

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Biotecnología

**MIGRACIÓN CATALÍTICA EN LA SUPERFAMILIA DE LAS  
 $\beta$ -LACTAMASAS: OBTENCIÓN DE LA ACTIVIDAD  
 $\beta$ -LACTAMASA EN UNA DD-PEPTIDASA**

Tesis que para obtener el título de Doctora en Ciencias Bioquímicas, presenta  
Mariana Peimbert Torres

Cuernavaca, Mor.

abril 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Lorenzo Segovia, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante la realización del mismo se recibió una beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Lorenzo Segovia

A los integrantes del comité tutorial

Dr. Armando Gómez Poyou, Dr. Lorenzo Segovia y Dr. Xavier Soberón

A los integrantes del jurado

Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos, Dr. Humberto Flores Soto,  
Dr. Alejandro Garcíarrubio Granados, Dr. Agustín López Munguía  
Canales, Dra. Gloria Saab Rincón, Dr. Lorenzo Segovia Forcella y  
Dr. Rafael Vázquez Duhalt.

A mis maestras y maestros

Q. Escobar, Dra. Saab, Dra. Valderrama, Dr. Flores y Biol. Sánchez.

A los compañeros de laboratorio (en este caso no han sido paredes las que definen el concepto)

Rosy, Viviana, Humberto, Jorge, Alex, Areli, Neto, Gina, Javier, Fily,  
Humberto, Gus, Gloria, Brenda, Mary, Lety, Ricardo, Eugenio, Manuel,  
Joel, Juanita, Enrique, Rodrigo y Sonia.

Al conjunto de grandes personas que constituyen el Instituto de Biotecnología.

A los integrantes de lo que fuera la CEPSI y SIDA.

A los guayabos

Selene, Viviana, Elia, Jimena y Ricardo

A Ricardo Rodríguez de la Vega.

A la fundación Peimbert.

A todos ellos muchas gracias.

A Usted, querido lector, también gracias.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
GENERALIDADES.....	4
La evolución de proteínas.....	5
Ingeniería de proteínas.....	10
La superfamilia de las $\beta$ -lactamasas y DD-peptidasas.....	15
OBJETIVO.....	30
RESULTADOS.....	31
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXO.....	A-1
PCR.....	A-2
PCR de colonia.....	A-4
Diseño de oligos.....	A-5
Purificación de oligos.....	A-8
PCR mutagénico.....	A-9
<i>Shuffling</i> .....	A-10
Ligaciones.....	A-12
Células competentes.....	A-14
Electroporación.....	A-15

## RESUMEN

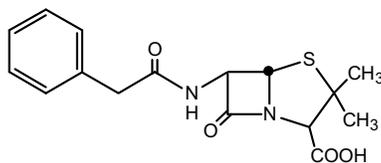
La actividad hidrolítica de las  $\beta$ -lactamasas ha surgido varias veces a partir de las DD-peptidasas. En este trabajo, mediante evolución dirigida se generó la actividad de  $\beta$ -lactamasa en el contexto de la DD-transpeptidasa PBP2x. Modificar las propiedades catalíticas de una enzima puede requerir que varias mutaciones actúen de manera sinérgica, por lo que resulta importante explorar de manera eficiente el espacio de secuencia mediante la selección de la diversidad correcta. Se diseñó una biblioteca en la que se incorporaron datos bioquímicos y estructurales. De esta biblioteca se aislaron mutantes que confieren una resistencia a cefotaxima 10 veces mayor a la original. Se demostró que tres sustituciones, localizadas en el sitio activo, son suficientes para que PBP2x adquiriera la actividad de  $\beta$ -lactamasa. El producto purificado de una mutante (MutE) tiene un incremento de  $10^5$  veces en la tasa de desacilación de cefotaxima, con respecto a la enzima silvestre. MutE no perdió su actividad sobre el sustrato sintético S2d, lo cual sugiere que todavía presenta la actividad de DD-transpeptidasa. Este trabajo muestra un posible intermediario evolutivo entre las  $\beta$ -lactamasas y las transpeptidasas necesario para el surgimiento de la resistencia a las  $\beta$ -lactamas.

## ABSTRACT

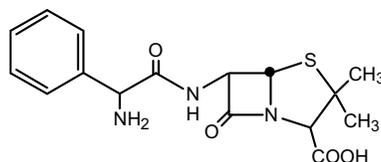
The  $\beta$ -lactamase hydrolytic activity has arisen several times from DD-transpeptidases. Directed evolution has allowed us to replicate the evolutionary process of  $\beta$ -lactamase activity emergence on a PBP2X DD-transpeptidase. Some of the most interesting changes, like modifying the catalytic properties of an enzyme, may require several mutations in concert; therefore it is essential to explore efficiently sequence space by generating the right diversity. A biased combinatorial library was designed in which biochemical and structural information were incorporated by site directed mutagenesis on relevant residues and then subjected to random mutagenesis to allow for mutations in unforeseen positions. Mutants were isolated from this library conferring 10-fold higher cefotaxime resistance levels than the background WT through mutations exclusively in the coding sequence. We demonstrate that only three substitutions in the DD-transpeptidase active site, two produced by the directed and one by the random mutagenesis, are sufficient to acquire this activity. The purified product of one mutant (MutE) had a  $10^5$ -fold increase in cefotaxime deacilation rate allowing it to hydrolyze  $\beta$ -lactams yet it has apparently conserved DD-peptidase activity. This work is the first to show a possible evolutionary intermediate between a  $\beta$ -lactamase and a DD-transpeptidase necessary for the development of antibiotic resistance.

A continuación se muestra la estructura de algunas  $\beta$ -lactamas a las que se hace referencia en el texto.

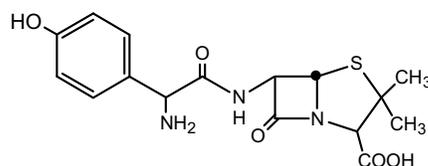
Bencil-penicilina



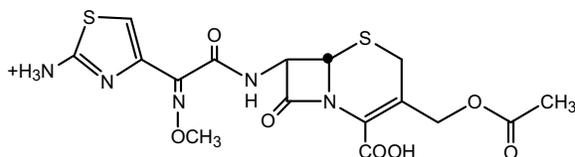
Ampicilina



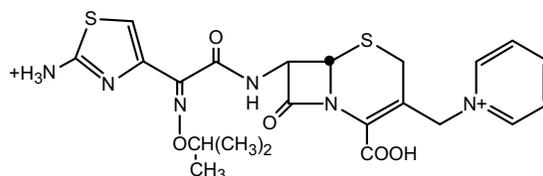
Amoxicilina



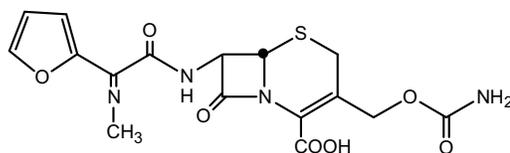
Cefotaxima



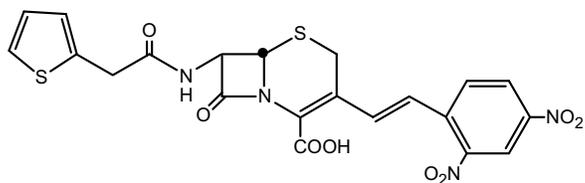
Ceftacídima



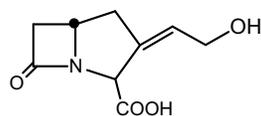
Cefuroxíma



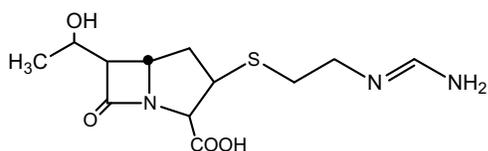
Nitrocefina



Ac. clavulánico



Imipenem



## **INTRODUCCIÓN**

### **El universo proteico o el espacio de secuencia**

Las proteínas son polímeros lineales formados con 20 aminoácidos diferentes. Con estos polímeros se catalizan la mayoría de las reacciones que suceden en los sistemas vivos; parecería un sistema sencillo para llevar a cabo tantas, tan variadas y tan eficientes reacciones, sin embargo dista mucho de serlo; si pensamos en la combinatoria de 20 en 200 (el tamaño promedio de las proteínas) es decir  $20^{200}$ , resulta que la masa del universo no alcanza para tener una molécula de cada proteína. Entonces el número de diferentes secuencias de proteínas es, para todo fin práctico, infinito (Koonin 2002).

Ahora bien, no cualquier polipéptido tiene la información para codificar una estructura secundaria y terciaria estable, mucho menos para poder llevar a cabo alguna reacción. Es decir que son pocas las secuencias de aminoácidos que resultan en enzimas. Considerando que actualmente existen alrededor de 10 millones de especies y cada especie tiene, en promedio, 5 000 genes, entonces hay  $\sim 5 \times 10^{10}$  secuencias únicas de proteínas (Koonin 2002). El número de plegamientos se ha estimado en  $\sim 1000$  (Chothia 1992), lo cual indica que diversas secuencias dan lugar al mismo plegamiento y que el mismo plegamiento sirve para varias funciones.

Al parecer la creación de las primeras proteínas plegadas fue un paso limitante para la aparición de la vida (basada en proteínas), por lo tanto las proteínas existentes han surgido por divergencia a partir de un número limitado de plegamientos ancestrales. La duplicación de genes seguida de mutación y selección es el principal mecanismo por el cual evolucionan nuevas funciones proteicas (Patthy 1999).

Lo anterior nos lleva a plantear la hipótesis central de este trabajo: si naturalmente surgen constantemente nuevas funciones enzimáticas a partir de la modificación de proteínas existentes, entonces en el laboratorio se puede reproducir este proceso y llevar a cabo una migración catalítica (cambio de función).

## **GENERALIDADES**

Para lograr que una enzima haga una reacción diferente es prudente entender algunos temas, sobre los cuales comentaré los conceptos y casos más

relevantes para el problema particular de la obtención de una  $\beta$ -lactamasa a partir de una DD-transpeptidasa.

- Evolución de las proteínas: cómo se generan nuevas actividades enzimáticas en la naturaleza.
- Ingeniería de proteínas: que otros casos de modificaciones enzimáticas se han logrado en el laboratorio.
- El caso particular, la superfamilia estructural de las  $\beta$ -lactamasas y las DD-peptidasas: como son las  $\beta$ -lactamasas y las DD-peptidasas.

## La evolución de proteínas

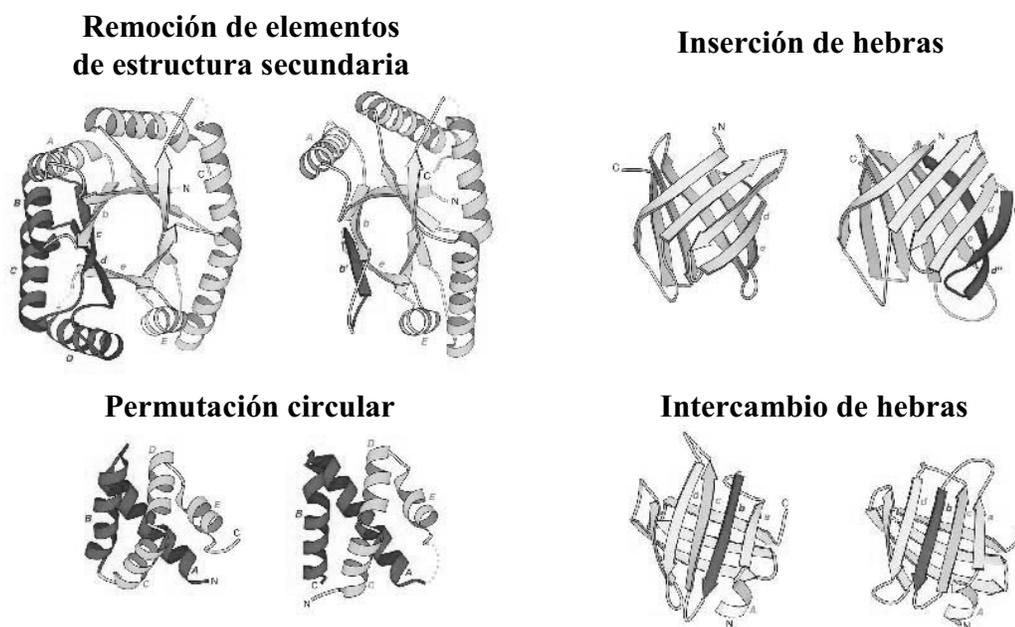
Durante eones, a partir de procesos de selección natural y deriva génica, las proteínas han divergido dando lugar a proteínas con diferentes características y funciones (Voet 1990). Las mutaciones puntuales, remociones e inserciones son los eventos genéticos más frecuentes en el proceso de la evolución de las proteínas; estas modificaciones son en su mayoría neutrales, sólo algunas mutaciones generan cambios estructurales y funcionales (Patthy 1999). Dadas las características de las proteínas los cambios estructurales suelen seguir las siguientes reglas (Lesk 2001, D'Alfonso 2001):

- La mayoría de los elementos de estructura secundaria se conservan
  - El núcleo de las proteínas conserva la misma topología
  - Las regiones periféricas pueden cambiar completamente
  - La geometría relativa de los distintos elementos puede cambiar (hélices y hojas pueden rotar entre si)
- Cuando la función es la misma, los elementos directamente relacionados con ésta se mantienen.

Chothia y Lesk observaron, en 1986, que aquellas secuencias con una identidad  $>30\%$  tienen el mismo plegamiento; es decir, secuencias muy distintas pueden conformar un mismo andamio. De lo anterior se infiere que, durante la divergencia de las proteínas, las estructuras cambian mucho más despacio que las secuencias, incluso se puede perder la identidad de secuencia

por debajo de la probabilidad al azar<sup>1</sup> y todavía encontrar homología por criterios estructurales y de actividad (Orengo 2001). Esta capacidad de las estructuras de amortiguar la presencia de sustituciones también se ha observado en experimentos de mutagénesis intensiva (Huang 1996).

Aunque no son muchas, hay excepciones a la regla de conservación del plegamiento con identidades > 30% (Grishin 2001). Los mecanismos más comunes para el cambio de plegamiento son: la inserción, remoción o sustitución de elementos de estructura secundaria, permutaciones circulares, invasión o retiro de hebras beta, intercambio de hebras beta e intercambio de dominios (**Figura 1**). Los ejemplos de proteínas homólogas con diferentes plegamientos, dan lugar a un nuevo paradigma que indica que la evolución de las estructuras proteicas es plástica (Kinch 2002).



**Figura 1.** Ejemplos de cambios estructurales en proteínas homólogas con una identidad >30%. En rojo se indican los elementos de estructura secundaria que cambian. (Grishin 2001)

<sup>1</sup> Cuando dos secuencias sin ninguna relación se alinean sin *gaps* tienen un promedio de identidad del 6%, lo cual está dado por la frecuencia de aparición de los 20 aminoácidos (Doolittle 1981). Cuando se utilizan algoritmos para alinear secuencias que permiten introducir *gaps*, entonces los valores de identidad estadísticamente significativos son mayores al 20-30%, dependiendo de la longitud del fragmento alineado (Sander 1991).

## **La generación de nuevas funciones y la plasticidad de los sitios activos**

Mediante la comparación de todas las estructuras depositadas en el PDB<sup>2</sup> se ha detectado la presencia de motivos en proteínas sin ninguna relación aparente (Rusell 1998). Este hecho se puede explicar de varias maneras: Rusell, por ejemplo, propone un modelo en el cual las estructuras proteicas ancestrales estaban formadas por agregados de pequeños polipéptidos, posteriormente, con la evolución de la fidelidad en la replicación de ADN, surgieron los dominios de un sólo polipéptido a partir de la fusión de estos minigenes, y justamente la combinación de los pequeños polipéptidos generó nuevas funciones (Lupas 2001).

Actualmente, la duplicación génica es el mecanismo predominante por el cual surgen nuevos genes, el gene duplicado puede acumular mutaciones divergentes y ocasionalmente surge una nueva función. La duplicación génica se puede dar a varios niveles, desde duplicaciones parciales de un gene, hasta la duplicación de genomas completos (Patthy 1999). Las proteínas originadas en eventos de duplicación son llamadas *parálogas*, mientras que las originadas a partir de eventos de especiación son llamadas *ortólogas*. Los procesos de transferencia horizontal también pueden dar lugar a nuevas funciones, este fenómeno ocurre sobretodo en procariotes (Nelson 1999).

Existen varios modelos sobre cuál proteína se recluta para llevar a cabo una nueva función, los principales son el de evolución retrograda de Horowitz y el de evolución por parches de Jensen (Rison 2002). En el modelo de evolución retrograda (Horowitz 1945), un organismo utiliza la molécula A hasta que ya no está disponible, en esta condición ambiental el organismo capaz de sintetizar la molécula A partiendo de B tendrá una mayor adecuación, y así sucesivamente; en este modelo las enzimas mantienen la afinidad por el ligando y el sustrato de una enzima se convierte en el producto de la enzima previa en la ruta metabólica. En el modelo de la evolución por parches (Jensen 1976), las enzimas ancestrales presentan actividades poco específicas, y mediante procesos de duplicación y especialización se llegaría a las nuevas enzimas; en este otro modelo el tipo de reacción es lo que se mantiene. Estos

---

<sup>2</sup> PDB, Protein Data Bank, es la base de datos que comprende todas las estructuras proteicas publicadas ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).

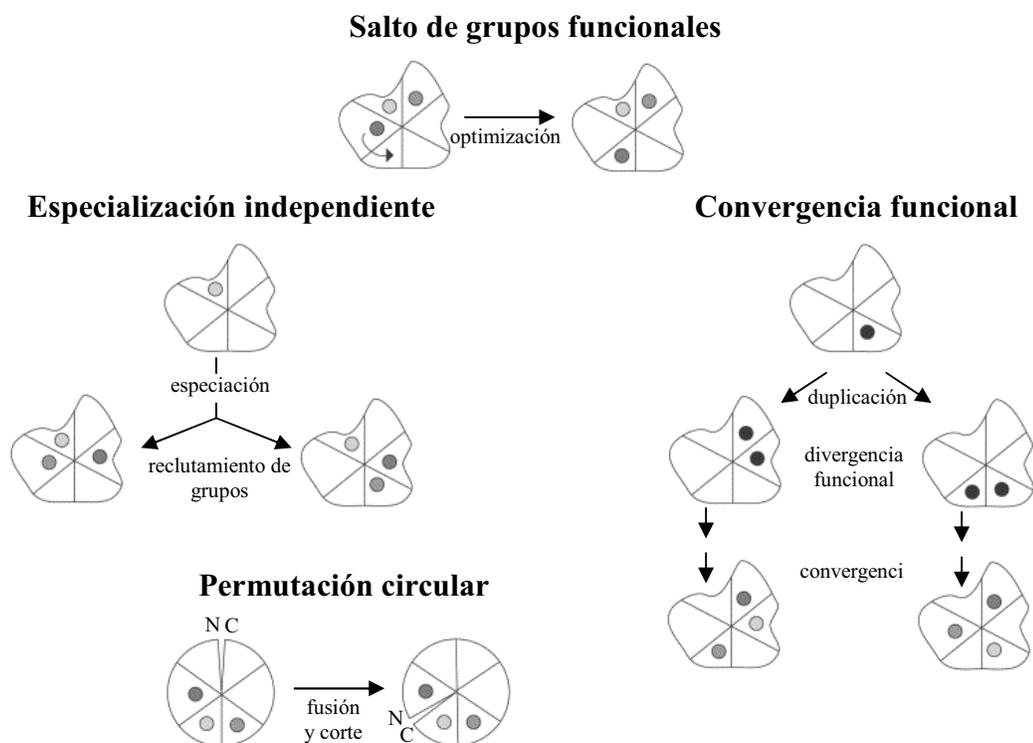
dos modelos están basados en algunos ejemplos, y recientemente se están empezando a hacer estudios sistemáticos para poder hacer algunas generalizaciones.

Thornton y col. (Todd 2001) compararon el número EC (la clasificación funcional de las enzimas, *Enzyme Commission number*) con las secuencias de las proteínas del PDB, y encontraron que cuando dos proteínas homólogas tienen una identidad > 40% los cuatro dígitos de EC se conservan y cuando la identidad de secuencia < 30% los cambios de función son significativos. Además encontraron que los cambios de especificidad son comunes dentro de las superfamilias, mientras que el tipo de química de la reacción, en general, se mantiene. De este análisis vuelven a llegar a la conclusión de que naturalmente las proteínas “antiguas” son reestructuradas para realizar nuevas funciones mediante la duplicación y mutación.

La manera más sencilla de tener reacciones químicas semejantes a partir de enzimas homólogas es mediante la conservación de los residuos catalíticos, lo cual sucede en muchos casos; sin embargo existen ejemplos de enzimas homólogas con la misma química en los cuales no se conservan los grupos funcionales a nivel de la secuencia (Gerlt 1998). A veces los átomos están en una posición equivalente y otras veces los residuos catalíticos pueden localizarse en distintos lugares del andamio. Esta variabilidad del sitio activo puede ser el resultado de i) el salto de grupos funcionales de un lugar a otro para la optimización de la catálisis; ii) la especialización independiente de una baja actividad en diferentes linajes filogenéticos; iii) convergencia funcional posterior a eventos de divergencia; o iv) eventos de permutación circular (Todd 2002) (**Figura 2**).

Estas diferencias funcionales en proteínas homólogas resultan en problemas serios para la anotación automática de los genomas. En la era postgenómica es indispensable predecir eventos de divergencia funcional, para lo cual se están desarrollando nuevas herramientas computacionales; algunas se basan en detectar los cambios en la tasa de mutagénesis sitio específica, es decir, si se supone que la importancia funcional de cada residuo es inversamente proporcional a la tasa de cambio de aminoácido, entonces un cambio de función de la proteína implica el cambio de función en algunos residuos y este se verá

reflejado en la tasa de cambio de los mismos; de esta manera se pueden identificar los linajes filogenéticos con diferente función (Gaucher 2002).



**Figura 2.** Representación esquemática de los mecanismos posibles para la generación de residuos catalíticos diferentes con la misma función. Cada objeto representa una enzima, y cada punto un residuo catalítico. (Todd 2002)

### La evolución de los proteomas

Las secuencias de los genomas permiten empezar a analizar la evolución de los proteomas. Chothia y colaboradores (Teichmann 2001) analizaron las enzimas de las rutas metabólicas de moléculas pequeñas de *E.coli*, que si bien es un universo muy acotado, tiene pocos problemas de anotación. Ellos encontraron que la mayoría de estas proteínas contienen tanto hélices alfa, como hojas beta (dominios  $\alpha/\beta$ ), donde el barril TIM constituye el plegamiento más común. La mitad de estas proteínas están formadas por un solo dominio, y en aquellas proteínas con la misma combinación de dominios el orden de los mismos se conserva. Se observó una correlación directa entre la distancia entre

los genes y la distancia metabólica<sup>3</sup> de las enzimas. Las proteínas homólogas en general conservan el mecanismo catalítico o la unión al cofactor, y en muy pocos casos mantienen la unión al ligando. Además las proteínas homólogas se distribuyen en su mayoría en distintas rutas metabólicas. Con todas estas evidencias concluyen que las enzimas de las rutas metabólicas de moléculas pequeñas de *E.coli* siguen el modelo de evolución por parches.

Es importante notar que la distribución de los plegamientos de proteínas no es homogénea, hay algunos plegamientos poblados con muchas secuencias y muchos plegamientos con un sólo elemento. La distribución de los plegamientos describe una ecuación de potencia (del estilo  $f(i) \sim (i+a)^y$ , donde  $f(i)$  es la frecuencia de plegamientos presentes en  $i$  familias). Esta ecuación se puede ajustar a modelos matemáticos simples basados en nacimiento, muerte y proliferación, en los que el principio de articulación preferencial es determinante; es decir que los plegamientos más representados cada vez estarán más representados y en el equilibrio tendrán una tasa de nacimiento y muerte semejante, y los plegamientos poco representados se generarán y se perderán rápidamente. Lo cual implica que la distribución de plegamientos inicial es determinante para la distribución en equilibrio, y que no es necesario recurrir a argumentos de atractores determinados por características fisicoquímicas ni a los argumentos de convergencia (Koonin 2002).

