

37  
217



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DESARROLLO DE UNA TECNICA DE MUTAGENESIS  
DIRIGIDA Y A SATURACION USANDO COMO MODELO LA  
B-LACTAMASA DE Escherichia coli**

**TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A  
ERNESTO COTA SEGURA**

MEXICO, D. F.

1992

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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	
Resumen	1
Introducción	
1) Ingeniería de proteínas.	
a) Características.	2
b) Aplicaciones actuales en la investigación básica, clínica y en la industria.	3
c) Técnicas de mutagénesis.	5
i) Mutagénesis localizada.	5
ii) Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos.	6
iii) Mutagénesis dirigida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	8
2) $\beta$ -lactamasas.	
a) Contexto biológico.	11
i) Antibióticos $\beta$ -lactámicos y proteínas unidoras de penicilinas.	11
ii) $\beta$ -lactamasas.	15
b) Utilidad de estas enzimas como modelo en ingeniería de proteínas.	17
Antecedentes y Objetivos	27
Materiales y Métodos	
1) Cepas bacterianas y plásmidos. Medios de cultivo.	29
2) Extracción de plásmidos.	31
3) Electroforesis en gel.	32
4) Transformación.	33
5) Digestión de DNA con enzimas de restricción.	34
6) Mutagénesis dirigida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	35
7) Clonación de los fragmentos mutantes.	36
8) Caracterización <i>in vivo</i> de los genotipos mutantes.	37
9) Secuenciación.	37
Resultados	40
Discusión y Conclusiones	45
Referencias	49

## Resumen

Se describe la implementación de un método de mutagénesis con el cual es posible sustituir un residuo determinado en una proteína por las 19 variedades restantes. Este método es una modificación al descrito por Nelson y Long (22). Tomando como modelo la B-lactamasa de *E. coli*, se obtuvieron 24 mutantes de la posición 37 (ácido glutámico) aisladas a partir de diferencias de actividad *in vivo* en comparación con la enzima silvestre. En las regiones secuenciadas se encontraron cambios puntuales que en algunos casos pueden afectar al fenotipo producido por la sustitución en el Glu37. También se obtuvieron secuencias en las que no se incorporó la mutación deseada. Se discuten nuevas opciones para mejorar el rendimiento de este tipo de mutagénesis así como las implicaciones de los cambios generados en un contexto estructural.

## Introducción

### 1) Ingeniería de proteínas.

#### a) Características.

#### b) Aplicaciones actuales en investigación básica, clínica e industria.

#### c) Técnicas de mutagénesis.

#### a) Características.

La ingeniería de proteínas es un conjunto de métodos teóricos y experimentales utilizados para modificar y rediseñar polipéptidos. Se deriva principalmente de los avances iniciados en los setentas con el surgimiento de la tecnología del DNA recombinante (rDNA). En esta disciplina se trata de obtener funciones novedosas o mejoradas con la modificación de proteínas aisladas de algún organismo o a partir de péptidos generados *in vitro*. Asimismo, se trata de comprender la interacción que existe entre los aspectos bioquímicos y la estructura de las proteínas. Ulmer (1), describe las propiedades que sería deseable controlar de manera predictiva con el uso de estas técnicas: a) la constante catalítica ( $K_{cat}$ ) y la constante de Michaelis ( $K_M$ ) para un sustrato particular, b) termoestabilidad y temperatura óptima, c) estabilidad y actividad en solventes no acuosos, d) especificidad de reacción y de sustratos, e) requerimiento de cofactores, f) optimización del pH, g) resistencia a proteasas, h) regulación alostérica, i) estructura de subunidades y peso molecular, etc. Según Leatherbarrow y Fersht (2), ya existen ejemplos de modificación hacia cada una de las propiedades enumeradas. En el siguiente inciso se mencionarán algunas de ellas.

El desarrollo de esta disciplina depende del avance de distintas áreas relacionadas: la tecnología del rDNA es a la fecha su principal base metodológica. Continuamente se reportan nuevas técnicas para el aislamiento, expresión y modificación de genes que codifican polipéptidos. Los métodos computacionales (bases de datos para estudios de análisis de secuencia, gráfica molecular, etc.) han sido de gran ayuda para identificar patrones de secuencia ligados a funciones o estructuras conservadas, para modelar cambios en proteínas de estructura conocida, identificar las perturbaciones producidas por estos cambios, etc. A largo plazo, su principal objetivo es la creación de algoritmos para predecir las estructuras tridimensionales que pueden adoptar polipéptidos dados. La resolución de cálculos de este tipo

involucra también la utilización de las computadoras más veloces disponibles; de otro modo, muchos de ellos no se efectuarían en tiempos razonables. Los métodos estructurales (cristalografía de rayos X, NMR, dicroísmo circular) son actualmente la única alternativa para la determinación de estructuras. Sin embargo, el costo y tiempo que requieren limita la generación de información estructural. Se espera que en un futuro próximo, el modelamiento por computadora sea suficiente para describir una estructura realista de un polipéptido, con ayuda de proteínas homólogas de estructura resuelta. Por último, la ingeniería de proteínas se sustenta en los métodos de enzimología, con los que ha sido posible caracterizar bioquímicamente las variantes obtenidas. En este campo se han creado distintos métodos de extracción y purificación de enzimas así como un gran número de sustratos sintéticos para facilitar la detección de actividades enzimáticas.

Los beneficios a corto y mediano plazo de esta tecnología incipiente son múltiples. De ésta puede surgir una nueva generación de fármacos, vacunas y otras proteínas de interés clínico e industrial.

#### b) Aplicaciones actuales en la investigación básica, clínica e industria.

A continuación se mencionan algunos casos sobresalientes de modelos cuyas propiedades funcionales han sido implementadas para aplicaciones específicas.

**TPA.** El TPA, o activador del plasminógeno tisular, forma parte del sistema enzimático de la sangre que es responsable de disolver la fibrina en coágulos sanguíneos. Produce plasmina a partir de la proteólisis limitada del plasminógeno. A su vez, la plasmina degrada la red de fibrina que se forma en coágulos, liberando productos solubles. Sin embargo, la actividad del TPA es limitada por el PAI-1, inhibidor que se une a su sitio activo. Se ha descrito (3) la modificación de esta proteasa hacia una variante que conserva sus funciones catalíticas y no es inactivada por dicho inhibidor. A esta mutante le han sido deletados siete aminoácidos que forman parte de un asa que interactúa con el PAI-1. Puesto que no existe una estructura cristalográfica del TPA, el diseño de esta modificación se dió a partir de un complejo homólogo de estructura conocida: la tripsina y el inhibidor de tripsina de páncreas de bovino. Como es de esperar, esta variante de TPA puede ser un sustituto eficaz de la forma silvestre

en el tratamiento de afecciones vasculares.

**LDH.** La lactato deshidrogenasa (LDH) y la malato deshidrogenasa (MDH) son enzimas homólogas (relacionadas a nivel de secuencia y de estructura) que catalizan reacciones similares: reducen al piruvato y oxaloacetato para formar lactato y malato, respectivamente. Ambas utilizan NADH como donador de protones. A partir de esta similitud, Wilks et al. (4) han descrito un enfoque para dar a una proteína modelo nuevas propiedades funcionales. En este caso, se busca una variante de LDH que pierda su afinidad hacia el lactato y que catalice la formación del malato como lo hace la MDH. Como primer paso, identifican los residuos involucrados en la unión y catálisis de sustratos en cada enzima. Con esto determinan cuáles son las sustituciones necesarias para "mimetizar" en la proteína modelo (LDH), la región que da la función observada a la proteína homóloga (MDH). Dirigen tres cambios puntuales: Asp197 a Asn, Thr246 a Gly y Gln102 a Arg. De éstos, sólo uno (Gln a Arg) fue necesario para modificar drásticamente la especificidad de la LDH hacia una mutante con actividad de malato deshidrogenasa. En condiciones estándar, la LDH normal muestra una eficiencia catalítica ( $K_{cat}/K_M$ ) de  $4.2 \times 10^6$  hacia su sustrato natural y de  $4 \times 10^3$  para el oxaloacetato. Con la mutación mencionada, esta enzima es 8400 veces más activa hacia oxaloacetato en comparación con el piruvato, o sea, tan activa como con su sustrato original. Tradicionalmente, el aislamiento de nuevas funciones enzimáticas se ha dado a partir de un monitoreo intensivo en organismos silvestres. Para estos y otros autores, una de las mejores opciones para la creación de nuevas especificidades se basa en la elección de moldes protéicos térmicamente estables, bien caracterizados, sobre los cuales diseñar las actividades deseadas. Como ejemplo, presentan un modelo en el que se ha reducido de manera significativa el tiempo y el trabajo empleados para la obtención de una nueva actividad.

**Lisozima.** Matsumura y Matthews (5) describen la inserción de nuevos puentes disulfuro como medio para regular la actividad catalítica de la lisozima del fago T4. Para esto, analizan pares de aminoácidos que puedan ser reemplazados por cisteínas para formar dichos enlaces. Simultáneamente, eliminan las cisteínas silvestres (Cys54 y 97) para evitar la formación de puentes disulfuro no deseados. Eligen dos treoninas (Thr21 y 142) que se localizan en posiciones opuestas en la parte más exterior de la cavidad del sitio activo. La actividad de la

molécula resultante depende de la no-formación del puente de disulfuro. En condiciones reductoras (puente s-s no formado) su actividad es del 70% en comparación con la enzima silvestre; sin embargo, la exposición a condiciones oxidantes induce la formación de este enlace, con lo cual la enzima queda sin actividad detectable. Este notable cambio de actividad es reversible y está asociado a un aumento en la estabilidad de la enzima. Argumentan los autores que este diseño puede ser extrapolado a otras enzimas, en especial proteasas, que requieren ser almacenadas por largos períodos de tiempo.

CHZ-1. Con base en el diseño por gráfica molecular, Hahn et al. (6) han desarrollado un péptido sintético con actividad de esterasa. Tomando como referencia la estructura cristalográfica de la quimotripsina, estos autores producen una molécula compacta formada por cuatro hélices anfipáticas que se unen covalentemente por el extremo carboxilo terminal. Al extremo opuesto (NH terminal) posicionan a los aminoácidos que en proteasas de serina forman la "triada catalítica" (Ser, His y Asp) en una conformación similar a la observada en dichas enzimas. Este péptido, denominado CHZ-1 (de "quimohelizima 1"), une substratos propios de la quimotripsina y los hidroliza a una tasa del 0.01% en comparación con dicha proteasa. Asimismo, la actividad del péptido se reduce totalmente con el uso de inhibidores específicos de la quimotripsina.

Los modelos descritos son sólo parte de una extensa lista de ejemplos de generación de nuevas funciones. Para mayor detalle, consultar las revisiones de Leatherbarrow y Fersht (2), Robson y Garnier (7) y Moody y Wilkinson (8).

### c) Técnicas de mutagénesis

En la ingeniería de proteínas se requieren modificaciones en zonas o aminoácidos específicos de una proteína. Con este propósito, se han utilizado distintos enfoques:

#### i) Mutagénesis localizada.

La exposición de un segmento aislado de DNA ante reactivos como hidroxilamina o ácido nítrico es el método más sencillo de mutagénesis localizada al azar. La clonación de este DNA en un sistema apropiado (célula huésped-vector de expresión) permite seleccionar los

cambios producidos en regiones de interés (9).

El uso de DNAs de cadena sencilla (como los bacteriófagos M13 recombinantes) mejora el rendimiento mutagénico de algunos agentes químicos (hidrazina, ácidos fórmico y nítrico, etc.). Estos agentes son capaces de modificar las bases nitrogenadas conservando intacto el esqueleto de azúcares y fosfatos. Al producir la cadena complementaria con ayuda de una polimerasa, las posiciones dañadas son apareadas con nucleótidos al azar (a diferencia del DNA de doble cadena, en el que la zona mutagenizada puede repararse *in vivo* tomando como molde la cadena complementaria). Otros reactivos (químicos y algunos análogos de nucleótidos) pueden aumentar el número de mutantes y la especificidad mutagénica al utilizarse en la síntesis *in vitro* de DNA. Estos agentes interactúan con bases en especial. El bisulfito de sodio cataliza la desaminación de la citosina a uracilo en DNA de cadena sencilla. Esto resulta en transiciones de pares C-G hacia pares T-A (10). El uso de N<sup>4</sup> hidroxí-dCTP produce transiciones del par A-T hacia el par G-C (11). El dBrUTP es incorporado por la transcriptasa reversa y produce transiciones del par T-A hacia el par G-C (12). Adicionalmente, varios autores han reportado la omisión de nucleótidos como método para producir transiciones, transversiones y mutaciones puntuales en gran cantidad (citados en la referencia 2). Dado el carácter azaroso de estas técnicas, el principal problema es la baja producción de cambios no conservativos de aminoácidos, porque en este caso es necesario mutar simultáneamente dos o hasta tres nucleótidos dentro de un mismo codón (13): al aumentar la tasa mutagénica (con mayores concentraciones del agente) se aumenta también la probabilidad de producir cambios deletéreos en la secuencia, con lo que se reduce el conjunto de cambios múltiples observables. La mutagénesis química puede ser útil para conocer el contenido informativo de secuencias cortas (como algún fragmento de una proteína) cuyas secuencias codificantes se mutagenizan intensivamente.

## ii) Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos

A medida que ha evolucionado la tecnología del DNA recombinante, los métodos generales de mutagénesis han sido reemplazados por formas más directas de producir estos cambios. La aportación más significativa es a través del uso de oligonucleótidos sintéticos. Desde 1978, año en el se presentan los primeros reportes de mutagénesis dirigida por oligos (14), se han

generado numerosas técnicas con este fin. Se describen a continuación algunas de las de mayor uso en la actualidad.

