidazol 10mM y 20mM, respectivamente.

-Para eluir a la beta-lactamasa con histidinas, se lavó la columna con alícuotas de 4ml de imidazol 100, 200, 300 y 400mM en buffer de lisis.

-Se corrió un gel de proteínas con 5-10 $\mu$ l de cada fracción eluida por carril para monitorear la purificación.

\*El plásmido pLysS es una modificación del pACYC184 (Chang y Cohen, 1978) que porta a la lisozima del bacteriófago T7 y el gen de resistencia a cloranfenicol (Dunn y Studier, 1983).

### Caracterización cinética de mutantes

De las fracciones eluidas de la columna de afinidad a níquel, se seleccionaron aquellas con actividad de beta-lactamasa con nitrocefina (cambio de coloración de amarillo a rojo). Estas se dializaron y concentraron con una membrana YM-10 (Amicon) en buffer de fosfato de sodio 50mM, KCl 0.15M, pH 7.0. La enzima se obtuvo con una pureza de >95%.

La actividad de la beta-lactamasa a ampicilina se determinó espectrofotométricamente con un espectrofotómetro Beckman DU650 y celdas de cuarzo de 1cm de ancho. La hidrólisis de la ampicilina se monitoreó a 240nm a 30°C en buffer de fosfato de sodio 50mM y KCl 0.15M a pH 7.0. Los coeficientes de extinción molar usados fueron de 538 M<sup>-1</sup> c<sup>-1</sup> para la ampicilina (Ellerby, 1990) y de 29,400 M<sup>-1</sup> c<sup>-1</sup> (Fisher, 1980) para la beta-lactamasa.

Los valores de  $K_M$  y  $K_{cat}$  se obtuvieron por dos métodos: medidas de velocidad inicial (tres determinaciones) con un mínimo de cinco concentraciones distintas de sustrato (analizadas en gráficas de Eadie-Hofstee), y a partir de curvas progresivas usando concentraciones de sustrato de al menos 5 veces la  $K_M$ . Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten en el programa Kaleidagraph (Abelbeck software).

### Producción de anticuerpos de conejo anti-beta-lactamasa

Los anticuerpos anti-beta-lactamasa se obtuvieron a partir de una coneja cepa Nueva Zelanda de 2 meses de edad. Esta fue inoculada en tres ocasiones a intervalos de quince días cada una. En la primera inoculación, se utilizó una mezcla de adyuvante completo de Freund (2ml) y 30 $\mu$ g de beta-lactamasa comercial (Boehringer-Mannheim). En las ocasiones restantes se usó la misma cantidad de enzima mezclada con 2ml de adyuvante incompleto de Freund. Cinco días después de la última inoculación, se extrajeron 15ml de sangre del conejo y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 6h para la formación del coágulo. Se extrajo el sobrenadante (suero) y se centrifugó durante 10min. a 10,000g. Se hicieron alícuotas de 3ml del sobrenadante y se almacenaron a -20°C.

Para la purificación de anticuerpos específicos de la beta-lactamasa de este suero, se utilizó la siguiente metodología:

- En un aparato de filtración Swinex® (Millipore) se puso una membrana de nitrocelulosa de poro de 0.45µm (Schleicher and Schuell) y 2.5cm de diámetro.
- Se pasaron 3 ml de una solución de 10µg/ml de beta-lactamasa en 5ml de PBS (en 800ml de agua bidestilada, disolver 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y ajustar el pH a 7.4 con HCl. Llevar a 1l con agua bidestilada) y se recicló 2 veces con la misma solución.
- Se pasó una solución de albúmina al 1% en PBS (5ml).
- Se lavó la membrana con 5ml de PBS y posteriormente se pasaron 5ml de suero centrifugado. Se recicló 3 veces con la misma solución.
- Se lavó con una solución de 5ml de PBS y Tween 20 al 0.1% y se repitió 2 veces la operación y después con 5ml de PBS.
- Se eluyó el anticuerpo con 4ml de amortiguador de glicina (glicina 0.2M, NaCl 0.5M y Tween 20 al 0.5%) y se colectó la elución en 4ml de solución de Tris 1M. A ésta se le agregaron 2ml de PBS.
- Se hicieron alícuotas de 1ml y se guardaron a -20°C.
- Para conservar la membrana, se lavó en PBS y Tween al 0.05% y se almacenó a 4°C en PBS y ázida de sodio 0.05%.

El Ab puede ser usado a una dilución de 1:100-500

#### Detección de la expresión de mutantes por inmunoblots (westerns)

- Para este ensayo, se hizo una dilución 1:1000 de un cultivo crecido durante toda la noche. Las células se crecieron en medio LB y tetraciclina 5µg/ml hasta una DO<sub>Abs600</sub> de 0.4 y se agregó IPTG a una concentración final de 1mM.
- Después de la inducción, se dejaron crecer hasta una DO<sub>Abs600</sub> de 1 para mantener de manera aproximada la cantidad de células en todas las mutantes.
- 1ml de cada muestra fue centrifugado y posteriormente sonificado tres veces durante 30s c/u. Se centrifugaron las muestras 15min a 12,000g.
- Las fracciones solubles e insolubles de las proteínas fueron corridas en geles de poliacrilamida al 15% (según la técnica de Laemmli, citada por Rodriguez y Tait, 1993).
- Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (glicina 39mM, Tris base 48mM, SDS 0.037% y metanol al 20%) durante 45min: a 400mA.
- Se lavó la membrana en PBS durante 10min. y de la misma manera con PBS/Tween20 al 2% y 0.05% durante 10min. c/u.
- Se incubó con el primer anticuerpo anti-beta-lactamasa (de la preparación descrita anteriormente) diluido 1: 500 durante 40min.
- Se enjuagó con agua bidestilada y se lavó con PBS durante 10min. y de la misma manera con PBS/Tween20 0.05%.
- Se incubó con el segundo anticuerpo (anti-anticuerpo de conejo acoplado a fosfatasa alcalina, Amersham, dilución 1: 7500) en PBS/Tween20 al 0.05% durante 40min.
- Se lavó con PBS y posteriormente con solución de revelado para fosfatasa alcalina. Esta solución se hace con Tris 100mM pH 9.5, NaCl 100mM y MgCl<sub>2</sub> 5mM. Los sustratos de la fosfatasa, son el NBT (cloruro de nitro tetrazolio azul) y

el BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato). 0.5g de NBT se disuelven en 10ml de dimetilformamida al 70% y 0.5g de BCIP en 10ml de dimetilformamida al 100%. De estas soluciones, agregar 66 $\mu$ l de NBT y 33 $\mu$ l de BCIP a 10ml de solución de revelado.

-Dejar la reacción durante 10h a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez que las bandas tengan la intensidad deseada, lavar con agua bidestilada para detener la reacción.

# Resultados

## Alineamiento de secuencias y árbol filogenético

En el apéndice A se muestran las secuencias de 29 beta-lactamasas de clase A. Como se menciona en la estrategia experimental, se excluyó de este grupo a beta-lactamasas con  $\geq 95\%$  de similitud con alguna de las enlistadas. Se han reagrupado a 4 nuevas beta-lactamasas en un subgrupo (clase A') por no contener a la mayoría de los residuos invariantes en el resto de la clase A. Se muestran dos secuencias consenso: el de las primeras 25 secuencias y el de las 29 en total. Los residuos invariantes de cada grupo consenso están en letras mayúsculas. Es notable que la gran mayoría de los residuos que permanecen invariantes con la adición de estas cuatro nuevas secuencias sean aquellos estrechamente relacionados a la función catalítica. En el cladograma (árbol sin raíz) puede observarse gráficamente la distancia de secuencia que separa a ambos grupos. Como se ha mencionado, en éste y en un trabajo previo (E. Cota, tesis de licenciatura) se han construido mutantes para analizar el contenido informativo de mutantes en la posición 37 de las beta-lactamasas de clase A.