## Ingeniería de proteínas

Por muchos años la identificación de biocatalizadores se limitó a la búsqueda de microorganismos con la actividad deseada; actualmente el surgimiento de la tecnología del ADN recombinante ha permitido el rediseño de los biocatalizadores a nivel molecular (Arnold 2001). El rediseño de proteínas se refiere a la habilidad de alterar la estructura de una enzima para causar un cambio en su función.

Existen dos grandes escuelas para hacer ingeniería de proteínas, una es de diseño racional y otra es de evolución dirigida. La primera se basa en hacer análisis cuidadoso e intensivo sobre la enzima a modificar y posteriormente llevar a cabo mutagénesis dirigida al sitio. Este acercamiento permite probar

---

<sup>3</sup> Distancia metabólica es una medida del número de pasos metabólicos que separan a dos enzimas (Rison 2002)

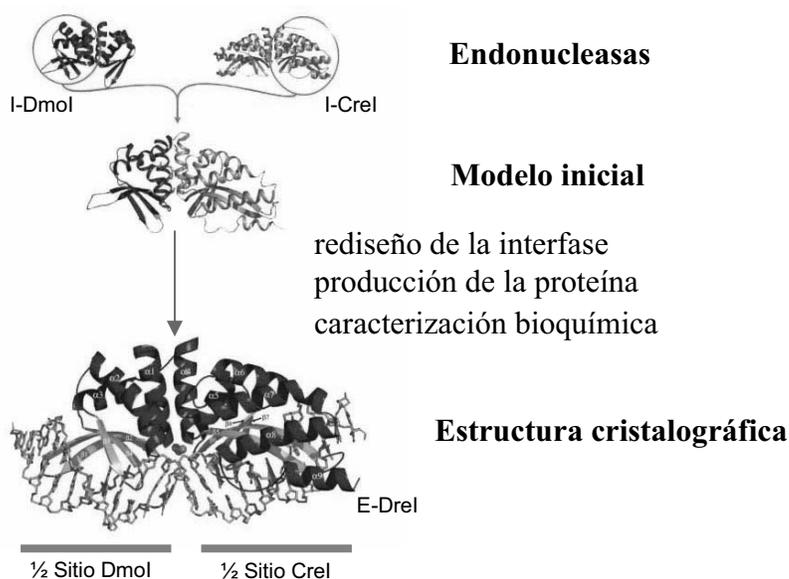
hipótesis sobre la función de los residuos y tiene el inconveniente de necesitar mucha información previa (Penning 2001). La evolución dirigida se basa en fuerza bruta, consiste en hacer grupos de variantes, buscar dentro de éstas aquellas que tengan las características deseadas y someterlas a nuevos ciclos de generación de variantes y búsqueda. La principal virtud de este acercamiento es que no necesita (casi) ninguna información previa, y su desventaja es que se requieren metodologías poderosas para generar grandes bibliotecas y poder evaluarlas (Zhao 1997). La evolución dirigida permite encontrar soluciones por vías inesperadas, sin embargo, en el diseño racional cuando el cambio propuesto da el resultado esperado, el diseñador entiende el principio bioquímico que le dio lugar (Penning 2001).

Generalmente la ingeniería de proteínas se lleva a cabo mediante el uso de una poderosa batería de programas de cómputo y de diversas metodologías experimentales, dentro de las más utilizadas están: la mutagénesis dirigida al sitio, la formación de quimeras entre dos enzimas, la modificación postraduccional, y las de evolución dirigida que son el despliegue en fagos, PCR mutagénica y recombinante, tamizaje robótico, etc.

La modificación de enzimas es de particular interés para las compañías biotecnológicas, por lo anterior, algunos de los avances al respecto no son públicos. Sobre el creciente número de trabajos académicos en ingeniería de proteínas existen varias revisiones actualizadas (Brannigan 2002, Saven 2002, Zhao 2002). Los ingenieros de proteínas han logrado aumentos en la estabilidad (Van den Bur 1998, Miyazaki, 2000 Merz 2000), cambios en la especificidad del sustrato (Viadiú 1995, Jurgens 2000, Sun 2002), inversión de la estereoquímica (Liebeton 2000, Fong 2000), y generación de nuevos mecanismos de reacción en un mismo sitio activo (Pinto 1997, Xiang 1999, Branney 2003). A continuación resumo algunos casos que considero ilustrativos.

Las técnicas de evolución dirigida, en un principio, se inspiraron en la potencia de los procesos que rigen la selección natural y finalmente no es ni más ni menos que iterar usando química combinatoria. Estas técnicas son particularmente poderosas para aquellas características que, como la estabilidad, responden a mutaciones puntuales aditivas, distribuidas e independientes. Por ejemplo con 5 ciclos de mutagénesis al azar, se logró el

aumento de la estabilidad térmica de la subtilisina E. Ocho sustituciones en aminoácidos de la superficie lograron que la temperatura óptima de la subtilisina E aumentara en 17°C (Zhao 1999). Otro acercamiento muy interesante para incrementar la termoestabilidad de las enzimas es el trabajo de van Loon y col (Lehmann 2000), ellos alinean 13 secuencias de fitasas homólogas, a partir de este generan una secuencia consenso, misma que sintetizan y expresan. Dicha construcción es de 15 a 26°C más termoestable que las enzimas naturales que le dieron lugar.

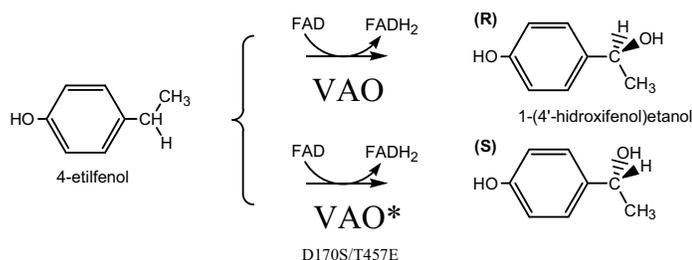


**Figura 3.** Estrategia de diseño de la quimera entre I-DmoI y I-CreI. La endonucleasa E-DreI, reconoce un sitio de DNA también quimérico (Chevalier 2002).

Como ejemplo de cambio de especificidad, fusión de dominios (quimeras) y diseño de interfases, hay que mencionar el trabajo Stoddard y col. (Chevalier 2002), quienes al fusionar dos proteínas generaron una endonucleasa altamente específica (**Figura 3**). En este trabajo utilizaron DmoI y CreI, dos endonucleasas de la misma familia (LAGLIDADG *homing*), DmoI es una proteína monómerica formada por dos dominios semejantes, mientras que CreI es un homodímero; en ambos casos los dos dominios identifican la secuencia de ADN y el sitio activo se encuentra en la interfase entre los dos dominios; hicieron la fusión con el dominio N-terminal de DmoI y CreI, modificando la interfase para que esta enzima presentara actividad. La nueva interfase fue

diseñada computacionalmente, primero identificaron aquellos residuos que en el modelo mostraran choques estéricos, y aquellos que contribuían substancialmente a la energía libre de la interfase, se identificaron un total de 14 residuos. Posteriormente hicieron una biblioteca teórica utilizando 19 aminoácidos en cada posición (todos menos cisteína) y 500 rotámeros por aminoácido, esta biblioteca fue evaluada y 16 secuencias resultaron energéticamente más favorecidas. Mediante mutagénesis dirigida al sitio se generaron las 16 enzimas y las tres más solubles se purificaron y caracterizaron. En los tres casos las enzimas hidrolizan y reconocen específicamente una secuencia de ADN que corresponde a la mitad del sitio de DmoI más la mitad del sitio CreI. El cristal muestra una interfase bien empacada y del tamaño esperado (1 400 Å<sup>2</sup>) (**Figura 3**).

Para lograr los cambios esteroespecíficos se han seguido diferentes estrategias, en unos casos se ha modificado el sitio activo para que el sustrato gire 180° (Nakajima 1999), y en otros casos se ha logrado relocalizando algún residuo catalítico dentro del sitio activo. van Berkel y col (van den Heuvel 2000) invirtieron la esteroespecificidad de la vainillil-alcohol oxidasa VAO; esta flavoenzima convierte el 4-etilfenol en (R)-1-(4'-hidroxifenol)etanol. Existe otra enzima relacionada que lleva a cabo la misma reacción pero favorece el enantiómero S. De las diferencias más importantes entre estas dos enzimas es la localización del residuo que funciona como donador de protón. Por mutagénesis dirigida al sitio movieron la base general al lado opuesto del sitio activo (D170S/T457E), logrando que más del 80 % del producto resulte ser el enantiómero S. La estructura de la mutante con un inhibidor indica que el cambio en la selectividad está dado por el cambio de la posición de la molécula del agua que ataca al sustrato (**Esquema 1**).



**Esquema 1.** Reacción que lleva a cabo la vainillil-alcohol oxidasa (la enzima silvestre VAO, la enzima modificada VAO\*)

Con la intención de obtener una proteasa específica para prolina, Ménez y col (Quéménéur 1998) insertaron la maquinaria proteolítica a una ciclofilina, enzima que cataliza la isomerización *cis-trans* de los enlaces X-Pro, pero no hidroliza estos enlaces. Basados en la información existente sobre las serin-proteasas decidieron mutar a serina los residuos más cercanos al carbono del enlace amida del sustrato; de las cuatro mutantes que hicieron dos presentaron actividad; posteriormente con el fin de aumentar la actividad le agregaron una histidina y un ácido aspártico, completando así la triada catalítica. Esta nueva enzima (A91S/F104H/N106D) cataliza la hidrólisis específica de los enlaces X-Pro con una eficiencia ( $k_{cat} / K_m$ ) de  $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

El número de casos publicado con diseños *de novo* es muy reducido. De cualquier forma, se han reportado casos impresionantes, como el desarrollado por Bolon y Mayo (Bolon 2001). En este trabajo se diseñó el sitio activo en su conjunto, tanto en la capacidad de unir al sustrato como en la presencia de actividad catalítica. Los autores usaron como andamio la tioredoxina y la actividad que implantaron fue la hidrólisis nucleofílica del *p*-nitrofenil acetato. Esta reacción ocurre mediante la formación de un intermediario acil-enzima. Cada uno de los residuos de la tioredoxina se intercambió *in silico* por la histidina unida al sustrato, y se permitió que los demás residuos cambiaran a alanina (o permanecieran igual). Posteriormente se permitió a aquellos residuos que cambiaron a alanina, el cambio por los otros 18 residuos para mejorar las interacciones con el sustrato. Pensando en que por un lado se requiere afinidad por el estado de transición y que por el otro el intermediario debe ser inestable, estos modelos utilizaban rotámeros de alta energía. Los modelos se evaluaron con una función de energía y con una función de accesibilidad hidrofóbica al solvente, esta última como medida de reconocimiento del sustrato. Las dos mejores secuencias (F12H/Y70A y F12A/L17H/Y70A) se sintetizaron y purificaron, ambas presentaron la actividad diseñada, la limitante de este trabajo es la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$   $2.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y  $k_{cat}/k_{unecat}$  180), valores relativamente modestos, pero comparables a aquellos que presentaron los primeros anticuerpos catalíticos (Pollack 1986).

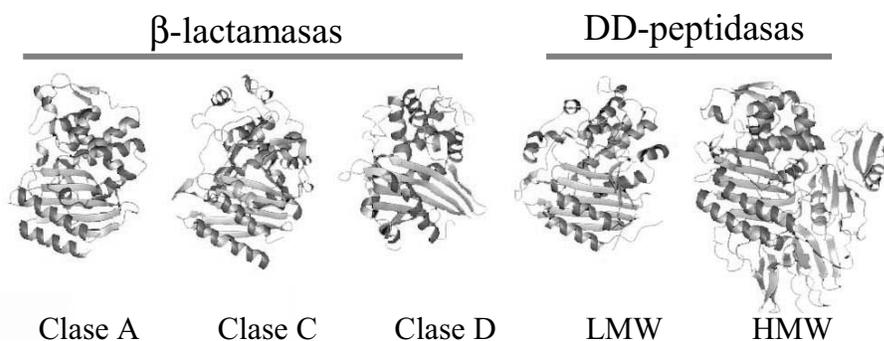
Este campo de la biotecnología se está ampliando por diversos caminos, desde la modificación de rutas metabólicas mediante el uso de varias enzimas

rediseñadas (Schmidt-Dannert 2000); el desarrollo de metodologías que permitan la generación de bibliotecas cada vez más grandes (Cho 2000, Keefe 2001) y la evaluación de las mismas (Olsen 2000); la incorporación de nuevos grupos funcionales en las enzimas aumentado el número de aminoácidos y de tARNs (Mehl 2003, Wang 2003, Santoro 2003), así como el desarrollo de nuevos programas de cómputo que incorporen más información y que permitirán que el diseño sea cada vez más predictivo (Bolon 2002, Gordon 2003).

De cualquier manera, lo que realmente hace que la ingeniería de proteínas se desarrolle son los estudios de bioquímica y biología molecular, desde el crecimiento de las bases de datos de estructuras y secuencias de proteínas hasta la caracterización cinética de alguna enzima. Es decir, para que la ingeniería de proteínas sea predictiva, aún hacen falta muchos estudios, tanto extensivos como intensivos, que permitan hacer modelos generales sobre el funcionamiento enzimático.

## La superfamilia estructural de las $\beta$ -lactamasas y DD-peptidasas

Las serin- $\beta$ -lactamasas, las DD-peptidasas y las esterases (tipo VII) constituyen una superfamilia definida tanto en el CATH como en el SCOP<sup>4</sup>. Estas enzimas están distribuidas, esencialmente, en eubacterias ([www.sanger.ac.uk/Software/Pfam](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam)). A la fecha existen 24 proteínas con estructura conocida de esta superfamilia (**Figura 4** y **Tabla 1**).



**Figura 4.** Estructuras de la superfamilia de  $\beta$ -lactamasas / DD-peptidasas.

<sup>4</sup> CATH ([www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath](http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath)) y SCOP ([www.bio.cam.ac.uk/scop](http://www.bio.cam.ac.uk/scop)), son sistemas de clasificación de estructura de proteínas.

**Tabla 1.** Proteínas con estructura conocida de la superfamilia  $\beta$ -lactamasa/D-ala D-ala carboxipeptidasa; entre paréntesis se indica el número de cristales depositados en el PDB (www.bio.cam.ac.uk/scop (sep 02)).

---

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>DD carboxipeptidasa/transpeptidasa</b></li> <li><i>Streptomyces sp.</i>, K15 (7)</li> <li><i>Streptomyces sp.</i>, R61 (4)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Pseudomonas aeruginosa</i>, PER-1 (1)</li> <li><i>Serratia marcescens</i>, Sme-1 (1) hidroliza imipenem</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Esterasa EstB</b></li> <li><i>Burkholderia gladioli</i> (2)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><math>\beta</math>-lactamasa, clase C</b></li> <li><i>Citrobacter freundii</i> (2)</li> <li><i>Enterobacter cloacae</i>, P99, cefalosporinasa (4)</li> <li><i>Escherichia coli</i>, cefalosporinase (24)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><math>\beta</math>-lactamasa, clase A</b></li> <li><i>Escherichia coli</i>, TEM-1 (18)</li> <li><i>Klebsiella pneumoniae</i>, TEM52 (1)</li> <li><i>Escherichia coli</i>, TOHO-1 (1)</li> <li><i>Proteus vulgaris</i> (1)</li> <li><i>Klebsiella pneumoniae</i>, SHV-1 (2)</li> <li><i>Pseudomonas aeruginosa</i>, PSE-4 carbenicilinas (2)</li> <li><i>Staphylococcus aureus</i> (16)</li> <li><i>Bacillus licheniformis</i> (5)</li> <li><i>Enterobacter cloacae</i>, NMC-A carbapenemasa (2)</li> <li><i>Streptomyces albus G</i> (1)</li> <li><i>Mycobacterium fortuitum</i> (1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><math>\beta</math>-lactamasa, clase D</b></li> <li><i>Pseudomonas aeruginosa</i>, OXA-10 (10)</li> <li><i>Pseudomonas aeruginosa</i>, OXA-13 (3)</li> <li>• <b>DD-transpeptidasa</b></li> <li><i>Streptococcus pneumoniae</i> (4)</li> <li><i>Escherichia coli</i> (1)</li> <li>• <b>DD-aminopeptidasa</b></li> <li><i>Ochrobactrum anthropi</i> (1)</li> </ul>

---

Thornton y col (Todd et al., 2001) definen esta superfamilia de la siguiente manera: la **estructura** comprende una hoja beta de 5 hebras antiparalelas, bordeada en ambos lados por  $\alpha$ -hélices, tiene un sitio común de unión a penicilina y presenta tres pequeñas firmas que determinan el sitio activo (la primera, SxxK, incluye la serina catalítica, las otras dos, [SY]x[NV] y K[TS]G, forman las paredes del sitio (Ghuysen 1994)). El **sustrato** contiene un enlace peptídico. El **mecanismo de reacción** involucra un doble desplazamiento que sucede mediante la formación de dos intermediarios tetraédricos. En el primer paso, una serina conservada lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el carbonilo del enlace peptídico del sustrato, formando un intermediario acil-enzima; el segundo paso involucra la hidrólisis (o aminólisis) de este intermediario. Una o dos bases se requieren en el sitio activo, una para activar la serina para la acilación y otra para activar el agua para la desacilación.

## Las DD-peptidasas o PBPs

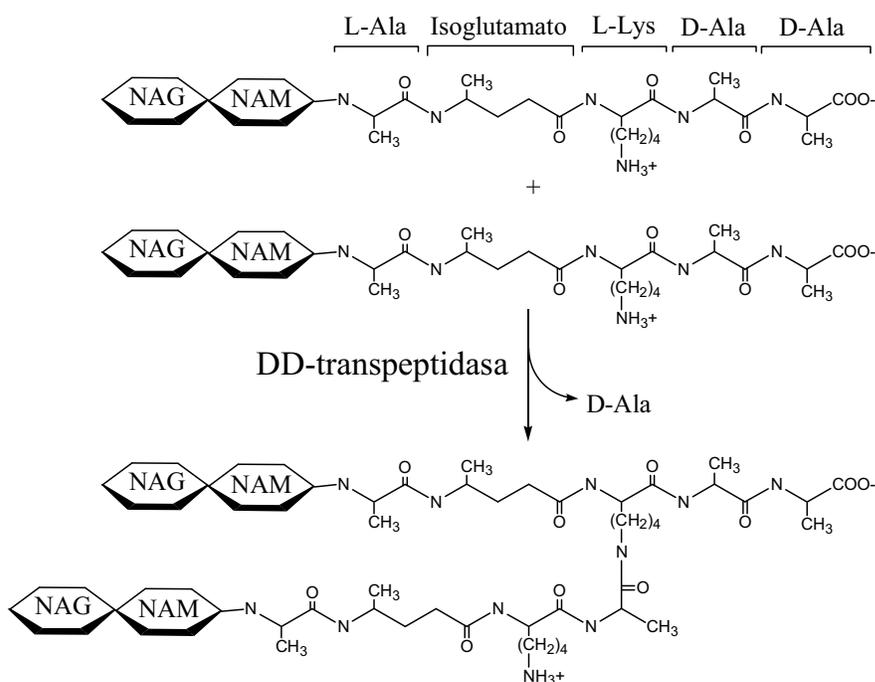
Las células bacterianas son contenidas, definidas y protegidas por un exoesqueleto de peptidoglicano. Esta pared es de tal importancia para las bacterias que es el blanco de los antibióticos más usados, los  $\beta$ -lactámicos. Estos antibióticos inhiben a las enzimas que sintetizan y remodelan el peptidoglicano. Debido a que estas enzimas actúan sobre enlaces peptídicos entre dos D aminoácidos, se llaman DD-peptidasas; también se llaman proteínas unidoras de penicilina (PBPs), puesto que originalmente se identificaron mediante su unión covalente a penicilina radioactiva. (Young 2001)

Las bacterias tienen varias PBPs, por ejemplo *Escherichia coli* presenta 12 PBPs, estas enzimas tienen un peso molecular de 20 a 120 kDa y son subdivididas en dos grupos, las de alto peso molecular (HMW) y las de bajo peso molecular (LMW), las cuales se pueden dividir a su vez en las subclases A, B y C. Las LMW PBPs tienen un dominio de transpeptidación/hidrólisis mientras que las HMW tienen además un dominio N-terminal, que en algunos casos presenta actividad de transglucosidasa.

Las LMW llevan a cabo predominantemente reacciones de hidrólisis semejantes a las proteolíticas y entonces también son llamadas DD-carboxipeptidasas o DD-endopeptidasas según sea el caso. Las HMW llevan a cabo reacciones de DD-transpeptidación (**Esquema 2**) y con frecuencia son blancos letales de los antibióticos, mientras que las LMW suelen ser proteínas no esenciales para el organismo.

La función de estas enzimas *in vivo* se ha estudiado sobretodo en *E. coli*. Se sabe que las PBP1a y 1b son responsables de la elongación del *sacculus*, la PBP2 mantiene la forma alargada mientras que la PBP3 se necesita para la formación del *septum* durante la división celular. A pesar de grandes esfuerzos es muy poco lo que se sabe sobre las demás PBPs, en gran medida debido a que estas enzimas tienen actividades muy semejantes. Lo que da como resultado que mutaciones en una PBP pueden carecer de fenotipo, puesto que otra PBP puede realizar su función, idea que se le ha llamado “teoría de las sustituciones equivalentes” (Young 2001). Con esto en mente el grupo de Young se ha dedicado a hacer una biblioteca de cepas en las que ha mutado de manera combinatoria las PBPs, lo que ha llevado a observaciones interesantes: remover

simultáneamente las 7 LMW PBPs no afecta la cinética de crecimiento (Denome 99); algunas combinaciones impiden la infección por bacteriofagos, algunas otras resultan en la resistencia a antibióticos como aztreonam y mecillinam, y en muchas su crecimiento es sensible a temperatura. Debido a la existencia de un solapamiento de las actividades de las PBPs y a que la mayoría de estas no son esenciales para la viabilidad, la identificación de sus funciones biológicas sigue pendiente.



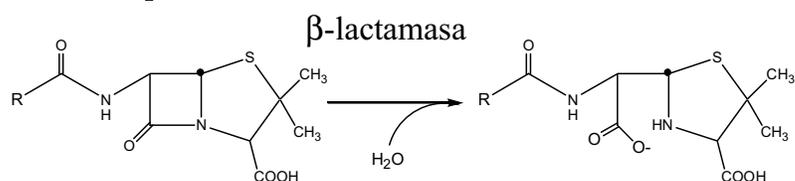
**Esquema 2.** Reacción que lleva a cabo la DD-transpeptidasa.

La actividad *in vitro* de las DD-peptidasas contra los precursores de peptidoglicano tiene constantes de recambio y especificidad muy bajas ( $k_{cat} / K_m$   $3.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , Adedirán 1999), por lo que se ha propuesto que estas enzimas tienen que actuar en ambientes membranales y/o en complejos multienzimáticos (Holtje, 1998).

### Las $\beta$ -lactamasas

Las  $\beta$ -lactamasas son el principal mecanismo de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, fundamentalmente porque catalizan eficientemente la hidrólisis irreversible del enlace amida del anillo lactámico, dando lugar a productos biológicamente inactivos (**Esquema 3**). Hasta la fecha se han identificado más de 340  $\beta$ -lactamasas (Merueh 2002). Algunas de estas enzimas

son tan eficientes que su velocidad catalítica está limitada por la difusión del sustrato. (Hard, 1984 y Bulychev 1999). Las  $\beta$ -lactamasas pueden ser codificadas en el cromosoma o en plásmidos y pueden producirse ya sea constitutivamente o de manera inducida. Con base en su secuencia las serin  $\beta$ -lactamasas se dividen en tres clases A, C y D (**Figura 5**); la clase B está compuesta por metalo  $\beta$ -lactamasas que tienen uno o dos átomos de  $Zn^{2+}$  y no forman parte de esta superfamilia estructural. Madeiros y colaboradores (Bush 1995) clasificaron de manera funcional a estas enzimas recopilando todos los datos cinéticos conocidos; de tal análisis resulta que la especificidad de las  $\beta$ -lactamasas corresponde de manera general a la clasificación estructural: las  $\beta$ -lactamasas clase A hidrolizan penicilinas y en algunos casos cefalosporinas, y se inhiben por el ácido clavulánico; las clase B hidrolizan la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos incluyendo las carbapenemas y se inhiben por EDTA; las clase C hidrolizan cefalosporinas, mientras que las clase D hidrolizan penicilinas y oxacilinas, y se inhiben por NaCl.