Como se menciona arriba, los bacteriófagos M13 de *E. coli* tienen la capacidad de producir DNA de cadena sencilla, propiedad que ha sido explotada al clonar genes de interés con el fin de facilitar su modificación. En este caso, los oligos mutantes (un cierto número de bases modificadas flanqueadas por secuencias cortas silvestres) se reasocian a la región que se desea cambiar. Posteriormente, se incuba este complejo en una reacción enzimática de polimerización y la doble cadena resultante es introducida a una célula huésped. Las mutantes se identifican al hibridar el DNA total (presente en las colonias transformantes) con el oligo utilizado para introducir la mutación. Gracias al uso de "kits" comerciales de laboratorio (en los que se incluyen los reactivos necesarios para una metodología determinada, 15), esta técnica se ha hecho reproducible y se ha difundido ampliamente. Con ella se han reportado todo tipo de mutaciones (inserciones, deleciones, sustituciones), sin embargo, en la práctica presenta dificultades para ciertas aplicaciones. El problema que se observa más comúnmente es la contaminación de las colonias transformantes con la secuencia silvestre. Esto se ha atribuido a diversas causas, entre las cuales resulta que el DNA molde se transforme como tal (cadena sencilla sin cambios que se convierte a la doble cadena *in vivo*) o a la actividad correctora en la bacteria que degrada al extremo 5' del oligo mutante, llevándose la porción modificada. Se han diseñado varias alternativas para evitar lo anterior y así incrementar el número de mutantes. El DNA de cadena sencilla puede removerse físicamente por medio de centrifugación en gradientes de densidad (16), electroforesis en geles de agarosa (17) o por medios enzimáticos con la nucleasa S1 (14). El efecto de la reparación *in vivo* puede disminuirse polimerizando con otro oligo hasta la región mutagenizada. Al ligar el DNA resultante se pierde el extremo 5' libre y se evita su reparación (18).

Mutagénesis en cassette. Como una adaptación a la metodología descrita por Matteucci y Heyneker (19), Wells et al. (20) han implementado un tipo de mutagénesis a saturación que no involucra el uso de polimerasas. Esta técnica requiere que la zona a mutagenizar este flanqueada por dos sitios de restricción cercanos entre sí. Con esto, se diseñan dos oligos mutantes complementarios que al reasociarse formen un producto similar al obtenido con la digestión del vector en esos sitios únicos. De este modo el DNA sintético puede reemplazar a la región silvestre. Como es evidente, la limitante de este enfoque es la necesidad de tener

sitos de restricción apropiados.

iii) Mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Puesto que este tipo de mutagénesis es una modificación al protocolo original de PCR (21), se describe primeramente a esta técnica (esquematzada en la Figura 1). Se utiliza para la amplificación de un fragmento de DNA que se localiza entre dos regiones de secuencia

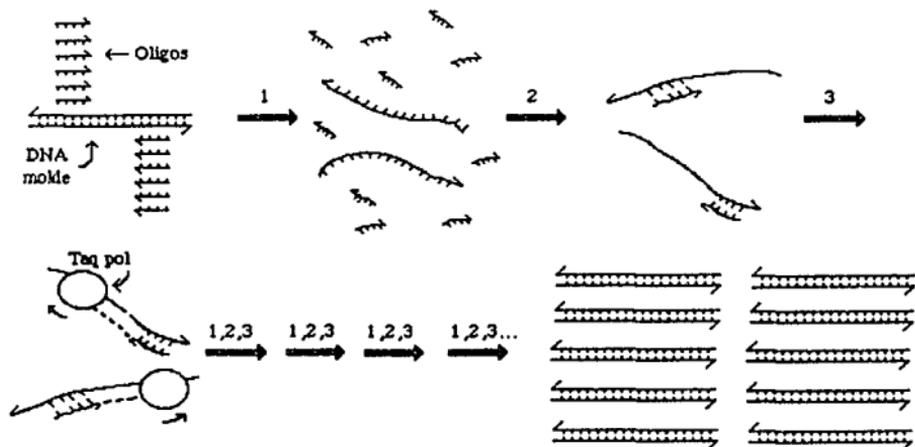


Fig. 1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica consiste en la amplificación selectiva de un segmento de DNA de extremos conocidos. Consta de tres pasos: 1) desnaturalización del DNA molde a altas temperaturas en presencia de oligonucleótidos específicos, 2) reasociación de los oligos con la región complementaria del molde. Al estar los oligos en exceso molar en relación 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 esta serie de pasos se logra la amplificación a nivel exponencial de un segmento de DNA.

Dos oligos son utilizados como primeros en una serie de reacciones catalizadas por una DNA polimerasa: a) el DNA usado como molde se desnatura incubándolo a alta temperatura con un exceso molar de los oligos complementarios a cada sus extremos. b) al disminuir la temperatura de esta mezcla, se permite la reasociación de los oligos con su secuencia blanco en el molde. c) se produce la doble cadena al extender la hebra del oligo con ayuda de una DNA polimerasa. Al repetir varias veces este ciclo de desnaturalización, reasociación y polimerización, se logra la amplificación a nivel exponencial de una muestra de DNA. Esta técnica se beneficia con el uso de DNA polimerasas termoestables (*Taq* polimerasas) que resisten cambios drásticos de temperatura de un ciclo a otro.

Sustituyen a las polimerasas convencionales (DNA pol I de *E. coli* y Klenow) que requieren ser agregadas al iniciar cada ronda de polimerización. En la técnica de mutagénesis por PCR, los oligos utilizados para amplificar al DNA son los mismos que incorporan los cambios deseados. Tiene varias ventajas sobre los métodos descritos de mutagénesis sitio-dirigida.

Al obtener el DNA mutante en cantidades casi ilimitadas, se facilita la ejecución de varias técnicas previas a su clonación (como la caracterización por medio de secuencia o por patrones de restricción cuando se han insertado nuevos sitios). También resulta más fácil la clonación misma, porque al tener estos DNAs en volúmenes grandes se evita la pérdida de muestra en los pasos preparativos. Esto también está ligado a la eficiencia de la transformación bacteriana. En la práctica, no siempre es factible mantener niveles altos de eficiencia de transformación. Como este valor está en función del número de células competentes y de la cantidad de DNA empleado, un número moderado de éstas puede ser compensado al utilizar un volumen grande de DNA, siempre y cuando éste no llegue a concentraciones saturantes. Así, el grado de optimización requerido depende de la variedad de proteínas mutantes que se espera obtener.

En la literatura se observa una infinidad de reportes sobre modificaciones por mutagénesis por PCR aplicadas a la ingeniería de proteínas (generación de sitios de restricción, sustitución de aminoácidos por cambios puntuales de nucleótidos, sustitución de uno o más codones adyacentes, etc.). Para la creación de bancos de mutantes heterogéneos, se requieren técnicas alternativas de PCR en donde los productos amplificados no contengan secuencias silvestres como contaminantes. A la fecha, una de las más efectivas es la descrita por Nelson y Long (22). En este reporte, se describe la incorporación de un cambio de citosina a guanina en el gen de la proteína S humana. De las colonias analizadas, se reporta una eficiencia del 100%

en la obtención del cambio deseado, sin observar colonias silvestres del gen original. Con el uso de cuatro oligos, permite insertar mutaciones en cualquier región de la secuencia. Otra de sus ventajas (a diferencia de otros tipos de PCR), es que al insertar la primera mutación, requiere de sólo un oligonucleótido adicional para cada nuevo cambio. De los cuatro oligos requeridos, uno de ellos porta la mutación deseada. Los tres restantes sirven para amplificar selectivamente el producto mutante. Los pasos de esta técnica se esquetizan en la Fig. 2 (ver antecedentes). Dada su versatilidad, esta es la metodología sobre la cual hemos diseñado algunas modificaciones para la adaptación de un sistema de mutagénesis a saturación, como se verá más adelante.

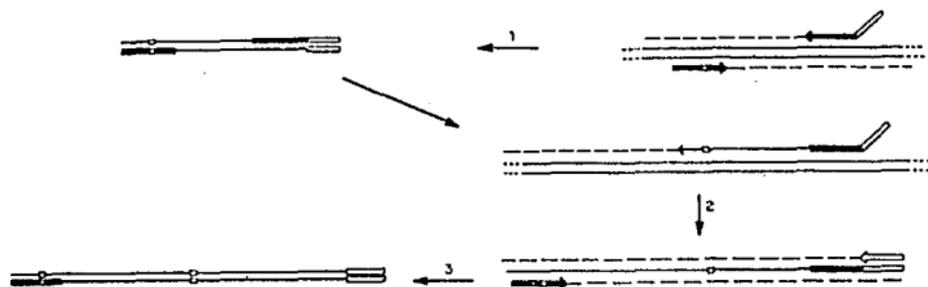


Fig. 2. Esquema del método de mutagénesis. 1) Se amplifica un fragmento del gen con el uso del oligo mutante E37III (  $\blackrightarrow$  ) que contiene la mezcla NNG/C y el oligo combinado B35 (  $\blackleftarrow$  ). Este último inicia con una región no complementaria al DNA molde (pBR322) más una región terminal que hibrida con el extremo 3' del gen por amplificar. 2) 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 primero B20 tapón (  $\blackleftarrow$  ) y el HE26 (  $\blackrightarrow$  ) amplifican selectivamente la región que flanquean, o sea, todo el gen de la  $\beta$ -lactamasa. En este último paso se asegura que los fragmentos amplificados sean todos mutantes. Las líneas discontinuas representan cadenas recién producidas por la Taq polimerasa. En esta Figura solo se presentan las cadenas relevantes producidas en la reacción.

## 2) $\beta$ -lactamasas

### a) Contexto biológico.

i) Antibióticos  $\beta$ -lactámicos y proteínas unidoras de penicilina (PBPs).

ii)  $\beta$ -lactamasas.

i) Antibióticos  $\beta$ -lactámicos y proteínas unidoras de penicilina (PBPs).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y monobactamas, Fig. 3) son compuestos antimicrobianos de gran utilidad. Desde su descubrimiento en 1929 y su uso intensivo a partir de los años cuarenta, han tenido un impacto creciente en la clínica y en el desarrollo de varios aspectos de la fisiología bacteriana. El interés que han despertado se refleja también en el número de moléculas que compone a esta familia de antibióticos. Combinando los  $\beta$ -lactámicos obtenidos de organismos silvestres con los producidos por vías semisintéticas, se tienen a la fecha más de 20,000 moléculas distintas (23).

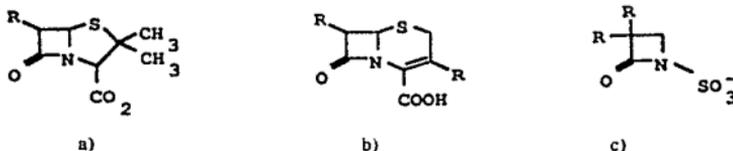


Fig. 3. Núcleo básico de a) penicilinas, b) cefalosporinas y c) monobactamas.

Su blanco es un conjunto de enzimas denominadas genéricamente proteínas unidoras de penicilina o PBPs (penicillin binding proteins). Estas enzimas catalizan las etapas terminales de la síntesis de peptidoglucanos, o sea, las moléculas sillares de la pared celular bacteriana. En las eubacterias estudiadas a la fecha, se encuentran de tres a ocho PBPs diferentes por especie (24). Las PBPs exhiben una gran diversidad en cuanto a pesos moleculares, especificidades por sustratos y por la función celular que realizan. En su mayoría son proteínas integrales de membrana, embebidas en la membrana interna (citoplásmica) de bacterias gram-negativas. La sensibilidad diferencial que muestran ante diversas  $\beta$ -lactamas sugiere la existencia de dos grandes grupos (24): uno con proteínas de bajo peso molecular

(de 40 a 50kD), que son por lo general muy sensibles a la mayoría de las penicilinas pero insensibles a las cefalosporinas. Un segundo grupo contiene a las proteínas de alto peso molecular (de 60 a 140kD) que son sensibles tanto a penicilinas como a cefalosporinas. La característica más notable de aquellas que muestran actividad catalítica es la presencia de un residuo de serina en el sitio activo y se les denomina D-D peptidasas. En la Tabla 1 se muestran las características sobresalientes de las ocho PBPs presentes en *E. coli* (25). Las moléculas sillares en la síntesis mureína son cadenas formadas por unidades alternantes

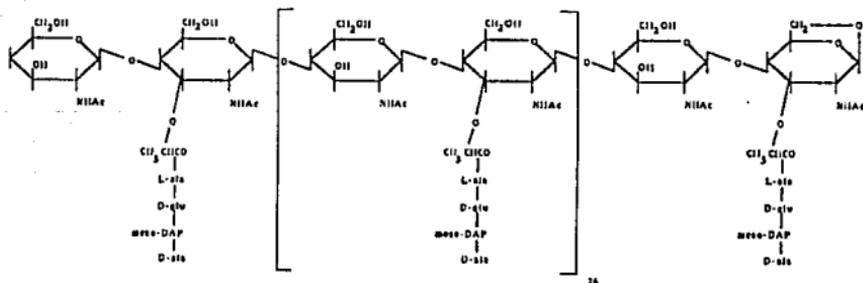


Fig. 4. Hebra lineal de mureína con una longitud promedio de 30 muropéptidos que termina en ácido 1,6-anhidromurámico. Ac: acetil; DAP: ácido diaminopimélico (tomado de Park, 25).

de N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico. El ácido N-acetil murámico está sustituido en el oxígeno del carbono 3 por un penta-peptido de L-alanina, D-glutamato, ácido meso-diaminopimélico y dos D-alaninas. Estos precursores, formados por treinta muropéptidos en promedio (Fig. 4), son los sustratos sobre los que actúan las PBPs.