## Construcción de mutantes

Construcción del vector de expresión. Se ha observado que el rendimiento de purificación de mutantes en la posición 37 de la beta-lactamasa clonada en el plásmido pBR322, es siempre menor al obtenido con la enzima silvestre (E. Cota, tesis de licenciatura). Debido a la dificultad para purificar estas mutantes, se optó por un sistema en que el rendimiento de esta proteína fuera mayor. Con este fin, se eligió uno los sistemas de expresión más eficientes usados en la actualidad, que utiliza las señales de transcripción y traducción del bacteriófago T7 (Studier y Mofatt, 1986). Para la expresión de la beta-lactamasa en este sistema, se sustituyó a uno de los promotores originales de este gen en pBR322 (promotor P3) por el pT7. Esta construcción deja intacto a uno de los dos promotores silvestres de la

beta-lactamasa en pBR322 (promotor P1), con lo que es posible la expresión constitutiva de la enzima en ausencia de la polimerasa viral. Adicionalmente, se introdujo a este gen una región codificante de 6 histidinas en el carboxilo terminal para facilitar la purificación de la enzima en columnas de afinidad a níquel (ver más adelante). Este plásmido fue introducido en la cepa BL21/pLysS de *E. coli*, en la que se expresa la RNA polimerasa del fago T7 de manera inducible con IPTG (Grodberg y Dunn, 1988).

Como se ha descrito en la Estrategia Experimental, se utilizaron 4 oligos para la generación del promotor de T7 y la 'cola' de histidinas en la región 3' del gen de la beta-lactamasa y se obtuvieron por PCR los productos de los tamaños esperados. La clonación del gen modificado de la beta-lactamasa se hizo en el plásmido pBR-Bgl con los sitios EcoRI y BglII. El plásmido resultante se llamó pBR-T7H (Fig. 11). Para desechar las mutaciones espontáneas producidas durante la PCR en el fragmento clonado (gen de la beta-lactamasa con pT7 y poli-his), se substituyó el fragmento DraI-PstI de este nuevo plásmido por el de pBR322. Se secuenciaron por el método de Sanger las regiones mutantes adyacentes a éste (de EcoRI a DraI y de PstI a BglII).

Subclonación de mutantes. Las mutantes en la posiciones 37 y 61 fueron subclonadas en el vector pBR-T7H en los sitios únicos XbaI y DraI. Las regiones mutantes subclonadas fueron verificadas por secuenciación de DNA. Estas se designan con el código de una letra (p. ej. E37Q para la mutante que cambia de ácido glutámico a glutamina).

### **Medición de concentraciones mínimas inhibitorias (MIC's)**

Los DNAs mutantes clonados en el plásmido pBR-Bgl fueron transformados en la cepa JM101 y se midió la resistencia que confieren las proteínas mutantes a distintas concentraciones de ampicilina (Tabla 1). Los valores de resistencia mostrados son el promedio de tres experimentos realizados en las mismas condiciones.

---

Tabla 1. Resistencia de mutantes en la posición 37 (ácido glutámico) de la beta-lactamasa TEM de *E. coli* expresadas en la cepa JM101.

Mutante	Codón	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ampicilina)
E37 (silvestre)	GAG	2000
E37A	GCC	400
E37D	GAC	10
E37H	CAC	10
E37L	CTG	20
E37M	ATG	400
E37Q	CAG	500
E37R	CGG	200
E37S	TCG	400
E37T	ACG	20
E37V	GTC	400
E37W	TGG	10
E37Y	TAC	20
R61E	GAA	500
Cepa JM101		10

---

De las mutantes descritas en la Tabla 1, se seleccionaron 3 para ser sobre-expresadas y purificadas con el método descrito. Estas mutantes se seleccionaron bajo los siguientes criterios: la mutante conservativa que mostrara la mayor resistencia a ampicilina, E37Q; una mutante no conservativa que perdiera la resistencia, E37H y una mutante en posición vecina con la que se forma interacción importante en la enzima silvestre, R61E.



## **Expresión de la beta-lactamasa recombinante en la cepa *E. coli* BL21/pLysS y purificación en columnas de afinidad a níquel**

Concentración de inductor en el sistema BL21/pBR-T7H. La concentración usada de inductor para el sistema de expresión de *E. coli* BL21/pLysS transformada con plásmidos multicopia es de 40mM de IPTG (pET system manual, Novagen). Sin embargo, la concentración con la que se obtuvo el mejor rendimiento de proteína en este sistema fue de 0.1mM. Esto puede deberse a que el derivado de pBR322 es de bajo número de copias y por lo tanto los promotores pT7 presentes se titulan rápidamente con bajas cantidades de polimerasa de T7. Asimismo, este plásmido no expresa al represor LacI, normalmente codificado en plásmidos que contienen genes recombinantes expresados bajo el promotor de LacZ, con lo que disminuye la concentración de inductor necesaria para inhibir la represión.

Purificación de la enzima silvestre y mutantes. La fracción de beta-lactamasa silvestre eluyó a partir de una concentración de 30mM hasta 200mM de imidazol. Las enzimas mutantes purificadas eluyeron a las mismas concentraciones. El rendimiento de proteína en cada caso se muestra en la Tabla 2. Las fracciones totales de proteínas solubles e insolubles de células que expresan a la enzima silvestre y las mutantes E37H y E37Q (crecidas a 30°C) se observaron en geles de poliacrilamida. En este análisis se observó que una fracción de la proteína recombinante permaneció en las fracciones insolubles. En los tres casos las proteínas mostraron el peso molecular que corresponde al de la enzima procesada. Como se observa en la Fig. 13, la proporción de proteína varió con cada una de estas mutantes en relación a la proteína silvestre. Esto se hizo más evidente en los ensayos de inmunodetección, en los que se observa únicamente la banda que corresponde a la beta-lactamasa (ver más adelante). A pesar de que el rendimiento de enzima activa puede ser mayor con la purificación a partir de los agregados insolubles, se purificó solo a partir de las fracciones solubles para la caracterización inicial de las mutantes.

---

Tabla 2. Rendimiento de purificación de mutantes en la posición 37 de la beta-lactamasa TEM de *E. coli*.

	$\mu\text{g}$ de proteína pura/100ml de cultivo
silvestre	560.0
E37Q	52.1
E37H	115.0
R61E	166.0

---

### Caracterización cinética de mutantes

Como se observa en la Tabla 3, las constantes cinéticas reportadas para la enzima silvestre (Sigal, et al., 1984), son ligeramente mayores que las de la enzima con la cola de histidinas en el carboxilo terminal. En comparación con la enzima silvestre con histidinas, las tres mutantes ensayadas muestran una  $K_{\text{cat}}/K_M$  relativa inferior. A pesar de tratarse de un cambio conservativo, la mutante E37Q tiene una actividad aproximadamente 100 veces menor a la silvestre. La mutante R61E (residuo que en la enzima silvestre interactúa con el E37), tiene una actividad aproximadamente 50 veces menor.

-----  
 Tabla 3. Constantes catalíticas de mutantes con 'cola' de histidinas en la posición 37 de la beta-lactamasa RTEM-1 y comparación con la enzima silvestre.

	$K_M$	$K_{cat}$	$K_{cat}/K_M$	Rel. $K_{cat}/K_M$
wt	$0.4 \times 10^{-4}$	2000.0	$4.00 \times 10^7$	1
wt-his	$1.5 \times 10^{-4}$	2357.6	$1.57 \times 10^7$	0.39
E37Q	$7.7 \times 10^{-5}$	14.8	$1.91 \times 10^5$	$4.75 \times 10^{-3}$
R61E	$1.1 \times 10^{-4}$	103.7	$9.34 \times 10^5$	$2.35 \times 10^{-2}$

-----

### Inmunodetección de mutantes

La expresión de las mutantes en las posiciones 37 y 61 de la beta-lactamasa fueron analizadas en ensayos de inmunodetección (inmunoblot o western). Ambas fracciones fueron analizadas con anticuerpos de conejo anti-beta-lactamasa como se describe en la estrategia experimental. Los resultados muestran que algunas de las mutantes se expresan en menor cantidad que la enzima silvestre, lo cual indica que la disminución de la resistencia que confieren no se debe solamente a una disminución en la actividad de la enzima, sino también a una tasa aumentada de degradación. Como se observa en la Fig. 14, las sustituciones pueden afectar la estabilidad de la molécula en distintos grados. En particular, resulta inesperado que la mutante E37Q, que es la más activa de las mutantes sencillas, se observe en cantidades tan bajas, tanto en la fracción soluble como en la insoluble. De la misma manera, se observa que en algunas mutantes se acumula cierta cantidad de precursor en condiciones en que la enzima silvestre se procesa totalmente.