**Esquema 3.** Reacción que lleva a cabo la  $\beta$ -lactamasa

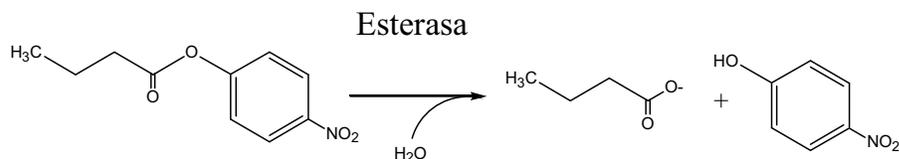
<b>Clase A</b>	[FY]-x-[LIVMFY]-x- <b>S</b> -[TV]-x-K-x(4)-[AGLM]-x(2)-[LC]
<b>Clase C</b>	F-E-[LIVM]-G- <b>S</b> -[LIVMG]-[SA]-K
<b>Clase D</b>	[PA]-x- <b>S</b> -[ST]-F-K-[LIV]-[PAL]-x-[STA]-[LI]

**Figura 5.** Secuencias consenso para las diferentes clases de  $\beta$ -lactamasas. En negritas la serina catalítica. Las serin  $\beta$ -lactamasas y cada una de sus clases se pueden identificar certeramente utilizando las firmas anotadas en PROSITE. ([www.expasy.ch/prosite](http://www.expasy.ch/prosite))

### Las esterasas

Las esterasas, como su nombre lo indica, hidrolizan enlaces tipo ester (**Esquema 4**), están ampliamente distribuidas tanto en eucariotes como en bacterias, y su papel fisiológico se entiende poco (con excepción de las lipasas).

Las esterasas tipo VII, que forman parte de esta superfamilia, se unen a sustratos como el ácido 7-aminocefalosporínico (7-ACA) y lo hidrolizan, pero no rompiendo el anillo lactámico sino hidrolizando el enlace ester. En algunas ocasiones llegan a tener actividad cruzada con las  $\beta$ -lactamasas. Su mecanismo catalítico y estructura se parece al de las  $\beta$ -lactamasas clase C y al correspondiente de la DD-carboxipeptidasa R61, la diferencia principal radica en la forma del sitio activo (Wagner 2001).



**Esquema 4.** Reacción que lleva a cabo la esterasa

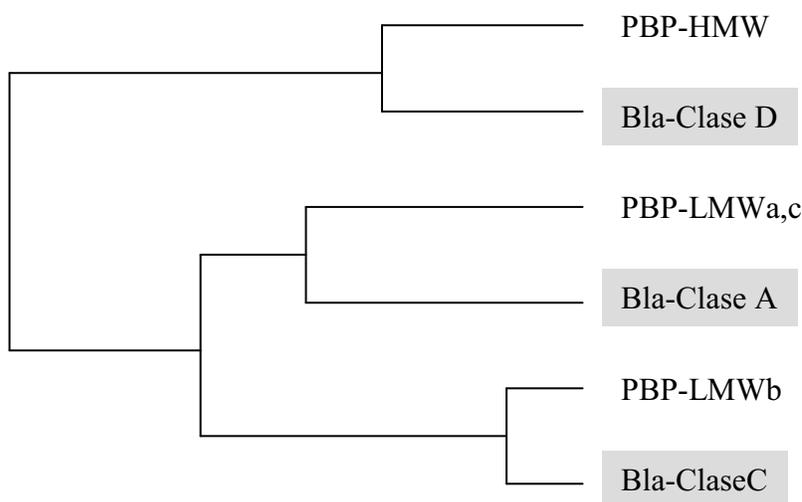
## La evolución de la superfamilia de las $\beta$ -lactamasas y

### DD-peptidasas

Para entender un poco a esta superfamilia es de utilidad conocer la secuencia en que estos actores fueron apareciendo. Hace al menos 1 800 millones de años surgieron las bacterias y con ellas la pared de peptidoglicano y enzimas que la sintetizan (Madigan 2000). Más recientemente, surgieron los  $\beta$ -lactámicos, muy probablemente como armas químicas entre microorganismos. Las penicilinas y cefalosporinas se sintetizan en varios microorganismos, en su mayoría hongos filamentosos y Streptomyces (bacterias Gram +); en todos los casos se usa la misma ruta de biosíntesis y las enzimas presentan clara homología, lo cual indica al menos un evento de transferencia horizontal; evidencias indirectas sugieren que la transferencia ocurrió de las bacterias a los hongos (Aharonowitz 1992).

La actividad de  $\beta$ -lactamasa debió surgir al mismo tiempo que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, o después si su origen fuese micótico; finalmente, los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas se seleccionaron y optimizaron en algunas bacterias. Parecería que en este punto la historia se mantuvo parcialmente estática por muchos millones de años. Este estado se interrumpe en 1945, con el inicio del uso médico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, que ha promovido una carrera evolutiva que aún no termina (Pratt 2002). Desde entonces se han seleccionado DD-peptidasas menos sensibles y  $\beta$ -lactamasas más eficientes, que ágilmente se han transferido de manera horizontal. (Barlow 2002 a, b, c)

Desde 1965 se ha propuesto que las DD-peptidasas y  $\beta$ -lactamasas compartieron un ancestro común (Tipper 1965) y a simple vista lo más parsimonioso sería que las  $\beta$ -lactamasas surgieran una vez y de ahí se diversificaran; sin embargo, el análisis de estructura primaria agrupa las diferentes clases de  $\beta$ -lactamasas con diferentes clases de DD-peptidasas, lo que rompe un esquema de agrupamiento por función (**Figura 6**). El análisis de la estructura terciaria es consistente con lo anterior; tanto las distancias del alineamiento global como la disposición del lazo omega (uno de los lazos que forma parte del sitio activo), indican múltiples eventos de radiación (Knox 1996). Otro argumento que confirma el surgimiento repetido de las  $\beta$ -lactamasas es que la maquinaria de desacilación es diferente para cada una de las clases (Bulychev 1997) (Golemi 2001 Clase d).

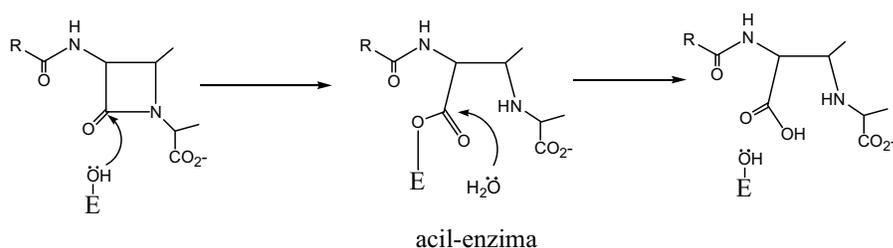


**Figura 6.** Árbol filogenético simplificado de PBP y  $\beta$ -lactamasas.

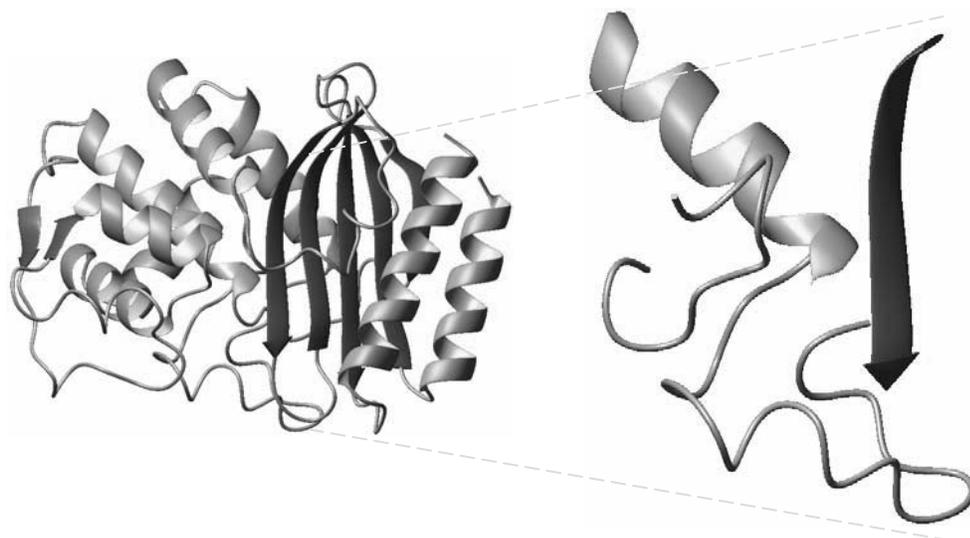
### **El mecanismo de reacción: coincidencias y diferencias**

En esta superfamilia, el sitio catalítico lo conforman una  $\alpha$ -hélice, una hebra beta y dos lazos, uno de los cuales se denominó omega en consecuencia de su disposición estructural (**Figura 7**). Al principio de la hélice se encuentra la serina catalítica, los aminoácidos de la hebra beta están involucrados en la estabilización del oxanión y en la especificidad por el sustrato. En el mecanismo de reacción, una base general activa a la serina catalítica, que a su vez ataca nucleofílicamente al carbono carbonílico de la  $\beta$ -lactama (o del enlace

peptídico); el oxianión generado se estabiliza por la estructura del sitio activo y se forma el complejo covalente acil-enzima transfiriendo el protón del hidroxilo al nitrógeno de la  $\beta$ -lactama (o del enlace peptídico). El proceso de desacilación es semejante: el ataque nucleofílico lo hace una molécula de agua activada, y en el caso de las transpeptidasas lo hace una amina (de la cadena lateral) de otro DD-peptido (**Esquema 5**). En las DD-peptidasas el complejo covalente con la  $\beta$ -lactama se hidroliza muy despacio, lo que da como resultado la inhibición de estas enzimas. En general, la química para todos los elementos de esta superfamilia es la misma, sin embargo el detalle del mecanismo de reacción es un poco diferente para cada clase, tanto por el tipo de grupos funcionales y la posición de los mismos (en el espacio y en la secuencia), así como por la posición del agua.



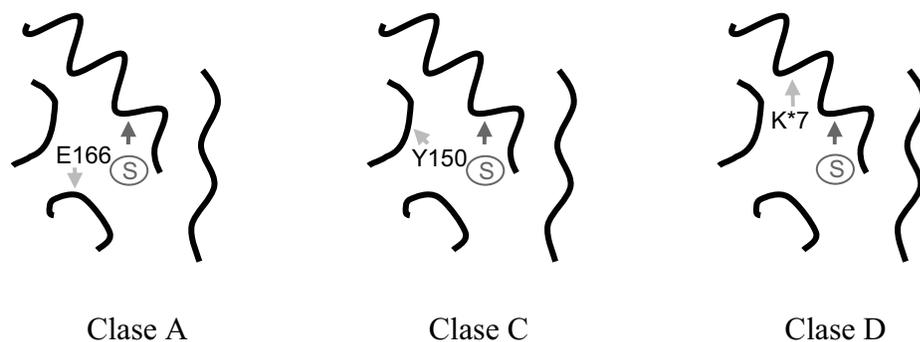
**Esquema 5.** Mecanismo de reacción de la  $\beta$ -lactamasa.



**Figura 7.** Acercamiento del sitio activo en la estructura de una  $\beta$ -lactamasa (1btl.pdb). Sólo se indican los elementos de estructura secundaria que forman las paredes de la cavidad. Al principio de la hélice se localiza la serina catalítica; el lazo omega se encuentra en la parte inferior del sitio activo.



eficientemente los depsipéptidos acíclicos, los cuales se caracterizan por no tener este nitrógeno. (Xu 1996). En el otro mecanismo propuesto, la tirosina 150 funciona como base general (Oefner 1990, Lobkovsky 1994), esta tirosina está 100% conservada en la clase C, se ubica en un lazo y forma parte de la firma (S/Y) x N. Se han sugerido dos papeles para las aminas de las lisinas 67 y 315: por un lado bajan el pKa del hidroxilo de la Tyr<sup>150</sup> para que pueda actuar como base general a pH neutro, y por otro lado estabilizan el oxianión del intermediario tetraédrico (**Figura 9**). Este sitio activo también presenta una red de puentes de hidrógeno muy compleja constituida por Ser<sup>64</sup>, Lys<sup>67</sup>, Gln<sup>120</sup>, Tyr<sup>150</sup>, Asn<sup>152</sup>, Glu<sup>272</sup>, His<sup>314</sup>, Lys<sup>315</sup>, Thr<sup>316</sup> y Ser<sup>318</sup>. A diferencia de las β-lactamasas clase A, el agua catalítica no está atrapada en el sitio activo, sino que proviene del solvente (Oefner 1990, Lobkovsky 1994).



**Figura 9.** Esquema comparativo de los sitios activos de las diferentes clases de beta-lactamasas. Se indica la serina catalítica y los residuos propuestos como base general.

En los últimos dos años se ha generado la mayoría del conocimiento estructural y cinético de las β-lactamasas clase D, las cuales pueden formar dímeros con átomos de cobalto en la interfase. Esta dimerización se ha observado tanto en los cristales, como en experimentos de filtración y ultracentrifugación (Paetzel 2000, Maveyraud 2000, Pernot 2001). Algunas enzimas se caracterizan por tener cinéticas bifásicas para algunos sustratos, y esto ha sido explicado debido a que el dímero es más activo y es estabilizado por el sustrato; para aquellos casos donde no se observa el comportamiento bifásico pudiera ser que el equilibrio monómero:dímero se de más rápido o bien que las propiedades cinéticas de las dos formas sean muy parecidas (Danel 2001). La lisina de la firma SxxK está carbamilada y se sugiere como la base general

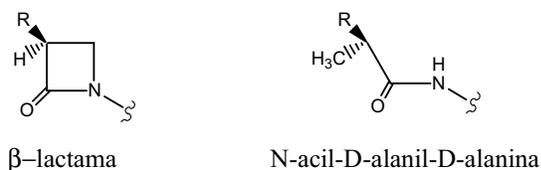
tanto para la acilación como para la desacilación. Estudios con carbono radioactivo indican que esta modificación postraduccional es reversible y los estudios estructurales indican que la forma carbamilada es la activa (Golemi 2001) (**Figura 9**). El sitio de unión es más grande que para las otras  $\beta$ -lactamasas, lo que podría explicar la actividad sobre más sustratos, también es más hidrofóbico en particular por la presencia de la valina 117 (característica de esta clase), el triptofano 102 y varios residuos del lazo omega, lo que reemplaza la red de puentes de hidrógeno de las  $\beta$ -lactamasas clase A y C por un sitio de unión esencialmente hidrofóbico (Paetzel 2000, Sun 2003). Para entender mejor el mecanismo de reacción de la clase D hacen falta estudios de mutagénesis dirigida al sitio, específicamente hacia el Trp 154, que forma parte del lazo omega y hace un puente de hidrógeno con el agua que se supone es la molécula catalítica (Majiduddin 2002).

Los mecanismos de reacción para las DD-peptidasas y las estererasas se comprenden menos, y se basan en los mecanismos descritos para las  $\beta$ -lactamasas. De los más estudiados es el mecanismo de la DD-peptidasa R61 de *Streptomyces* sp., esta enzima se parece a las  $\beta$ -lactamasas clase C, su estructura se ha determinado a gran resolución (a 1.2, 1.6 y 1.9 Å) y se ha cristalizado con inhibidores y con el sustrato. Del análisis de estas estructuras se sabe que las hebras de peptidoglicano están ancladas por 11 puentes de hidrógeno, 5 asociados con la hebra 1 y 6 asociados con la 2; siete de estas interacciones involucran residuos que están conservados en todas las PBPs. La lisina 67 y/o la tirosina 159 actuarían como la base general para la desacilación (Kelly 1995, Lee 2001, McDonough 2002)

### **Porqué y cómo las $\beta$ -lactamasas no son peptidasas**

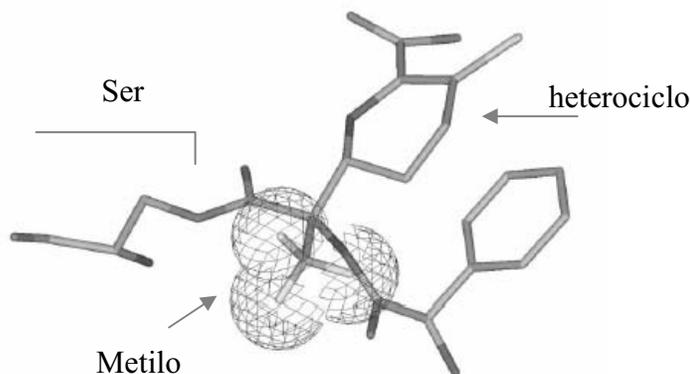
Se ha propuesto que existe una fuerte selección para que las  $\beta$ -lactamasas no hidrolicen los péptidos D-Ala-D-Ala, sustrato de las DD-peptidasas, pues de lo contrario interferirían con la síntesis de la pared celular; es más, la simple unión de las  $\beta$ -lactamasas y los DD-péptidos resultaría en la inhibición competitiva de las DD-peptidasas. Lo que es cierto es que las  $\beta$ -lactamasas presentan una actividad espuria para la hidrólisis de los DD-péptidos ( $k_{cat} / K_m \leq 10^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) y en particular la formación del complejo MM se favorece poco (Rhazi, 1999). La baja afinidad por los péptidos se ha explicado de dos maneras complementarias: por la falta de espacio para un sustituyente y por el

tamaño del sitio de unión. Una diferencia entre los sustratos es la presencia de un grupo metilo en el penúltimo aminoácido del N-acil-D-Ala-D-Ala (**Esquema 6**), mientras que en el sitio activo de la DD-peptidasa R61, la DD-peptidasa K15, la PBP2x y la PBP5 de *E.coli* existe espacio para este metilo, en las  $\beta$ -lactamasas parece no haber lugar para el mismo (Knox 1996, Pratt 2002). Por otro lado la forma del sitio de unión al sustrato es muy diferente, en las traspeptidasas está formado por dos surcos uno para cada una de las hebras de peptidoglicano, y en las  $\beta$ -lactamasas es una cavidad más pequeña. La superficie de la transpeptidasa que une la hebra uno (la donante) está ausente en las  $\beta$ -lactamasas y el surco que acomoda la segunda hebra (la aceptora) de las DD-peptidasas se eliminó por la inserción de nuevos residuos (residuos 214-224 y 285-296 en las  $\beta$ -lactamasas clase A y clase C, respectivamente). Es interesante que estas inserciones son independientes puesto que la dirección del polipéptido es la contraria (Massova 1998).



**Esquema 6.** Sustrato de la  $\beta$ -lactamasa y DD-transpeptidasa,.

Sobre las diferencias que hacen que las peptidasas no puedan hidrolizar el complejo acil-enzima formado con las  $\beta$ -lactamas, Pratt (2002) sugiere que el posicionamiento del heterociclo colgante impide el contacto entre la base general y el agua, y que si este heterociclo se girara para promover la hidrólisis (suponiendo que el sitio activo no tuviera ningún impedimento), entonces el metilo de la penúltima alanina del sustrato natural, terminaría en el espacio ocupado por el enlace del carbonilo que une a la enzima con el sustrato (**Figura 10**). Es decir, si la base general es la tirosina como en el caso de la DD-carboxipeptidasa y  $\beta$ -lactamasas clase C, o la lisina como en el caso de la PBP2x no se puede llevar a cabo la hidrólisis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y a su vez unir el sustrato de las DD-peptidasas. Por su parte, Knox (Knox 1996) considera que las características que convirtieron a las DD-peptidasas en  $\beta$ -lactamasas son: un aumento en el ángulo de la hebra beta con respecto a la hélice, el aumento en la electrofilicidad de la cavidad del oxianión y la prevención de la unión de péptidos.



**Figura 10.** Complejo acil-enzima de una  $\beta$ -lactamasa clase C (AmpC) con un inhibidor  $\beta$ -lactámico, al que se le agregó un grupo metilo. Este grupo metilo choca con el enlace carbonilo, lo cual indica por qué los sustratos de las DD-peptidasas no tienen la misma orientación que en las  $\beta$ -lactamasas (Pratt 2002).

### Los cambios de especificidad (resistencia a inhibidores)

Para contrarrestar la presencia de las  $\beta$ -lactamasas se han modificado las  $\beta$ -lactamas existentes, ya sea para que no sean reconocidas por las  $\beta$ -lactamasas y de cualquier forma sigan inhibiendo las DD-peptidasas (Ej. cefalosporinas de tercera generación) o bien para que funcionen directamente como inhibidoras de  $\beta$ -lactamasas, y usarlas en combinación con antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Ej. imipenem, ácido clavulánico). Sin embargo se han aislado  $\beta$ -lactamasas resistentes a ambos tipos de compuestos; se han identificado dos mutaciones muy frecuentes en  $\beta$ -lactamasas clase A que amplían el rango de especificidad, la primera es Gly238Ser, este residuo se encuentra al final de la hebra beta que conforma el sitio activo y hace un nuevo puente de hidrógeno intraenzimático (Cantu 1998); la segunda es Arg164Ser, este cambio impide la formación de un puente salino en la base del lazo omega, haciendo el sitio activo más grande (Kuzin 1999). Existe una  $\beta$ -lactamasa clase C que presenta resistencia a ceftazidima debido a la inserción de tres aminoácidos en el lazo omega, ampliando así la cavidad del sitio activo (Crichlow 1999). Las  $\beta$ -lactamasas resistentes a imipenem suelen tener cambios en la metionina 69, residuo inmediato anterior a la serina catalítica que forma uno de los vértices del sitio activo, indicando que cambios en este residuo modifican el ángulo entre la hélice y la hebra beta y/o modifican la vibración entre estos dos elementos

(Swarén 1998, y Meroueh 2002). El ácido clavulánico actúa mediante un entrecruzamiento secundario posterior a la formación del complejo acil-enzima, este entrecruzamiento se da con la serina 130; las enzimas resistentes a este inhibidor modifican el ambiente local de esta serina, casualmente también suelen presentar cambios en Met<sup>69</sup> (Wang 2002).

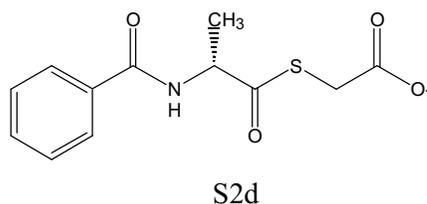
Además se han diseñado inhibidores de  $\beta$ -lactamasas que mimetizan al estado de transición tetraédrico, estos son boronatos y fosfonatos. Se ha obtenido poco éxito tratando de hacer inhibidores de este estilo para las DD-peptidasas (a pesar del parecido del estado de transición en estas enzimas). Se ha especulado que lo anterior responde al hecho de que las  $\beta$ -lactamasas son menos específicas que las DD-peptidasas (Pratt 2002).

La aparición de  $\beta$ -lactamasas no es la única estrategia de resistencia a las  $\beta$ -lactamas, también se ha logrado mediante la evolución de transpeptidasas menos sensibles a la acilación por estos antibióticos, sin que pierdan la capacidad de entrecruzar la pared celular. Transpeptidasas resistentes a la acilación han evolucionado en Streptococci y Gonococci, no sólo mediante mutaciones puntuales sino también por conjugación entre diferentes especies bacterianas, lo que ha permitido la creación de proteínas mosaico que llegan a ser 1000 veces menos sensibles a los antibióticos (Laible 1991, Reichmann 1997, Hakenbeck 2000). La estructura de la PBP2a (metecilina-resistente) de *Staphylococcus aureus* indica que la unión con las  $\beta$ -lactamas requiere el movimiento de varias cadenas laterales e incluso el movimiento del esqueleto de carbonos, desfavoreciendo la formación del acil-enzima (Lim 2002). Para el caso de la PBP2x Sp328 (resistente a penicilina) de *Streptococcus pneumoniae* no es el complejo MM el que se afecta sino directamente la acilación, dada la sutil distorsión de la constelación catalítica (Lu 2001, Dessen 2001).