Tabla 1. Propiedades de las enzimas involucradas en la síntesis de mureína en etapas terminales.\*

PBP	P.M.	moléculas/cél.	actividad enzimática conocida	posible función
1A	92,000	100	Transglucosilasa-transpeptidasa	Síntesis de mureína durante la elongación celular
1Bs	90,000	120	Transglucosilasa-transpeptidasa	Síntesis de mureína durante la elongación celular
C2+	66,000	20	Transpeptidasa	Crecimiento en forma de bastón. Elongación celular.
C3	60,000	50	Transglucosilasa-transpeptidasa	Síntesis de mureína durante la formación del septo.
C4	49,000	110	DD-endopeptidasa, DD-carboxipeptidasa	Hidrólisis de polímeros entrecruzados durante la elongación celular
C5	42,000	1,800	DD-carboxipeptidasa	Destrucción de pentapéptidos no utilizados para asegurar que solo la mureína madura sirva como aceptor durante la transpeptidación para entrecruzar polímeros
C6	40,000	600	DD-carboxipeptidasa	Destrucción de pentapéptidos no utilizados

\* tomado de Park (25)

+ existen otras PBPs de tipo C (C1, C7 y C8), pero aún no han sido estudiadas.

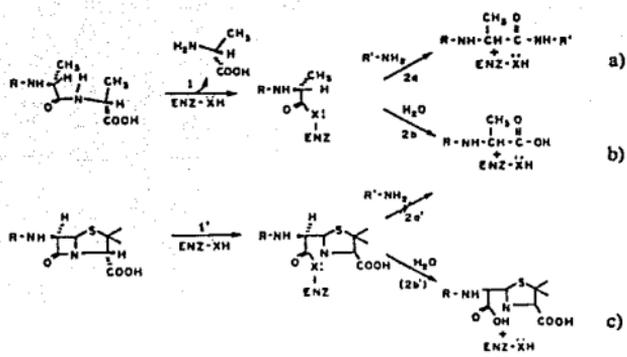


Fig. 5. Reacciones catalizadas por a) transpeptidasas y b) carboxipeptidasas (PBPs) y c) β-lactamasas (tomado de Waxman y Strominger, 24. Ver texto).

Las dos reacciones que éstas catalizan son muy semejantes mecanísticamente (24). La transpeptidación (Fig. 5a) consiste de dos pasos: a) la escisión del enlace D-alanil-D-alanina terminal del pentapéptido, con la consecuente formación del intermediario acil-enzima inestable y la liberación de la D-alanina terminal y b) la reacción del complejo acil-enzima (intermediario activado) con el grupo amino del ácido diaminopimélico del tetrapéptido disponible en la cadena vecina. De este modo se forma un nuevo enlace peptídico y se da el entrecruzamiento de dos hebras. En la carboxipeptidación (Fig. 5b) el aceptor último del grupo carboxilo del intermediario acil-enzima es una molécula de agua. Siendo las β-lactamas análogos estructurales de la D-alanil-D-alanina (26), muchas de las PBPs que catalicen alguna de las reacciones anteriores serán aciladas por alguno de estos compuestos (Fig. 5c). El intermediario resultante es de vida media larga y por lo tanto la enzima se inactiva.

*In vitro*, la incubación del complejo peniciloil-PBP en ausencia de un exceso de penicilina no unida da como resultado la liberación del ácido peniciloico (que carece de actividad biológica) y de la enzima en forma activa (27-29). Lo anterior demuestra que las PBPs poseen una actividad residual de β-lactamasas. Sin embargo, *in vivo*, a condiciones saturantes de sustrato, esta es la causa de los efectos morfológicos que se observan en las bacterias. La imposibilidad de disociar eficientemente el complejo peniciloil-PBP evita la formación de unidades

entrecruzadas de peptidoglucanos. Esto induce la filamentación bacteriana, y a grandes concentraciones del antibiótico, acumulación de masa celular y lisis, observado inicialmente por Gardner en 1940 (citado en 24).

## ii) $\beta$ -lactamasas

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas bacterianas que hidrolizan eficientemente el anillo  $\beta$ -lactámico. Su similitud con las PBPs en distintos aspectos hace suponer que divergieron evolutivamente a partir de éstas. A nivel de secuencia, se ha encontrado homología al comparar las regiones amino terminal de la carboxipeptidasa de *Bacillus sp.* y aquéllas de las  $\beta$ -lactamasas de las clases A (de 50 y 29kD en promedio, respectivamente), C y D (ver más adelante). Esta identidad es más notable al aproximarse a los aminoácidos cercanos a la serina catalítica. El uso de inserciones y deleciones necesarias para el alineamiento óptimo de varias  $\beta$ -lactamasas mejora notablemente la homología entre estas y la carboxipeptidasa (30). En este corto segmento la homología se extiende también a nivel de estructura secundaria (como se predice por el método de Chou y Fasman (31)). Del mismo modo, al alinear las  $\beta$ -lactamasas de clase A y los extremos amino terminal de las PBPs 5 y 6 de *E. coli* (carboxipeptidasas), la identidad es del 25% en las regiones que incluyen a la serina catalítica (30). Por tratarse de proteínas con pesos moleculares distintos (al incluir al resto de las PBPs), se podría dudar que la información de secuencia sea concluyente. Sin embargo, esta homología se extiende al nivel de estructura tridimensional. Kelly, et al. (32) a partir de modelos obtenidos por medios cristalográficos, comparan la carboxipeptidasa de *Streptomyces R61* y la  $\beta$ -lactamasa de *Bacillus licheniformis 749/C*. Entre ellas el patrón de  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -plegadas es muy similar (Fig. 6). En ambas estructuras se presenta una lámina plegada compuesta de cinco hebras. Su cara frontal está flanqueada por dos  $\alpha$ -hélices y la cara trasera por una sola. De las  $\alpha$ -hélices restantes en la peptidasa, siete de ellas adoptan una disposición espacial identificable en la  $\beta$ -lactamasa, si se toma como referencia a la lámina plegada central. Estos mismos autores argumentan que la secuencia de aminoácidos puede cambiar muy rápidamente a través del tiempo, disminuyendo su valor informativo. En contraste, los plegamientos tridimensionales son evolutivamente más estables puesto que se mantienen por limitaciones entrópicas y energéticas del medio. Samraoui, et al. (33) llegan a conclusiones similares con la  $\beta$ -lactamasa I de *B.*

*cereus* y esta misma carboxipeptidasa.

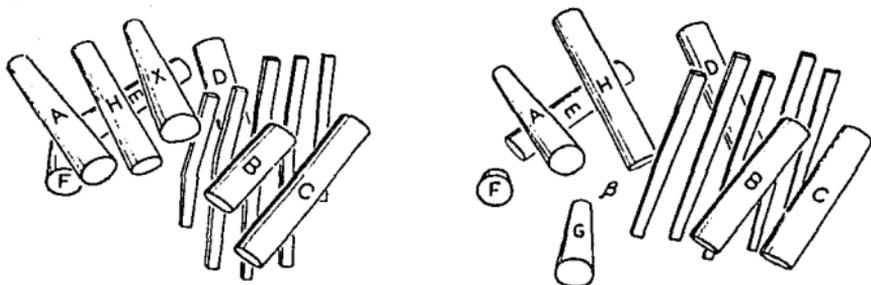


Fig. 6. Elementos de estructura secundaria en la  $\beta$ -lactamasa de *Bacillus licheniformis* 749/C (izquierda) y la DD-peptidasa de *Streptomyces R61* (derecha). Los cilindros representan  $\alpha$ -hélices y las bandas representan  $\beta$ -plegadas. Los dos dibujos resultan al sobreponer las gráficas por computadora del plegamiento polipéptidico determinado cristalográficamente. Ambos se presentan a la misma escala (tomado de Kelly, et al., 31. Ver texto).

Otras consideraciones refuerzan la hipótesis mencionada sobre el origen de las  $\beta$ -lactamasas. Con el interés de corroborar el parecido de estos dos grupos de proteínas, varios autores han analizado sus actividades cruzadas ante distintos sustratos. Ya se ha dicho que algunas PBPs muestran actividad débil de  $\beta$ -lactamasa. Asimismo puede suponerse que algunas  $\beta$ -lactamasas tienen actividad de carboxipeptidasa. Sin embargo, Pratt, et al. (34) han demostrado que las  $\beta$ -lactamasas son incapaces de degradar péptidos que contengan sustituyentes R-D-ala-D-ala. Se ha sugerido que la habilidad de las carboxipeptidasas de acilar  $\beta$ -lactamas puede ser evolutivamente irrelevante, puesto que enzimas no relacionadas estructuralmente, como la  $\beta$ -lactamasa II de clase B de *B. cereus* también poseen esta capacidad. Como alternativa,

proponen un sustrato específico para  $\beta$ -lactamasas clase A que carece de anillo  $\beta$ -lactámico. Este compuesto, el fenilpropinal, inactiva a la carboxipeptidasa de *B. subtilis* y a la PBP 6 de *E. coli*. La cinética de inactivación es muy similar al de varias  $\beta$ -lactamasas y por lo tanto apoya la similitud mecánica que se propone (Amanuma y Waxman, observaciones no publicadas).

Algunas PBPs membranales pueden ser solubilizadas con proteólisis limitada. La digestión parcial de las carboxipeptidasas de *B. stearothermophilus* y *B. subtilis* (de 46.5 y 50kD, respectivamente), produce fragmentos solubles en agua de distintos tamaños. Estos productos, de 35 a 45kD, mantienen completamente su actividad catalítica. Además, se hacen resistentes a la inactivación térmica y dejan de unirse a micelas de detergentes. Las dos protefnas estudiadas están compuestas por un dominio catalítico, amino terminal, altamente hidrofílico y otro dominio carboxilo terminal, hidrofóbico y de menor tamaño que es el responsable de la inserción a membrana (35). Por ser la región carboxilo terminal de estas enzimas la que presenta mayor homología con las  $\beta$ -lactamasas, es probable que éstas hayan evolucionado a partir de algún segmento o dominio amino terminal de las PBPs.

Actualmente se han aislado cerca de 80  $\beta$ -lactamasas distintas. Su ubicuidad en distintas especies se demuestra por el número de variedades aisladas en el campo y en la clínica.

#### b) Utilidad de las $\beta$ -lactamasas como modelo en ingeniería de protefnas.

En cepas bacterianas resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, las  $\beta$ -lactamasas son el principal mecanismo de defensa. El problema clínico que representan ha motivado su estudio en distintas áreas, al punto de ser una de las familias de protefnas mejor conocidas. En la ingeniería de protefnas es deseable la utilización de modelos de este tipo, con información estructural y funcional relevante. Así, el efecto de los cambios generados *in vitro* es cada vez más predecible. Estas enzimas poseen varias características que las hacen un modelo atractivo. La clonación de los genes respectivos de distintas especies ha facilitado su modificación por técnicas de DNA recombinante. Como ya se ha mencionado, existe una amplia variedad de sustratos para estas enzimas. En condiciones de laboratorio, las  $\beta$ -lactamasas pueden usarse como único determinante de resistencia. Con esto, la exposición *in vivo* a distintas moléculas permite una rápida identificación de cambios mínimos en los parámetros enzimológicos de

mutantes. Existen en la literatura reportes sobre ensayos de purificación, actividad, secreción, etc., para la caracterización fina de estas variaciones.

Con base en los datos que se tienen de estas proteínas, se han propuesto varios esquemas de clasificación. El más aceptado es el de Ambler (36, 37), que las agrupa por sus propiedades catalíticas (perfil de sustratos) y por homología de secuencia. Según este autor, existen cuatro clases de  $\beta$ -lactamasas. La clase A agrupa enzimas estrechamente relacionadas en secuencia y que hidrolizan preferencialmente a las penicilinas. Este es el grupo mejor conocido y a la fecha se han secuenciado los genes de 20 de estas proteínas (ver Fig. 7). Aquí se incluyen las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 de *E. coli*, la de *B. licheniformis* 7491C y la de *Staphylococcus aureus* PCI. La clase B se compone de metaloenzimas que utilizan un átomo de Zn como cofactor. No muestran homología estructural ni de secuencia con los miembros de la clase A. La clase C contiene a las  $\beta$ -lactamasas cromosomales de *E. coli*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*, entre otras. Aunque muestran cierta semejanza con las de clase A (como la presencia de una serina catalítica), hidrolizan preferencialmente a cefalosporinas. En la clase D (38) se encuentra la  $\beta$ -lactamasa oxa-2 de *Salmonella typhimurium* que es homóloga a las de clase A y C y a algunas PBPs pero tiene un peso molecular menor (de 25kD).





Fig. 7. Alineamiento de veinte secuencias de  $\beta$ -lactamasas clase A según la numeración de Ambler et al. (37). Los aminoácidos conservados al 100% se encuentran encerrados en cajas.

20

Como complemento a los estudios mencionados, el análisis estructural y de secuencia de las  $\beta$ -lactamasas de clase A deriva información sobre la importancia relativa de los aminoácidos en su función. Muchos de estos permiten cambios conservativos, o sea, pueden sustituirse por otros que posean una cadena lateral de la misma carga o tamaño sin afectar a la proteína en general. Estructuralmente, se puede decir que son el andamiaje sobre el cual se posicionan los residuos involucrados en funciones específicas. Estos últimos son invariantes; su sustitución tiene distintos efectos en las propiedades de la enzima. Se localizan principalmente en la región cercana a la serina catalítica. Otros residuos se conservan por motivos estructurales. Contribuyen estabilizando posiciones críticas en la estructura secundaria ( $\alpha$ -hélices,  $\beta$ -plegadas) o agregaciones regionales (núcleos hidrofóbicos). Algunos autores, como Herzberg (39), no dan mucho valor a la permanencia de algunos aminoácidos conservados. En último caso, sugieren cambios correlativos de secuencia como una forma de llegar a la misma estructura y/o función. Este razonamiento quizá no toma en cuenta las propiedades que estos podrían conferir a la proteína en otros contextos. Se ha resuelto la estructura tridimensional de tres proteínas de esta clase: la de *S. aureus* PC1 (39), la de *B. licheniformis* 749/C (40) y la de *Streptomyces albus* G (41). La arquitectura de estas tres proteínas es casi idéntica (Fig. 8).