En un estudio de mutantes en la zona del sitio activo de la beta-lactamasa TEM de *E. coli*, Palzkill et al. (1994) demuestran que la expresión disminuida de mutantes, como se observa en experimentos de inmunodetección correlaciona con un aumento en la tasa de recambio de la proteína y no a otros factores, como la disminución en la tasa de síntesis. Dado que los sistemas empleados en ese y el presente trabajo son comparables, el mismo fenómeno puede explicar el comportamiento de las mutantes de este trabajo. Además, es improbable que la tasa de síntesis se vea afectada por la sustitución de un solo codón.

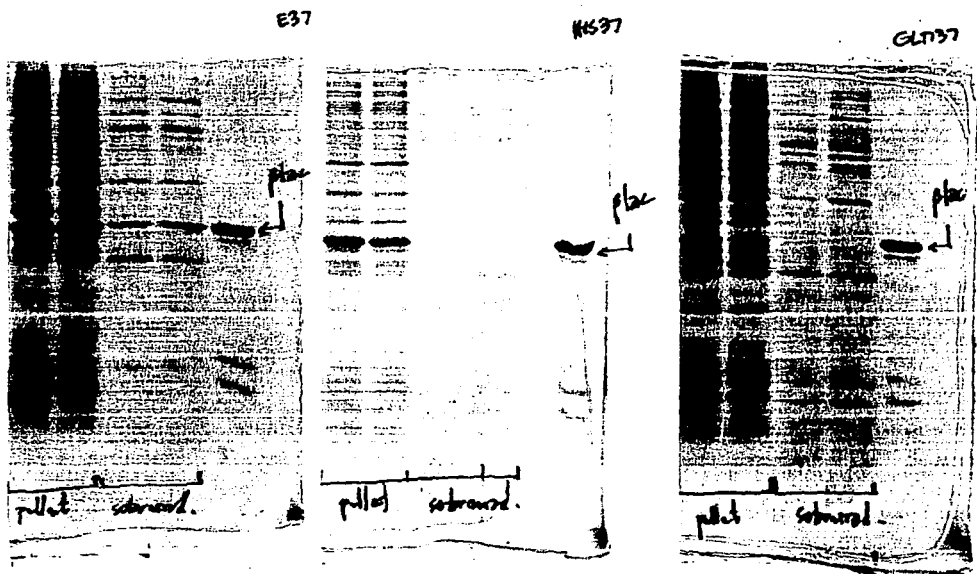


Fig. 13. Expresión proteínas totales de la cepa BL21/pLysS, crecida a 30°C y transformada con el plásmido pBR-T7H, con la beta-lactamasa silvestre y las mutantes E37H y E37Q. Se muestra la fracción precipitada (pellet) y la fracción soluble (sobrenadante). La última banda corresponde a la enzima silvestre purificada.

## Discusión y Conclusiones

En este estudio se comprueba que la permanencia del E37 en las beta-lactamasas de clase A esta ligada al mantenimiento de varias características funcionales. A diferencia de la mayoría de los residuos expuestos al solvente en las proteínas, este aminoácido se conserva en 25 de las 29 secuencias descritas de beta-lactamasas de clase A. Por su localización, se observa que el ácido glutámico 37 es un residuo estructuralmente muy 'comprometido': forma un puente de hidrógeno con la cadena principal de la V44 (en la RTEM-1 de *E. coli*) y un puente salino con la R61 (que se convierte en puente de hidrógeno en las estructuras de *S. aureus* y *B. licheniformis*, ver Fig. 7). Como se ha mencionado, esta red de interacciones se mantiene en las distintas estructuras de beta-lactamasas de clase A resueltas a la fecha, aunque los aminoácidos con los que contacta la cadena lateral del E37 no muestren la misma conservación. A pesar de la distancia que separa a este residuo de la región catalítica (22Å, aproximadamente), se ha postulado que puede ser importante para la estructuración de dicha zona. Según esta hipótesis, el puente salino que establece con la R61 forma parte de una serie de interacciones que son necesarias para posicionar a la  $\alpha$ -hélice H2, en la que se sitúa la serina catalítica, S70 (Knox y Moews 1991).

Recientemente se ha descrito el aislamiento de cuatro nuevas beta-lactamasas de clase A en las que esta posición cambia de ácido glutámico a valina, leucina o isoleucina (Rogers et al, 1994, Parker y Smith, 1993, Nordmann y Naas, 1994). Por el agrupamiento que muestran en el árbol filogenético, estas enzimas pueden considerarse como un subgrupo de las beta-lactamasas clase A (o clase A'). Estas nuevas proteínas comparten varias características de secuencia: se observa que de los residuos invariantes para el total de secuencias reportadas solo se mantienen invariantes los que estan directamente involucrados con la actividad catalítica de la enzima: de los 21 residuos invariantes en la clase A, solo 9 permanecen en este subgrupo. Además, es importante notar que estas modificaciones se dieron solamente despues de una gran divergencia de secuencia comparada con el grupo

antes conocido de beta-lactamasas de esta clase. La mayor similitud de estas secuencias con el resto de la clase A es de aproximadamente el 30%.

A partir de la información estructural que se ha acumulado, se puede esperar que algunas mutaciones en esta posición alteren la estabilidad y la actividad de la proteína, pero que aquellas con la capacidad de reestablecer el patrón de contactos de la cadena lateral original regeneren las características de la enzima silvestre. Sin embargo, todas las mutantes de la beta-lactamasa RTEM-1 obtenidas en este trabajo confieren una resistencia a ampicilina muy inferior en comparación a la enzima silvestre. En relación a las secuencias mencionadas en las que el E37 deja de ser invariante, se han descrito en este trabajo dos de estas mutantes (valina y leucina) en el contexto de secuencia de la RTEM-1 de *E. coli*. En esta variante las mutantes tienen valores de resistencia a ampicilina muy inferiores a los de la enzima silvestre, por lo que se puede suponer que el contexto en el que se encuentra este residuo es importante para hacer funcional a uno u otro aminoácido. Tomando en conjunto a las mutantes descritas en este trabajo, se observa además que la resistencia se perturba en mayor grado que la estabilidad de la enzima, pero además existe para la mayoría de ellas una correlación inversa entre la actividad y la estabilidad: aquellas que carecen de actividad son las que se producen en mayor cantidad y las que muestran mayor actividad se producen en bajas cantidades. Dos mutaciones son las que muestran este efecto en mayor medida. La mutante sencilla más activa es la E37Q, que tiene aproximadamente 1/100 de la actividad de la enzima silvestre. En las fracciones solubles e insolubles de proteína, tiene un rendimiento de purificación menor en comparación con otras mutantes menos activas. Este efecto disminuye con el uso de inhibidores de proteasas durante la extracción, lo cual indica que puede estar degradándose a medida que se produce (dato no mostrado). En contraste, la mutante E37H, que no confiere resistencia detectable, se observa en bajas cantidades en la fracción soluble pero se agrega en gran cantidad en la fracción insoluble. Otra mutante conservativa, E37D, muestra una resistencia residual y se degrada en mayor medida que la E37Q. Además, en experimentos de inmunodetección se observa que una fracción de la enzima producida se

acumula en forma de precursor. Las mutantes E37R y E37S a pesar de tener una resistencia considerable (200 y 400g/ml de ampicilina, respectivamente), son las mutantes sencillas que se producen en menor cantidad (tanto en fracciones solubles como insolubles).