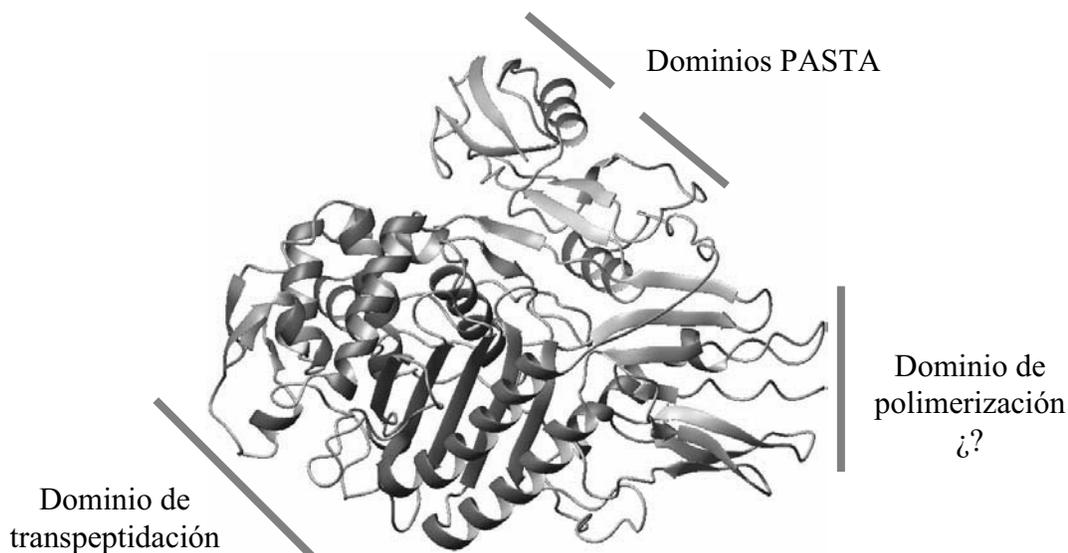
### **La DD-transpeptidasa PBP2x**

La DD-transpeptidasa PBP2x de *Streptococcus pneumoniae* se ha estudiado cinéticamente y estructuralmente debido a que variaciones de esta proteína generan la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Esta enzima no es capaz de hidrolizar péptidos, únicamente lleva a cabo reacciones de transferencia; su actividad puede ser monitoreada a partir de la hidrólisis del tioéster sintético Bz-(D)-Ala<sup>s</sup>-Gly (S2d, Jamin 1993) (**Esquema 7**). La estructura de la PBP2x presenta 5 dominios, primero una región transmembranal, luego un dominio

alfa/beta con forma de tenazas (sugar tongs) que presentan todas las HMW PBPs clase B, y cuya función no se ha caracterizado, pero se sugiere que estaría involucrado en la polimerización (Pares 1996, Gordon 2000). En seguida se ubica el dominio catalítico, que es el que pertenece a la superfamilia de las  $\beta$ -lactamasas / DD-peptidasas y por último dos dominios PASTA, estos son pequeños dominios globulares que comprenden tres hojas beta y un alfa hélice, y que se asocian a DD-peptidasas y a serin/treonin cinasas; se ha sugerido que estos dominios actúan como sensores al unir (con baja afinidad) los monómeros de peptidoglicano (Yeats 2002) (**Figura 11**).



**Esquema 7.** Sustrato sintético de la PBP2x.



**Figura 11.** Estructura de la DD-transpeptidasa PBP2x de *Streptococcus pneumoniae* (1qme.pdb). El dominio transmembranal no fue cristalizado.

## **OBJETIVO**

Obtener la actividad de  $\beta$ -lactamasa en el andamio de la DD-transpeptidasa PBP2x de *Streptococcus pneumoniae* mediante evolución dirigida. Esta migración catalítica nos permitirá tener una mejor comprensión de dónde radican las diferencias funcionales en estas enzimas y también contribuirá en el entendimiento de la evolución de esta superfamilia.

### **Justificación del modelo**

Se sabe que la mayoría de las actividades enzimáticas han surgido mediante divergencia; existen esencialmente dos propuestas sobre cual es la enzima que evoluciona para dar una nueva actividad. En una propuesta, el reconocimiento del ligando (sustrato o producto) es determinante, en la otra se conserva el mecanismo de reacción. El modelo que nosotros escogimos es uno de los más sencillos para lograr una migración catalítica, la enzima DD-transpeptidasa ya reconoce al nuevo sustrato como inhibidor (competidor y suicida) y por otro lado el mecanismo de reacción es semejante. Por si esto fuera poco, sabemos que existen enzimas con este plegamiento que catalizan la reacción de  $\beta$ -lactamasa, de hecho, hay modelos evolutivos que sugieren que las  $\beta$ -lactamasas han evolucionado varias veces y de diferentes maneras a partir de las DD-peptidasas. Otra de las bondades del modelo es la posibilidad de la selección positiva, al retar el crecimiento bacteriano con antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En particular el uso de PBP2x de *Streptococcus pneumoniae* respondió a que en su momento era una de las dos DD-peptidasas con estructura conocida.

## RESULTADOS

### Consideraciones teóricas (supuestos)

Los proyectos de ingeniería de proteínas parten de al menos dos supuestos importantes, que son indispensables y no son triviales (Steipe 1999)

- **La proteína no está en un óptimo para la función evaluada.**

Sabemos que el plegamiento de PBP2x no está en un óptimo para la hidrólisis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, ya que hay enzimas con el mismo plegamiento que llevan a cabo estas reacciones con mejor eficiencia.

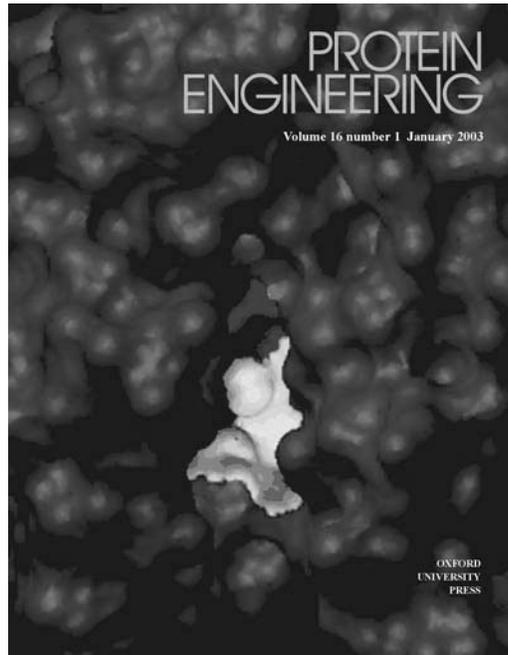
- **La nueva secuencia no es muy diferente de la nativa.**

Sabemos que el plegamiento de  $\beta$ -lactamasa puede llevar a cabo varios tipos de reacciones, y finalmente estas diferencias funcionales están dadas por las diferencias en la secuencias de aminoácidos; sin embargo, las diferencias son  $> 80\%$ , por lo que es difícil reconocer aquellos aminoácidos que definen la función. Es lógico pensar que la mayoría de estas diferencias en secuencia resultan de la deriva génica, o bien de procesos de selección que poco tienen que ver con la función catalítica y están más relacionados con las características del andamio (tales como estabilidad, cinética de plegamiento, interacción con otras enzimas, etc.), y que en realidad son pocas las sustituciones que determinan la diferencia funcional. De no ser cierto este supuesto el problema se volvería tan complejo que podría ser irresoluble, al menos experimentalmente.

### Estrategia

Se utilizaron técnicas de evolución dirigida, puesto que la solución al problema no era obvia. Sin embargo, se consideró importante no divagar en todo el gene y aumentar las probabilidades de mutagénesis en aquellos residuos que parecían ser los responsables de la identidad funcional. Se recurrió a un sistema *in vivo*, aprovechando así las virtudes de la selección positiva. En este sistema se duplicó la actividad de transpeptidasa. *E. coli* se transformó con un plásmido con el gen de la enzima PBP2x, de esta manera la pérdida total de la actividad de la transpeptidasa exógena no afectaría el crecimiento de la bacteria. Para la realización de este trabajo se usaron técnicas convencionales de bioquímica y biología molecular, en particular para la generación de las bibliotecas fue necesario optimizar algunas técnicas (ver Apéndice).

El conjunto de resultados obtenidos a partir de este trabajo, se presentaron de manera formal en la revista Protein Engineering, volumen 16, pp. 27-35, publicada en 2003.

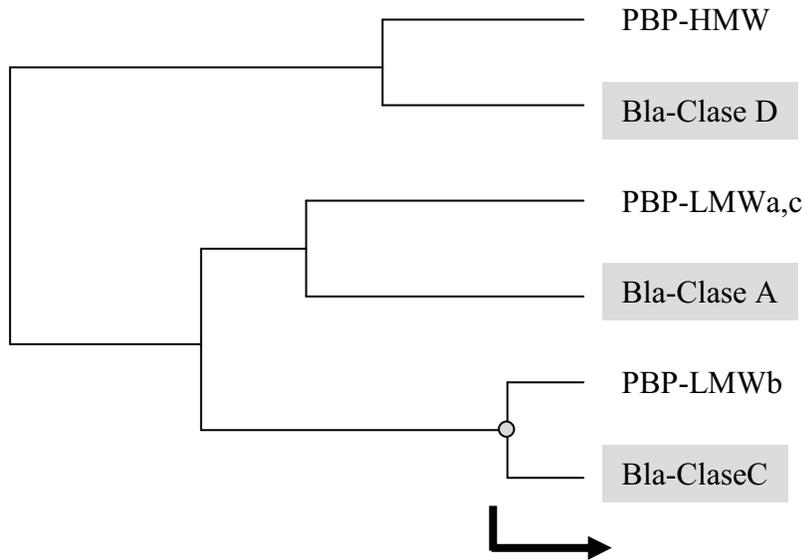


## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A pesar de que la DD-transpeptidasa PBP2x y la  $\beta$ -lactamasa más cercana tienen solamente 19% de identidad, en el presente trabajo demostramos que las dos actividades están cercanas en el espacio de secuencia; tan sólo tres mutaciones son suficientes para obtener una  $\beta$ -lactamasa a partir de una DD-transpeptidasa. Es decir, aquí demostramos experimentalmente que el repetido surgimiento natural de las  $\beta$ -lactamasas sobre el andamio de las DD-peptidasas se debe a esta cercanía.

El éxito de este trabajo se atribuye, en gran medida, a la estrategia utilizada, en la cual se mezclan técnicas propias del diseño de proteínas y también de evolución dirigida. Una estrategia exclusivamente de diseño, con la información accesible hasta la fecha, no hubiera contemplado el residuo 452 como un blanco importante, mientras que una estrategia exclusivamente de evolución dirigida hubiera requerido de bibliotecas enormes para encontrar, la combinación de las tres mutaciones simultáneas, sólo la combinatoria de todas las mutaciones triples, a una base de distancia, es de  $1 \times 10^9$ .

Al parecer la proteína MutE no perdió su actividad original, resulta interesante que tiene el comportamiento generalista de un intermediario evolutivo (Matsumura 2001) y que a partir de éste se podrían especializar enzimas con diferentes características, sin embargo distintos esquemas clásicos de evolución dirigida no permitieron aumentar la actividad de hidrólisis de cefotaxima, lo que nos hace pensar que para aumentar esta actividad se requieren, otra vez, varios cambios que actúen de manera sinérgica. Estos problemas para seguir evolucionando la actividad de  $\beta$ -lactamasa, pueden estar dados por tantos años de especialización de la PBP2x, y pensamos que una manera interesante de darle la vuelta a este problema es partir de una proteína ancestral. Un ancestro de DD-peptidasas y  $\beta$ -lactamasas, debería tener actividad de DD-peptidasa y debería estar menos especializado, de tal forma que evolucionar la actividad  $\beta$ -lactamasa y optimizarla debería ser más sencillo (**Figura 12**). Este ancestro también podría presentar actividad de  $\beta$ -lactamasa y sólo requeriría la optimización de la actividad, sin embargo los sitios activos de  $\beta$ -lactamasas claramente excluyen los péptidos (ver introducción), lo que puede responder a la selección misma de la actividad de  $\beta$ -lactamasa o bien a la selección negativa de la unión de los péptidos.



**Figura 12.** Árbol filogenético de PBP y beta-lactamasas. Con una flecha se indica la ruta que tendría que tomar el ancestro para convertirse en beta-lactamasa.

## BIBLIGRAFÍA

- Adachi, H., Ohta, T. & Matsuzawa, H. (1991). Site-directed mutants, at position 166, of RTEM-1 beta-lactamase that form a stable acyl-enzyme intermediate with penicillin. *J Biol Chem* **266**(5), 3186-91.
- Adediran, S. A. & Pratt, R. F. (1999). Beta-secondary and solvent deuterium kinetic isotope effects on catalysis by the *Streptomyces* R61 DD-peptidase: comparisons with a structurally similar class C beta-lactamase. *Biochemistry* **38**(5), 1469-77.
- Aharonowitz, Y., Cohen, G. & Martin, J. F. (1992). Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annu Rev Microbiol* **46**, 461-95.
- Arnold, F. H., Wintrode, P. L., Miyazaki, K. & Gershenson, A. (2001). How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem Sci* **26**(2), 100-6.
- Atanasov, B. P., Mustafi, D. & Makinen, M. W. (2000). Protonation of the beta-lactam nitrogen is the trigger event in the catalytic action of class A beta-lactamases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7), 3160-5.
- Barlow, M. & Hall, B. G. (2002). Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J Mol Evol* **55**(3), 314-21.
- Barlow, M. & Hall, B. G. (2002). Predicting Evolutionary Potential. In vitro evolution accurately reproduces natural evolution of the tem beta-lactamase. *Genetics* **161**(3), 1355B-1355.
- Barlow, M. & Hall, B. G. (2002). Predicting evolutionary potential: in vitro evolution accurately reproduces natural evolution of the tem beta-lactamase. *Genetics* **160**(3), 823-32.
- Bolon, D. N. & Mayo, S. L. (2001). Enzyme-like proteins by computational design. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25), 14274-14279.
- Bolon, D. N., Voigt, C. A. & Mayo, S. L. (2002). De novo design of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* **6**(2), 125-9.
- Branneby, C., Carlqvist, P., Magnusson, A., Hult, K., Brinck, T. & Berglund, P. (2003). Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. *J Am Chem Soc* **125**(4), 874-5.
- Brannigan, J. A. & Wilkinson, A. J. (2002). Protein engineering 20 years on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12), 964-70.
- Bulychev, A., Massova, I., Miyashita, K. & Mobashery, S. (1997). Nuances of mechanisms and their implications for evolution of the versatile beta-lactamase activity: From biosynthetic enzymes to drug resistance factors. *J Am Chem Soc* **119**(33), 7619-7625.
- Bulychev, A. & Mobashery, S. (1999). Class C beta-lactamases operate at the diffusion limit for turnover of their preferred cephalosporin substrates. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(7), 1743-6.
- Bush, L. M., Calmon, J. & Johnson, C. C. (1995). Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors. *Infect Dis Clin North Am* **9**(3), 653-86.
- Cantu, C. r. & Palzkill, T. (1998). The role of residue 238 of TEM-1 beta-lactamase in the hydrolysis of extended-spectrum antibiotics. *J Biol Chem* **273**(41), 26603-9.
- Chevalier, B. S., Kortemme, T., Chadsey, M. S., Baker, D., Monnat, R. J. & Stoddard, B. L. (2002). Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease. *Mol Cell* **10**(4), 895-905.
- Chothia, C. (1992). Proteins. One thousand families for the molecular biologist. *Nature* **357**(6379), 543-4.
- Crichlow, G. V., Kuzin, A. P., Nukaga, M., Mayama, K., Sawai, T. & Knox, J. R. (1999). Structure of the extended-spectrum class C beta-lactamase of *Enterobacter cloacae* GC1, a natural mutant with a tandem tripeptide insertion. *Biochemistry* **38**(32), 10256-61.
- D'Alfonso, G., Tramontano, A. & Lahm, A. (2001). Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling. *J Struct Biol* **134**(2-3), 246-56.

- Danel, F., Frere, J. M. & Livermore, D. M. (2001). Evidence of dimerisation among class D beta-lactamases: kinetics of OXA-14 beta-lactamase. *Biochim Biophys Acta* **1546**(1), 132-42.
- Denome, S. A., Elf, P. K., Henderson, T. A., Nelson, D. E. & Young, K. D. (1999). Escherichia coli mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol* **181**(13), 3981-93.
- Dessen, A., Mouz, N., Gordon, E., Hopkins, J. & Dideberg, O. (2001). Crystal Structure of PBP2x from a Highly Penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae Clinical Isolate. A MOSAIC FRAMEWORK CONTAINING 83 MUTATIONS. *J Biol Chem* **276**(48), 45106-12.
- Doolittle, R. F. (1981). Similar amino acid sequences: chance or common ancestry? *Science* **214**(4517), 149-59.
- Fong, S., Machajewski, T. D., Mak, C. C. & Wong, C. (2000). Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D- and L-sugars. *Chem Biol* **7**(11), 873-83.
- Gaucher, E. A., Gu, X., Miyamoto, M. M. & Benner, S. A. (2002). Predicting functional divergence in protein evolution by site-specific rate shifts. *Trends Biochem Sci* **27**(6), 315-21.
- Gerlt, J. A. & Babbitt, P. C. (1998). Mechanistically diverse enzyme superfamilies: the importance of chemistry in the evolution of catalysis. *Curr Opin Chem Biol* **2**(5), 607-12.
- Ghuysen, J. M., Lamotte, B. J., Joris, B. & Shockman, G. D. (1994). Binding site-shaped repeated sequences of bacterial wall peptidoglycan hydrolases. *Febs Lett* **342**(1), 23-8.
- Golemi, D., Maveyraud, L., Vakulenko, S., Samama, J. P. & Mobashery, S. (2001). Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of class D beta-lactamases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **27**, 27.
- Gordon, D. B., Hom, G. K., Mayo, S. L. & Pierce, N. A. (2003). Exact rotamer optimization for protein design. *J Comput Chem* **24**(2), 232-43.
- Gordon, E., Mouz, N., Duee, E. & Dideberg, O. (2000). The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from Streptococcus pneumoniae and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol* **299**(2), 477-85.
- Grishin, N. V. (2001). Fold change in evolution of protein structures. *J Struct Biol* **134**(2-3), 167-85.
- Hakenbeck, R. (2000). Transformation in Streptococcus pneumoniae: mosaic genes and the regulation of competence. *Res Microbiol* **151**(6), 453-6.
- Hardy, L. W. & Kirsch, J. F. (1984). Diffusion-limited component of reactions catalyzed by Bacillus cereus beta-lactamase I. *Biochemistry* **23**(6), 1275-82.
- Herzberg, O. & Moul, J. (1987). Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: crystal structure of beta-lactamase from Staphylococcus aureus PC1 at 2.5 Å resolution. *Science* **236**(4802), 694-701.
- Holtje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of Escherichia coli. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1), 181-203.
- Horowitz, N. (1945). On the evolution of biochemical synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **31**, 153-157.
- Huang, W., Petrosino, J., Hirsch, M., Shenkin, P. S. & Palzkill, T. (1996). Amino acid sequence determinants of beta-lactamase structure and activity. *J Mol Biol* **258**(4), 688-703.
- Jamin, M., Damblon, C., Millier, S., Hakenbeck, R. & Frere, J. M. (1993). Penicillin-binding protein 2x of Streptococcus pneumoniae: enzymic activities and interactions with beta-lactams. *Biochem J*, 735-41.
- Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J. M. & Samama, J. P. (1993). Crystal structure of Escherichia coli TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins* **16**(4), 364-83.
- Jurgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M. & Sterner, R. (2000). Directed evolution of a (beta alpha)8-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18), 9925-30.
- Keefe, A. D. & Szostak, J. W. (2001).

- Functional proteins from a random-sequence library. *Nature* **410**(6829), 715-8.
- Kelly, J. A. & Kuzin, A. P. (1995). The refined crystallographic structure of a DD-peptidase penicillin-target enzyme at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol* **254**(2), 223-36.
- Kinch, L. N. & Grishin, N. V. (2002). Evolution of protein structures and functions. *Curr Opin Struct Biol* **12**(3), 400-8.
- Knox, J. R. & Moews, P. C. (1991). Beta-lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C. Refinement at 2 Å resolution and analysis of hydration. *J Mol Biol* **220**(2), 435-55.
- Knox, J. R., Moews, P. C. & Frere, J. M. (1996). Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. *Chem Biol* **3**(11), 937-47.
- Koonin, E. V., Wolf, Y. I. & Karev, G. P. (2002). The structure of the protein universe and genome evolution. *Nature* **420**(6912), 218-23.
- Kuzin, A. P., Nukaga, M., Nukaga, Y., Hujer, A. M., Bonomo, R. A. & Knox, J. R. (1999). Structure of the SHV-1 beta-lactamase. *Biochemistry* **38**(18), 5720-7.
- Laible, G., Spratt, B. G. & Hakenbeck, R. (1991). Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **5**(8), 1993-2002.
- Lamotte-Brasseur, J., Dive, G., Dideberg, O., Charlier, P., Frere, J. M. & Ghuysen, J. M. (1991). Mechanism of acyl transfer by the class A serine beta-lactamase of *Streptomyces albus* G. *Biochem J* **279**(Pt 1), 213-21.
- Lee, W., McDonough, M. A., Kotra, L., Li, Z. H., Silvaggi, N. R., Takeda, Y., Kelly, J. A. & Mobashery, S. (2001). A 1.2-Å snapshot of the final step of bacterial cell wall biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4), 1427-31.
- Lehmann, M., Kostrewa, D., Wyss, M., Brugger, R., D'Arcy, A., Pasamontes, L. & van Loon, A. P. (2000). From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng* **13**(1), 49-57.
- Lesk, A. M. (2001). *Introduction to protein architecture*. 1st. edit, Oxford University Press, Grafiche.
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. & Jaeger, K. E. (2000). Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem Biol* **7**(9), 709-18.
- Lietz, E. J., Truher, H., Kahn, D., Hokenson, M. J. & Fink, A. L. (2000). Lysine-73 is involved in the acylation and deacylation of beta-lactamase. *Biochemistry* **39**(17), 4971-81.
- Lim, D. & Strynadka, N. C. (2002). Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* **9**(11), 870-6.
- Lobkovsky, E., Billings, E. M., Moews, P. C., Rahil, J., Pratt, R. F. & Knox, J. R. (1994). Crystallographic structure of a phosphonate derivative of the *Enterobacter cloacae* P99 cephalosporinase: mechanistic interpretation of a beta-lactamase transition-state analog. *Biochemistry* **33**(22), 6762-72.
- Lu, W. P., Kincaid, E., Sun, Y. & Bauer, M. D. (2001). Kinetics of beta-lactam interactions with penicillin-susceptible and -resistant penicillin-binding protein 2x proteins from *Streptococcus pneumoniae*. Involvement of acylation and deacylation in  $\beta$ -lactam resistance. *J Biol Chem* **276**(34), 31494-501.
- Lupas, A. N., Ponting, C. P. & Russell, R. B. (2001). On the evolution of protein folds: are similar motifs in different protein folds the result of convergence, insertion, or relics of an ancient peptide world? *J Struct Biol* **134**(2-3), 191-203.
- Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (2000). *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Majiduddin, F. K., Materon, I. C. & Palzkill, T. G. (2002). Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int J Med Microbiol* **292**(2), 127-37.
- Massova, I. & Mobashery, S. (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **42**(1), 1-17.
- Maveyraud, L., Golemi, D., Kotra, L. P.,

- Tranier, S., Vakulenko, S., Mobashery, S. & Samama, J. P. (2000). Insights into class D beta-lactamases are revealed by the crystal structure of the OXA10 enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure Fold Des* **8**(12), 1289-98.
- McDonough, M. A., Anderson, J. W., Silvaggi, N. R., Pratt, R. F., Knox, J. R. & Kelly, J. A. (2002). Structures of two kinetic intermediates reveal species specificity of penicillin-binding proteins. *J Mol Biol* **322**(1), 111-22.
- Mehl, R. A., Anderson, J. C., Santoro, S. W., Wang, L., Martin, A. B., King, D. S., Horn, D. M. & Schultz, P. G. (2003). Generation of a bacterium with a 21 amino Acid genetic code. *J Am Chem Soc* **125**(4), 935-9.
- Meroueh, S. O., Roblin, P., Golemi, D., Maveyraud, L., Vakulenko, S. B., Zhang, Y., Samama, J. P. & Mobashery, S. (2002). Molecular dynamics at the root of expansion of function in the M69L inhibitor-resistant TEM beta-lactamase from *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* **124**(32), 9422-30.
- Merz, A., Yee, M. C., Szadkowski, H., Pappenberger, G., Cramer, A., Stemmer, W. P., Yanofsky, C. & Kirschner, K. (2000). Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry* **39**(5), 880-9.
- Miyazaki, K., Wintrode, P. L., Grayling, R. A., Rubingh, D. N. & Arnold, F. H. (2000). Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J Mol Biol* **297**(4), 1015-26.
- Murphy, B. P. & Pratt, R. F. (1988). Evidence for an oxyanion hole in serine beta-lactamases and DD-peptidases. *Biochem J* **256**(2), 669-72.
- Nakajima, K., Kato, H., Oda, J., Yamada, Y. & Hashimoto, T. (1999). Site-directed mutagenesis of putative substrate-binding residues reveals a mechanism controlling the different stereospecificities of two tropinone reductases. *J Biol Chem* **274**(23), 16563-8.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., Fraser, C. M. & et al. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**(6734), 323-9.
- Oefner, C., D'Arcy, A., Daly, J. J., Gubernator, K., Charnas, R. L., Heinze, I., Hubschwerlen, C. & Winkler, F. K. (1990). Refined crystal structure of beta-lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for beta-lactam hydrolysis. *Nature* **343**(6255), 284-8.
- Olsen, M., Iverson, B. & Georgiou, G. (2000). High-throughput screening of enzyme libraries. *Curr Opin Biotechnol* **11**(4), 331-7.
- Orengo, C. A., Sillitoe, I., Reeves, G. & Pearl, F. M. (2001). Review: what can structural classifications reveal about protein evolution? *J Struct Biol* **134**(2-3), 145-65.
- Paetzel, M., Danel, F., de Castro, L., Mosimann, S. C., Page, M. G. & Strynadka, N. C. (2000). Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat Struct Biol* **7**(10), 918-25.
- Pares, S., Mouz, N., Petillot, Y., Hakenbeck, R. & Dideberg, O. (1996). X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat Struct Biol* **3**(3), 284-9.
- Patera, A., Blaszcak, L. C. & Shoichet, B. K. (2000). Crystal structures of substrate and inhibitor complexes with AmpC beta-lactamase: Possible implications for substrate-assisted catalysis. *J Am Chem Soc* **122**(43), 10504-10512.
- Patthy, L. (1999). *Protein evolution*. 1st. edit, Blackwell Science, Bodmin.
- Pernot, L., Frenois, F., Rybkine, T., L'Hermite, G., Petrella, S., Delettre, J., Jarlier, V., Collatz, E. & Sougakoff, W. (2001). Crystal structures of the class D beta-lactamase OXA-13 in the native form and in complex with meropenem. *J Mol Biol* **310**(4), 859-74.
- Pinto, A. L., Hellinga, H. W. & Caradonna, J. P. (1997). Construction of a catalytically active iron superoxide dismutase by rational protein design.

- Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11), 5562-7.
- Pollack, S. J., Jacobs, J. W. & Schultz, P. G. (1986). Selective chemical catalysis by an antibody. *Science* **234**(4783), 1570-3.
- Pratt, R. F. (2002). Functional evolution of the serine beta-lactamase active site. *J Chem Soc Perkin Trans* **2**(5), 851-861.
- Quemeneur, E., Moutiez, M., Charbonnier, J. B. & Menez, A. (1998). Engineering cyclophilin into a proline-specific endopeptidase. *Nature* **391**(6664), 301-4.
- RA, J. (1976). Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu Rev Microbiol* **30**, 409-425.
- Reichmann, P., Konig, A., Linares, J., Alcaide, F., Tenover, F. C., McDougal, L., Swidsinski, S. & Hakenbeck, R. (1997). A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **176**(4), 1001-12.
- Rhazi, N., Galleni, M., Page, M. I. & Frere, J. M. (1999). Peptidase activity of beta-lactamases. *Biochem J*, 409-13.
- Rison, S. C. & Thornton, J. M. (2002). Pathway evolution, structurally speaking. *Curr Opin Struct Biol* **12**(3), 374-82.
- Russell, R. B. (1998). Detection of protein three-dimensional side-chain patterns: new examples of convergent evolution. *J Mol Biol* **279**(5), 1211-27.
- Sander, C. & Schneider, R. (1991). Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* **9**(1), 56-68.
- Santoro, S. W., Wang, L., Herberich, B., King, D. S. & Schultz, P. G. (2002). An efficient system for the evolution of aminoacyl-tRNA synthetase specificity. *Nat Biotechnol* **20**(10), 1044-8.
- Saven, J. G. (2002). Combinatorial protein design. *Curr Opin Struct Biol* **12**(4), 453-8.
- Schmidt-Dannert, C., Umeno, D. & Arnold, F. H. (2000). Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat Biotechnol* **18**(7), 750-753.
- Strynadka, N. C., Jensen, S. E., Alzari, P. M. & James, M. N. (1996). A potent new mode of beta-lactamase inhibition revealed by the 1.7 Å X-ray crystallographic structure of the TEM-1-BLIP complex [see comments]. *Nat Struct Biol* **3**(3), 290-7.
- Sun, T., Nukaga, M., Mayama, K., Braswell, E. H. & Knox, J. R. (2003). Comparison of beta-lactamases of classes A and D: 1.5-Å crystallographic structure of the class D OXA-1 oxacillinase. *Protein Sci* **12**(1), 82-91.
- Swaren, P., Maveyraud, L., Raquet, X., Cabantous, S., Duez, C., Pedelacq, J. D., Mariotte, B. S., Mourey, L., Labia, R., Nicolas, C. M., Nordmann, P., Frere, J. M. & Samama, J. P. (1998). X-ray analysis of the NMC-A beta-lactamase at 1.64-Å resolution, a class A carbapenemase with broad substrate specificity. *J Biol Chem* **273**(41), 26714-21.
- Teichmann, S. A., Rison, S. C., Thornton, J. M., Riley, M., Gough, J. & Chothia, C. (2001). The evolution and structural anatomy of the small molecule metabolic pathways in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **311**(4), 693-708.
- Todd, A. E., Orengo, C. A. & Thornton, J. M. (2001). Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *J Mol Biol* **307**(4), 1113-43.
- Todd, A. E., Orengo, C. A. & Thornton, J. M. (2002). Plasticity of enzyme active sites. *Trends Biochem Sci* **27**(8), 419-26.
- Van den Burg, B., Vriend, G., Veltman, O. R., Venema, G. & Eijsink, V. G. (1998). Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5), 2056-60.
- van Den Heuvel, R. H., Fraaije, M. W., Ferrer, M., Mattevi, A. & van Berkel, W. J. (2000). Inversion of stereospecificity of vanillyl-alcohol oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17), 9455-60.
- Viadiu, H., Osuna, J., Fink, A. L. & Soberon, X. (1995). A new TEM beta-lactamase double mutant with broadened specificity reveals substrate-dependent functional interactions. *J Biol Chem* **270**(2), 781-7.
- Voet, D. & Voet, J. G. (1990). *Biochemistry*. 1st. edit, John Wiley and sons, U.S.A.
- Wagner, U. G., Petersen, E. I., Schwab, H. & Kratky, C. (2002). EstB from *Burkholderia gladioli*: a novel esterase with a beta-lactamase fold reveals steric factors to discriminate between esterolytic and beta-lactam cleaving activity. *Protein Sci* **11**(3), 467-78.
- Wang, L., Zhang, Z., Brock, A. & Schultz, P.

- G. (2003). Addition of the keto functional group to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1), 56-61.
- Wang, X., Minasov, G. & Shoichet, B. K. (2002). The structural bases of antibiotic resistance in the clinically derived mutant beta-lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. *J Biol Chem* **277**(35), 32149-56.
- Xiang, H., Luo, L., Taylor, K. L. & Dunaway-Mariano, D.(1999). Interchange of catalytic activity within the 2-enoyl-coenzyme A hydratase/isomerase superfamily based on a common active site template. *Biochemistry* **38**(24), 7638-52.
- Xu, Y., Soto, G., Hirsch, K. R. & Pratt, R. F. (1996). Kinetics and mechanism of the hydrolysis of depsipeptides catalyzed by the beta-lactamase of *Enterobacter cloacae* P99. *Biochemistry* **35**(11), 3595-603.
- Yeats, C., Finn, R. D. & Bateman, A. (2002). The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27**(9), 438.
- Young, K. D. (2001). Approaching the physiological functions of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *Biochimie* **83**(1), 99-102.
- Zhao, H. & Arnold, F. H. (1997). Combinatorial protein design: strategies for screening protein libraries. *Curr Opin Struct Biol* **7**(4), 480-5.
- Zhao, H. & Arnold, F. H. (1999). Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Eng* **12**(1), 47-53.
- Zhao, H., Chockalingam, K. & Chen, Z. (2002). Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol* **13**(2), 104-110

# ANEXO

## Carpeta de Métodos

El anexo sólo consta de técnicas de Biología Molecular, puesto que este tipo de experimentos (a diferencia de los de Bioquímica) suelen tener una serie de variables “ocultas” que entorpecen la reproducibilidad de los mismos. El valor de este anexo radica en todas las recomendaciones, muchas de las cuales se han transmitido por tradición oral. Con este anexo se pretende no perder información sumamente útil y ayudar al querido lector a realizar sus experimentos. El estilo no intenta ser formal sino claro, por lo que habrá varios anglicismos utilizados frecuentemente en el laboratorio.

Este anexo está dirigido para personas familiarizadas con las técnicas, si no fuera su caso se recomienda la lectura de algún libro clásico de técnicas (Sambrook 1989) donde se explica el principio básico de las mismas. Adicionalmente se recomienda la lectura de los manuales de los proveedores de las enzimas y *kits*, en algunos casos son muy buenos (ej. Biolabs y Quiagen).

### Consideraciones generales

- La limpieza es importante, de preferencia use material desechable y estéril.
- Para resuspender el ADN y para las reacciones *in vitro*, utilice la mejor agua que tenga a su alcance, de preferencia estéril. Se pueden hacer alícuotas de 1 ml y guardarlas a -20. (Sobretudo para los PCR)
- Guarde el ADN a -20. Los ADN lineales se maltratan mucho más, de preferencia no los guarde demasiado tiempo.
- Mejor trabaje todo sobre hielo, pero no es indispensable.
- Trate todas las enzimas con cuidado, no permita que se calienten (sáquelas del congelador en *stratacooler*, o no las saque). No embarre el tip de enzima.
- El ADN se puede limpiar bastante bien al extraer con fenol-cloroformo y luego precipitar con etanol (o isopropanol en presencia de sales), o con resinas de vidrio. Se recomiendan las resinas para disminuir el contacto con solventes tóxicos. Modifique los distintos *Kits* y protocolos para purificar el ADN que usted requiera.
- Para precipitar ADN con un peso molecular <100 pb utilice butanol, puesto que no se precipitan con etanol ni con isopropanol.

### Abreviaturas

PP	PreciPitado
SNAD	SobreNADante
ON	Over Night (toda la noche, o de 8 a 20 hrs)
TA	Temperatura Ambiente (25°)
mQ	Agua milliQ (equivalente a tridestilada)

# PCR

(Sambrook et al., 1989. Molecular Cloning)

Concentrado		final
100 mM Tris	500 mM KCl pH8.3	Amortiguador 10 µl
	2.5 mM c/u	dNTP 10 µl
	50mM	MgCl <sub>2</sub> 3-5µl
	10 pmol/µl	OligoA 3-5 µl
	10 pmol/µl	OligoB 3-5 µl
		Templado ---
		Taq 1µl
mQ	Agua cbp	100 µl

+ 1 gota de aceite mineral

## Ciclado

92°-96°	5 min	
<hr/>		
20-30X		
92°-96°	1 min	desnaturalización
45°-60°	1 min	hibridación
72°	1 min	extensión
<hr/>		
72°	5 min	

## Notas

- Ser cuidadoso con la limpieza, cualquier contaminación se puede amplificar.
- Cada vez que se clona un PCR es necesario resecuenciar.
- Puede ser necesaria la optimización de la concentración del Mg. La concentración del Mg cambia la eficiencia y también la fidelidad de la Taq, entre más Mg mayor eficiencia y menor fidelidad. Procurar mantener el Mg entre 1.5 y 2.5 mM, mayor a 2.5 mM se considera mutagénico, sin embargo hay ocasiones en que es necesario. Los amortiguadores comerciales tienen <2.5 mM Mg.
- La temperatura de hibridación depende de la T<sub>m</sub> de los oligos, es mejor si los dos oligos tienen la misma T<sub>m</sub>, al aumentar esta temperatura el PCR se vuelve más específico. En caso de ser un oligo que hibride poco, se pueden poner los primeros 5-10 ciclos a menor temperatura. Puede ser necesaria la optimización de la temperatura.
- El tiempo de extensión depende del número de bases que se desee amplificar, para la Taq 1 min por Kb es suficiente.
- El número de ciclos depende de la impaciencia del experimentador, pero cuando el templado es escaso (en molar) es necesario dejarlo 30 ciclos.

- Cuando se usan **enzimas de alta fidelidad** (que tienen actividad de exonucleasa 3') es necesario aumentar el tiempo de extensión puesto que son menos procesivas, a veces traen otros amortiguadores y pueden usar  $MgSO_4$ .
- Para fragmentos mayores a 3 Kb se recomienda usar mezclas de Taq + Pfu (ej), así la reacción no se acaba por presencia de mutaciones pero sigue siendo procesiva, varias compañías venden mezclas para tal efecto.
- El aceite mineral impide que se evapore la reacción y puede no ser necesario si el termociclador calienta también por arriba, como en los equipos Perkin Elmer

Cuando el PCR no sale:

- Repetir, algún reactivo pudo haber faltado, o la enzima se pudo inactivar.
- Si es la primera vez que se utilizan los oligos con el templado optimizar Mg y temperatura de hibridación
- Si el templado es muy grande o muy estructurado, romperlo (mecánicamente o bien con enzimas) y aumentar el tiempo de desnaturalización.
- Revisar la pureza de los oligos, de existir subproductos de la síntesis purificar por gel de acrilamida.
- Revisar si los oligos realmente pueden hibridar, en caso de ser necesario mandarlos a sintetizar de nuevo.

Cuando no es específico:

- Optimizar Mg y temperatura de hibridación
- Procurar mayor limpieza y utilizar controles negativos
- Reamplificar el PCR con oligos (otros) internos

# PCR DE COLONIA

(Sambrook et al., 1989. Molecular Cloning)

Para hacer diagnósticos de presencia o ausencia de inserto por PCR, se puede ahorrar el miniprep haciendo PCR de colonia. Esto se recomienda para plásmidos de alto número de copias.

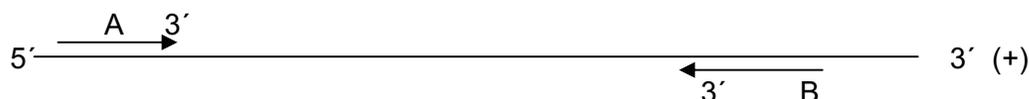
1. Hacer un cultivo
2. Centrifugar 200 $\mu$ l
3. Resuspender en 20 $\mu$ l agua
4. Calentar 95° 2 min
5. Pasar a 4° 5 min
6. Repetir 4 y 5 dos veces
7. Centrifugar
8. Tomar 10  $\mu$ l SNAD como templado para el PCR de 50 $\mu$ l
9. Hacer el PCR como es sabido

## Notas

- No siempre salen. Utilizar siempre control positivo y negativo.
- Utilizar oligos que funcionen bien.
- Se pueden poner PCR de 20 $\mu$ l o menos.
- No se recomienda hacer PCR de más de 1kb
- Pueden no salir muy limpios, por lo tanto, sólo para diagnóstico, para clonar es mejor hacer un miniprep.
- Si se ve todo un barrido y una gran mancha en el frente es que puso demasiado templado.
- Si no salió mejor haga un miniprep.
- Los pasos 4 -7 se pueden evitar si se le ponen 15 min a 96° , antes de empezar el PCR. Ojo, poner la Taq después de la incubación a 96°. Este método es menos efectivo.

## DISEÑO DE OLIGOS

Se requieren dos oligos para cada PCR, uno que hibride en la cadena (+) y otro en la cadena (-).

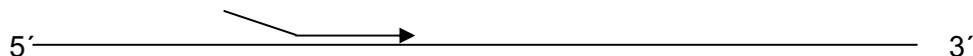


Entonces el **oligo A**, tiene la secuencia de (+) e hibrida con la cadena (-), mientras que el **oligo B** tiene la secuencia inversa complementaria para así poder hibridar con (+).

- ~15 bases del 3' tienen que hibridar, para que la polimerasa pueda empezar la síntesis.
- Para calcular  $T_m$  contar 2° por cada A o T y 4° por cada C o G (que hibriden) y restarle 5°.  $T_m$  de 50° - 60° son buenas. Es mejor si los dos oligos en cuestión tienen  $T_m$  semejantes.
- Procurar que no haya hibridación inter ni intra oligos.
- En caso de existir un programa para diseñar oligos (ej. OLIGO) utilizarlo sobretodo para revisar la presencia de estructura secundaria e hibridación entre los oligos, también calculan mejor la  $T_m$  y pueden sugerir regiones de hibridación.
- Procurar G o C en el extremo 3'.

### Caso 1

ej. Agregar un sitio de restricción para clonar



Si hay un sitio de restricción en el 5', requiere ~4 bases de ambos lados para que la endonucleasa pueda cortar (ver tablas de Biolabs, depende de la enzima cuantas bases se requieren).

#### Nota

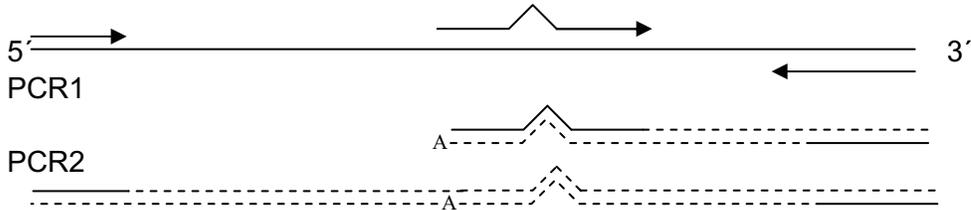
- Cuando se incorpora el sitio de restricción la  $T_m$  es sólo de la parte del 3' que hibrida. Una vez que ya se clonó con el sitio de restricción, más bases del oligo hibridan; por lo tanto al agregar las bases del lado de la 5' se puede poner la secuencia de la construcción final.

**Oligo con cola**, para reamplificar específicamente el PCR y así evitar reamplificar el templado. Se pueden utilizar “colas” universales, usar la misma secuencia para todos los oligos.

## Caso 2: Megaprimer

ej. Hacer una mutación sitio dirigida para cambiar un aa

Megaprimer: Se utiliza un primer PCR para que una de sus cadenas funcione como cebador (primer) y del otro lado un oligonucléotido.



- Diseño del oligo mutagénico, si son menos de 4 bases las que no hibridan: calcular  $T_m$  suponiendo que se forma una burbuja (así como muestra la figura), es decir contar las bases de extremo 5' así como las del 3' (obviamente no contar las bases que no hibridan). Si 4 o más bases no hibridan: suponer que el extremo 5' queda volando (como la figura del caso 1), entonces calcular la  $T_m$  para el extremo 3' para hacer el PCR 1 y la  $T_m$  del extremo 5' para el PCR 2.
- La Taq (polimerasa sin actividad de exonucleasa 3') agrega una A antes de terminar, por lo tanto, es necesario que la base inmediata anterior a la del oligo mutagénico sea una T. Si esto no fuera posible, es necesario utilizar una enzima de alta fidelidad para el PCR1.
- El sentido del oligo se escoge de tal forma que el mega primer es del menor tamaño posible (pero arriba de 100pb, para que se pueda distinguir de los oligos).
- Los oligos de los extremos se diseñan como siempre.

### Notas

- Se puede diseñar para usar varios megaprimers en serie, de tal forma que se va creciendo el PCR poco a poco.
- El PCR1 se hace como ya es sabido.
- El megaprimer (producto del PCR1) tiene que purificarse, sobre todo para quitar el exceso de oligos, de lo contrario durante el PCR2 se extenderán los dos oligos de los extremos sin introducir ninguna mutación. Puede purificarse por columna o por cualquier otro método que elimine los fragmentos pequeños de ADN.
- Es conveniente que para el PCR2 se utilice un templado lineal.
- La cantidad del megaprimer es crítica para el PCR2. El PCR2 no amplifica propiamente, entonces piense en moléculas y haga un estimado de cuanto megaprimer necesita para terminar con  $\sim 50\text{ng}/\mu\text{l}$  del ADN amplificado. No ponga megaprimer en exceso y verifique en gel que la cantidad de megaprimer ha disminuido después del PCR2.
- A veces es necesario hacer un PCR3, para amplificar el producto y así poder manipularlo, en este caso se usan los oligos de los extremos y el PCR2 se utiliza como templado. Es indispensable purificar el producto del PCR2 a partir de un gel de agarosa, de lo contrario es posible amplificar el templado que se usó para el PCR1y2.
- Mejor y ante la duda no se ahorre los controles negativos.
- El rendimiento puede salir mejor si las reacciones de PCR se llevan a cabo en  $50\mu\text{l}$ .

### Caso 3: saliendo a pescar

Si conoce la secuencia (tal cual), se puede pescar el gen completo. Ojo, pescar el promotor o zonas no codificantes puede ser un poco difícil, dado que son zonas poco informativas y ricas en AT.

Si se conocen varias secuencias muy semejantes, buscar las zonas conservadas y ahí diseñar los oligos. Si la identidad de las secuencias no es suficiente para alinear el ADN, se alinean los aa, también conviene buscar zonas donde haya aa que sean codificados por pocos codones para que el oligo sea lo menos degenerado posible, puede ayudar ver el uso de codones.

Estos oligos deben ser lo más simples posibles, sin sitios de restricción, ni ninguna otra monería. Para clonar estos PCR, se pueden utilizar kits, diseñados para tal efecto, o bien clonar en extremos rasos (ojo con la famosa A de la Taq, ver caso2).

Para bacterias se puede pensar en PCR tal cual, diseñando dos oligos.

#### Notas

- Para eucariotes es mejor pensar en RT-PCR, utilizando de un lado un oligo poli T que en el 3' tenga NN. Puede ser necesario hacer un 5' RACE, después de conocer sólo un extremo de la secuencia diseñar un oligo pero ahora para el otro lado y sin ser degenerado.

## PURIFICACIÓN DE OLIGOS

(Sambrook et al., 1989. Molecular Cloning)

Purifique los oligos mediante un gel, cuando la síntesis de los mismos haya dado varios productos.