Constan de dos dominios que interactúan muy estrechamente. Un dominio está formado por cinco  $\beta$ -plegadas que forman la lámina- $\beta$  que ya se ha mencionado. Tres  $\alpha$ -hélices se empaquetan contra esta hoja. El segundo dominio se compone básicamente por otro conjunto de hélices que tapan la cara restante de la lámina- $\beta$ . La cavidad del sitio activo se encuentra en la interfase de estos dos dominios. Dentro de esta cavidad, el residuo más importante a nivel funcional es la Ser70. Alrededor de éste, distintos aminoácidos conservados unen al sustrato y orientan al enlace  $\beta$ -lactámico para su hidrólisis.

En relación a la catálisis que realizan estas enzimas, el mecanismo de reacción propuesto (42) es muy similar al de las proteasas de serina (43). Consta de dos pasos: a) la estabilización del sustrato en forma de intermediario activado para la formación del complejo acil-enzima y b) la hidrólisis de este complejo. Según la teoría del estado de transición (43 y referencias), las enzimas son "moldes" sobre los cuales se estabiliza el sustrato específico en forma de intermediario activado, o sea, en una conformación que facilita la reacción. En ese estado, un átomo de carbono de la  $\beta$ -lactama (el del carbonilo que es parte del enlace  $\beta$ -lactámico) adopta una geometría tetraédrica que caracteriza al intermediario inestable. Esta configuración es

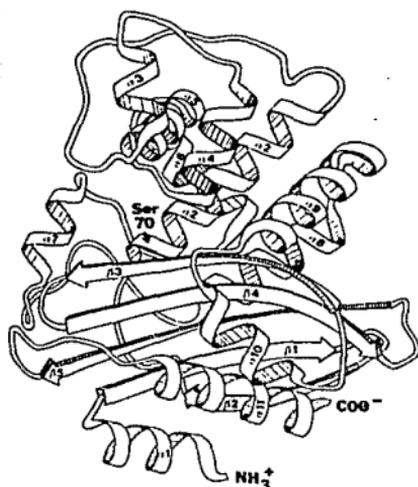


Fig. 8 Plegamiento general de la  $\beta$ -lactamasa de *Staphylococcus aureus* PC1 en el que se remarcan los elementos de estructura secundaria: los bucles corresponden a las  $\alpha$ -hélices y las flechas corresponden a las  $\beta$ -plegadas (tomado de Herzberg y Moulit, 44).

consecuencia del ataque nucleofílico del oxígeno de la Ser70. 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 hacia el nitrógeno 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. Como se indica arriba, estos eventos se acoplan directamente en la vecindad estructural alrededor de la Ser70 (43): Al igual que en las reacciones catalizadas por proteasas de serina, se postula que el carbono tetraédrico de la  $\beta$ -lactama es estabilizado por el "hoyo del oxianión", o sea, la región dada por dos grupos amino de cadena principal que forman puentes de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo del enlace amídico. En la  $\beta$ -lactamasa estos grupos están dados por la Ser70 y la Gln237. La Lys73 repele y orienta al protón liberado por la serina hacia el carbonilo donador. El Glu166 (que forma un puente salino con la Lys73) es el residuo en el que probablemente se posiciona la molécula de agua necesaria para la

desacilación. La Lys234 interacciona con el grupo carboxilo presente en el anillo de tiazolidina de la  $\beta$ -lactama. Con el aislamiento clínico o construcción *in vitro* de mutantes de  $\beta$ -lactamasas se han evidenciado algunas de las funciones propuestas a aminoácidos en particular. Igualmente, en muchos casos se han descubierto otras no esperadas. En la  $\beta$ -lactamasa RTEM-1 de *E. coli*, al substituir la serina catalítica (Ser70) por cisteína, se disminuye la actividad catalítica ( $K_{cat}$ ) ante ampicilina y bencilpenicilina a un 1-2%. Su actividad ante nitrocefina (cefalosporina) disminuye a la mitad. Su  $K_m$  ante este sustrato aumenta un orden de magnitud. Además de este cambio de especificidad, la enzima se hace más resistente al tratamiento con tripsina (45). Ellerby, et al. (46) usando como modelo la  $\beta$ -lactamasa de *B. licheniformis*, substituyen a la Lys234 por ácido glutámico o alanina. Como es de esperarse, observan en estas mutantes una disminución drástica en la unión de sustratos así como en la actividad catalítica. Con los datos obtenidos, amplían la idea establecida sobre este sitio. Concluyen que interviene en la formación del ambiente electrostático necesario para la unión del sustrato así como para la estabilización del estado de transición previo a la catálisis.

Al reemplazar la Lys73 y el Glu166 por arginina y ácido aspártico, respectivamente (47), se observa una baja notable en la tasa de acilación y desacilación de la bencilpenicilina, sin embargo, la especificidad no es muy distinta a la de la enzima silvestre. Se comprueba que la Lys73 actúa como una "base general" al facilitar la liberación del protón de la serina en la catálisis. En la Fig. 9 se muestran los residuos vecinos a la Ser70 que son relevantes en la catálisis.



toda la proteína. De aislamientos clínicos se han obtenido varias mutantes resistentes a cefalosporinas de tercera generación no degradadas por la enzima silvestre (citadas en conjunto por Collatz, et al. 50). Estos cambios se sitúan en las posiciones 102, 162, 235, 236 y 237. Por su localización, se cree que estas sustituciones ofrecen nuevas interacciones con el radical oximino presente en estos nuevos compuestos. Explorando otras zonas de la proteína se han encontrado distintos fenotipos. Al modificar dos de las cisteínas presentes en la  $\beta$ -lactamasa (C75 y C121) por tirosinas, Fitts, et al. (51) observan defectos de transporte al periplasma, quedando la proteína en la fracción membranal. Estos cambios se relacionan probablemente a nuevos estados conformacionales relevantes a procesos como la secreción o el plegamiento. La localización de los aminoácidos conservados de las  $\beta$ -lactamasas de clase A se esquematiza en la Fig. 10.

Como se ha visto, éste es un modelo del cual se puede obtener información sobre los elementos que determinan la especificidad, catálisis, plegamiento, secreción, etc., de esta y otras proteínas. Dicho de otro modo, de su estudio pueden surgir nociones que nos permitan comprender mejor las interacciones necesarias para que las funciones protéicas sean posibles.

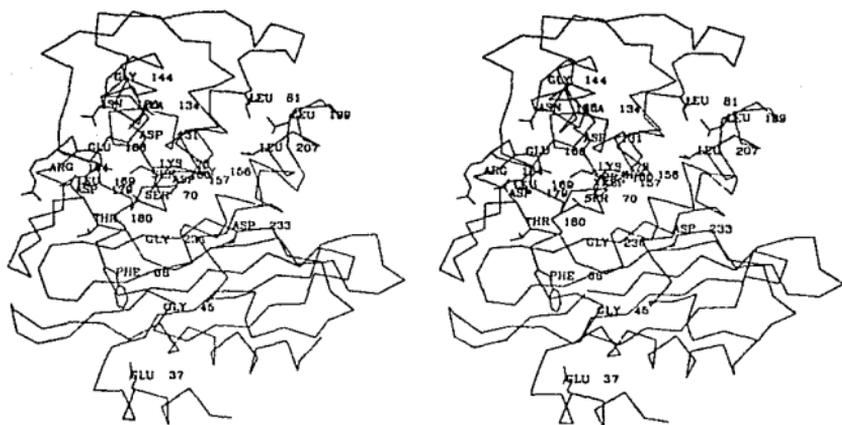


Fig. 10. Par estereoscópico de la estructura de la  $\beta$ -lactamasa de *Staphylococcus aureus* PCI (carbonos  $\alpha$ ). Se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos conservados al 100% en las veinte secuencias reportadas.

## Antecedentes

La mutagénesis dirigida a saturación permite substituir un aminoácido presente en una proteína por cada uno de los 19 residuos restantes en esa misma posición. En esta técnica se utilizan oligos degenerados en el codón por mutar. Flaqueado por secuencias silvestres, este triplete contiene a cualquiera de los cuatro nucleótidos en la primera y segunda posición y una mezcla equimolar de G y C en la tercera. La combinación que resulta (representada como NNG/C) es capaz de regenerar al menos un codón de cada uno de los veinte aminoácidos así como un codón de término. De este modo puede estudiarse el contenido informativo del aminoácido en cuestión en un contexto particular. En la literatura existen varias técnicas para lograr este fin. Sin embargo, presentan algunos problemas o pasos adicionales que pueden dificultar la rápida obtención de mutantes. El principal problema es la contaminación de moléculas silvestres en elevada proporción. Al crear bancos de genes mutantes (de la mutagénesis a saturación de uno o más aminoácidos, por ejemplo) es necesario eliminar esta limitante para así poder obtener grupos heterogéneos de proteínas modificadas.

Tomando en cuenta lo anterior, se presenta en este trabajo un diseño experimental versátil que evita ésta y otras limitantes. Este sistema es una adaptación al descrito por Nelson y Long (22, Fig. 2).

El modelo experimental utilizado es la  $\beta$ -lactamasa de *E. coli*. De ésta hemos elegido al ácido glutámico 37 (según la numeración de Ambler, 36), uno de sus 22 aminoácidos conservados, para substituirlo a saturación. Este residuo es invariante en las veinte secuencias reportadas de  $\beta$ -lactamasas de clase A. Como se muestra en la Fig. 10, se localiza cerca del extremo amino terminal de la proteína madura. A diferencia de otros aminoácidos conservados, no parece tener una función catalítica o estructural notoria que justifique su permanencia a ese grado. Según Herzberg (39), el Glu37 forma una serie de puentes de hidrógeno necesarios para la estabilización de una  $\beta$ -plegada adyacente. Sin embargo, hemos observado que este patrón no se mantiene de la misma manera en la  $\beta$ -lactamasa de *B. licheniformis* 749/C (40), proteína altamente homóloga a nivel de estructura y secuencia. Con la inserción de otros residuos en esa posición podremos tener más información de las limitaciones que lo mantienen sin cambio.

## **Objetivos**

**Con base en la técnica descrita por Nelson y Long, adaptar las modificaciones necesarias para obtener un método de mutagénesis dirigida a saturación más eficaz que los descritos en la literatura.**

**Caracterizar la incorporación de las mutaciones deseadas mediante la secuenciación de los DNAs respectivos.**

**Caracterizar preliminarmente los cambios fenotípicos de algunas de las mutantes obtenidas en la posición 37 de la  $\beta$ -lactamasa.**

## Materiales y Métodos

### 1) Cepas bacterianas y plásmidos. Medios de cultivo.

Cepas (*E. coli*). JM101 (supE thi  $\delta$ (lac-proAB) F'[traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>+</sup> lacZ $\delta$ M15]). Se utiliza para la extracción de plásmidos y para la expresión de proteínas silvestres y mutantes. También es útil por el marcador genético (lacI<sup>+</sup> lacZ $\delta$ M15) que permite la  $\alpha$ -complementación con el extremo amino terminal de la  $\beta$ -galactosidasa codificada en vectores de expresión del tipo pUC.

DH5 $\alpha$  (supE44  $\delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1). Se utiliza para la producción de DNA para secuencia (en doble cadena). Cepa deficiente en el sistema de recombinación, lo cual facilita la transformación y permanencia de DNAs modificados *in vitro*.

Plásmidos. Se utiliza el plásmido pBR322 (Amp<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>, rop y origen de replicación ORI. 4631pb.) como DNA molde en experimentos de mutagénesis, clonación de fragmentos de PCR y para la expresión de proteínas silvestres y mutantes.

El plásmido pKGS (Kan<sup>r</sup>, origen de replicación ORI y la endonucleasa de restricción EcoRI bajo el promotor de LacZ, 3442pb. 52) se utiliza como vector de selección positiva. La endonucleasa es un marcador genético letal. Bajo represión (sistema del operón de lacZ), la enzima se expresa a bajos niveles; las bacterias que portan dicho gen forman colonias translúcidas parcialmente lisadas. Al inducir con IPTG el sistema se desreprime y la enzima se produce en gran cantidad, por lo que las bacterias son incapaces de formar colonias. Al insertar un fragmento de DNA dentro del gen que la codifica, se evita la síntesis de ésta y desaparece el fenotipo letal. Con esto se comprueba la clonación del fragmento deseado.

### Medios de cultivo

#### Medio LB (Luria-Bertani):

A 950ml de agua desionizada agregar 10g de bactotripton, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl. Agitar hasta que los solutos se disuelvan. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y llevar a un volumen final de 1l con agua desionizada. Esterilizar con autoclave durante 20min. a 15libras/pulgada .

#### Medio M9

A 750ml de agua desionizada estéril agregar 200ml de sales M9 5x, 20ml de glucosa al 20% (u otra fuente de carbono como glicerol) y 20ml de casaminoácidos al 20%. Aforar a 1l con agua desionizada estéril.

#### Sales M9 (5x):

Disolver las siguientes sales en 750ml de agua desionizada y posteriormente aforar a 1l: 64g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 15g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5g de  $\text{NaCl}$  y 5g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Esterilizar con autoclave.

#### Medio SOB

A 950ml de agua desionizada agregar: 20g de bacto-triptona, 5g de extracto de levadura y 0.5g de  $\text{NaCl}$ . Agitar hasta que los solutos se disuelvan y posteriormente agregar 10ml de  $\text{KCl}$  250mM. Ajustar a pH 7.0 con  $\text{NaOH}$  5N y Aforar a 1l con agua desionizada. Esterilizar con autoclave. Previo a su uso, se le adicionan 5ml de una solución estéril de  $\text{MgCl}_2$  2M.

