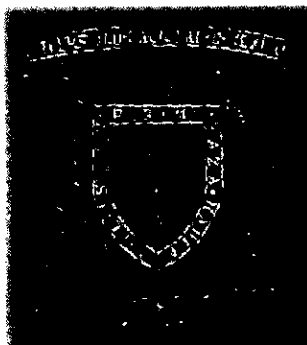


03072

4  
29.



UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

---

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MUTAGÉNESIS COMBINATORIA DE LA  
REGIÓN DEL SITIO ACTIVO DE LA  
BETA LACTAMASA TEM-1 DE *Escherichia coli*

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

Presenta la Bióloga

Lilia Chihu Amparán

Cuernavaca, Morelos  
MÉXICO

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

261663



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de la Dra. L. Yolanda Fuchs, del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del INSP y en el Laboratorio del Dr. Xavier Soberón Mainero, del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

BAJO LA TUTORÍA DE LOS DRs.:

DRA. L. YOLANDA FUCHS GÓMEZ

DR. XAVIER SOBERÓN MAINERO

## **COMITÉ TUTORIAL**

DRA. L. YOLANDA FUCHS GÓMEZ  
DR. XAVIER SOBERÓN MAINERO  
M. en C. CÉSAR OVANDO ISHIKAWA

## **JURADO**

DR. FERNANDO BASTARRACHEA AVILA  
DR. HUMBERTO FLORES SOTO  
DRA. L. YOLANDA FUCHS GÓMEZ  
DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA  
DR. JESÚS SILVA SÁNCHEZ

## DEDICATORIAS

A mi esposo Alejandro Sánchez por su apoyo, paciencia y amor durante todos estos años.

A mi mamá Lilia Amparán, quien me ha guiado e impulsado desde mis primeros pasos y por todo el amor y comprensión que me ha dado.

A mis hermanos Dinorah y Jesús por su amor infinito e incondicional.

A mis tíos Angélica, Aquiles y Sis Amparán por el cariño que me han brindado.

A la memoria de mi tío Aurelio Martínez por su apoyo y comprensión en los momentos más difíciles.

A todos ellos dedico mi tesis.

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Yolanda Fuchs Gómez por su apoyo para la realización de este proyecto, por sus valiosos comentarios, por creer en mi. Por brindarme su amistad y confianza.
- Al Comité Tutorial por su orientación y apoyo.
- A los miembros del jurado por sus comentarios y sugerencias, al presente trabajo.
- Quiero expresar mi agradecimiento a todos los integrantes del Laboratorio del Laboratorio del Dr. Xavier Soberón: Ernesto, Héctor, Joel, Humberto, Moreno y Fili, que de alguna forma me ayudaron para el desarrollo del presente trabajo.
- A los integrantes del Laboratorio de Resistencia Bacteriana, a los ausentes y a los presentes: Cesar, Victor, Fernando, Berta y Mago, por su apoyo.
- A Gloria nuestra secretaria por todo el apoyo que me ha brindado.
- Al M. en C. César Ovando por su asesoría técnica y académica. Por brindarme su amistad y consejos.
- A la Ma. de Dra. Lourdes Gutiérrez y al M. en C. Adolfo Pedroza por honrarme con su amistad y sus valiosos consejos.

## RESUMEN

La beta-lactamasa TEM-1 cataliza la hidrólisis de antibióticos beta lactámicos como las penicilinas y algunas cefalosporinas. Paralelamente a la introducción de antibióticos mas potentes, como ceftazidima y cefotaxima (cefalosporinas de amplio espectro), aparecieron mutaciones en las enzimas tipo TEM que les permitieron hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro, estas substituciones se han encontrado en el sitio activo de la enzima. El incremento en la resistencia bacteriana es debido principalmente a la presión de selección ejercida por el uso de agentes antimicrobianos. Para entender el papel del residuo 164 de TEM-1 en la hidrólisis de cefalosporinas de tercera generación se mutó R164 a saturación, usando una metodología que pudiera dar lugar a otras posibles substituciones de aminoácidos en esa posición. Adicionalmente se uso un molde de DNA de TEM-1 con la mutación G238S, la cual disminuye la sensibilidad a cefotaxima