1. Hacer un gel de poliacrilamida 20%, 8M urea
2. Lavar bien los pozos
3. Cargar muestra (40µl de oligos + 40 µl amortiguador de carga con formamida)
4. Correr el GEL con TBE 1X a 300V de 2 a 3 horas
5. Observar el gel con una lámpara de UV de onda corta
6. Cortar la banda
7. Colocarla en un tubo de 1.5 ml y agregar 1 ml de agua
8. Vortex
9. Incubar ON a 37°
10. Centrifugar
11. Agregar butanol al sobrenadante, vortex
12. Centrifugar
13. Repetir hasta que no quede agua
14. Lavar pp con 200 µl etanol abs frío, vortex
15. Centrifugar
16. Secar pp en el savant
17. Resuspender en 20 µl agua
18. Diluir 1:400, leer OD 260 y 280nm

Amortiguador para cargar

Formamida, (+ 0.05% xilen cianol) +0.05% azul de bromofenol

### **Acrilamida 20% Urea 8M**

96 g Urea

50ml Acrilamida-bis 40% (38+2)

10ml TBE 10x

aforar a 100ml y filtrar

para polimerizar 8ml

agregar 80 µl PSA 10% y 8 µl TEMED

Notas:

- En 5. si no se observa nada, teñir el gel con etidio-Br y observarlo en un transiluminador
- En 6. corte la banda más grande, durante la síntesis se producen fragmentos de menor peso.
- En 7. para mejorar la difusión del oligo, corte la banda en pedacitos pequeños.
- Entre más grande sea el oligo más ineficiente es la síntesis, si su oligo mide más de 35 bases no dude en limpiarlo.
- En un gel al 20% el xilen cianol comigra con ~22b y azul de bromofenol ~6 b

## PCR MUTAGÉNICO

### Error prone PCR

(Leung, DV, EY Chen & DV Goeddel. 1989. *Techniques*; 1:11-15)

100 mM Tris 500 mM KCl pH8.3	Amortiguador	10 µl
10 mM dG/C/TTP, 2 mM dATP	dNTP	10 µl
50mM	MgCl <sub>2</sub>	12.5 µl
50mM	MnCl <sub>2</sub>	1 µl
	DMSO	10 µl
1:20 (recién preparado)	β-mecarpto	1µl
	Templado	---
10 pmol/µl	OligoA	3 µl
10 pmol/µl	OligoB	3 µl
	Taq	1µl
mQ	Agua cbp	100 µl

(Cadwell RC, Joyce GF. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl*;2(1):28-33)

Tasa de 0.7%

100 mM Tris 500 mM KCl pH8.3	Amortiguador	10 µl
10 mM dC/TTP, 2 mM dA/GTP	dNTP	10 µl
50mM	MgCl <sub>2</sub>	14 µl
50mM	MnCl <sub>2</sub>	1 µl
	Templado	---
10 pmol/µl	OligoA	3 µl
10 pmol/µl	OligoB	3 µl
	Taq	1µl
mQ	Agua cbp	100 µl

### Notas

- Los PCR mutagénicos suelen dar mejor rendimiento, las condiciones de ciclado son normales ej. 94° - 1min, 50° - 1min, 72° - 1min; 30 veces
- Agregar el Mn después del agua para que no precipite.
- Otras recetas: Zaccolo, et. al., 1996. *J.Mol.Biol* 255: 589-603. Para tazas bajas utilice la polimerasa Mutazime de Stratagene.
- Como en todo PCR mutagénico, procure clonar sólo lo que le interesa (no mute el vector o el promotor). Y también procure tener buenos sitios restricción para después poder hacer grandes bancos

## SHUFFLING (PCR SEXUAL O RECOMBINOGÉNICO)

(Stemmer 1994, Nature 370: 389-91)

Esta técnica sirve para recombinar genes homólogos (con una identidad de nucleótidos mayor al 70%), en el laboratorio sólo se ha utilizado para recombinar mutantes puntuales del mismo gen (por arriba del 98% idénticos).

También sirve para introducir mutaciones al azar, con una tasa de 0.7%

### I. Amplificación de los genes parentales

Ia. Hacer un PCR como ya es sabido (2 mM Mg, Taq)(~ 5 x 100µl), de tal forma de tener más de 3 ug de ADN.

Ib. Purificar por columna o por fenol-cloroformo

### II. Digestión con ADNsa I

IIa. Hacer una mezcla equimolar de los genes a recombinar (un total de 2µg)

IIb. Llevar la mezcla a 44 µl de agua

IIc. Agregar 5µl de amortiguador 10X (Tris-HCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM pH 7.4)

IId. Agregar ADNsa I 1U

IIe. Incubar a TA, y tomar alícuotas de 10 µl a los 5, 10 , 20, 30 y 60 min, inactivar la enzima 5 min a 95° y de ahí al hielo

IIf. Correr en un gel analítico de agarosa 2%, 2µl de c/u

IIg. Si más del 50% del ADN pesa ~100-300pb correr un gel preparativo juntando todas las fracciones que los contengan. De lo contrario repetir desde IIa, ajustando la cantidad de ADNsa I y el tiempo de incubación.

IIh. Purificar los fragmentos de 100-300 pb con columna o con fenol cloroformo. Resuspender en 100 µl de agua.

### III. PCR sin oligos

Hacer PCR como es sabido pero sin oligos

	PCRa	PCRb
Amortiguador 10 x	10 µl	10 µl
dNTP 10x	10 µl	10 µl
Mg 50 mM	4 µl	4 µl
Fragmentos	75 µl	10 µl
Agua		65 µl
Taq	1µl	1µl

Ciclado: [92° 30 seg + 52° 30 seg + 72° 30 seg] x 40

### IV. PCR con oligos

Hacer tres PCR, ahora si tal cual como es sabido.

IVa. PCRa1, PCRb1 utilizando de templado 10 µl del PCRa y PCRb (100 µl).

IVb. PCRc1 (control) utilizando de templado 2µl de los fragmentos (20 µl)

IVc. Correr un gel de agarosa analítico, cargando PM, PCRa, PCRb, PCRa1, PCRb1, PCRc1.

## Notas

- Punto crítico, LOS OLIGOS. De preferencia use oligos diferentes para el paso I y el IV (de tal manera que los oligos del paso IV queden por dentro).
- En el laboratorio se ha hecho PCR recombinogénico de ~1 kb, entre más grande sea el fragmento a amplificar es más difícil. Estos PCR se han llevado a cabo en un robocicler (Stratagene), si su termociclador es del tipo Perkin Elmer, pudiera ser necesario aumentar los tiempos del PCR sin oligos.
- La tasa de mutagénesis no es constante (Stemmer la reporta 0.7%), las diferencias pudieran estar determinadas por la distribución del tamaño de los fragmentos.
- Si quisiera que el no fuera mutagénico y sólo fuera para recombinar, use para todos los pasos alguna enzima de alta fidelidad, ojo estas enzimas son delicadas, por lo tanto si no le sale con Taq no espere que le salga con ninguna otra enzima.

### Amplificación

- Sólo cerciórese que el PCR de una sola banda, y ponga poco templado para que no sea necesario purificar por agarosa.

### Digestión con ADNsa I

- Dependiendo de su interés puede hacer las mezclas no equimolares, ej. Si quisiera hacer una retrocruza ponga más del fragmento silvestre.
- La cinética depende mucho de la pureza del ADN, así como de la calidad de la enzima, por lo tanto no se confíe y para cada experimento vuelva a hacer la cinética.
- Corra muy poco el gel preparativo (~3 cm), para que al cortar los fragmentos de ADN la rebanada de agarosa no sea tan grande.

### PCR sin oligos

- La cantidad de fragmentos es crítica, pudiera ser necesario ponerle más o menos fragmentos.

### Qué esperar

- PCRa y PCRb, puede que no se vea nada, o bien se puede ver un barrido de ADN de 500 pb hacia arriba. Recuerde que no es propiamente una amplificación.
- PCRa1 y PCRb1, con un poco de suerte se ve el producto del tamaño esperado, pueden salir otras banditas (no se preocupe, pero antes de clonarlo purifíquelo mediante un gel de agarosa). Si sale todo un súper barrido puede ser por exceso de ADN en el PCR sin oligos, disminuya la cantidad de fragmentos. Si sale una banda pero de un tamaño menor al esperado, cambie de oligos (o por lo menos de uno), difícilmente podrá salir de esa trampa (antes de cambiar de oligos descarte la posibilidad de alguna contaminación). Si no sale nada, pueden ser por falta de ADN en el PCR sin oligos.
- PCRC1, es posible que no se vea nada, o bien un poco de basura inespecífica. Si se ve una banda muy clara del tamaño esperado, puede ser que durante la purificación de la digestión con ADNsaI, se hayan colado algunas moléculas sin digerir.
- Como en todo PCR mutagénico, procure clonar sólo lo que le interesa (no mute el vector ni el promotor). Y también procure tener buenos sitios restricción para después poder hacer grandes bancos (estos sitios pueden o no estar en los oligos usados en el paso IV, si no estuvieran en los oligos, asegúrese que quedan por dentro de los mismos)
- Esta técnica no sale fácilmente, si ya hizo varios intentos cambie de oligos o de parejas de los mismos, recuerde que están los oligos del vector y probablemente le sirvan. Verifique que las parejas de oligos que va a usar den mucho producto y muy específico.

## LIGACIONES

(Sambrook et al., 1989. Molecular Cloning)

1. Digerir el vector y el inserto
2. Purificar los fragmentos de ADN
3. Cuantifiqué los fragmentos
4. Mezclar los fragmentos en una relación vector inserto 1:3 (molar)
5. Agregue el amortiguador, el agua y al final la enzima ligasa T4
6. Incubar ON a 16°
7. Extraer con butanol (hasta que no quede agua)
8. Limpiar con etanol al 70% (frío)
9. Secar en el savant
10. Resuspender en agua tetradestilada

SIEMPRE PONER UN CONTROL DE AUTOLIGACION, todo igual pero sin inserto

ejemplos

### **Ligación normal**

En una reacción de 20 µl finales, colocar 200 ng de inserto y 0.5U ligasa T4, resuspender en 10 µl, transformar 3µl.

### **Ligación para banco**

En una reacción de 200 µl finales, colocar 2ug de inserto y 5U ligasa T4, resuspender en 20 µl, transformar todo.

Notas

#### Puntos críticos (todos)

- La digestión
- La purificación de los fragmentos
- La relación vector : inserto
- La transformación (la eficiencia de las células y las sales de la ligación)

Con frecuencia las ligaciones no salen, sin embargo la mayor pérdida de tiempo es cuando se supone erróneamente que ya se tiene la construcción. SIEMPRE haga un control de autoligación.

- En la medida de lo posible utilizar dos enzimas diferentes, ambas con extremos cohesivos. Si ambos extremos son rasos, si se digiere con una sola enzima, o si una enzima no digiere bien, tratar el vector con fosfatasa alcalina. Es muy importante que el vector este bien digerido, el plásmido súper enrollado se transforma mucho mejor, y las ligaciones unimoleculares son muy eficientes.
- Si se liberan fragmentos, o las digestiones son parciales es necesario purificar los fragmentos a partir de un gel de agarosa. La purificación puede ser con kits o extracción fenol-cloroformo y pp con isopropanol-etanol al 70%, ya sea que se purifique de gel o no. La pureza de los fragmentos y del agua es crítica.
- Se pueden cuantificar en UV o en un gel de agarosa (lo más importante es la relación no la cantidad absoluta, por lo tanto cuantifique el vector y el inserto al mismo tiempo)
- Si una clonación se va a repetir varias veces es mejor optimizar la relación vector inserto. Pruebe las siguientes condiciones 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5 (molar)

- Las enzimas las venden con el amortiguador, puede ser conveniente hacer alícuotas del amortiguador, al congelar y descongelar el amortiguador se hidroliza el ATP; otra alternativa es dejar el amortiguador a 4°.
- Si tiene mucha prisa, se puede dejar 2 horas a 25°, sin embargo esto disminuye la eficiencia
- 8. y 9. Ahórreselos si transforma con Ca<sup>++</sup>. Se pueden evitar estos pasos, y electroporar 2µl tal cual, baja la eficiencia por las sales e incluso puede tronar la celda.
- 8. y 9. Se pueden reemplazar por una precipitación con glucógeno, lo cual limpia muy bien el DNA pero es poco eficiente.
- Antes de transformar se puede correr un gel de agarosa para saber si hubo o no ligación (no es inequívoco).
- Rendimientos de purificación (aprox): gel de agarosa 80%, Fenol-cloroformo 80%, precipitación por isopropanol o etanol 90%, precipitación por butanol 95%, columna 90%.

#### Fosfatasa alcalina

Agregue 1U de FA e incube durante 1 hora a 37°. Inmediatamente limpie el ADN, por fenol, agarosa o columna. Se puede usar cualquier amortiguador de digestión o bien el de la FA. No deje la reacción más de 1 hora.

#### Precipitación con glucógeno

- Agregar a agua volumen final 100 µl
- Agregar 2 µl glucógeno (2mg/ml)
- Agregar 2 µl acetato de sodio 3M pH 5.2
- Agregar 500 µl etanol abs frío
- Incubar a -20° 30 min
- Centrifugar 10 min
- Lavar pp con 500 µl etanol al 70% frío
- Centrifugar 3 min
- Secar pp en savant
- Resuspender en 10 µl de agua

#### Notas para bancos

- Es necesario estar seguro de que las digestiones están bien (dejar ON).
- Purificar los fragmentos lo mejor posible (el kit de Quiagen es muy bueno). Es preferible usar los fragmentos frescos, a veces no les va muy bien en el congelador.
- De ser posible evite el uso de la fosfatasa alcalina y use sitios cohesivos.
- El amortiguador de Biolabs, funciona muy bien (tiene menos sales).
- Dejar la ligación ON.
- Utilizar células competentes con eficiencias de transformación > 10<sup>8</sup> colonias/mg.

## CÉLULAS COMPETENTES

(Sambrook et al., 1989. Molecular Cloning)

Todo estéril

Todo en frío

1. Inocular 15 ml LB ON
2. Inocular 1 L con 10 ml
3. Crecer a 37° 250 rpm hasta OD<sub>600</sub> 0.4 - 0.6, ~ 2.5 horas
4. Dividir en frascos de 250 ml
5. 20-30 min en hielo
6. Centrifugar 10 min a 4 000 rpm
7. Resuspender en 500ml de glicerol 10 % frío
8. Centrifugar 10 min a 4 000 rpm
9. Resuspender en 500ml de glicerol 10 % frío
10. Centrifugar 10 min a 4 000 rpm
11. Resuspender en 1 ml glicerol 10% + 1 ml GYT
12. Hacer alícuotas de 60 µl
13. Congelar en hielo seco con etanol o en nitrógeno líquido
14. Guardar en el REVCO (-70 °)

Verificar la eficiencia transformando con 40pg de pUC18 y plaqueando 10 y 100µl.

**GYT** glicerol 10%, extracto de levadura 0.125%, triptona 0.25%

### Notas

- 1. Es mejor empezar de una caja recién crecida. Se pueden utilizar antibióticos en caso de que la cepa sea resistente.
- 3. También se puede detener el cultivo a una OD 0.92 - 0.94, esto es un poco complicado pero para JM109 hay un pico mayor de eficiencia. El tiempo depende de la cepa y es reproducible.
- 7., 9. y 11. resuspender con mucho cuidado y totalmente, ~ 5 ml de amortiguador con movimientos circulares sin permitir que se caliente.
- 11. Se puede resuspender en 2 ml de glicerol 10%, lo que disminuye la resistencia de las células.
- Si por alguna razón aparecen grumos, tirar todo a la basura, probablemente el cultivo se contaminó.
- Eficiencias de 10<sup>9</sup> células por mg son muy buenas, eficiencias <10<sup>7</sup> sólo sirven para transformar súper enrollado. La eficiencia baja conforme pasa el tiempo, sobretodo si el REVCO no funciona a la perfección. Las células duran meses, y también pueden servir de glicerol para conservar-recuperar cepas
- Las cepas XL1-blue y MC1061 funcionan muy bien.

## ELECTROPORACIÓN

(Sambrook et al., 1989. Molecular Cloning)

1. Descongelar en hielo las células electrocompetentes (~10 min)
2. Colocar en hielo las celdas para electroporación (0.1 cm)
3. En condiciones estériles agregar 1µl de plásmido superenrollado a los 60 µl de células competentes.
4. Depositar 50 µl de la mezcla en la celda de electroporación, con precaución para evitar la formación de burbujas.
5. Aplicar un pulso eléctrico de 1.8 V (200 Ω, 25 mF)
6. Rápidamente resuspender las bacterias en medio SOC adicionado con 1% glucosa 2M y 1 % cloruro de magnesio 2M, en condiciones estériles.
7. Incubar una hora a 37° y 250 rpm
8. Platear 10 –100µl en cajas Petri con antibiótico.
9. Crecer las células a 37° ON

### Medio SOC

Bacto-triptona	2.0g
Extracto de levadura	0.5g
NaCl	0.05g
KCl 250mM	1.0ml

Ajustar a pH 7 con NaOH 4M

Aforar a 100 mL con agua mQ y esterilizar

### Notas

- Antes de electroporar mantener las células frías.
- En 3. pudiera no ser en condiciones estériles.
- En 4. constatar la ausencia de burbujas, en caso de que estuvieran presentes, darle a la celda 1-3 golpes secos contra la mesa, si esto no fuera suficiente, quitar la burbuja con ayuda de una micropipeta.
- En 5. si la celda fuera de 0.2 cm (200 µl de células), aplicar un pulso de 2.5V. Si quiere transformar un plásmido súper enrollado y no le importa la eficiencia puede disminuir el pulso a 1.7 V. Entre más grande la constante de tiempo (output) es mejor, si le está dando por 3.6s (depende del equipo) es muy probable que a la próxima le explote la celda.
- En 6. se puede resuspender en cualquier otro medio rico, pero se recomienda el SOC. Lo mejor es adicionar la glucosa y el Mg justo antes de usarlo (el primero para evitar más contaminaciones y el segundo para evitar que se precipite), sin embargo se puede adicionar y hacer alícuotas de 1 ml, y guardarlas congeladas.
- Para 7. en la mayoría de los casos se puede incubar por media hora, pero no se recomienda dejar más tiempo puesto que las bacterias empiezan a dividirse.
- En 9. dependiendo del caso puede ser mejor incubar a 30°.
- En caso de electroporar ligaciones, electropore 3 µl y platee 100 y 900µl.
- Las celdas se pueden lavar y reutilizar; justo después de electroporar enjuague 5 veces las celdas con agua mQ y deje sacar invertidas; también se pueden lavar con una solución de SDS al 0.1% o dextran 2%, pero es importante enjuagar muy bien con agua mQ. Se pueden reutilizar muchas veces.

Las celdas explotan cuando:

- Tiene mucha sal la muestra electroporada, diluya la muestra 1:10 y repita
- Quedaron burbujas en la celda, repita
- La celda estaba sucia, repita
- Las células se rompieron, por mal manejo de las mismas (suele suceder con BL21-pLys)

(Importante: tire la celda explotada, no la reuse. Si no puede repetir la electroporación, de cualquier manera recupere y platee el SOC, aunque la eficiencia disminuye considerablemente puede andar de suerte)

Para bancos, electropore todo en tres celdas nuevas, y recupere todo junto en 3 ml, platee 3  $\mu$ l (para estimar el tamaño del banco), y con lo demás inocule un matraz con 30 ml de LB adicionado con el antibiótico correspondiente, de este cultivo va a hacer un miniprep para así tener el banco en grandes cantidades y súper enrollado, también se puede utilizar este cultivo para ir haciendo selección y/o screening. Si la cepa de selección no se electropora muy bien haga el banco en otra cepa y después electropore el súper enrollado.

## Evolutionary engineering of a $\beta$ -Lactamase activity on a D-Ala D-Ala transpeptidase fold

Mariana Peimbert and Lorenzo Segovia

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62250 México

E-mail: {lorenzo, peimbert}@ibt.unam.mx

**The  $\beta$ -Lactamase hydrolytic activity has arisen several times from DD-transpeptidases. We have been able to replicate the evolutionary process of  $\beta$ -Lactamase activity emergence on a PBP2X DD-transpeptidase. Some of the most interesting changes, like modifying the catalytic properties of an enzyme, may require several mutations in concert; therefore it is essential to explore efficiently sequence space by generating the right diversity. We designed a biased combinatorial library in which biochemical and structural information were incorporated by site directed mutagenesis on relevant residues and then subjected to random mutagenesis to allow for mutations in unforeseen positions. We isolated mutants from this library conferring 10-fold higher cefotaxime resistance levels than the background wild-type through mutations exclusively in the coding sequence. We demonstrate that only three substitutions in the DD-transpeptidase active site, two produced by the directed and one by the random mutagenesis, are sufficient to acquire this activity. The purified product of one mutant (MutE) had a  $10^5$ -fold increase in cefotaxime deacylation rate allowing it to hydrolyze  $\beta$ -Lactams yet it has apparently conserved DD-peptidase activity. This work is the first to show a possible evolutionary intermediate between a  $\beta$ -Lactamase and a DD-transpeptidase necessary for the development of antibiotic resistance.**

**Keywords:**  $\beta$ -Lactamase/combinatorial mutagenesis/directed evolution/evolutionary engineering/PBP2X

### Introduction

The number of unique protein folds has been estimated to be no more than a few thousand (Chothia, 1992), much lower than the number of proteins encoded by nature. Thus, extant folds should be reused by divergent evolution to provide the functional range represented across the entire protein universe. Recent systematic studies show that enzymes with a common ancestor can have different biochemical and physicochemical properties and can even catalyze overall unrelated reactions (Gerlt and Babbitt, 2001).

Fold versatility has been proved by both rational and evolutionary protein engineering; just a few amino acid substitutions have allowed impressive changes in protein function: a histidine biosynthesis isomerase was engineered into a tryptophan biosynthesis isomerase by broadening its substrate specificity (Jurgens *et al.*, 2000); a cyclophilin isomerase was converted into an endopeptidase by grafting a catalytic triad (Quemeneur *et al.*, 1998), and thioredoxin was transformed

into a histidine hydrolase by the design of an active site cleft and inclusion of the catalytic residue (Bolon and Mayo, 2001).

The DD-peptidase/ $\beta$ -Lactamase superfamily is an example of a fold with functional diversity; it is composed mainly of hydrolases and transferases, although a carboxyesterase has been found recently to belong to this superfamily (Wagner *et al.*, 2002). Although members of the family exhibit less than 20% sequence identity, all of them bind  $\beta$ -Lactam antibiotics by the same mechanism. DD-peptidases and  $\beta$ -Lactamases evolved from a common ancestor, they share the same fold, three short signature sequences in the active site, and the acylation mechanism. The DD-peptidase/ $\beta$ -Lactamase structural superfamily has an antiparallel  $\beta$ -sheet, flanked by  $\alpha$ -helices on both sides and an  $\alpha$ -helical domain (Todd *et al.*, 2001). Its catalytic mechanism involves two steps and proceeds through two tetrahedral intermediates; in the first step an invariant nucleophilic Ser residue attacks the labile peptide bond of the substrate to form an acyl-enzyme intermediate; the second step involves the hydrolysis or transfer of this intermediate (Cohen and Pratt, 1980; Fisher *et al.*, 1981).

DD-peptidases are enzymes involved in the biosynthesis and remodelling of the bacterial cell wall, and are often referred to as Penicillin Binding Proteins (PBP). These proteins can act as carboxypeptidases or as transpeptidases. They catalyze the cleavage of the terminal D-alanyl-D-alanine bond of the stem peptide and the subsequent formation of the peptide bridge to an amino acceptor on an adjacent peptidoglycan branch.  $\beta$ -Lactam antibiotics acylate both DD-peptidases and  $\beta$ -Lactamases; nevertheless the deacylation step in DD-peptidases is much less efficient than in  $\beta$ -Lactamases (over  $10^8$ -fold lower) (Guillaume *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2001). This extremely slow reaction is responsible for the covalent inhibition of DD-peptidases, resulting in the synthesis of non-functional peptidoglycan and eventually cell death (Ghuysen, 1994; Goffin and Ghuysen, 1998).

$\beta$ -Lactamases are the most common mechanism of resistance to  $\beta$ -Lactam antibiotics, such as penicillins and cephalosporins. These enzymes catalyze the hydrolysis of the  $\beta$ -Lactam ring amide bond thereby protecting bacteria from the action of the drug.  $\beta$ -Lactamases have been grouped in four classes: classes A, C and D are active site serine  $\beta$ -Lactamases, while class B is a zinc-dependent metalloenzyme (Bush *et al.*, 1995). Sequence, structure and catalytic behavior analyses show that the DD-peptidases gave rise to at least two of the various classes of serine  $\beta$ -Lactamases independently (Knox *et al.*, 1996; Massova and Mobasherry, 1998). This suggests that both catalytic activities are close in catalytic space and as such it should be feasible to interconvert one into another.

We wanted to explore whether this change in catalysis could be gradual, with both catalysts coexisting or if they were exclusive one of another. Directed evolution studies carried out on  $\beta$ -Lactamases have shown that the gain of a new specificity implies the gradual loss of the previous one (Zaccolo

and Gherardi, 1999; Wang *et al.*, 2002), and recent studies on the directed evolution of a  $\beta$ -glucuronidase into a  $\beta$ -galactosidase show that the change proceeds through an evolutionary intermediate which has a broadened substrate range (Matsumura and Ellington, 2001).