#### Medio SOC

Este medio es idéntico al SOB, solo que contiene glucosa a una concentración 20mM. Para esto, agregar 20ml de glucosa 1M estéril al medio SOB cuando éste haya llegado a 60°C o menos después de autoclavar.

#### Medios sólidos.

De los medios descritos arriba, preparar el deseado y agregar 15g de bacto-agar. Esterilizar con autoclave. Dejar que el medio se enfríe hasta 50°C aproximadamente antes de agregar sustancias termolábiles, como antibióticos. Vaciar 20ml de medio a cada caja de Petri de 90mm. Dejar 20min. a temperatura ambiente para que el agar solidifique. Almacenar a 4°C. Antes de usar, secarlas en una campana de flujo laminar (dejando las tapas entreabiertas) durante 20min.

#### Antibióticos

Se preparan como soluciones stock 1000x y se almacenan a -20°C:

Ampicilina. Disolver 1g en 5ml de agua bidestilada (200mg/ml final). Pasar por filtro Millipore de 0.45µm. La concentración para seleccionar cepas transformadas es de 200ug/ml.

Kanamicina. Disolver 125mg en 5ml de agua bidestilada (25mg/ml final) y filtrar como arriba. La concentración de trabajo es de 25ug/ml.

Tetraciclina. Disolver 75mg en 6ml de etanol absoluto (12.5mg/ml final) y filtrar como arriba. La concentración de trabajo es de 12.5ug/ml.

#### Soluciones amortiguadoras.

##### Amortiguador TE

Este amortiguador se utiliza para resuspender DNA. Consta de tris hidroximetilaminometano (trizma base) 10mM pH 7.6 y etilendinitilotetracetato disódico (EDTA) 1mM pH 8.0

### Amortiguador TB

Este amortiguador se utiliza para resuspender células al hacerlas competentes para transformación. Está compuesto por piperazina-N,N'-bis 2-etano ácido sulfónico (PIPES) 10mM, MnCl<sub>2</sub> 55mM, CaCl<sub>2</sub> 15mM y KCl 250mM. Mezclar todos los componentes excepto el MnCl<sub>2</sub> y ajustar el pH hasta 6.7 con KOH 5M. Disolver posteriormente el MgCl<sub>2</sub> y esterilizar por filtración. Guardar a 4°C.

### Amortiguador TBE

Se usa como amortiguador de corrida en geles de acrilamida o agarosa. Para preparar el stock 10x se mezclan 108g de tris base, 55g de ácido bórico y 40ml de EDTA 0.5M (pH 8.0) en un litro de agua bidestilada.

2) Extracción de plásmidos en *E. coli* (Según Birnboim y Doly, citado en Rodríguez y Tait, (53).

- 1) Inocular una colonia bacteriana transformada en 1.5ml de medio LB en un tubo de vidrio de 15ml. Incubar toda la noche a 37°C con agitación de 200rpm.
- 2) Pasar el cultivo a un tubo de polipropileno de 1.5ml y centrifugar 5min. a 12,000xg.
- 3) Tirar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 1ml de amortiguador TES (tris HCl 50mM, pH 7.6, sacarosa al 20% y EDTA 50mM) con ayuda de un agitador magnético (vórtex).
- 4) Centrifugar durante 5min. a 12,000xg, tirar el sobrenadante y resuspender en 150ul de amortiguador TES.
- 5) Agregar 5ul de RNasa (ribonucleasa pancreática A, 10mg/ml en acetato de sodio 0.1M, EDTA 0.3mM, pH 4.8 y precalentado a 80°C durante 10min.) y 350ul de mezcla lítica (solución 1:1 de SDS al 2% y NaOH 0.4M). Agitar levemente e incubar en hielo durante 20min.
- 6) Agregar 250ul de acetato de sodio 3M pH 4.8. Invertir el tubo varias veces. Incubar en hielo durante 30min.
- 7) Centrifugar 15min. a 12,000xg a 4°C. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio.
- 8) Agregar un volumen de isopropanol. Invertir el tubo varias veces y centrifugar 15min. a temperatura ambiente. Tirar el sobrenadante.
- 9) Limpiar con un papel higiénico las paredes del tubo con cuidado de no tocar la pastilla de DNA. Secar el tubo en Savant (desecador de vacío y calor).
- 10) Resuspender en 300ul de agua bidestilada y agregar un volumen de fenol. Agitar con vórtex y agregar otro de cloroformo. Agitar nuevamente.
- 11) Centrifugar 4min. a 12,000xg. Pasar el sobrenadante a otro tubo y agregarle 300ul de cloroformo. Agitar y centrifugar nuevamente.
- 12) Tomar el sobrenadante y agregar 12ul de NaCl 5M. Agitar y posteriormente poner 300ul de isopropanol. Dejar 15min. a temperatura ambiente.
- 13) Centrifugar 15min. a 12,000xg. Tirar el sobrenadante y agregar 500ul de etanol al 70%. Centrifugar 5min. a 12,000xg y tirar el sobrenadante. Secar en Savant.
- 14) Resuspender en 20ul de agua bidestilada.

Se obtienen de 1 a 2ug de DNA por ml de cultivo.

### 3) Electroforesis en gel.

La técnica para preparación de geles de agarosa es la descrita por Sambrook et al. (9). Para el análisis y aislamiento de DNA de plásmido utilizar agarosa al 0.8% en amortiguador TBE1x. Los fragmentos de DNA de menor tamaño (2000-100pb) se observan en concentraciones variables de agarosa (de 1 a 1.5%), según el caso. A cada muestra (desde 50 hasta 500ng de DNA si es un gel analítico) agregar 2ul de amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol al 30% en agua bidestilada) por cada 10ul de DNA. Los geles se corren a un voltaje de 1-5V/cm (el número de cm es igual al de la distancia entre electrodos) en amortiguador TBE 1x. Es importante que el amortiguador con el que se prepara el gel sea del mismo stock con el cual se hace la corrida. Después de ésta, sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio (1ug/ml de agua bidestilada) durante 1min. Enjuagar el gel en agua para remover el exceso de bromuro de etidio. Observar en transiluminador de luz ultravioleta.

Extracción de bandas de DNA a partir de agarosa.

En esta técnica es importante que el DNA por aislar no sea sumergido en bromuro de etidio ni expuesto a la luz ultravioleta:

1) Utilizar una alícuota mínima del DNA a extraer como control de migración (la cual puede correr en uno de los extremos del gel). Así, en base a su posición observada en luz UV se cortan las bandas de DNA restante no teñido.

2) Pasar la agarosa por una jeringa de 1 o 3ml (con aguja) y devolver el machacado a un tubo de polipropileno de 1.5ml.

3) Agregar tres volúmenes de fenol, agitar fuertemente con vórtex y congelar en hielo seco durante 15min.

4) Centrifugar durante 15min. a 12,000xg y tomar el sobrenadante.

A éste, agregarle un volumen de fenol, agitar con vórtex y agregar otro de cloroformo. Agitar nuevamente y centrifugar a 12,000xg durante 4min.

5) Tomar el sobrenadante y precipitar con 4ul de NaCl5M por cada 100ul de muestra y un volumen de isopropanol. Dejar a temperatura ambiente durante 15min.

6) Centrifugar 15min. a 12,000xg. Tirar el sobrenadante y agregar 500ul de etanol al 70%, invertir el tubo y centrifugar 5min. a 12,000xg. Tirar el sobrenadante con cuidado para conservar la pastilla (dos veces).

7) Secar el tubo con Savant. Resuspender la pastilla en amortiguador TE o agua bidestilada. Verificar la cantidad de DNA recuperado en un gel apropiado.

Caracterización y aislamiento de oligonucleótidos (oligos).

Se utilizan geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) al 20% como se describe en (9). El stock al 20% de acrilamida se prepara de la siguiente manera: a 50ml de agua bidestilada agregar 19g de acrilamida, 1g de bis-acrilamida, 48.04g de urea (8M final) y 10ml de amortiguador

TBE 10x. Agitar hasta disolver y aforar a 100ml de agua. Filtrar con membrana Millipore de 0.45 micras. Guardar en frasco color ámbar. Para la preparación de estos geles existen varios modelos de cámaras verticales con diferentes volúmenes. En nuestro caso, se requiere de 6ml de stock de acrilamida, 28ul de persulfato de amonio y 5ul de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) para un gel. A cada 10ul de muestra, agregar 2ul de amortiguador de carga (para prepararlo, mezclar: 10ml de formamida, 10mg de xilencianol, 10mg de azul de bromofenol y 200ul de EDTA 0.5M (pH 8.0)). Correr las muestras a 300V. Sacar el gel del molde e iluminar con lámpara de luz ultravioleta de onda corta. Los geles preparativos se hacen en cámaras de mayor capacidad (27ml de stock de acrilamida, 200ul de persulfato de amonio y 25ul de TEMED) y se corren a 200V.

Elución de oligos a partir de bandas de poli(acrilamida) al 20%.

- 1) Cortar con navaja la banda deseada y ponerla en un tubo de polipropileno de 1.5ml (nunca más de 0.2g de gel por tubo).
- 2) Agregar 1ml de agua bidestilada a cada tubo e incubar durante 12h a 37°C.
- 3) Guardar los sobrenadantes en tubos de polipropileno de 1.5ml.
- 4) Tomar una columna Sepak (columna comercial de fase reversa C18) y pasar por ella 10ml de acetonitrilo con ayuda de una jeringa.
- 5) Del mismo modo, lavarla con 10ml de agua bidestilada.
- 6) Tomar la muestra de oligos y pasarla por la columna.
- 7) Lavar nuevamente la columna con 3ml de agua bidestilada (para remover urea).
- 8) Para sacar al oligo de la columna, pasar por ella 3ml de una mezcla 1:1 de acetonitrilo y agua bidestilada. Recoger en tubos de polipropileno de 1.5ml.
- 9) Secar los tubos en Savant. Resuspender en amortiguador TE o en agua bidestilada.
- 10) Verificar la concentración del oligo en un gel apropiado.

#### 4) Transformación bacteriana.

El método utilizado es una modificación de Inoue, H. et al (54), al descrito por Hanahan (55).

#### a) Preparación de células competentes:

- 1) Descongelar stock de células (en medio LB con dimetil sulfóxido (DMSO) al 7%) y estriar en medio LB-agar. Cultivar toda la noche a 37°C.
- 2) Tomar de 10 a 12 colonias e inocular en 250ml de medio SOB en matraz de 2L. Cultivar a 18°C en agitación rápida (200 A 250rpm) hasta 0.6 A<sub>600</sub> de densidad óptica.
- 3) Poner en matraz en hielo durante 10min.
- 4) Transferir el cultivo a tubos de 250ml y centrifugar 10min. a 4,000xg a 4°C.
- 5) Resuspender la pastilla celular en 80ml de TB e incubar 10min. a 4°C. Centrifugar como arriba.
- 6) Resuspender suavemente la pastilla en 20ml de TB y posteriormente agregar DMSO hasta una concentración de 7%.

7) Después de incubar durante 10min. en un baño de hielo, alícuotar en tubos de cultivo celular y congelar inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido.

#### b) Transformación

- 1) Descongelar una alícuota de células competentes a temperatura ambiente y agregar 200ul a un tubo de polipropileno de 0.5ml. Poner en hielo.
- 2) Agregar de 1 a 5ul de solución del DNA a las células competentes e incubar en hielo durante 30min.
- 3) Dar choque térmico (sin agitar) durante 30seg. a 42°C y regresar al hielo.
- 4) Agregar 800ul de medio SOC y poner en incubadora con agitación (200rpm) a 37°C durante 1h.
- 5) Platear en medio selectivo y dejar crecer toda la noche.

#### 5) Digestión de DNA con enzimas de restricción.

A continuación se describen las enzimas utilizadas y los amortiguadores de ensayo descritos por los fabricantes (a concentración 10x):

*Bam*HI (Boehringer Mannheim, BM): tris HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NaCl 100mM y 2-mercaptoetanol 1mM a pH 8.0.

*Bgl*II (New England Biolabs, NEB): tris HCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaCl 100mM y DTT 1mM a pH 7.9.

*Dra*I (Promega, P): tris HCl 6mM (pH 7.6), NaCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 6mM, 2-mercaptoetanol 6mM y albúmina sérica de bovino (BSA) 0.1mg/ml.

*Eco*R1 (P): tris HCl 90mM (pH 7.5), NaCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y BSA 0.1mg/ml.

*Hinc*II (P): tris HCl 10mM (pH 7.5), NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 7mM y BSA 0.1mg/ml.

*Hind*III (NEB): tris HCl 10mM, NaCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y DTT 1mM a pH 7.9.

*Hinf*I (NEB): tris HCl 10mM, NaCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y DTT 1mM a pH 7.9.

*Pst*I (NEB): tris HCl 50mM, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y DTT 1mM a pH 7.9.

*Sma*I (P): tris HCl 15mM (pH 8.0), KCl 15mM, MgCl<sub>2</sub> 6mM, 2-mercaptoetanol 6mM y BSA 0.1mg/ml.

La temperatura de reacción para todas las enzimas es de 37°C, con excepción de *Sma*I (26°C). Las unidades de actividad definidas por los fabricantes no fueron reproducibles en nuestros experimentos, por lo cual se usaron cantidades variables de enzima. En una reacción estándar, se necesita de 10ul de mezcla de reacción por cada ug de DNA a digerir. Los tiempos de digestión son de 2 a 12h según la enzima utilizada. Los productos de digestión se analizan en geles de agarosa de 0.8, 1.2 o 1.5% dependiendo de los tamaños de las bandas esperadas.