Existen otros trabajos en los que se han construido mutantes en esta posición. Palzkill y Botstein (1992), mutagenizan un total de 66 aminoácidos de la beta-lactamasa RTTEM-1 (agrupados en 19 regiones) con el fin de obtener "una perspectiva global de los residuos críticos para la estructura o la función de la proteína". De este modo, al obtener un bajo porcentaje de secuencias funcionales en una librería de mutantes generadas al azar, se obtiene información sobre las regiones que son importantes para la estructura o la función de la molécula. De cada región mutagenizada miden la resistencia que confieren a ampicilina y la capacidad de expresarse en comparación con la enzima silvestre. Concluyen que la beta-lactamasa es extremadamente tolerante a sustituciones de aminoácidos, puesto que 44% de las mutantes se expresan, secretan y se pliegan suficientemente bien para funcionar a niveles similares a los de la enzima silvestre. Entre las mutantes obtenidas, caracterizan tres en la posición 37. Sustituyen a este aminoácido por alanina, ácido aspártico y valina. Las resistencias obtenidas en este trabajo para las dos últimas mutantes son comparables, dado que confieren resistencia a 10µg/ml de ampicilina. Sin embargo para la mutante E37A obtienen una resistencia de hasta 1mg/ml, mientras que en nuestras manos la cepa transformada con esta mutante deja de crecer a 400µg/ml de ampicilina. Las diferencias pueden deberse a la cepa de *E. coli* en la que se expresa la mutante, el número de copias del plásmido en el que se expresa y la preparación del antibiótico. A partir de esta información, ellos consideran que dicha posición puede funcionar con un intervalo más amplio de aminoácidos. En contraste, los resultados de este trabajo muestran que mutaciones sencillas son incapaces de sustituir al residuo original porque afectan de manera importante a alguna de las funciones de la proteína. Es muy posible que otro conjunto de residuos pueda regenerar las propiedades de esa zona, pero como se ha visto en las nuevas secuencias reportadas, se requiere de más de una mutación para lograr ese cambio.



En un estudio de mutantes de delección del gen de la beta-lactamasa, Plückthun y Knowles (1987) buscan conocer los determinantes de secreción codificados en el extremo amino terminal de la enzima. Con este fin analizan la cinética de secreción y la resistencia de dichas mutantes. Entre las obtenidas, observan que al deletar la  $\alpha$ -hélice que contiene al E37 (primer elemento de estructura secundaria de la molécula), las enzimas mantienen la capacidad de secretarse pero se hace indetectable la resistencia que confieren a ampicilina. De estos datos concluyen que no existen en esa zona interacciones que sean importantes para la secreción de la proteína. A nuestra manera de ver, los datos de ese y el presente trabajo apoyan la hipótesis de que esta región este implicada en la actividad catalítica de la enzima, pero ninguno concluye sobre su importancia para la secreción de la molécula. Al parecer los determinantes de secreción están dispersos a lo largo de la molécula, y como tal, la región amino terminal puede ser una de ellas. De hecho, al fusionar las regiones codificantes para el péptido líder de la beta-lactamasa con el gen de la triosa fosfato isomerasa se produce una forma que no se secreta. Sin embargo, la secreción es observable al incluir a esta fusión los primeros 75 aminoácidos de la parte madura de la beta-lactamasa (Plückthun y Knowles, 1987). Del comportamiento de las variantes descritas en este trabajo se puede concluir que la posición mutada influye solo parcialmente en la secreción: a pesar de que las mutantes se producen en condiciones de sobreexpresión, se observa que la mayoría de ellas se agregan en la forma madura. En algunos casos se observa la acumulación del precursor, pero el efecto es siempre más notable sobre la estabilidad o la actividad de la enzima. Ya con esta misma enzima se ha observado agregación en periplasma en condiciones de sobreexpresión, como lo demuestra la formación de cuerpos de inclusión en esa zona (Georgiou et al., 1991).

En conjunto, las mutantes descritas reflejan posibles caminos de sustituciones que pudieron ser probadas evolutivamente para la generación de una conformación alternativa que reprodujera la actividad y la estabilidad de la enzima silvestre. Es posible que entre éstas no haya aparecido una variante con las características de la silvestre por ser necesarias dos o más sustituciones, dado

que los pasos intermedios observados son inestables o inactivos. Por otro lado, desconocemos si la estabilidad o la resistencia dada por alguna de las mutantes la hagan suficientemente 'adaptada' para aislarse como una variante natural. La sustitución de este aminoácido debe estar relacionada a un cambio drástico en su contexto estructural, como se demuestra con la aparición de otras secuencias en las que cambia el residuo invariante.

Con los métodos existentes de dinámica molecular, es necesario simular el empacamiento de las cadenas laterales en las nuevas secuencias y así conocer cuáles son las interacciones equivalentes al resto de las beta-lactamasas de clase A. La producción de un banco de mutantes con alguno de los métodos descritos (mutagénesis combinatoria, PCR sexual), puede dar información sobre el tipo y número mínimo de cambios necesarios para 'remodelar' esa región *in vitro*.

## Referencias

- Alberts, B. et al. Molecular Biology of the Cell. Garland, 1989.
- Ambler, R. P. (1980) The structure of beta-lactamases. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 289: 321-31.
- Ambler, R. P. et al. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem. J. 276, 269-72.
- Bowie, J. U. et al. (1990) Deciphering the message in protein sequences: tolerance to aminoacid substitutions. Science 247: 1306-10.
- Chang, A. y Cohen, S. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. 134, 1141-
- Creighton, T. Proteins: structure and molecular properties. 2nd edition. Freeman, 1993.
- Dunn, J. y Studier, F. (1983) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. J. Mol. Biol. 166, 477-
- Fisher, J. et al. (1980) Beta-lactamase proceeds via an acyl-enzyme intermediate. Interaction of *Escherichia coli* RTEM enzyme with cefoxitin. Biochemistry 19, 2895-901.
- Georgiou, G. et al. (1986) Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or alkaline phosphatase. Appl. Environ. Microbiol. 52, 1157-61.
- Herzberg, O. (1991). Refined crystal structure of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.0 Å resolution. J. Mol. Biol. 217, 701-19.
- Herzberg, O. y Moul, J. (1991). Penicillin binding and degrading enzymes. Curr. Op. Struc. Biol. 1, 946-53.
- Jelsch, C. et al. (1993). Crystal structure of *Escherichia coli* TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution. Proteins 16, 364-83.
- Joris, B. et al. (1988) The active-site serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family. Biochem. J. 250: 313-24.
- Kelly, J. et al. (1986) On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. Science 231, 1429-31.
- Kimura, M y Ohta, T. (1973) Mutation and evolution at the molecular level.

Genetics 73, 19-35

Knox, J. R. y Moews, P. C. (1991). Beta-lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C. Refinement at 2Å resolution and analysis of hydration. J. Mol. Biol. 220, 435-55.

Kozarich, J. y Strominger, J. (1980) A membrane enzyme from *Staphylococcus aureus* which catalyzes transpeptidase, carboxypeptidase and penicillinase activities. J. Biol. Chem. 253, 1272-78.

Lee, B. (1971) Conformation of penicillin as a transition state analog of the substrate of peptidoglycan transpeptidase. J. Mol. Biol. 61, 463-69.

Nei, M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, 1987.

Nelson, R. y Long, G. (1989) A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the *Thermus aquaticus* polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 180: 147-51.

Nordmann, P. y Naas, T. (1994). Sequence analysis of PER-1 extended spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with Class A beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 38(1): 104-14.

Ochman, H. y Wilson, A. (1987) Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. J. Mol. Evol. 26, 74-86.

Oefner, C. (1990) Refined crystal structure of beta-lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for beta-lactam hydrolysis. Nature 343: 284-88.

Palzkill, T. y Botstein, D. (1992). Probing beta-lactamase structure and function using random replacement mutagenesis. Proteins 14, 29-44.

Palzkill, T. et al. (1994). Evolution of antibiotic resistance: several different amino acid substitutions in the active site loop alter the substrate profile of beta-lactamase. Mol. Microbiol. 12(2): 217-29.