We have used a rational evolutionary strategy to elicit a  $\beta$ -Lactamase activity on a DD-peptidase of known structure. This method has allowed us to obtain libraries with an effective high mutant multiplicity. Our starting point was a wild-type *Streptococcus pneumoniae* PBP2X DD-transpeptidase (MX1). With just a few amino acid substitutions we were able to obtain a cephalosporinase thus recreating the evolutionary process of  $\beta$ -Lactamase activity appearance. We have done the biochemical analysis of one mutant which does not seem to have lost its original DD-transpeptidase activity yet has gained the capacity to hydrolyze  $\beta$ -Lactams, thus behaving as an evolutionary intermediate.

## Materials and methods

### Construction of the *Escherichia coli* expression plasmid pBC-PBP2X

The gene encoding for the PBP2X was cloned by PCR amplification from a penicillin-sensitive clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* using primers: T 5'(CGG AAT TCG CGG AGT AAG ATA TGA AGT G)3', and H 5'(GTC AGC TCT AGA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTC TCC TAA AGT TAA TGT AAT TTT)3'. The amplified DNA fragment was treated with Klenow fragment, digested with *EcoRI*, and cloned into pBC SK(+), a chloramphenicol-resistant pUC19 derivative (Stratagene, La Jolla, CA). A *PstI* site was created by site directed mutagenesis at position encoding Leu269, the restriction site does not modify the amino acid sequence and was created to facilitate the recloning of the transpeptidase-domain coding region. The PBP2X gene is under the *lac* promoter and the protein has a C-terminal His 6 flag. This gene has been called MX1, and has been submitted to GenBank with accession number AF 468152.

The constructions were sequenced to confirm gene identity. Protein expression and localization were detected by western blot, using an anti-His IgG (Roche, Mannheim, Germany).

### Library construction

The C library was constructed by recursive PCR. The degenerate oligonucleotides used as primers were: M1 5'(AAC CAA GGT AGC CCC CAT ATA CTT G)3', M2 5'(AAC TAT GAG CCG RYG TCA ACC ATG AA)3', M3 5'(GAG GGT CAT CCC AGC GTT ATC TGA CRK TGC AAA ACC TTG)3', M4 5'(GCA GTT AAA TCC GGT RSC RGC GRS ATC GCT GAT GAG AA)3', M5 5'(AAC TGA GAA AAT AYY ATT GGT AGA AC)3'. The primers were incorporated as follows: M1, M3, M5, M4, and M2. After each PCR, DNA fragments were purified by gel extraction (Qiagen, Hilden, Germany), and amplifications were carried out using the previous product as megaprimer and the next oligonucleotide (Merino *et al.*, 1992). Each reaction was also performed without its megaprimer to allow for the wild-type residues. Error prone PCR (Cadwell and Joyce, 1992) was carried out on the DNA fragment corresponding to the transpeptidase domain.

For recombination libraries shuffling mutagenesis was performed as described by Stemmer (Stemmer, 1994). Fragments of 100–300 bp were recovered after DNase I digestion and reassembled by PCR without primers. The rate of point mutations per shuffling cycle was 0.5%.

The SM library was constructed by recursive PCR using the following degenerate oligonucleotides: SM312 5'(TT CTT AGT ATC SNN ATC AAA GGT TG)3', SM336 5'(AAC CTT CAT GGT TGA SNN CGG CTC ATA G)3', SM450-452 5'(CAC TGA AAT CCC SNN CCC SNN TGA GCT TTG C)3'.

To clone the libraries, 2  $\mu$ g of *PstI/BstEII* digested PCR product was ligated to 2  $\mu$ g of *PstI/BstEII* pBC-PBP2X at 16 °C overnight, using 3U of T4 ligase (Roche). Ligation mixtures were precipitated with butanol, washed with 70% ethanol, dried, and dissolved in 15  $\mu$ l of water. These were transformed in *E.coli* MC1061 electrocompetent cells.

### PCR

All PCR reactions were performed with 5U *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL, Rockville, MD), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 0.25 mM each dNTP and 1  $\mu$ M of each primer. Cycling was done according to the following program: 94 °C, 5 min (94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 2 min)  $\times$  25, 72 °C, 5 min.

### Selection

A library of *E.coli* MC1061 transformants, with a 10-fold size coverage, was enriched for 48 h at 30 °C in 2 ml LB medium with chloramphenicol and cefotaxime. Plasmid DNA was isolated and used to retransform *E.coli* MC1061; cells were selected on LB agar plates with chloramphenicol and cefotaxime at 37 °C. The minimum inhibitory concentrations (MIC) for the selected colonies were determined by a dilution method on LB agar plates at 37 °C, with inocula of 10–30 colony-forming units dispensed in 5  $\mu$ l drops (Viadiu *et al.*, 1995).

### Protein purification

pBC- $\Delta$ 19-48 was constructed by the removal of the hydrophobic transmembrane-domain coding region (amino acids 19–48) to create PBP2X soluble forms (Jamin *et al.*, 1993). *E.coli* XL1-Blue (Stratagene) carrying plasmid pBC- $\Delta$ 19-48 cells were grown in a 1.5 liter fermentor containing LB medium supplemented with chloramphenicol and induced with 1 mM IPTG. The cell pellet was suspended in 15 ml of buffer A (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 8.0) and sonicated. The lysate was centrifuged at 14 000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was filtered (0.45  $\mu$ m) and loaded into a His-Trap column (Pharmacia) that was previously equilibrated with buffer A. The column was washed with 5 volumes of buffer A, and the protein was eluted with a linear gradient of 20–200 mM imidazole. The fractions containing PBP2X were pooled and dialyzed against 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. Protein was quantified by the Bradford method using a Bio-Rad kit, with bovine serum albumin as standard. The homogeneity of protein samples was determined by SDS-PAGE.

### Enzyme kinetics

All kinetic assays were performed at 37 °C in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, using a Beckman DU650 spectrophotometer for cefotaxime and Bz-(D)-Ala<sup>8</sup>-Gly thioester (S2d) hydrolysis determination, and a Bio-Rad EIA Reader 2550 microplate spectrophotometer for the nitrocefin hydrolysis assay. All points were determined at least in triplicate.

$\beta$ -Lactamase activities were determined by standard steady state kinetics methods. Hydrolysis of cefotaxime was monitored by loss of absorbance at 262 nm ( $\Delta\epsilon_{262} = 7250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Hydrolysis of the chromogenic cephalosporin, nitrocefin, was monitored by the increase of absorbance at 492 nm

( $\Delta\epsilon_{492} = 17\,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). Initial rates were measured for a minimum of six different substrate concentrations.

Transpeptidase activity was determined by the hydrolysis of S2d, a thioester analog of cell wall stem peptides (Adam *et al.*, 1990). The thio-group release, that was coupled to 4,4'-dithiodipyridine, was measured by monitoring the increase of optical density at 325 nm ( $\Delta\epsilon_{325} = 19\,800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) as described before (Zhao *et al.*, 1997), with minor modifications. Reaction mixtures (0.5 ml each) contained 0.1–2 mM of S2d, 0.4 mM of 4,4'-dithiodipyridine, and 16  $\mu\text{g}$  of wild-type protein or 20  $\mu\text{g}$  of MutE. The increase in absorbance at 325 nm was monitored for 60 min.

The MX1 wild-type PBP2X cefotaxime deacylation rate constant ( $k_{\text{cat}}$ ), was determined by following the recovery of activity against S2d as a function of time. 46  $\mu\text{M}$  of PBP2X (~4 mg/ml) was incubated with 0.5 mM cefotaxime for 5 min at 37 °C. Unbound  $\beta$ -Lactam was removed by centrifuging the reaction mixture at ~1000 g for 2 min in a 'Penefsky column' (Penefsky, 1977). The effluent containing the PBP2X bound to  $\beta$ -Lactam was diluted (1 mg/ml) and incubated at 37 °C. At various time intervals an aliquot of the sample was removed to measure activity against S2d. Assay buffer contained 2.0 mM S2d, 0.4 mM 4,4'-dithiodipyridine, and 150 mg/ml of PBP2X. At  $t_0$ , inhibition of wild-type PBP2X was complete. As less than 20% of activity was recovered after 48 h (when less than half of the free enzyme remains active), only apparent  $k_{\text{cat}}$  was determined. We have verified the complete removal of free cefotaxime by centrifuging 0.5 mM cefotaxime in a Penefsky column and pre-incubating PBP2X with the effluent. Under those conditions the wild-type PBP2X remains fully active as indicated by S2d hydrolysis.

### Chemicals

Ampicillin, penicillin, cefuroxime, ceftriaxone and cefotaxime were purchased from Sigma Chem, St Louis, MO. Nitrocefin was purchased from Becton Dickinson & Co, Franklin Lakes, NJ. Ceftazidime was supplied by Glaxo, Brentford, UK. S2d was purchased from Absolute Science (MA, USA).

## Results and discussion

### Combinatorial library design and construction

We followed a rational evolutionary strategy which combines rational design with directed evolution to elicit a  $\beta$ -Lactamase activity from a DD-transpeptidase. In a rational strategy, mutations are directed to positions that probably are going to produce relevant phenotypes yet their scope will be limited by the *a priori* information available. In a classical directed evolution approach, for instance, a  $10^{10}$  clone library would be needed to be able to screen for all possible triple mutants, many of which would be inconsequential. A hybrid approach allows us to increase the odds of obtaining new mutations—produced by the mutagenic PCR—in combination with previously chosen positions. Thus a greater return can be made with the same number of mutants than with a random whole gene mutagenesis scheme (Voigt *et al.*, 2000). We constructed a combinatorial library (C library) based on relevant information, by promoting mutations at sequence positions that are expected to show improvements.

The most promising targets for rational mutagenesis are the positions that distinguish  $\beta$ -Lactamase from DD-transpeptidase active sites as they must be the ones conferring the differences between both catalysts. Both active sites recognize  $\beta$ -Lactams and covalently bind them to the catalytic serine; a stable acyl-

enzyme complex is formed in DD-transpeptidases while this intermediary is hydrolyzed in  $\beta$ -Lactamases, therefore, an activated water molecule is needed in the active site to promote the hydrolysis.

A significant difference between the  $\beta$ -Lactamase and DD-peptidase active sites is that the former are more exposed to solvent. The PBP2X crystal structure analysis (Pares *et al.*, 1996; Gordon *et al.*, 2000) shows that the active site is protected from water mainly by Phe450 and Trp374. As water is necessary for acyl-enzyme hydrolysis, these positions were mutated to saturation to increase water access to the active site. Moreover, Phe450 is in a position analogous to that of Glu166 in the class A  $\beta$ -Lactamases, where this amino acid is catalytic and activates water for deacylation (Adachi *et al.*, 1991; Strynadka *et al.*, 1992), and thus a charged amino acid in this position could activate a water molecule. Trp374 is equivalent to the class C Leu293, mutations in this residue increase activity for some cephalosporins (Zhang *et al.*, 2001). As residues 450 and 374 are situated in variable size loops, residue correspondence to other structures is not apparent in sequence alignments (Figure 1).

Residues involved in broadening specificity were also mutated, as changes in specificity could result in the improvement of binding interactions or in transition state stabilization (Viadiú *et al.*, 1995). A better catalytic efficiency could be reached by the substrate proper positioning. Residues Thr550, Ala551, Gln552 are situated in the  $\beta_3$ , an element of the  $\beta$ -Lactamase active site; mutations in this strand produce extended spectrum enzymes, which confer resistance to third generation cephalosporins (Mantagne *et al.*, 1998). Gly336 is located just next to the nucleophilic serine and is buried within the hydrophobic interface between the two domains,  $\beta$ -Lactamases mutated in an analogous position are resistant to clavulanate (Delaire *et al.*, 1992).

Several residues have been shown to be conserved and essential for function in  $\beta$ -Lactamases (Huang *et al.*, 1996), we mutated those which are near the active site and different from those found in DD-peptidases. Although the function of these residues is not completely clear, we assume that they must be involved in determining  $\beta$ -Lactamase catalytic properties as they are conserved in the active site. Those residues conserved away from the active site might be important for stability or folding but both properties are already present in DD-peptidases. Residues Leu394, Ser396, Val398 form a wall of the active site and are located next to Ser395, which is involved in the acylation mechanism (through a hydrogen bonding network) (Imtiaz *et al.*, 1994); the equivalent residues in class A  $\beta$ -Lactamases are conserved, in particular Ser396 (Asp131 in  $\beta$ -Lactamases) which is invariant. Tyr568 is located on the  $\beta_4$  pointing towards the active site; the equivalent residue in  $\beta$ -Lactamases is a glycine (Figure 1).

Based on the previous analysis, the C library was designed and constructed by site directed mutagenesis of 10 PBP2X residues as follows: Gly336MetAla, Trp374X, Leu394MetThr, Ser396Asp, Val398Ala, Phe450X, Thr550AlaGlySerThr, Ala551GlySer, Gln552GlyGluAsp and Tyr568Gly (Figure 2). The wild-type residue was allowed for all positions. After the combinatorial site directed mutagenesis, the transpeptidase domain coding region was amplified by error prone PCR, at a 0.8% mutagenesis rate, to allow the appearance of advantageous substitutions in unforeseen positions. The amplified material was cloned into the pBC-PBP2X vector, by exchange

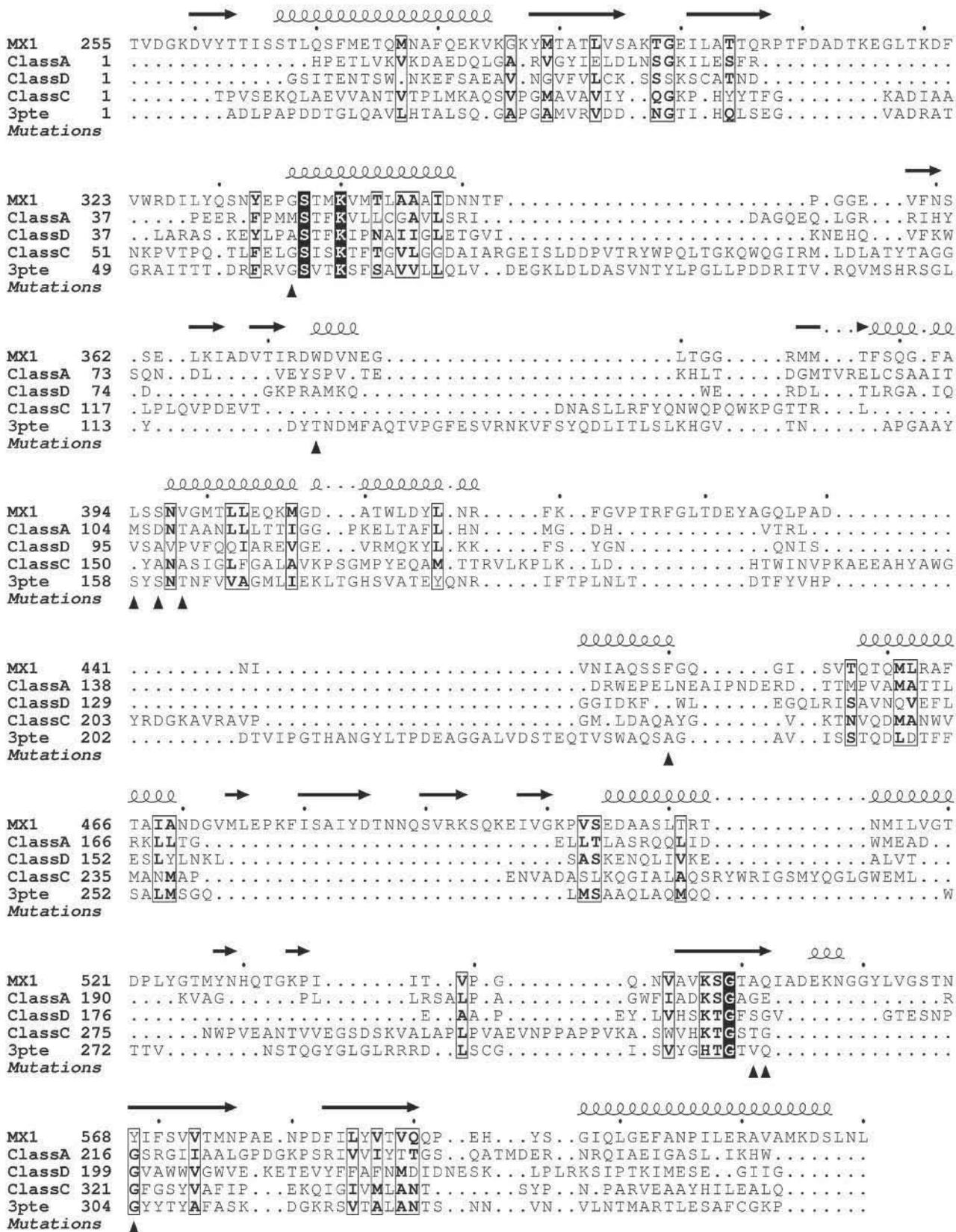
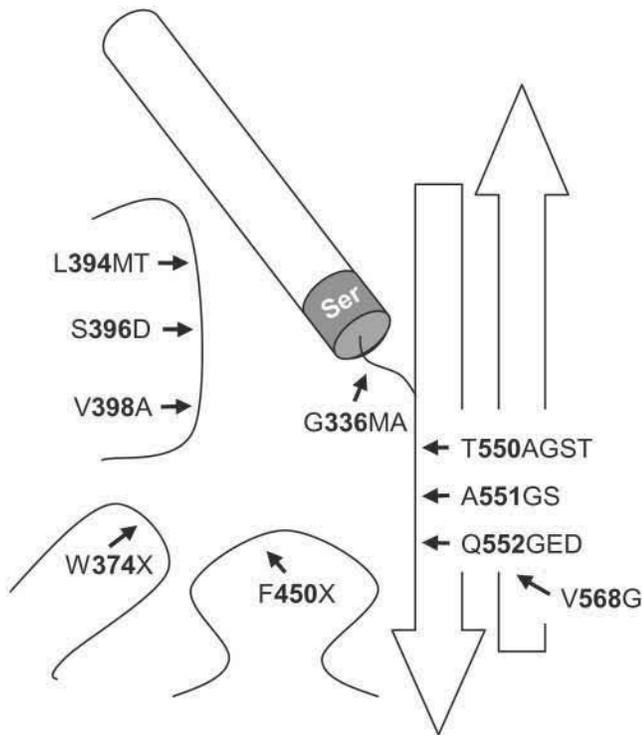


Fig. 1. Sequence alignment of the  $\beta$ -Lactamase/DD-peptidase superfamily. The secondary structure elements are shown. Strictly conserved residues (shaded letters), and homologous residues (black boxes) are indicated. Triangles mark the residues mutated in C library. The alignment was produced by Dali server (Dietmann and Holm, 2001), using the structural alignment of class A, C and D  $\beta$ -Lactamase representatives (1bt1, 1fof and 1gce respectively) with a high molecular weight and low molecular weight (LMW) DD-peptidases (1qme and 3pte). The 1qme sequence was replaced by the MX1 sequence to produce the alignment shown here.



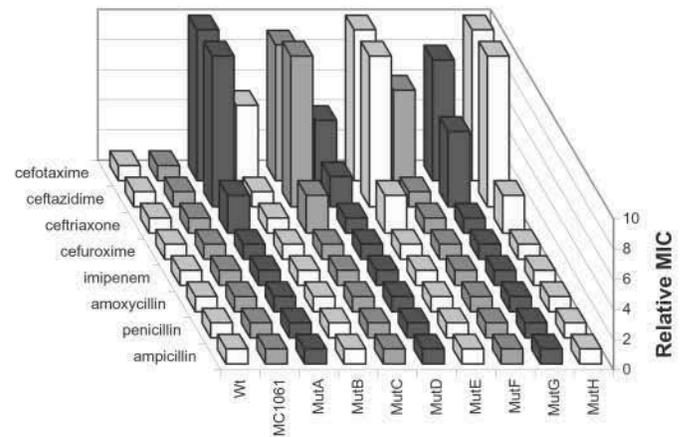
**Fig. 2.** Diagram of the C library mutagenesis scheme. Secondary structure and catalytic serine (337) are also indicated. The positions and type of the mutated residues around the active site are depicted.

**Table I.** Amino acid substitutions in cefotaxime-resistant clones

	WT	Ala312	Gly336	Trp374	Phe450	Gln452	Ala554
C library	MutA	Thr	Ala		Leu	His	Thr
	MutB	Thr	Ala	Arg	Leu	Thr	
	MutC	Thr	Ala		Leu	His	
	MutD	Thr	Ala				
SM library	MutE		Ala		Leu	His	
	MutF	Thr	Ala		Met	His	
	MutG	Pro	Ala		Leu	His	
	MutH	Ser	Ala		Leu	His	

of the transpeptidase coding region. We obtained a library of  $5 \times 10^6$  transformants.

The C library transformant cells were selected for their ability to grow on LB with cefotaxime (200 ng/ml). Selection was performed first in liquid medium to enrich for resistant clones before further selection on solid medium to isolate the more resistant ones. Seven clones were selected and their plasmid DNA was isolated. Fresh cells were transformed with these plasmids to confirm the phenotype. The transpeptidase-domain coding region was sequenced and four different clones were identified: MutA, B, C and D; their sequences include both random and site directed mutations (Table I). The Gly336Ala, Trp374Arg and Phe450Leu substitutions are the product of the site directed mutagenesis, while Ala312Thr, Gln452His and Ala554Thr arose from the error prone PCR. Mutations at 312, 336, 450 and 452 were found in several clones; it is interesting that the leucine codons at position 450 are different, indicating that MutA and MutC are independent clones. *E.coli* transformed with the wild-type DD-transpeptidase or with the empty plasmid have the same background β-Lactam resistance level,



**Fig. 3.** Relative minimal inhibitory concentration (MIC) for clones resistant to β-Lactam antibiotics, data are normalized to the wild-type MIC (cefotaxime 20 ng/ml, ceftazidime 100 ng/ml, ceftriaxone 20 ng/ml, cefuroxime 2 μg/ml, ampicillin 2 μg/ml, penicillin 10 μg/ml).

while MutA, B, C and D clones conferred 4- to 10-fold higher cefotaxime resistance levels (Figure 3).

### Error prone and shuffling mutageneses

We undertook further directed evolution rounds looking for higher levels of resistance, and thus higher catalytic efficiencies. We constructed two error prone libraries and four libraries by gene shuffling. Library sizes varied between  $1.2 \times 10^6$  and  $8.7 \times 10^6$  clones. The effectiveness of the mutageneses performed for each library was verified by sequencing of unselected clones. We identified a clone exhibiting a 100-fold higher cefotaxime resistance level than the wild-type from one of the shuffling libraries intended to eliminate neutral and deleterious mutations. The increase in resistance was conferred by a deletion between the promoter and the start codon that induced protein expression (detected by western blot, data not shown). When the transpeptidase coding region was subcloned into a fresh vector, the transformed cells were again only 10-fold more resistant than the wild-type.

### Saturation mutagenesis library

As mutations at residues 312, 336, 450 and 452 were found at least twice in the clones selected from the C library, we presumed that these positions were important for β-Lactamase activity. The structure of the genetic code and the C library design reduce the accessibility to numerous portions of the protein sequence space, including non-conservative substitutions that require multiple base changes within a single codon. The exploration of further mutations on positions previously shown to be important for the desired properties have yielded greatly improved variants which otherwise would not have been obtained (Miyazaki and Arnold, 1999). We constructed a new library (SM library) by saturation mutagenesis to find the best substitution combination at these positions. We did not find any increase in resistance levels but achieved the segregation of mutations, allowing us to evaluate the individual contribution of each substitution to the overall clone fitness. Positions 312, 336, 450 and 452 were subjected to saturation mutagenesis resulting in a  $1.2 \times 10^7$  library, covering 10-fold all the combinatorial possibilities ( $1.05 \times 10^6$ ). The SM library was selected as previously described (cefotaxime 200 ng/ml). After selection, 17 transformants were isolated; their analysis showed that they were grouped into four different clones (Table I). We found alanine at position 336, histidine at position

452 and leucine or methionine at position 450; however we found various amino acids at position 312 (even the wild-type), indicating that this residue is not involved in antibiotic resistance. Residues 336, 450 and 452 are in the vicinity of the active site, 336 is next to the catalytic Ser (337), whereas 450 and 452 reside in the omega loop (see below).