Doble digestión. En muchos casos es necesario digerir una muestra de DNA con dos endonucleasas distintas. Estas pueden usarse de manera simultánea en la misma mezcla siempre y cuando las condiciones de reacción sean similares para ambas. Generalmente, el único parámetro que puede diferir es el amortiguador empleado. En este caso, se utiliza en la mezcla el amortiguador que contenga menos sal (NaCl, KCl). Para completar la doble digestión, es

necesario agregar un pequeño exceso de la enzima que no se encuentra en su condición óptima.

#### 6) Mutagénesis dirigida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se construyeron cuatro oligos para su uso como primeros en la PCR (Unidad de Síntesis de Macromoléculas, CEINGEBI/UNAM). Sus características se describen en la Tabla 2 (Ver también Fig. 2). Para la producción de la  $\beta$ -lactamasa mutante se requiere de dos reacciones de amplificación y mutagénesis. La primera consta de:

- 76.5ul de agua bidestilada
- 10ul de amortiguador de reacción
- 10ul de dNTP's 25mM
- 1ul de oligo E37 (20pM, 230ng)
- 1ul de oligo B35 (20pM, 230ng)
- 1ul de plásmido pBR322 linearizado con *Bam*HI (1ng)
- 0.5ul de enzima *Taq* polimerasa (2.5 unidades)

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la PCR.

Nombre	Longitud	Secuencia 5'-3'	Características
HE26	26amero	GCAATTTAAACTGTGA TAAACTACCGC	Idéntico a la región 64-39 de pBR322 en dirección 5'-3'.
E37III	35amero	GGTGAAAGTAAAAGA TGCTNNG/CGATCAGT TGGGTG	Oligo mutante para el aminoácido Glu37 (con la mezcla NNG/C). Flanqueada por diecinueve y trece nucleótidos con la secuencia silvestre. Hibrida en la región 4061-4040 de la secuencia codificante de la $\beta$ -lactamasa de pBR322.
B35	35amero	GGAATAGCCGATCGAG ATCTAGGATCTTCACC TAG	Oligo compuesto de un segmento idéntico a la región 3212-3226 de pBR322 (dirección 3'-5') y otra secuencia contigua a su extremo 5' que no hibrida con región alguna de este mismo plásmido. Este oligo crea un sitio de restricción para la enzima <i>Bgl</i> II.
B20	20amero	GGAATAGCCGATCGAG ATCT	Idéntico a la región no homóloga a pBR322 en B35.

Mezclar y poner 75ul de aceite mineral. Cada ciclo consta de las siguientes temperaturas: 1min. a 92°C (desnaturalización del DNA de doble cadena), 1min. a 55°C (reasociación de DNA molde y oligos) y de 3min. a 70°C (polimerización) cada uno. Se incuba la reacción 30 ciclos. De ésta se obtiene un producto de 880pb (E880), el cual necesita aislarse de gel (agarosa al 0.8%) para usarse como uno de los dos moldes en la siguiente PCR:

75.5ul de agua bidestilada  
10ul de amortiguador de reacción  
10ul de dNTP's 25mM  
1ul de oligo HE26 (20pM, 170ng)  
1ul de oligo B20 (20pM, 130ng)  
1ul de E880 (1ng)  
1ul de pBR322/*Bam*HI (1ng)  
0.5ul de enzima *Taq* polimerasa (2.5 unidades)

Mezclar y poner 75ul de aceite mineral. Los ciclos son idénticos a los de la reacción anterior. Se obtiene un producto de 1227pb (E1200). Estos DNAs se analizan en geles de acrilamida al 8%. En éstos se puede observar con bastante nitidez las bandas de tamaños esperados y descartar otros productos inespecíficos.

## 7) Clonación de los fragmentos mutantes.

### a) Preparación de los vectores de clonación.

Se digiere el plásmido pBR322 con las enzimas *Hind*III y *Pst*I. Se obtienen dos fragmentos (de 3583 y 778pb) y se aíslan de gel. Para comprobar que no exista contaminación de plásmido superenrollado o digerido parcialmente (lo cual regenera a la  $\beta$ -lactamasa silvestre), tomar 50ng del fragmento mayor (el de 3583pb) e incubar en una reacción de ligación:

9ul de agua bidestilada  
1ul de plásmido digerido (50ng)  
3ul de amortiguador de ligasa 5x (tris HCl 50mM (pH 7.8), MgCl<sub>2</sub> 10mM y 2-mercaptoetanol 10mM).  
1.5ul de ATP 10mM  
0.5ul de ligasa (2 unidades).

Se utiliza el total de esta reacción para transformar una alícuota de *E. coli* JM101 competentes como se describe arriba. No deben observarse colonias resistentes al seleccionar en LB y ampicilina a 200ug/ml. Esto indica que no existe la contaminación mencionada. En caso contrario, el fragmento debe ser digerido y aislado nuevamente.

Del mismo modo, se hace la doble digestión del plásmido pKGS con las enzimas *Hind*III y *Bgl*II. La digestión total produce dos fragmentos de 230 y 3212pb. Este último es el vector digerido que se utiliza para la clonación del fragmento mutante. Se aísla de gel y se comprueba que no este contaminado con otros DNAs, como se menciona arriba. En este caso, la contaminación se muestra como colonias parcialmente lisadas (ver Plásmidos).

#### Preparación de los fragmentos mutantes.

El segundo fragmento obtenido de la PCR ( $\beta$ -lactamasa mutante, 1227pb) se digiere con las enzimas *HindIII* y *BglII* como se describe arriba. Se obtiene una banda de DNA de 1050pb. Aislar de gel de agarosa al 1% y cuantificar el DNA recuperado.

#### Ligación y clonación del vector con el fragmento mutante.

Para facilitar que el fragmento mutante se ligue al vector de clonación, se prepara una mezcla de ligación en que la proporción molar de fragmento y vector sea aproximadamente de 5:1:

- 8ul de agua bidestilada
- 1.5ul de dATP 10mM
- 3ul de amortiguador de ligasa
- 1ul de DNA de vector de clonación (100ng)
- 1ul de fragmento de PCR digerido (100ng)
- 0.5ul de ligasa

Agitar e incubar durante 8h a 14°C. Transformar con 7.5ul de esta reacción y seleccionar en cajas de kanamicina a 25ug/ml (al utilizar el plásmido pKGS) o en cajas de ampicilina a 50ug/ml (al utilizar el plásmido pBR322).

#### 8) Caracterización *in vivo* de fenotipos mutantes

Las colonias recombinantes obtenidas de la transformación con el DNA mutante se seleccionan a distintas concentraciones de ampicilina, substrato convencional de la  $\beta$ -lactamasa, tomando como control la enzima silvestre codificada en el plásmido pBR322. Se aíslan los DNAs de cada una de ellas y se retransforman. De cada una de las transformantes se toma una colonia y se "pica" en cajas de LB a distintas concentraciones de ampicilina (50, 100, 200, 500, 1000, 2000 y 5000ug/ml.). Como control de actividad se pican colonias de la cepa silvestre (DH5 $\alpha$ ) y de ésta con los plásmidos pKGS y pBR322.

#### 9) Secuenciación (método de Sanger para DNA en doble cadena (56)).

- 1) A un tubo de polipropileno de 1.5ml, poner 2ug de DNA del plásmido a secuenciar. Llevar a 8ul y ponerle 2ul de NaOH 2N fresco. Dejar 5min. a temperatura ambiente.
- 2) Agregar 3ul de acetato de amonio 3M pH 4.5 y 2ul de agua desionizada.
- 3) Poner 5ul del oligo utilizado como primero (aprox. 25ng) y 75ul de etanol absoluto.
- 4) Dejar 15min. en hielo seco y posteriormente centrifugar 15min. a 12,000xg en la microfuga.
- 5) Aspirar el sobrenadante y lavar con 500ul de etanol al 70%. Centrifugar 5min. a 12,000xg (dos veces).
- 6) Secar la pastilla y resuspender en 8ul de agua bidestilada y 2ul de amortiguador de secuencia (concentrado 5x: tris HCl 200mM pH 7.5 MgCl<sub>2</sub> 100mM y NaCl 200mM).
- 7) Calentar 2min. a 65°C.
- 8) Agregar 0.4ul de mezcla de marcaje (concentrado 5x: dGTP 7.5uM, dCTP 7.5uM, dTTP

- 8) Agregar 0.4ul de mezcla de marcaje (concentrado 5x: dGTP 7.5uM, dCTP 7.5uM, dTTP 7.5uM), 1.6ul de agua bidestilada, 1ul de DTT 0.1M y 0.5ul de dATP <sup>32</sup>S (5uCi).
- 9) Tomar 0.25ul de enzima secuencasa (nombre comercial de una DNA polimerasa modificada del bacteriófago T7) y diluir con 1.75ul de agua desionizada y bidestilada.
- 10) Mezclar y dejar 10min. a temperatura ambiente.
- 11) Marcar cuatro tubos de polipropileno de 0.5ml con las letras G, A, T y C. Poner a cada uno 2.5ul de la mezcla de terminación respectiva (ésta contiene a tres dNTP's distintos a concentración 80uM y a uno de los didesoxinucleótidos a concentración 8uM. Así, para el tubo marcado con A, se requieren 2.5ul de una mezcla de dGTP, dTTP y dCTP 80uM y ddATP 8uM). Poner estos tubos a 37°C 2min. antes de que concluyan los 10min. del paso anterior.
- 12) Poner 3.5ul de la reacción del paso 10) a cada terminador.
- 13) Dejar 15min. a 37°C.
- 14) Poner 4ul de mezcla de paro y calentar 2min. a 75°C.
- 15) Cargar el gel con 3 o 4ul de la reacción. Correr las muestras a 35-40watts y 2000volts.
- 16) Desmontar el gel de la cámara de electroforesis y transferirlo a filtro de papel Whatman.
- 17) Secarlo durante 1h a 80°C en un desecador de geles.
- 18) Exponer ante un film X-OMAT (Kodak) durante 16h en un cassette oscuro de exposición.
- 19) Revelar la placa expuesta con los reactivos convencionales (revelador, fijador, agua).
- 20) Analizar la secuencia obtenida.

Si el DNA a secuenciar es un producto de PCR:

- 1) Poner 1pM de este y otro pM del oligo en un tubo de polipropileno de 1.5ml.
- 2) Calentar la muestra 3min. a 95°C.
- 3) Dejar en hielo 5min.
- 4) Seguir el protocolo anterior a partir del paso 6).

## Resultados.

Mutagénesis por PCR. Se obtuvieron de esta reacción los productos esperados de 880 (E800) y 1227pb (E1200). Corresponden al fragmento que va del Glu37 al carboxilo terminal y la  $\beta$ -lactamasa completa, respectivamente (Fig. 11). Ambos contienen un sitio interno de *Pst*I presente en el DNA molde (pBR322). De la digestión de cada uno de ellos se obtuvieron las bandas características (Fig 9). En las condiciones de PCR descritas, el rendimiento de DNA mutante fue de 10ug por incubación, en promedio. Como control de amplificación, se incubó al oligo B20 (que no tiene secuencia complementaria en pBR322) con el oligo HE26 y el DNA molde. No se observaron productos en esta reacción. Como se indica arriba, se introdujo un nuevo sitio de restricción para la enzima *Bgl*III en el fragmento mutante que contiene a la  $\beta$ -lactamasa completa (de 1227pb.). Asimismo, se regeneró el sitio de *Hind*III presente en la secuencia original. Para validar la presencia de estos dos sitios, el producto final fue digerido por separado con cada una de las dos endonucleasas y los fragmentos resultantes se incubaron independientemente en una mezcla de ligación. Puesto que los extremos de fragmentos de PCR carecen del grupo fosfato en el extremo 5', solamente los productos digeridos pueden formar dímeros al ser incubados en una reacción de ligación. Como resultado de la digestión con *Hind*III y *Bgl*III se observó la formación de las bandas esperadas de 2378 y 2340pb., respectivamente (datos no mostrados).

Inicialmente se utilizaron otros dos oligos con la mezcla mutante NNG/C para la posición 37 de la  $\beta$ -lactamasa. Con estos la producción de DNA mutante fue muy pobre. En el caso del 21amero E37I (5' AAAGATGCANNG/CGATCAGTTG 3'), el rendimiento fue de 500ng en promedio. Con el 20amero E37II (5' GATGCTNNG/CGATCAGTTGGG 3'), a pesar de ser más corto, la cantidad de DNA resultante fue mayor. Su temperatura de reasociación ( $T_m$ : valor que representa la temperatura a la cual el 50% del oligo en solución hibrida con el DNA molde) es ligeramente mayor a la del E37I. Sin embargo, al clonar este DNA en el plásmido no se observaron colonias mutantes. La secuenciación directa de este fragmento mostró que las mutaciones fijadas en el oligo no se incorporaron en el producto final. En la región correspondiente al codón mutado, se observó a la secuencia silvestre sin cambios. En la discusión se mencionarán algunas de las posibles explicaciones de este fenómeno. Con el fin de resolver esta dificultad, se sintetizó el 35amero E37III. Su contenido de G y C es similar

a la del E37II pero su temperatura de reasociación es mucho mayor (Tabla 2). Con el uso de este oligo se obtuvieron las colonias mutantes que se describen más adelante.

**Clonación de fragmentos de DNA mutante.** En los primeros intentos de clonación se utilizó al plásmido pBR322 como vector, sustituyendo la región *PstI-HindIII* silvestre por la producida en la PCR. El fragmento que se intentó insertar es prácticamente idéntico al anterior, menos en el codón correspondiente al Glu37. Para utilizar este vector (ver "plásmidos"), es necesario digerirlo totalmente con *HindIII* y *PstI* para separarlo del fragmento que se trata sustituir (así, la ligación de éste con el fragmento mutante no se contamina con el fenotipo silvestre). Sin embargo, al ligar sobre sí mismo y transformar este vector se observó invariablemente la generación de colonias silvestres resistentes a ampicilina. Para aliviar los efectos de este problema, se buscó otro plásmido que no portara a la  $\beta$ -lactamasa. Se eligió al pKGS, vector que codifica a la endonucleasa *EcoRI* como marcador de selección positiva. Dentro de este gen existen los sitios de restricción apropiados (de *HindIII* y *BglII*) para la clonación del fragmento que contiene al gen completo de la  $\beta$ -lactamasa. Con dicho plásmido se obtuvieron 106 colonias transformantes. Como se ha mencionado, el método de selección empleado garantiza que todas ellas sean recombinantes.