Parker, A. y Smith, J. (1993) Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A beta-lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1028-36.

Plückthun, A. y Knowles, J. (1987). The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site of beta-lactamase. J. Biol. Chem. 262(9): 3951-57.

Poteete, A.R. et al. (1992) Functional significance of conserved amino acid residues. Proteins 13, 38-40.

Reidhaar-Olson, J. y Sauer, R. (1988) Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. Science 241, 53-57.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Rodriguez, R. L. y Tait, R. C. Recombinant DNA techniques. An introduction. Addison-Wesley, 1983.

Rogers, M. et al. (1994) Insertional activation of *cepA* leads to high-level beta-lactamase expression in *Bacteroides fragilis* clinical isolates. *J. Bacteriol.* 176 (14), 4376-4384.

Samraoui, B. et al. (1986) Tertiary structural similarity between a class A beta-lactamase and a penicillin-sensitive D-alanyl carboxypeptidase-transpeptidase. *Nature* 320, 378-80.

Stemmer, W. P. C. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370, 389-91.

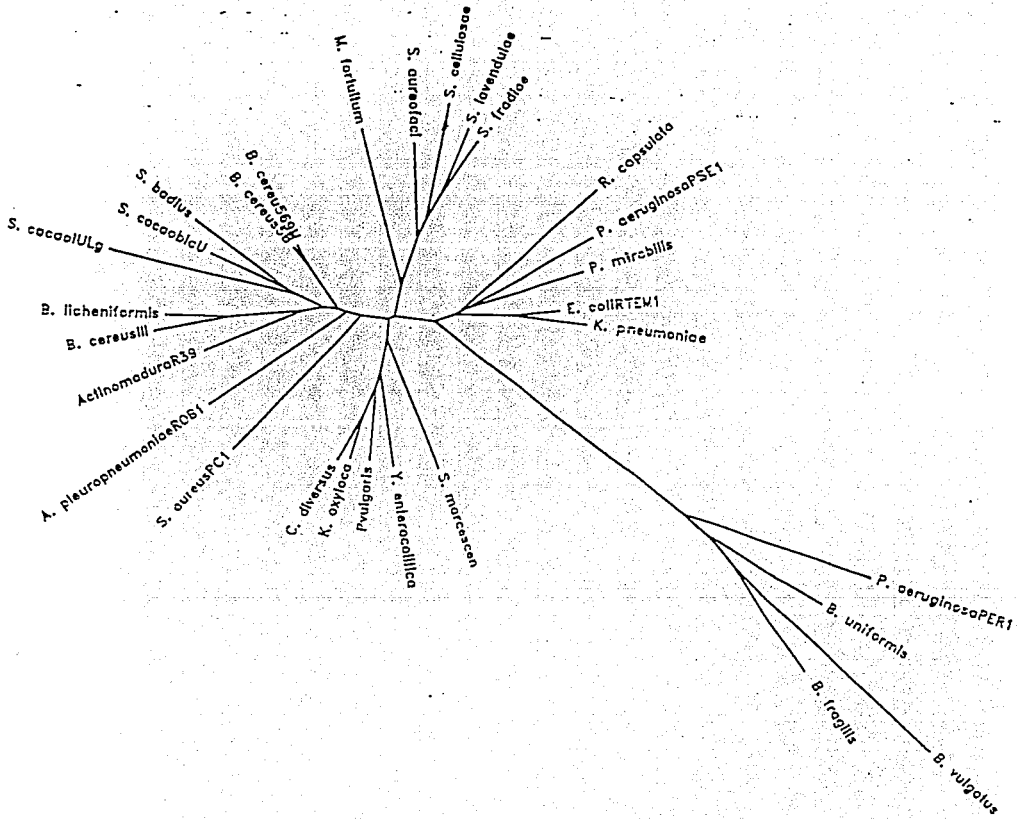
Stemmer, W. P. C. (1994a) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-51.

Studier, F. W. y Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-30.

Viadiú, H. et al. (1995) A new TEM beta-lactamase double mutant with broadened specificity reveals substrate-dependent functional interactions. *J. Biol. Chem.* 270: 781-87

Waxman, D. y Strominger, J. (1983) Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 825-59.

# Apéndice A



Ecoli	.....	.....	MSIQHF	RVALIPFFAA	FCLPVFA.HP	ETLVKVKDA.	...EDQLGAR
Kpneumonia	.....	.....	MRYV	RLCVISLLAT	LPLVVYA.GP	QPLEQIKQS.	...ESQLSGR
Pmirabilis	.....	.....	M	NVRQHKASFF	SVVITFLCLT	LSLNANA.TD	SVLEAVTNA.
PaerugPSE1	.....	.....	.....	MKFLLAFFSL	IPSVVFA.SS	SKPQQVEQDV	KATEVLSAR
Rcapsulata	.....	.....	.....	MRFTATVL	SRVATGLALG	LSMATASLAE	TPVEALSETV
Sfradiae	.....	.....	MDRTTARPNR	RAVLATGVG.	...AALAATA	AAAGPAHAAP	GRGARVEGRL
Slavendula	.....	.....	MGTTGARPSR	RAVLTAAG.	...AAVAGIP	LGGSTAFAP	RGNDPVLRL
Saureofaci	.....	.....	.....	.....	.....	AYASTTAKA	PAAEGISGRL
Scellulosa	.....	.....	MRKPTSSLTR	RSVLGAGLGL	GGALALGSTT	ASAASAGTTP	SENPAAVRRL
Mfortuitum	.....	.....	MTGLSR	RNVLIGSL.	...VAAAA	VGAGVGAAP	AFAAPIDDQL
Sbadius	MHHPVRTAV	AGLVAVLSLV	PLAACQSDS	TAPPSSAKPA	TSASASLRP	...KPYTGDF	KKLEREFDAR
ScacaoblaU	.....	.....	QESS	ADAAEPAGSA	PSSSAAAHKP	GEVEPYAAEL	KALEDEFDVR
Bcereu569H	.....	.....	.....	.....	.....	KHKNQATHK	E.....F
Bcereus5B	.....	.....	.....	.....	.....	KHKNQATHK	E.....F
Blichenif	MKLWFS	TLKPKAAAV	LLFSCVALAG	CANNQTNASQ	PAEKNEKTEM	KDD.....F	AKLEEQFDAQ
BcereusIII	MFVLNKFFT	NSHYKKIVPV	VLLSCATLIG	CSNSNTQSES	NKQTNQTNQV	KQENKRNHAF	AKLEKEYNAK
ActinoR39	MLFP	TARRTGFAAL	AALALVPAAA	CSGSAAPAEA	EPASAEVTAE	DLSG...EF	ERLESEFDAR
ScacaouiULg	MRIRPTR	RLLLGAVAPL	ALVPLVACGQ	ASGSESGQP	GLGGCGTSAH	GSADAHEKEF	RALEKKFDAH
ApleurROB1	MLNKLKIGTL	LLLTLTACSP	NSVHSVTSNP	QPASAPVQOS	ATQATFQOTL	ANLEQQYQAR	
Cdiversus	.....	.....	M	FKKRGQTVL	I.AAVLAFFT	ASSPLLARTQ	GEPTQVQKQL
Koxytoca	.....	.....	M	LKSSWRKTAL	MAAAAVPLLL	ASGSLWASAD	A...IQKQL
Pvulgaris	.....	.....	.....	.....	.....	.....	NTNNTIEEQL
Yentero	.....	.....	M	KHSSLRRSL	LAGITLPLV.	SFALPAWAN	ALPASVDKQL
Smarcescen	.....	.....	MSNKVNFK	TASFLFSVCL	ALSAPNAHAN	KSDAA.AKQI	KKLEEDFDGR
SaureusPC1	.....	.....	.....	LKKLIPL	IVIALVLSAC	NSNSGHAKEL	NLEKKYNAH
consenso	-----f-	ml--t-ia-m	-llsl-al-l	-aaaal--la	asas--atap	-e-eaveqel	aalekfedar
Bfragilis	.....	.....	MQRRLIHS	IIFLLCP.	...ALVV.	AQNSPLETQL	KKATIEGKAE
Buniformis	.....	.....	MKAYFIA	ILTLFTCI.	...ATVVRA	QQMSELENRI	DSLNGKAT
PaerugPER1	.....	.....	M	NVIKAVVTA	STLLMVSF.	...SSFETS	AQSPLLKEQI
Bvulgatus	.....	.....	MEKNRKKQ	IVVLSIALVC	IFILVFSLFH	KSATKDSANP	PLTNVLTDSI
consenso	-----f-	mll---a-m	-lvllaal-l	iaal-l-lla	asasa-a-ap	a--eave-ql	aalekfedar