As we have not observed any increase of  $\beta$ -Lactamase activity in these libraries, it appears that we have reached a local maximum in the  $\beta$ -Lactamase PBP2X transpeptidase landscape. Further improvements in the catalytic efficiency may require several mutations acting synergistically. Either a higher mutagenic rate—therefore larger libraries—or the design of a new combinatorial library that includes more information would be necessary to obtain these mutations. The detection of small additive increases in  $\beta$ -Lactamase activity could also be hindered by the lack of resolution in our selection procedures.

### Resistance to $\beta$ -Lactams

The  $\beta$ -Lactamases belonging to the different classes exhibit very different resistance spectra, penicillinases tend to have very poor cephalosporinase resistance levels and vice versa, when class D imipenemases tend exhibit a broader resistance spectrum, albeit at low levels. As the mutants were selected only for cefotaxime resistance we wanted to know if the resistance encompassed other  $\beta$ -Lactam antibiotics. We determined the MIC of ampicillin, penicillin, amoxicillin, imipenem, cefuroxime, ceftriaxone, ceftazidime and cefotaxime (Figure 3). The mutants with highest cefotaxime resistance levels, which have a leucine at residue 450, were also resistant to ceftazidime and ceftriaxone; none showed resistance to cefuroxime, ampicillin, penicillin, amoxicillin or imipenem. Although the MIC is not proportional to the enzymatic activity, Figure 3 suggested that these mutants have a broadened resistance range. The resistance spectrum observed resembles that of naturally occurring  $\beta$ -Lactamases in that they only confer resistance to certain  $\beta$ -Lactams (Mantagne *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2002). We decided to use MutE for further characterization as it has only three substitutions and confers the highest resistance level to cefotaxime.

### Kinetics of PBP2X and MutE purified proteins

To corroborate that the resistance phenotype was produced by the  $\beta$ -Lactamase activity, wild-type PBP2X and MutE proteins were purified to homogeneity to measure their kinetic parameters. The N-terminal membrane-anchoring domain of both enzymes was removed to confer solubility without compromising enzyme activity (Chittock *et al.*, 1999). The wild-type enzyme did not show any detectable  $\beta$ -Lactamase activity by the direct spectrometric method, therefore deacylation ( $k_{cat}$ ) was measured by recovery of the peptidase activity (Table II). The MX1 PBP2X deacylation rate is in agreement to the rates measured for R6 PBP2X by S2d hydrolytic activity recovery (Jamin *et al.*, 1993). The MutE activity kinetic parameters for  $\beta$ -Lactamase were determined by standard steady state methods using cefotaxime, and nitrocefin as substrates. The MutE  $K_m$  values were 33  $\mu$ M for cefotaxime and 321  $\mu$ M for nitrocefin, and the  $k_{cat}$  values were  $1.49 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  for cefotaxime and  $1.46 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  for nitrocefin (Table II). When compared to natural  $\beta$ -Lactamases, the turnover is slow for both substrates (Matagne *et al.*, 1998); nevertheless when compared to the MX1 wild-type PBP the turnover is  $10^5$ -fold greater, which is enough to confer a clearly detectable  $\beta$ -Lactam resistance level. The R6 PBP2X deacylation rate has been determined

**Table II.** Kinetic parameters of MutE compared to the wild-type PBP2X

$\beta$ -Lactamase activity	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
Cefotaxime			
Mut E	$1.49 (\pm 0.15) \times 10^{-2}$	$33.6 (\pm 3.5)$	443
Wild-type	$8.36 (\pm 0.14) \times 10^{-7a}$	Nd <sup>b</sup>	
Nitrocefin			
Mut E	$1.46 (\pm 0.14) \times 10^{-3}$	$321 (\pm 67)$	4.55
Wild-type	Nd	Nd	
DD-Peptidase activity		$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	
2 mM S2d			
	Mut E	$68.9 (\pm 3.7)$	
	Wild-type	$45.6 (\pm 2.7)$	

<sup>a</sup>Determined by the recovery of the peptidase activity.

<sup>b</sup>Nd, not detected.

by various methods including recovery of peptidase activity (Jamin *et al.*, 1993), fluorography of radioactive inhibitors (Mouz *et al.*, 1999), infrared spectrometry (Chittock *et al.*, 1999), and electrospray mass spectrometry (DiGuilmi *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001); these methods are not consistent and the reason for this discrepancy is unknown. The MutE and wild-type PBP2X deacylation rates are so different that they could not be determined by the same method; therefore the increment in deacylation rate could be an approximation.

To evaluate the specificity of MutE, the catalytic constants were also determined against ampicillin, a semisynthetic penicillin, and ceftazidime, another cephalosporin; in contrast to the wild-type, these activities are detectable by direct spectrophotometric methods. The activity for ampicillin is 10-fold lower than that for cefotaxime ( $K_m$  1240  $\mu\text{M}$ , and  $k_{cat}$   $5.22 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), and is not sufficient to confer resistance to this antibiotic. The catalytic activity against ceftazidime is similar to that of cefotaxime, yet the  $K_m$  and  $k_{cat}$  are higher ( $K_m$  1310  $\mu\text{M}$ , and  $k_{cat}$   $5.68 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

Transpeptidase activity was evaluated by the hydrolysis of Bz-(D)-Ala<sup>8</sup>-Gly (S2d), a thioester that mimics the (D)Ala-(D)Ala bond recognized by PBP on its natural substrate (Jamin *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1997). The hydrolytic activity values ( $k_{cat}/K_m$ ) obtained for MutE and wild-type were 69 ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) and 46 ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), respectively (Table II).

Apparently  $\beta$ -Lactamase activity arose in MutE without compromising its original DD-peptidase activity. Both activities might only be incompatible in highly specialized enzymes. Considering that PBP2X appears to be a transpeptidase without natural hydrolytic activity (Jamin *et al.*, 1993) and that S2d hydrolysis is not a transpeptidase reaction, hydrolysis could have been promoted in the broadest sense in MutE, both for cephalosporins and S2d.

Some *S.pneumoniae* strains are naturally resistant to  $\beta$ -Lactam antibiotics and this capacity is conferred by altered PBP2X and PBP2B enzymes (Grebe and Hakenbeck, 1996). These enzymes have evolved to be less susceptible to  $\beta$ -Lactam acylation by changing their substrate specificity (Zhao *et al.*, 1997; Di Guilmi *et al.*, 2000), resulting in a different cell wall composition (Severin *et al.*, 1996). However there is a documented case in which an 80-fold increase of deacylation efficiency was detected in a resistant PBP2X (Lu *et al.*, 2001).

Changes in penicillin-resistant *S.pneumoniae* PBP2X only protect the mutated enzyme and not the other existing types

of PBP2X which are also targets of the antibiotic. Although transformation of *S.pneumoniae* with a resistant form of PBP2X can confer a certain degree of protection, the level of protection is only up to the antibiotic threshold concentration that inactivates another essential PBP (Laible and Hakenbeck, 1991). In our case, the PBP2X mutant we obtained is capable by itself of conferring resistance to cefotaxime to the strains harboring it. In this heterologous system, the *S.pneumoniae* PBP2X seems not to have any direct participation in the *E.coli* cell wall synthesis, as shown by the lack of phenotype in strains carrying the wild-type PBP2X, and therefore the protective effect must be caused by its increased hydrolytic capacity.

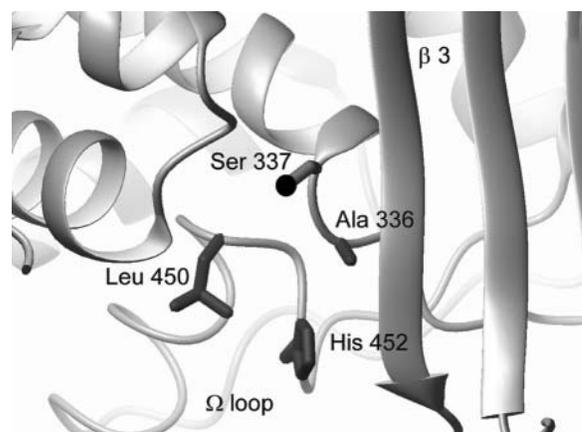
MX1 PBP2X was isolated from a  $\beta$ -Lactam-sensitive strain, classified into *S.pneumoniae* strain group II based on nucleotide substitutions within conserved amino acid motifs (Asahi *et al.*, 1999). The kinetic parameters for a sensitive PBP (R6 PBP2X) most recently determined were a  $k_{cat}/K_m$  for S2d of  $4900 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Thomas *et al.*, 2001), and a  $k_{cat}$  for cefotaxime of  $3.5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  (Lu *et al.*, 2001); these values are higher than the ones we determined. These differences are not surprising as 27 out of the 351 residues of the transpeptidase domain are different between MX1 PBP2X and R6 PBP2X.

The MutE active site has acquired the necessary functional properties for  $\beta$ -Lactam hydrolysis without losing its original activity and as such this enzyme may be an evolutionary intermediate between the two fully specialized enzymes (Matsumura and Ellington, 2001). Nevertheless, considering that S2d hydrolysis is not a direct measure of PBP2X DD-transpeptidase catalytic process, we may not be detecting a drop in the MutE DD-transpeptidase capacity caused by the rise of the  $\beta$ -Lactamase activity.

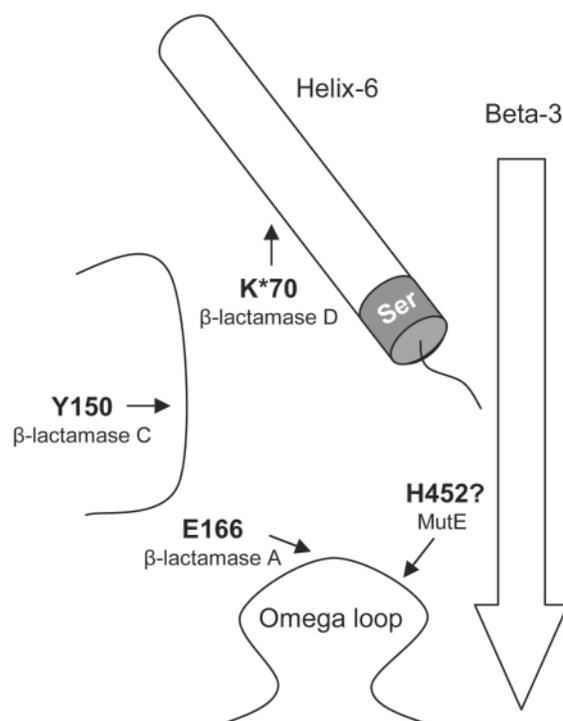
#### Residues 336, 450 and 452

The minimal set of altered residues necessary for cefotaxime resistance is Ala336, Leu450 and His452 as seen in the clones selected from the SM library. In naturally occurring PBP2X, residues Gly336, Phe450 and Gln452 are absolutely conserved, even in the resistant clones. Vernet and co-workers (Chesnel *et al.*, 2002) have recently replaced Phe450 by an aspartic acid in the R6 PBP2X. This mutant deacylates penicillin 110-fold faster, and they propose that this aspartic acid activates the water molecule for hydrolysis. Since we selected both leucine and methionine in this position (both hydrophobic amino acids), the deacylation mechanism must proceed otherwise.

A possible role for the substitutions Gly336Ala, Phe450Leu and Gln452His can be suggested by the analysis of the *S.pneumoniae* R6 PBP2X X-ray crystal structure (Gordon *et al.*, 2000). Residue 336 lies next to the catalytic Ser337 on a short turn and is buried in the hydrophobic interface between the two transpeptidase domains, constituting the hinge of the active site. The substitution of Gly336 for a bulkier amino acid may change the tilt of the  $\beta_3$  strand, favoring the initial binding and positioning of the  $\beta$ -Lactam for further hydrolysis (Knox *et al.*, 1996). Residues 450 and 452, in the omega loop, are pointing to the active site. It is well known that substitutions in the  $\beta$ -Lactamase omega loop result in structural changes, reflected in the active site shape,  $k_{cat}$ , specificity and/or folding kinetics (Venkatachalam *et al.*, 1994; Maveyraud *et al.*, 1996; Petrosino and Palzkill, 1996; Guillaume *et al.*, 1997; Wheeler *et al.*, 1998; Ibuka *et al.*, 1999; Vanwestwinkel *et al.*, 2000). Substitutions Phe450Leu and Gln452His may result in the destabilization of the entire loop through the loss of some



**Fig. 4.** Model of the MutE active site. The elements of secondary structure and the substituted amino acids are displayed. The catalytic Ser337 is shown in red. The homology-based model was made by the Swiss-Model server ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), the figure was generated using the program MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).



**Fig. 5.** Diagram of the proposed water-activating residues in different  $\beta$ -Lactamase classes. The position of His452, the proposed water-activating residue in MutE, is also indicated.

interactions. In summary, the three substitutions distort the active site conformation, probably by changing the angle between the domains and restructuring the  $\Omega$  loop (Figure 4).

Deacylation has been solved by different functional groups located in different positions of the active site in the DD-peptidase/ $\beta$ -Lactamase superfamily (Figure 5). In class A  $\beta$ -Lactamases, water is activated by Glu166 (Lamotte *et al.*, 1992), in class B  $\beta$ -Lactamases by Tyr150 (Powers *et al.*, 1999), while in class D  $\beta$ -Lactamases Lys70 is responsible for it (Golemi *et al.*, 2001). As seen in Figure 5, these residues are located in different secondary structure elements and also in different orientations in regard to the substrate. The simplest hypothesis for the mechanism of acyl MutE hydrolysis would

be that Gln452His is responsible for water activation as it is the only substitution with a new functional group that could act as a potential proton acceptor, this histidine could act as in a serine protease catalytic triad. This hypothesis is also supported by the Glu166Gln:Asn170Asp PC1 mutant. In this class A  $\beta$ -Lactamase mutant the general base has been moved to a different position of the omega loop without losing its deacylation capacity, proving that water could be activated by another residue of the omega loop (Chen and Herzberg, 1999). Deacylation could also be promoted by the reorientation of some other residue(s) already present in wild-type PBP2X. Nevertheless only a crystallographic structure would allow us to discriminate among these possibilities and assign the proper role to each of the substituted amino acids.

Directed evolution has allowed the generation of new functional proteins. This engineering strategy consists on the production of multiple variants and their later selection. It is an extremely powerful idea, however it can be limited in practice by the number of variants that we can produce and select. Some of the most interesting changes may require several mutations in concert; therefore it is essential to explore efficiently sequence space by generating the right diversity. Since we wanted to modify catalytic properties of the enzyme, we focused our mutagenesis schemes to those residues near or in direct contact with the substrate, i.e. residues forming the active site. This library was  $10^5$ -fold smaller than the library size needed to obtain all triple substitutions in a 341 amino acids protein through a purely random directed evolution scheme. We were able to select  $\beta$ -Lactam-resistant clones from a library generated through this kind of evolutionary engineering approach. Each of these clones had four or five mutations of which only three—two produced by directed mutagenesis and one by mutagenic PCR—are necessary to obtain the  $\beta$ -Lactamase activity. The residues found at these positions are absolutely conserved in nature and thus would be considered to be indispensable; nevertheless the MutE mutant seems to have acquired the necessary functional properties for  $\beta$ -Lactam hydrolysis without losing its original activity, as shown by S2d hydrolysis. It would have thus become an evolutionary intermediate between the two specialized enzymes (Matsumura and Ellington, 2001).

The MX1 PBP2X DD-transpeptidase and its most similar  $\beta$ -Lactamase (Swissprot: BLOB\_PSEAE) are only 19% identical; nevertheless we demonstrate here that these activities are so close in functional space that only three substitutions in a transpeptidase result in a  $\beta$ -Lactamase. The proximity of these activities could also help explain the fact that  $\beta$ -Lactamases have evolved several times from DD-peptidases (Knox *et al.*, 1996; Massova and Mobashery, 1998). The MutE cefotaxime deacylation rate is  $10^5$ -fold faster than that of the wild-type; this is biologically significant as it confers cephalosporin resistance to the strains harboring it. It has a broad substrate range, being able to degrade both penicillins and cephalosporins, although its catalytic capacity is 10-fold higher for the latter. This DD-peptidase bearing an incipient  $\beta$ -Lactamase activity could be a new evolutionary pathway in the development of antibiotic resistance.

## Acknowledgements

We thank Dr X.Soberón for support and helpful discussions throughout the development of this project, R.E.Mares for technical help, Dr J.M.Frère (University of Liège) for providing us with a sample of the S2d substrate, and Dr M.Bobadilla (Instituto Nacional de Nutrición) for the *S.pneumoniae*

clinical isolate. This work was supported by CONACyT (G0030-N9608), UNAM (DGAPA-IN220898), and by UNAM (DGEP) fellowship (M.P.).

## References

- Adachi,H., Ohta,T. and Matsuzawa,H. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 3186–3191.
- Adam,M., Dambon,C., Plaitin,B., Christiaens,L. and Frere,J.M. (1990) *Biochem. J.*, **270**, 525–529.
- Asahi,Y., Takeuchi,Y. and Ubukata,K. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1252–1255.
- Bolon,D.N. and Mayo,S.L. (2001) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 14274–14279.
- Bush,L.M., Calmon,J. and Johnson,C.C. (1995) *Infect. Dis. Clin. North Am.*, **9**, 653–686.
- Cadwell,R.C. and Joyce,G.F. (1992) *PCR Methods Appl.*, **2**, 28–33.
- Chen,C.C.H. and Herzberg,O. (1999) *Protein Eng.*, **12**, 573–579.
- Chesnel,L., Zapun,A., Mouz,N., Dideberg,O. and Vernet,T. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1678–1683.
- Chittock,R.S., Ward,S., Wilkinson,A.S., Caspers,P., Mensch,B., Page,M.G. and Wharton,C.W. (1999) *Biochem. J.*, **338**, 153–159.
- Chothia,C. (1992) *Nature*, **357**, 543–544.
- Cohen,S.A. and Pratt,R.F. (1980) *Biochemistry*, **19**, 3996–4003.
- Delaire,M., Labia,R., Samama,J.P. and Masson,J.M. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 20600–20606.
- Di Guilmi,A.M., Mouz,N., Petillot,Y., Forest,E., Dideberg,O. and Vernet,T. (2000) *Anal. Biochem.*, **284**, 240–246.
- Dietmann,S. and Holm,L. (2001) *Nature Struct. Biol.*, **8**, 953–957.
- Fisher,J., Charnas,R.L., Bradley,S.M. and Knowles,J.R. (1981) *Biochemistry*, **20**, 2726–2731.
- Gerlt,J.A. and Babbitt,P.C. (2001) *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 209–246.
- Ghuysen,J.M. (1994) *Trends Microbiol.*, **2**, 372–380.
- Goffin,C. and Ghuysen,J.M. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1079–1093.
- Golemi,D., Maveyraud,L., Vakulenko,S., Samama,J.P. and Mobashery,S. (2001) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **27**, 27.
- Gordon,E., Mouz,N., Duee,E. and Dideberg,O. (2000) *J. Mol. Biol.*, **299**, 477–485.
- Grebe,T. and Hakenbeck,R. (1996) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 829–834.
- Guillaume,G., Vanhove,M., Lamotte,B.J., Ledent,P., Jamin,M., Joris,B. and Frere,J.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 5438–5444.
- Huang,W., Petrosino,J., Hirsch,M., Shenkin,P.S. and Palzkill,T. (1996) *J. Mol. Biol.*, **258**, 688–703.
- Ibuka, A. *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.*, **285**, 2079–2087.
- Imtiaz,U., Billings,E.M., Knox,J.R. and Mobashery,S. (1994) *Biochemistry*, **33**, 5728–5738.
- Jamin,M., Dambon,C., Millier,S., Hakenbeck,R. and Frere,J.M. (1993) *Biochem. J.*, **292**, 735–741.
- Jurgens,C., Strom,A., Wegener,D., Hettwer,S., Wilmanns,M. and Sterner,R. (2000) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 9925–9930.
- Knox,J.R., Moews,P.C. and Frere,J.M. (1996) *Chem. Biol.*, **3**, 937–947.
- Koradi,R., Billeter,M. and Wuthrich,K. (1996) *J. Mol. Graph.*, **14**, 51–55, 29–32.
- Laible,G. and Hakenbeck,R. (1991) *J. Bacteriol.*, **173**, 6986–6990.
- Lamotte,B.J., Jacob,D.F., Dive,G., Frere,J.M. and Ghuysen,J.M. (1992) *Biochem. J.*, **282**, 189–195.
- Lu,W.P., Kincaid,E., Sun,Y. and Bauer,M.D. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 31494–31501.
- Massova,I. and Mobashery,S. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 1–17.
- Matagne,A., Lamotte,B.J. and Frere,J.M. (1998) *Biochem. J.*, **330**, 581–598.
- Matsumura,I. and Ellington,A.D. (2001) *J. Mol. Biol.*, **305**, 331–339.
- Maveyraud,L., Saves,I., Burlet,S.O., Swaren,P., Masson,J.M., Delaire,M., Mourey,L., Prome,J.C. and Samama,J.P. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 10482–10489.
- Merino,E., Osuna,J., Bolivar,F. and Soberon,X. (1992) *Biotechniques*, **12**, 508–510.
- Miyazaki,K. and Arnold,F.H. (1999) *J. Mol. Evol.*, **49**, 716–720.
- Mouz,N., Di Guilmi,A.M., Gordon,E., Hakenbeck,R., Dideberg,O. and Vernet,T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 19175–19180.
- Nagai,K., Davies,T.A., Jacobs,M.R. and Appelbaum,P.C. (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1273–1280.
- Pares,S., Mouz,N., Petillot,Y., Hakenbeck,R. and Dideberg,O. (1996) *Nature Struct. Biol.*, **3**, 284–289.
- Penefsky,H.S. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 2891–2899.
- Petrosino,J.F. and Palzkill,T. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 1821–1828.
- Powers,R.A., Blazquez,J., Weston,G.S., Morosini,M.I., Baquero,F. and Shoichet,B.K. (1999) *Protein Sci.*, **8**, 2330–2337.

- Quemeneur,E., Moutiez,M., Charbonnier,J.B. and Menez,A. (1998) *Nature*, **391**, 301–304.
- Severin,A., Figueiredo,A.M. and Tomasz,A. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 1788–1792.
- Stemmer,W.P. (1994) *Nature*, **370**, 389–391.
- Strynadka,N.C., Adachi,H., Jensen,S.E., Johns,K., Sielecki,A., Betzel,C., Sutoh,K. and James,M.N. (1992) *Nature*, **359**, 700–705.
- Thomas,B., Wang,Y. and Stein,R.L. (2001) *Biochemistry*, **40**, 15811–15823.
- Todd,A.E., Orengo,C.A. and Thornton,J.M. (2001) *J. Mol. Biol.*, **307**, 1113–1143.
- Vanwetswinkel,S., Avelle,B. and Fastrez,J. (2000) *J. Mol. Biol.*, **295**, 527–540.
- Venkatachalam,K.V., Huang,W., LaRocco,M. and Palzkill,T. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 23444–23450.
- Viadiu,H., Osuna,J., Fink,A.L. and Soberon,X. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 781–787.
- Voigt,C.A., Kauffman,S. and Wang,Z.G. (2000) *Adv. Protein Chem.*, **55**, 79–160.
- Wagner,U.G., Petersen,E.I., Schwab,H. and Kratky, C. (2002) *Protein Sci.*, **11**, 467–478.
- Wang,X., Minasov,G. and Shoichet,B.K. (2002) *J. Mol. Biol.*, **320**, 85–95.
- Wheeler,K.A., Hawkins,A.R., Pain,R. and Virden, R. (1998) *Proteins*, **33**, 550–557.
- Zaccolo,M. and Gherardi,E. (1999) *J. Mol. Biol.*, **285**, 775–783.
- Zhang,Z., Yu,Y., Musser,J.M. and Palzkill,T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 46568–46574.
- Zhao,G., Yeh,W.K., Carnahan,R.H., Flokowitsch,J., Meier,T.I., Alborn,W.J., Becker,G.W. and Jaskunas,S.R. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 4901–4908.

Received August 5, 2002; revised October 10, 2002; accepted November 14, 2002