**Selección de fenotipos.** Las colonias transformadas con la mezcla de ligación vector-fragmento mutante fueron seleccionadas en kanamicina. En teoría, todas las células que surjan de esta transformación deben contener, en el gen introducido, un codón distinto al original (GAA), porque éste no puede regenerarse con la mezcla NNG/C. Si la mutación diseñada produce algún cambio en la actividad de la enzima, éste puede reflejarse en la sensibilidad de la bacteria que la porta al crecerla a distintas concentraciones de ampicilina. Fue así como se seleccionaron las colonias obtenidas para identificar a los fenotipos mutantes. De 106 transformantes obtenidas, 34 fueron incapaces de crecer a 5000ug/ml de ampicilina (concentración máxima a la que crecen las colonias con la  $\beta$ -lactamasa silvestre).

Posteriormente, se aislaron los plásmidos correspondientes de cada una de las 34 colonias, más 10 de las que no muestran diferencias de crecimiento en comparación con la  $\beta$ -lactamasa normal. Para comprobar en éstos la presencia del gen de la  $\beta$ -lactamasa, se realizó una digestión con *PstI*, enzima de restricción para la cual existen dos sitios de corte en el plásmido

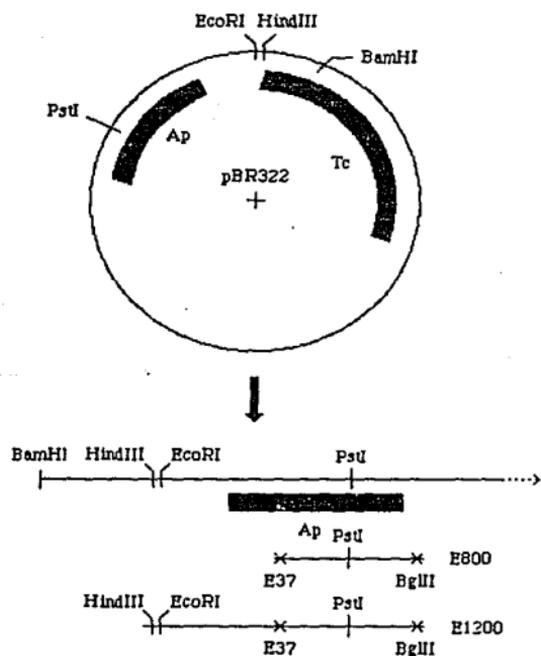


Fig. 11. Fragmentos mutantes obtenidos de la PCR. Diagrama de los productos amplificados a partir de los oligos E37III y B35 que da lugar al fragmento E800 y de los oligos HE26 y B20 que da lugar al fragmento E1200. Se muestran en la foto al fragmento E1200 (carril A, 1227pb.), E1200 digerido con PstI (carril B, 812 y 415pb.), E800 (carril C, 880pb.) y E800 digerido con PstI (carril D, 459 y 421pb.).

recombinante (en el plásmido original sólo existe uno; el segundo lo porta el gen bla). Esta doble digestión produjo el fragmento esperado de 628pb.

Previo a la secuenciación, se eligieron colonias con distintas susceptibilidades a ampicilina, principalmente de aquellas que no crecen a la concentración estándar (del grupo de las 34 que se menciona arriba). Como se menciona arriba, se pensó que estas variaciones podrían reflejar, sean cambios drásticos o cambios conservativos en comparación con el residuo original. También se eligieron colonias que crecen de manera similar a la enzima silvestre.

**Secuenciación.** De 24 colonias secuenciadas se observó la sustitución del ácido glutámico (GAA) en el residuo 37 por los siguientes codones: alanina (GCC), una por valina (GTG), dos por leucina (CTG), una por triptofano (TGG), una por metionina (ATG), una por glicina (GGC), dos por serina (TCG y TCC), dos por treonina (ACG), cuatro por arginina (3 CGG y 1 AGG), dos por histidina (CAC) y un codón de término (ámbar, TAG). Esta última mutante presenta una actividad mínima debido a que los genes se expresaron en una cepa supresora (DH5 $\alpha$ ), en la que los codones ámbar son sustituidos por ácido glutámico. Seis colonias secuenciadas no mostraron cambios en la posición 37; la actividad ante el antibiótico de dos de ellas es indistinguible al de las colonias con la  $\beta$ -lactamasa silvestre; las cuatro restantes tienen una actividad menor debido probablemente a mutaciones adicionales no identificadas. En la Tabla 3 se muestra la sensibilidad de estas colonias al crecerlas a distintas concentraciones de ampicilina. Al analizar las regiones secuenciadas se han encontrado otras mutaciones presumiblemente incorporadas por la *Taq* polimerasa a lo largo de estos genes (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad in vivo de mutantes de  $\beta$ -lactamasa en el residuo Glu37\*

Colonia	Sustitución	Ampicilina							Mutaciones adicionales encontradas
		50	100	200	500	1000	2000	5000	
10-10	Ala (GCC) <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	+	-	Ile56-Thr (ATC-ACC)
10-16	Val (GTC)	+	+	+	+	+	+	-	
10-9a	Leu (CTG) <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	-	-	Leu40-Phe (TTG-TTC)
10-15a	Leu (CTG) <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	-	-	Ala17-Val (GCG-GTG)
10-24a	Met (ATG) <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	+	-	Gln206-Gln (CAA-CAG)
10-7	Trp (TGG)	-	-	-	-	-	-	-	
10-13a	Gly (GGC) <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	-	Leu30-Pro (CTG-CCG)
10-2	Ser (TCC) <sup>a</sup>	+	-	-	-	-	-	-	
10-11a	Ser (TCG)	+	+	+	+	+	+	+	
10-17a	Thr (ACG)	+	+	+	+	+	+	-	
10-18a	Thr (ACG)	+	+	+	+	+	+	-	
10-6a	Glu (GAA) <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	-	-	
10-10a	Glu (GAA) <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	-	-	
10-19	Glu (GAA) <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	-	-	
10-9	Glu (GAA) <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	-	-	Asp50-Glu (GAT-GAA)
10-12	Glu (GAA)	+	+	+	+	+	+	+	
10-14	Glu (GAA)	+	+	+	+	+	+	+	
10-11	Arg (CGG) <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	
10-8a	Arg (CGG) <sup>c,d</sup>	+	+	-	-	-	-	-	Leu30-Gln (CTG-CAG), Asp38-Asn (GAT-AAT), Gln39-Lys (CAG-AAG).
10-12a	Arg (CGG) <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	-	-	
10-13	Arg (AGG)	+	+	+	+	+	-	-	
10-1a	His (CAC) <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	Val74-Ala (GTT-GCT)
10-14a	His (CAC)	-	-	-	-	-	-	-	
Codones de término									
10-5a	Amb (TAG)	+	-	-	-	-	-	-	Glu28-Glu (GAA-GAG)
Controles									
Cepa DH5 $\alpha$		-	-	-	-	-	-	-	
DH5 $\alpha$ /pBR322		+	+	+	+	+	+	+	
DH5 $\alpha$ /pKGS		-	-	-	-	-	-	-	

\* Se han encontrado mutaciones adicionales (incorporadas por la Taq polimerasa) con distintos efectos sobre los fenotipos producidos por el cambio en el codón mutado. Estas mutaciones se agrupan en cinco clases: a) Genes cuyo fenotipo supone la presencia de mutaciones espontáneas (no identificadas) que disminuyen la actividad de la enzima (secuenciados hasta los primeros 200 nucleótidos después del Glu37), b) Genes con mutaciones lejanas al sitio mutado o al sitio activo de la enzima y/o que pueden considerarse conservativas, c) Genes con mutaciones que pueden afectar al fenotipo producido por el cambio en la posición 37, d) Genes con mutaciones en el péptido líder que pueden afectar su expresión o secreción y e) Genes con mutaciones en el péptido líder que no tienen efecto sobre la funcionalidad de la enzima

## Discusión y Conclusiones.

Uno de los objetivos de este trabajo es presentar algunas alternativas para mejorar el rendimiento de la mutagénesis a saturación en comparación con otros métodos en base a la técnica descrita por Nelson y Long (22). Según lo observado, el diseño de los oligonucleótidos es uno de los elementos más importantes para la fijación de mutaciones. Los oligos cortos y con un contenido alto de adeninas y timinas (p. ej. el E37I) fueron incapaces de generar productos mutantes de manera confiable. Si para evitar lo anterior se disminuye la temperatura de reasociación, se favorece la unión a regiones inespecíficas, lo cual baja la cantidad del producto deseado y aumenta la producción de fragmentos espurios o falsos positivos (que pueden no amplificarse de manera observable). El segundo oligo mutagénico (E37II), tiene varias características que se utilizan comúnmente en el diseño de oligos para PCR (57): tiene un contenido de G y C cercano al 50% (el valor recomendado es del 50 al 60%) y su temperatura de reasociación es de aprox. 60°C. No es palindrómico (lo cual evita la formación de subproductos indeseables) y carece de "corridas" de G's o C's (que pueden producir inespecificidades al unirse a regiones ricas en dichos nucleótidos). Al utilizarlo en la PCR, la amplificación del fragmento esperado comprueba que fue usado como primero, pero la secuenciación directa del segundo producto (1227pb.) muestra que no incorporó mutaciones. Esto indica que los cambios no fueron editados *in vivo* sino al generar la  $\beta$ -lactamasa completa a partir del fragmento E800 en la PCR. Es improbable que estos cambios hayan sido deletados por la *Taq* polimerasa usada (*Taq* poll, Promega) porque esta enzima carece de actividad correctora 5'-3' detectable (57). Para explicar este efecto, una hipótesis razonable es que a distintos ciclos de la PCR pueden generarse productos incompletos o de degradación que no portan la mutación (fragmentos surgidos a partir del oligo HE26 que no se polimerizan hasta la zona mutante). Al ser de menor tamaño que cualquiera de los productos que acarrean la mutación, hibridan más rápidamente y se amplifican con mayor eficiencia que el producto mutante. El tercer oligo empleado (E37III) tiene todas las virtudes del anterior, pero su temperatura de reasociación es mayor en cerca de 30 grados centígrados. Al aumentar la secuencia a ambos lados del codón mutante se pudo aumentar drásticamente la temperatura de reasociación. Como resultado se observó una banda única que corresponde al tamaño esperado y en gran cantidad.

Los fragmentos mutantes son fácilmente diferenciables de productos inespecíficos de la reacción, ya sea por su tamaño o por la presencia de sitios de restricción que dan las bandas características.

Según las preferencias de aminoácidos para posiciones específicas de  $\alpha$ -hélices (58), el Glu37 no parece tener influencia sobre la formación de dicha estructura (primera  $\alpha$ -hélice de la enzima), pero tampoco afecta su estabilidad. Algunas de las sustituciones con las que se predice la mayor distorsión son las que muestran la menor actividad (Gly, His y Trp). En contraste, aquellas que mantienen la actividad poseen también la capacidad de formar  $\alpha$ -hélices (Ala, Ser, Val, Met). Como lo propone Herzberg (43), la carga negativa del Glu puede ser importante para estabilizar a una  $\beta$ -plegada adyacente: uno de los oxígenos carboxílicos forma un puente de hidrógeno con el nitrógeno de cadena principal de la posición 44 (Ile en *S. aureus PC1* y Leu en *B. licheniformis*). Sin embargo, como se ha visto, otros cambios mantienen la actividad de la enzima aún cuando no regeneran esta interacción. Pastor, et al. (59), encuentran que muchos de los residuos altamente conservados en las  $\beta$ -lactamasas de clase A forman núcleos donde la homología de secuencia es evidente. Asimismo, observan cambios correlativos alrededor del aminoácido conservado. No se observa por este método que el Glu37 forme alguna región conservada con los aminoácidos más cercanos, lo cual apoya la idea de que no se conserva por interacciones específicas con cadenas laterales vecinas. Podría pensarse que las diferencias de secuencia en dicha región son menos notorias al comparar la disposición espacial de estos residuos. Sin embargo, al observar la conformación que éstas adoptan en dos estructuras distintas (las  $\beta$ -lactamasas de *S. aureus PC1* y la de *B. licheniformis*) se observan algunas diferencias, principalmente en los contactos que forma el Glu37 con el residuo 61 (Asn en *S. aureus* y Arg en *B. licheniformis*): en el primer caso se forma un puente de hidrógeno con la cadena lateral de la Asn y en el segundo caso, un puente salino con la cadena lateral de la Arg (Fig. 12).