*Ecoli* VGYIELDLNS GKILESRPE ERFPMSTFK VLLCGAVLSR V..... DAGQEQLGRR IHYSQNDLV.  
*Kpneumonia* VGMVEMDLAN GRTLAAWRAD ERFPMVSTFK VLLCGAVLAR V..... DAGLEQLDRR IHYRQQDLV.  
*Pmirabilis* IGLAAHDLT GKRWE.HKSN ERFPLSSTFK TLACANVLQR V..... DLGKERIDRV VRFSESNLV.  
*PaerugPSE1* IGVSVLDTQN GEYWD.YNGN QRFPLTSTFK TIACAKLLYD A..... EOGKVNPNST VEIKKADLV.  
*Rcapsulata* VGLSLMETGT GWSW.SHRED ELFLMNSTVK VPVCGALLAR W..... DAGRLSLSDA LPVRKADLV.  
*Sfradiiae* LGAFAYDTGT GRTV.AYRAD ERFPIASMFK TIAVAAVLRD L..... DRDGEVLARR VHYTADYVKR  
*Slavendula* LGVYARDTAT GRTV.LHRAE ERFPMCSVFK TLAVAVALRD L..... DRDGEFLATR LPHYTEQEVKD  
*Saureofaci* LGVFALDTGT GAGR.SYRAG ERFPMCSVFK ALAAAAVLRD V..... DARREFLTKR IHYTEKFKVD  
*Scellulosa* IGVFALNLAT GASL.LHRAH ELFLPMCSVFK TLAAAAVLRD L..... DHGSQLARV IRYTEADVTK  
*Mfortuitum* IGLYAANLQS GRRI.THRLD EMFAMCSTFK GYAAARVLQM A..... EHGEISLDNR VFVDADALVP  
*Sbadius* LGVYAITDGT GREV.THNDR ARFAYHSTFK ALQAAVVLST..... YSLDGLDKR VTYTREDLV.  
*ScacaoblaU* LGVYAVDTGS GREV.AYRDG ERFVYNSTFK ALECGAVLKD..... IITDREMDRV VKYSEDDL.V  
*Bcereu569H* LGVYAITDGT NQTI.SYRPN ERFAPASTYK ALAAGVLLQ..... NSIDSLNEV ITYTKEDLV.  
*Bcereus5B* LGVYAITDGT NQTI.AYRPN ERFAPASTYK ALAAGVLLQ..... NSTKKLDEV ITYTKEDLV.  
*Blichenif* LGIFALDTGT NRTV.AYRPD ERFAPASTIK ALTVGVLLQ..... KSIDLNQR ITYTRDDL.V  
*BcereusIII* LGIYALDTST NQTV.AYHAD DRFAPASTSK SLAVGALLRQ..... NSIEALDER ITYTRKDL.S  
*ActinoR39* LGVYAVDTGT GEEV.FHRAD ERFYASTHK AFTAALVLQ..... NTPPEELVV VTYTEEDLV.  
*ScacaouiUG* PGVYAITDRD GQEI.THRAD ERFAYGSTFK ALQAGAILAQ VLRDGREVRR GAADGMDRV VHYQDAIL.  
*ApleurROB1* IGVYVWDTET GHSL.SYRAD ERFAYASTFK ALLAGAVLQS L..... PEKDLNRT ISYSQKDLV.  
*Cdiversus* LGVALINTAD RSQI.LYRGD ERFAMCSTSK TMVAAAALVKQ S..... ETQHDILQK MVIKKADLT.  
*Koxytoca* LGVALINTAD DSQT.LYRGD ERFAMCSTGK VMAAAAALVKQ S..... ESNPEVVNKR LEIKKSDLV.  
*Pvulgaris* LGVALINTED NSQI.TYRGE ERFAMASTSK VMAVAAILKE S..... EKQAGLLDKN IITKSDLV.  
*Yentero* LGVAMINTGN GTKI.LYRAA QRFPPCSTFK FMLAAAVLDQ S..... QSQPPLLKHK INYHESDLL.  
*Smarcescen* IGVFAIDTGS GNTF.GYRSD ERFPLCSSFK GFLAAAVLER V..... QQKKLDINQK VKYESRDL.E  
*SaureusPC1* IGVYALDTKS GKEV.KFNSD KRFAYASTSK AINSAILLEQ V..... PYNKLNKK VHINKDDIV.  
*consenso* LGVYaidtgt grtve-yrad erfFamaStfk alaaaavLqg v----- dag-edld-r i-ytkddlvp  
  
*Bfragilis* IGIAVI.IDG QDTI.TVNN D IHYPMMSVFK FHQALALADY M..... HHQKQPLETR LLIKKSDLKP  
*Buniformis* VGIAVW.TDK GDML.RYNDH VHFPLLSVFK FHVALAVLKD M..... DKQSIISLDSI VSIKASQMP  
*PaerugPER1* VGVAVWGPDD LEPL.LINPF EKFPMQSVFK LHLAMLVLHQ V..... DQKGLDLNQT VIVNRAKVLQ  
*Bvulgatus* IGVAVI.VNN RDTV.KVNNK SVYPMMSVFK VHQALALCND F..... DNKGISLDTL VNINRDKLDP  
*consenso* -GVyaidtgt grtvvelyrad erfpmastfk alaaaav1-q v----- d-gkedld-r v-ytkddlvp