Por lo expuesto, no existen razones convincentes que expliquen por que esta posición se encuentra conservada a tal extremo. Con la identificación de otros residuos, en especial el ácido aspártico (similar al Glu pero con una cadena lateral más corta) y la glutamina (cadena lateral similar pero sin carga) y su caracterización *in vitro* (ensayos de actividad, secreción, etc.), se podrán conocer las limitaciones que lo han mantenido invariante. Es probable que, a diferencia de los argumentos estructurales propuestos, dicho residuo participe en alguna otra función como plegamiento, secreción, etc. En muchos casos, las mutaciones producen cambios conservativos o caen en regiones estructuralmente alejadas del Glu37, por lo que no interfieren

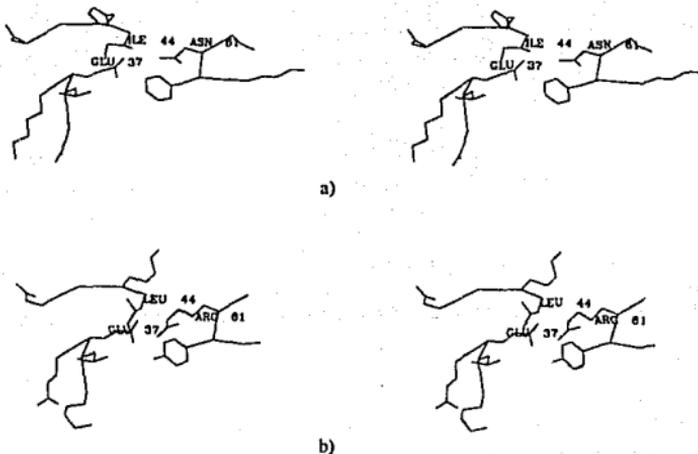


Fig. 12. Par estereoscópico de los residuos cercanos al Glu37 en la  $\beta$ -lactamasa de a) *Staphylococcus aureus* PC1 y b) *Bacillus licheniformis* 7491C. Nótese las diferencias estructurales de dicha región en las dos estructuras homólogas (ver texto).

con el cambio producido en este codón. En otros, la perturbación es obvia y se refuerza al compararla con la misma mutación en el Glu37 en un contexto silvestre.

Al carecer la *Taq* polimerasa de actividad de exonucleasa 3'-5', se espera una tasa de mutaciones de una base modificada por cada 5,000 a 100,000 nucleótidos incorporados (57). En las regiones secuenciadas de estos genes mutantes hemos encontrado una proporción significativamente mayor (de un cambio por cada 500 nucleótidos incorporados, aproximadamente). Una opción para validar el efecto de las mutaciones diseñadas es aislar los fragmentos mínimos que las contengan (como el fragmento *EcoRI-DraI* en este caso) y subclonarlos en un vector que porte al resto de la secuencia sin otros cambios. Asimismo, por el problema que

presenta la *Taq* polimerasa, no parece conveniente amplificar todo el gen al tratar de mutar una región, sino solo aquella que contenga sitios necesarios para clonarla en el vector usado como molde. Sin embargo, la mejor alternativa es el uso de otras *Taq* polimerasas (ya existentes en el mercado) que sí presentan dicha actividad. Con éstas se disminuye drásticamente la producción de mutaciones espontáneas y por lo tanto mejora el rendimiento de DNA mutante.

Como en cualquier otro tipo de PCR, la ventaja de ésta mutagénesis es que se puede insertar cualquier sitio de restricción en el fragmento mutado, ya sea para clonarlo en un vector o para facilitar su manipulación posterior. En contraste, la mutagénesis a saturación en "cassette" puede ser útil sólo en casos en donde la secuencia nativa tiene los sitios de restricción apropiados (sitios únicos alrededor de la zona a mutagenizar), o es necesario introducirlos.

Aunque la obtención de mutantes por este método tiene algunas dificultades asociadas, pensamos que sigue siendo la manera más ventajosa para lograr este fin. La modificación de algunas variables (uso de polimerasas con actividad de exonucleasa, diseño de oligos, condiciones de reacción, etc.) seguramente favorecerá la producción de DNA mutante.

Entre las sustituciones obtenidas no se observa preferencia por mutar hacia algún residuo en particular. Así, a pesar de no haber obtenido las 19 sustituciones posibles para ese aminoácido, se encontró un banco muy heterogéneo a partir de un número de transformantes relativamente bajo.

El esquema descrito puede ser utilizado también para la producción de mutaciones combinatorias (sustituciones simultáneas en cualquier región de un gen), con lo cual es posible estudiar el contenido informativo de residuos alejados en secuencia pero cercanos a nivel de estructura tridimensional, como en el caso de núcleos hidrofóbicos, sitios activos o alguna otra región funcional de interés en cualquier enzima.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## Referencias

- 1) Ulmer, K. Protein engineering. *Science* 219: 666-671, 1983.
- 2) Leatherbarrow, R. and Fersht, A. Protein engineering (review). *Prot. Eng.* 1:7-16, 1986.
- 3) Madison, E., Goldsmith, E., Gerard, R., Gething, M. and Sambrook, J. Serpin-resistant mutants of human tissue-type plasminogen activator. *Nature* 339:721-4, 1989.
- 4) Wilks, H., Hart, K., Feeney, R., Dunn, C., Muirhead, H., Chia, W., Barstow, D., Atkinson, T., Clarke, A. and Holbrook, J. A specific, highly active malate dehydrogenase framework. *Nature* 242:1541-1544, 1988.
- 5) Matsumura, M. and Matthews, B. Control of enzyme activity by an engineered disulfide bond. *Science* 243:792-794, 1989.
- 6) Hahn, K., Klis, W. and Stewart, J. Design and synthesis of a peptide having chymotrypsin-like esterase activity. *Science* 248: 1544-1547, 1990.
- 7) Robson, B. and Garnier, J. *Introduction to proteins and protein engineering*. Elsevier, Amsterdam (1986).
- 8) Moody, P. and Wilkinson, A. *Protein Engineering*. Oxford University Press, New York (1990).
- 9) Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- 10) Shortle, D. and Nathans, D. Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:21702174, 1978.
- 11) Muller, W., Weber, H., Meyer, F. and Weissmann, C. Site-directed mutagenesis in DNA: generation of point mutations in cloned beta globin complementary DNA at the positions corresponding to aminoacids 121 to 123. *J. Mol. Biol.* 124:343-358, 1978.
- 12) Mott, J., Van Arsdell, J. and Platt, T. Targeted mutagenesis *in vitro*: lac repressor mutations generated using AMV reverse transcriptase and dBrUTP. *Nucleic Acids Res.* 12:4139-52, 1984.
- 13) Sirotkin, K. Advantages to mutagenesis techniques generating populations containing the complete spectrum of single codon changes. *J. Theor. Biol.* 123:261-279, 1986.
- 14) Hutchinson, C., Phillips, S., Edgell, M., Gillam, S., Jahnke, P. and Smith, M. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.* 253:6551-6560, 1978.
- 15) Amersham UK. 1988. Oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis system, version 2.

- 16) Zoller, M. and Smith, M. Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500, 1982.
- 17) Simons, G., Veeneman, G., Konings, R., van-Boom, J. and Schoemakers, J. Oligonucleotide-directed mutagenesis of gene IX of bacteriophage M13. *Nucleic Acids Res.* 10: 821-832, 1982.
- 18) Norris, K., Norris, F., Christiansen, L. and Fiil, N. Efficient site-directed mutagenesis by simultaneous use of two primers. *Nucleic Acids Res.* 11:5103-12, 1983.
- 19) Matteucci, M. and Heyneker, H. Targeted random mutagenesis: the use of ambiguously synthesized oligonucleotides to mutagenize sequences immediately 5' of an ATG initiation codon. *Nucleic Acids Res.* 11:3113-3118, 1983.
- 20) Wells, T., Vasser, M. and Powers, D. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene* 34:315-323, 1985.
- 21) Erlich, H., Gelfand, D. and Saiki, R. Specific DNA amplification. *Nature* 331:461-470, 1988.
- 22) Nelson, R. and Long, G. A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the *Thermus aquaticus* polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 180: 147-151, 1989.
- 23) Berdy, J. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.* 14:309-406, 1974.
- 24) Waxman, D. and Strominger, J. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.* 52:825-859, 1983.
- 25) Park, J. 1987. The murein synthesis, p. 663-671. En: F. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology.* (Vol 2). American Society for Microbiology, Washington, 1987.
- 26) Lee, B. Conformation of penicillin as a transition state analog of the substrate of peptidoglycan transpeptidase. *J. Mol. Biol.* 61:463-469, 1971.
- 27) Amanuma, H. and Strominger, J. Purification and properties of penicillin-binding proteins 5 and 6 from *E. coli* membranes. *J. Biol. Chem.* 255:1173-1180, 1980.
- 28) Kozarich, J. and Strominger, J. A membrane enzyme from *Staphylococcus aureus* which catalyzes transpeptidase, carboxypeptidase and penicillinase activities. *J. Biol. Chem.* 253:1272-1278, 1978.
- 29) Tamura, T., Imae, Y. and Strominger, J. Purification to homogeneity and properties of two D-alanine carboxypeptidases I from *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 251:414-423, 1976.

- 30) Waxman, D. and Strominger, J. Sequence of active sites peptides from the penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase of *Bacillus subtilis*. Mechanism of penicillin action and sequence homology to beta-lactamase. *J. Biol. Chem.* 255:3964-3976, 1980.
- 31) Chou, P. and Fasman, G. Beta-turns in proteins. *J. Mol. Biol.* 155:135-175, 1977.
- 32) Kelly, J., Dideberg, O., Charlier, P., Wery, J., Libert, M., Moews, P., Knox, J., Duez, C., Fraipont, C., Joris, B., Dusart, J., Frère, J. and Ghuysen, J. On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a  $\beta$ -lactamase and a penicillin target. *Science* 231:1429-1431, 1986.
- 33) Samraoui, B., Sutton, B., Todd, R., Artymiuk, P., Waley, S. and Phillips, D. Tertiary structural similarity between a class A  $\beta$ -lactamase and a penicillin-sensitive D-alanyl carboxypeptidase-transpeptidase. *Nature* 320:378-380, 1986.
- 34) Pratt, R. Anderson, E. and Odeh, I. Certain monocyclic beta-lactams are beta-lactamase substrates: norcarceidin A and desthiobenzylpenicillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93:1266-1273, 1980.
- 35) Waxman, D. and Strominger, J. Limited proteolysis of the penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase purified from *Bacillus subtilis* membranes. Active water-soluble fragments generated by cleavage of a COOH-terminal membrane anchor. *J. Biol. Chem.* 256:2059-2066, 1981.
- 36) Ambler, R. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 289:321-331, 1980.
- 37) Ambler, R., Coulson, A., Frère, J., Ghuysen, J., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R., Tiraby, G. and Waley, S. A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases (letter). *Biochem. J.* 276:269-272, 1991.
- 38) Joris, B., Ghuysen, J., Dive, G., Renard, A., Dideberg, O., Charlier, P., Frère, J., Kelly, J., Boyington, J., Moews, P. and Knox, J. The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces R61* DD-peptidase family. *Biochem. J.* 250:313-324, 1988.
- 39) Herzberg, O. Refined crystal structure of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 217:701-719, 1991.
- 40) Moews, P., Knox, J., Dideberg, O., Charlier, P. and Frere, J.  $\beta$ -lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C at 2.5 Å resolution. *Proteins* 7:156-171, 1990.
- 41) Dideberg, O., Charlier, P., Wéry, J., Dehottay, P., Dusart, J., Ericum, T., Frère, J. and Ghuysen, J. The crystal structure of the  $\beta$ -lactamase of *Streptomyces albus* G at 0.3nm resolution.
- 42) Fisher, J., Belasco, J., Khosla S. and Knowles, J.  $\beta$ -lactamase proceeds via an acyl-enzyme intermediate: interaction of the *E. coli* RTEM enzyme with cefoxitin. *Biochemistry* 19:2895-2901, 1980.

- 43) Kraut, J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Ann. Rev. Biochem.* 46:331-358, 1977.
- 44) Herzberg, O. and Moulton, J. Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. Crystal structure of  $\beta$ -lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5 Å resolution. *Science* 236:694-701, 1987.
- 45) Sigal, I., DeGrado, W., Thomas, B. and Petteway, S. Purification and properties of thiol  $\beta$ -lactamase. *J. Biol. Chem.* 259:5327-5332, 1984.
- 46) Ellerby, L., Escobar, W., Fink, A., Mitchinson, C. and Wells, J. The role of lysine-234 in  $\beta$ -lactamase catalysis probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 29: 5797-5806, 1990.
- 47) Gibson, R., Christensen, H. and Waley, S. Site-directed mutagenesis of  $\beta$ -lactamase I. Single and double mutants of Glu166 and Lys73. *Biochem. J.* 272:613-619, 1990.
- 48) Jacob, F., Joris, B., Dideberg, O., Dusart, J., Ghuysen, J. and Frère, J. Engineering a novel  $\beta$ -lactamase by a single point mutation. *Prot. Eng.* 4:79-86, 1990.
- 49) Healey, W., Lubgold, M. and Richards J. H. Substrate specificities in class A  $\beta$ -lactamases: preferences for penams vs. cepheims. The role of residue 237. *Proteins* 6:275-283, 1989.
- 50) Collatz, E., Labia, R. and Gutmann, L. Molecular evolution of ubiquitous  $\beta$ -lactamases towards extended-spectrum enzymes active against newer  $\beta$ -lactam antibiotics. *Mol. Microbiol.* 4:1615-1620, 1990.
- 51) Fitts, R., Reuveny, Z., van Amsterdam, J., Mulholland, J. and Botstein, D. Substitution of tyrosine for either cysteine in  $\beta$ -lactamase prevents release from the membrane during secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8540-8543, 1987.
- 52) Kuhn, I., Stephenson, F., Boyer, H. and Greene, P. Positive-selection vectors utilizing lethality of the *EcoRI* endonuclease. *Gene* 44:253-263, 1986.
- 53) Rodriguez, R. and Tuit, R. *Recombinant DNA techniques. An Introduction.* Addison and Wesley, Massachusetts (1983).
- 54) Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28, 1990.
- 55) Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580, 1983.
- 56) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5468, 1977.
- 57) Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T. (eds.). *PCR protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego (1990).

58) Richardson, J. and Richardson, D. Amino acid preferences for specific locations at the ends of  $\alpha$ -helices. *Science* 240:1648-1652, 1988.

59) Pastor, N., Piñero, D., Valdés, A. and Soberón, X. Molecular evolution of class A  $\beta$ -lactamases: phylogeny and patterns of sequence conservation. *Mol. Microbiol.* 4:1957-1965, 1990.