<i>Ecoli</i>	.EYSPVTE.K	HLT.DGMTVR	ELCSAAITMS	DNTAANLLLT	.TIGGPKELT	AFLHNMG.DH	VTRLDRWEPE
<i>Kpneumonia</i>	.DYSPVSE.K	HLV.DGMTIG	ELCAAATLS	DNSAGNLLLA	.TVGGPAGLT	AFLRQIG.DN	VTRLDRWETA
<i>Pmirabilis</i>	.TYSPVTE.K	HVGRKGMGLA	ELCQATLSTE	DNSAANFILO	.ATGGPKALT	KFLRSIG.DD	TTRLDRWEPE
<i>PaerugPSE1</i>	.TYSPVIE.K	QVG.QAIFLD	DACFATMTTS	DNTAANIILS	.AVGGPKGVT	DFLRQIG.DK	ETRLDRIEPE
<i>Rcapsulata</i>	.PYAPVTE.T	RVG.GNMTLD	ELCLAADMS	DNVAANILIG	.HLGGPEAVT	QFFRSVG.DP	TSRLDRIEPE
<i>Sfradiae</i>	.SGYSPVTGLP	ENVANGMTVA	ELCEATLTRS	DNTAANLLLR	.DLGGPTAVT	RFCRSVG.DH	VTRLDRWEPE
<i>Slavendula</i>	.SGFGPVTGLP	ENLAAGMTVE	RLCAAACQS	DNAANLLLR	.ELGGPEAVT	RFCRSVG.DR	TTRLDRWEPE
<i>Saureofaci</i>	.AGYIPVTGKP	ENIAGGMTGA	ELCAAAVSES	DNGAGNLLLR	.ELDGP TGIT	RFCRSLG.DT	TTRLDRWEPE
<i>Scellulosa</i>	.SCHAPVT.K	DHIDTGMTIR	DLCDATIRYS	DNCAANLLLR	.ELGGPTAVT	RFCRSVG.DP	VTRLDRWEPE
<i>Mfortuitum</i>	.N.SPVTPEAR	A.GAEMTLA	ELCQAALQRS	DNTAANLLLR	.TIGGPAAVT	AFARSVG.DE	RTRLDRWEPE
<i>Sbadius</i>	.AHSPVTE..	KHVDTGMTLK	ELCDASVRS	DNTAANLLFD	.PRAAGPKGLD	ASLEKLG.DD	ITRMDREEPE
<i>ScacaoblaU</i>	.DNVSPVTE..	KHVEDGMTLT	ALCDAAVRS	DNTAANLLFE	.T.VGGPKGLD	KTLEGLG.DH	VTRMERVEPE
<i>Bcereu569H</i>	.DYSPVTE..	KHVDTCMGLG	EIAEAAVRSS	DNTAGNILFN	.KIGGPKGYE	KALRHMG.DR	ITMSNRFETE
<i>Bcereus5B</i>	.DYSPVTE..	KHVDTCMGLG	EIAEAAVRYS	DNTAGNILFH	.KIGGPKGYE	KALRRMG.DR	VTMSDRFEPE
<i>Blichenif</i>	.NYPNITE..	KHVDTCMGLK	ELADASLRS	DNAQNLLIK	.QIGGPESLK	KELRKIG.DD	VTNPERFEPE
<i>BcereusIII</i>	.NYPNITE..	KHVDTCMGLK	ELADASVRS	DSTAHNLILK	.KLGGPSAFE	KILREMG.DT	VTNSERFEPE
<i>ActinoR39</i>	.DYSPITE..	QHVDTCMTLL	EVADA AVRHS	DNTAANLLFE	.ELGGPEGFE	EDMRELG.DD	VISADRIETE
<i>ScacaouiUg</i>	.PNSPVTE..	KHVADGMSLR	ELCDAVVAYS	DNTAANLLFD	.QLGGRRGST	RVLKQLG.DH	TTSMDRYEQE
<i>ApleurROB1</i>	.SYSPETQ..	KYVVGKMTIA	QLCEAAVRFS	DNSATNLLLK	.ELGGVEQYQ	RILRQLG.DN	VHTNRLEPE
<i>Cdiversus</i>	.NWNPVTE..	KYVDKEMTLA	ELSAATLQYS	DNTAMNKLE	.HLGGTSNVT	AFARSIG.DT	TFRDRKEPE
<i>Koxytoca</i>	.VMSPITE..	KHLQSGMTLA	ELSAALQYS	DNTAMNKMS	.YLGGPVKVT	AFARSIG.DV	TFRDRTEPE
<i>Pvulgaris</i>	.AYSPITE..	KHLATGMSLA	QLSAATLQYS	DNTAMNKILD	.YLGGPVKVT	QFARSIG.DV	TYRLDRKEPE
<i>Yentero</i>	.SYAPITR..	KNLAHGMTVS	ELCAATIQYS	DNTAANLLIK	.ELGGLAAVN	QFARSIG.DQ	MFRDRWEPE
<i>Smarcescen</i>	.YHSPITT..	KYKSGGMTLG	DMASAALQYS	DNGATNIIME	.RFLGGPEGMT	KFMRSIG.DN	EFRDRWELE
<i>SaureusPC1</i>	.AYSPILE..	KYVVKDITLK	ALIEASMTYS	DNTAMNKIIK	.EIGGIKKVK	QRLKELG.DK	VTNPVRYEIE
<i>consenso</i>	.sdysPvteIk	khvdtgmtla	elcdaavrys	DntAanille	-.elgGpKgvT	kflrsig.Dd	vtrldRwEpe
<i>Bfragilis</i>	.DTYSPLRETY	PQGGIEMSA	DLLKYTLQSS	DNNACDILFN	.YQGGPDAVN	KYLHSLGIR.	ECAVIHTEND
<i>Buniformis</i>	.NTYSPLRKKF	PDQDFTITLR	ELMQYSISQS	DNNACDILIE	.YAGGIKHIN	DYIHRLSID.	SFNLSETEDG
<i>PaerugPER1</i>	.NTWAPIMKAY	QGDEFSPVPQ	QLLYQSVSHS	DNVACDLLFE	.LVGGPAALH	DYIQSMGIK.	ETAVVANAEO
<i>Bvulgatus</i>	.KTVSPMLKDY	SGPVISLTVR	DLRYTYLQSS	DNNASNLMFK	.DMVNAQTD	SFIATLIPRS	SFQIAYTEEE
<i>consenso</i>	-.ysPvte-k	khvdtgmtla	elcdaavrys	DntAanille	-.elggpk-vt	kflrsigidd	vtrldrwEpe

Ecoli	LNEAIPNDER	DTTTPAAMAT	TLRKLITGE.	...LLTLASR	QQLIDWMEAD	KVAGPLLRSA	L..PAGWFIA
Kpneumonia	LNEALPGDAR	DTTTPASMAA	TLRKLITQA.	...HLSARSQ	QQLLQWVDD	RVAGPLIRAV	L..PPGWFIA
Pmirabilis	LNEAVPGDKR	DTTTPIAMVT	TLEKLLIDE.	...TLSIKSR	QQLSWLKGK	EVGDALFRKG	V..PSDWIVA
PaerugPSE1	LNEGKLGDLR	DTTTPKAIAS	TLNKPLFGS.	...ALSEMNO	KKLESWMVNN	QVTGNLLRSV	L..PAGWNIA
Rcapsulata	LNDPAGSDE	DTTSPAAMSE	TLRALLGD.	...VLSPEAR	GKLAEWMRHG	GVTGALLRAE	A..EDAWLIL
Sfradiae	LNSAEPGRVT	DTTSPRAIGR	TYGRLLTGD.	...LLAAHDR	ERLTRWMLDN	RTSDERFRKG	L..PADWLLA
Slavendula	LNSAEPGRLT	DTTTPRAIGA	TYGELVLGD.	...ALAPRDR	ERLTGWLLAN	TTSTERFRKG	L..PADWTLG
Saureofaci	LNSAEPDRVT	DTTSPCAIGR	TFGRLLVGS.	...ALRAGDR	KRLTGWLVAN	TTNRPTFRAG	L..PDDWVLA
Scellulosa	LNSGEPDRRT	DTTSPYAIAR	TYQRLVLGN.	...ALNRPDR	ALLTDWLLRN	TTTLTTFRTG	L..PKQWTVV
Mfortuitum	LNSAIPGDPR	DTSTAALAV	GYRAILAGD.	...ALSPPQR	GLLEDWMRAN	QTS..SMRAC	L..PEGWTTA
Sbadius	LSRWVPGEKR	DTSTPRALAE	DLRAFVLGK.	...ALRAPER	AQLTTWLRTN	TTGDAVIRAG	V..PENWVVG
ScacaoblaU	LSRWEPGSKR	DTSTPRAFAK	DLRAYVLGD.	...VLAEGDR	KQLTTWLRNN	TTGDGLIRAG	V..RQGWVVG
Bcereu569H	LNEAIPGDIR	DTSTAKAIAT	NLKAFIVGN.	...ALPAEKR	KILTEWMKGN	ATGDKLIRAG	I..PTDWVVG
Bcereus5B	LNEAIPGDIR	DTSTAKAIAR	NLKDFIVGN.	...ALPHQKR	NILTEWMKGN	ATGDKLIRAG	V..PTDWVDA
Blichenif	LNEVNPGETQ	DTSTARALVT	SLRAFALGD.	...KLPSEKR	ELLIDWMKRN	TTGDALIRAG	V..PDGWEVA
BcereusIII	LNEVNPGETH	DTSTPKAIAK	TLQSFTLGT.	...VLPSEKR	ELLVDWMKRN	TTGDKLIRAG	V..PRGWEVA
ActinoR39	LNEVPPGETR	DTSTPRAMAG	SLEAFVLGD.	...VLEEGPR	DVLTEMLLNN	TTGDELIRAG	V..PEDWRVG
ScacaouiUlg	LGSVPGDPR	DTSTPRAFAE	DLRAFAVEDG	EKAALAPNDR	EQLNDWMSGS	RTGDALIRAG	V..PKDWKVE
ApleurROB1	LNOAKPNDIR	DTSTPKQMAM	NLNAYLLGN.	...TLTESQK	TILWNWLDNN	ATGNPLIRAA	T..PTSWKVY
Cdiversus	LNTAIPGDER	DTTGPLAMAK	SLHKLTLGD.	...ALAGAQR	AQLVEWLKGN	TTGGQSIRAG	L..PEGWVVG
Koxytoca	LNSAIPGDKR	DTTTPLAMAE	SLRKLTLGN.	...ALGEQQR	AQLVTWLKGN	TTGGQSIRAG	L..PASWAVG
Pvulgaris	LNTAIPGDER	DTTSPIAMAK	SLQALTLGD.	...ALGQSQR	QQLVTWLKGN	TTGDHSIKAG	L..PKHWIVG
Yentero	LNTARPNDPR	DTTTPAAMAA	SMNKLVLGD.	...ALRPAQR	SQLAVWLKGN	TTGDATIRAG	A..PTDWIVG
Smarcescen	LNTAIPGDKR	DTSTPKAVAN	SLNKALGN.	...VLNAKVK	AIYQNWLKGN	TTGDARIRAS	V..PADWVVG
SaureusPC1	LNYYSPKSKK	DTSTPAAFGK	TLNKLIANG.	...KLSKENK	KFLLDLMLNN	KSGDTLIKDG	V..PKDYKVA
consenso	lneaipgdkr	dtttpramak	tlralvlgd-	---aLsaedr	egltcdwlkgn	ttgdalirag	l--pedwvva
Bfragilis	MHKNLEFCYQ	NWTTPLAAAK	LLEIFRNL	F...DKEYK	NFIYQTMVEC	QTGDRLIAP	LLDK.KVTMG
Buniformis	MHSSPEAVYR	NWSTPSAMVR	LLRTADEKEL	FS...NKEK	DFLWQTMIDT	ETGANKLKG	MLPK.KTVVG
PaerugPER1	MHADQVQYQ	NWTSMKGAAE	ILKKFEQKTO	LS...ETS.Q	ALLWKMMVET	TTGPERLKG	LLPA.GTVVA
Bvulgatus	MSADHNKAYS	NYTSPGAAAM	LMNRLFTEGL	I...DDEKO	SFIKNTLKEC	KTGVDRIAAP	LLDKEGVVIA
consenso	lneaipgdkr	dtttp-amak	trl-lvlgd1	fs-aLs-edr	egltcdwmkgn	ttgdalirag	ll-pe-wvva

Ecoli DKSAG... .E.RGSRGII AALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDE..RNRQIAEIGASLIKHW.....  
 Kpneumonia DKTGAG... .E.RGARGIV ALLGPDGKPERIVVIYLRDTPASMAE..RNQHIAGIGQR.....  
 Pmirabilis DRTGAG... .G.YGSRAIT AVMWPPNRKPIVAALYITETDASFE..RNAVIKIGEGIAKTIATVLMENSRN..  
 PaerugPSE1 DRSGAG... .G.FGARSIT AVVWSEHQAPIIVSIYLAQTQASMAE..RNDAIVKIGHSIFDVYTSQSR....  
 Rcapsulata DKSGSG... .S.HT.RNLV AVIQPEGGAPWIATMFIISDTDAEFEV..RNEALKDLGRAVVAVVRE.....  
 Sfradiae DKTGGC... .D.YGTNDA GVAWPPG.RPPVVLAVQT.TRFT.PDAEADNVLVAEAAALLAEAMTD.....  
 Slavendula DKTGGG... .A.YGTNDA GVTWPPH.RPPVMVVL.THDR.PDAVADNPLVAKTAALLASALG.....  
 Saureofaci DKTGGG... .EQYGVANDV GVVQPPG.RAPLVLSVLS.TKFD.PKGPTDNPLVAKAALVAGELT.....  
 Scellulosa DKSGGG... .DTYGRNEA AIAWTPD.GAPVLLTALT.HKPSLPTAPGDTPLIILATVLSAVAPA.....  
 Mfortuitum DKTGSG... .D.YGSTNDA GIAFGPD.QRLLLVMMTRSQAHDPKAENLRPLIGELTALVPSLL.....  
 Sbadius DKTGTG... .SYYGARNDI AVVWPPD.SAPIVIAILSHRGTK..DAEPDELIAEAAASVVVDSLSS.....  
 ScacaoblaU DKTGTG... .SYYGARNDM AVVWRPD.GRPLVLNVMVHGHTK..DAELDELITARATEVVADRLG.....  
 Bcereu569H DKSGAG... .S.YGTRNDI AVVWPPN.SAPIIV.LISSKDEK..EAIYNDQLIAEATKVIVKGS.....  
 Bcereus5B DKSGAG... .S.YGTRNDI AIVWPPN.RSPIIIAILSSKDEK..EATYDNLIKEAAEVVIDAIK.....  
 Blichenif DKTGAA... .S.YGTRNDI AIIWPPK.GDPVVLAVLSSRDKK..DAKYDDKLI AEATKVVMKALNMNGK.....  
 BcereusIII DKTGAG... .S.YGTRNDI AIIWPPN.KKPIVLSILSNHDK..DAEYDDTLIADATKIVLETLKVTKN.....  
 ActinoR39 DKTGGC... .S.HGSRNDI AVVWPE.DDPIVIAVMSTREQE..DAEPNAILVSGATEVVVEAIAP.....  
 ScacaouLg DKSGQV... .K.YGTRNDI AVVRPPG.RAPIVSVMSHGDTQ..DAEPHDELVAEAGLVVADGLK.....  
 ApleurROB1 DKSGAG... .K.YGVRNDI AVVRIPN.RKPIVMAIMSTQFTE..EAKFNKLVEDAQAQVPHLQLN.....  
 Cdiversus DKTGA... .GDYGTNDI AVIWPED.RAPLILVYFTQPQQ..DAKGRKDILAAAIAKIVTEGL.....  
 Koxytoca DKTGA... .GDYGTNDI AVIWPEN.HAPLVLVYFTQPQQ..DAKSRKEVLAAAIAKIVTEGL.....  
 Pvulgaris DKTGS... .GDYGTNDI AVIWPKN.HAPLILVYFTQEEQ..DAKYRKDIIVKATEIVTKESNTSOKK...  
 Yentero DKTGS... .GDYGTNDI AVLWPTK.GAPIVLVVYFTQREK..DAKPRRDVLAASVTKIILSQIS.....  
 Smarcescen DKTGSC... .GAIGTANDY AVIWPKN.RAPLIVSIYTTTRKSK..DDKHSDKTIAEASRIAIAQID.....  
 SaureusPc1 DKSGQA... .ITYASRNDV AFVYPKGQSEPIVLVIFTNKDNK..SDKPNDKLISETAKSVKKEF.....  
 consenso DktGag----sdygtrndi avvwppn-rapivlvvsttdakmpdkydneliaeaaakvv-eal-m---k---  
  
 Bfragilis HKTGTGDRNA KQQQIGCNDI GFILLPDGHAYSIAVFKDSEADNREN..SEIIAEISRIVYEYVTQOID....  
 Buniformis HKTGSSDRNA DGMKTADNDA GLVILPDGRKYIIA AFVMDSETDEDN..ANIARISRMVYDAMR.....  
 PaerugPER1 HKTGTSGIKA .GKTAATNDL GIILLPDGRPLLAVFVKDSAESRNTN..EAIQAQVAQYAYQFELKLSALS PN  
 Bvulgatus HKTGSGYVNE NGVLAHNDV AYICLPNNISYTLAVFVKDFPKGNKSA..SQYVAHISAVYVSLLMQTSVKS...  
 consenso dktGagd-na-gdygtrndi avvwpp-grapivlvvls-td-kmpdkydneliaeaaakvveal-mts-k---