Las mutantes fueron seleccionadas en ceftazidima y cefotaxima. Se obtuvieron mutantes con substituciones en la posición 164 por Gly, Ser, His, Glu y Asn, las cuales confirieron resistencia a ceftazidima. Se obtuvieron mutaciones adicionales no diseñadas en la mutagenesis como V119E, R120G, I173V, A184V, E240K, algunas de las cuales participan en la hidrólisis de cefalosporinas de amplio espectro, y también se encontraron mutantes que perdieron la substitución G238S presente en el molde original.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Pared Celular.

La mayoría de las bacterias tienen una pared celular rígida indispensable para mantener la integridad de la célula, les da forma, las protege de lisis osmótica y les sirve como iniciador para la síntesis de la nueva pared celular. También proporciona una resistencia físico-mecánica a riesgos ambientales tales como: enzimas líticas, químicos tóxicos (como los antibióticos), y fagocitosis por eucariotes. La pared celular denominada también saco de mureína está formada por peptidoglicano o mureína (compuesto de carbohidratos y aminoácidos) [Jacobs y cols. 1994].

Las bacterias de acuerdo a su pared celular se dividen en: Gram-positivas y Gram-negativas. La pared celular de las bacterias Gram-positivas consiste de varias capas de peptidoglicanos, constituyendo aproximadamente el 90% de la misma Fig. 1.

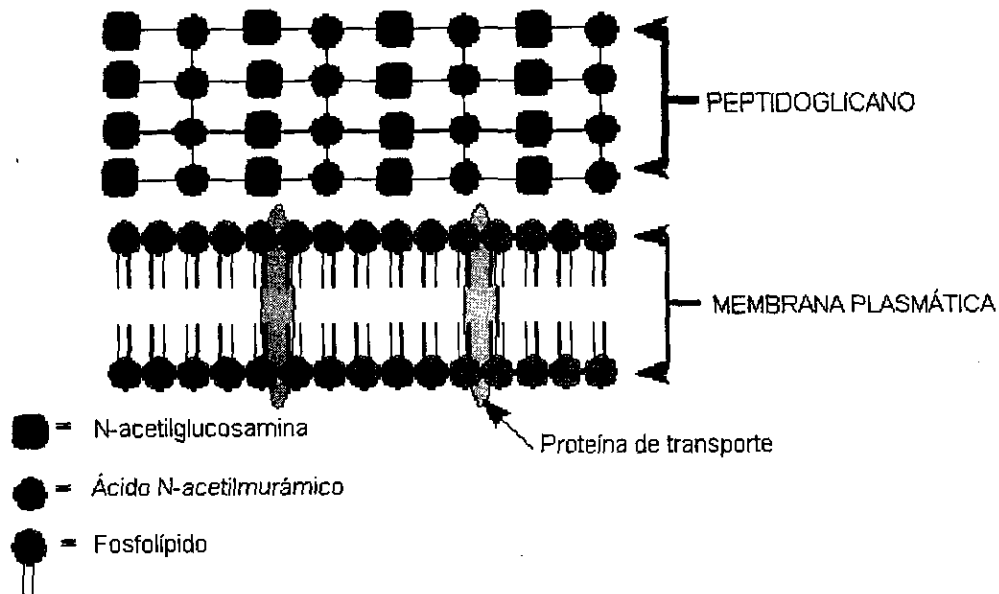


Fig. 1. Pared celular de Gram-positivos.



La pared celular de las bacterias Gram-negativas tiene una estructura más complicada, tiene dos membranas: la membrana citoplasmática y la membrana externa, (Fig. 2). Entre las dos membranas se encuentra el espacio periplásmico, que permite el crecimiento de la membrana externa y la pared celular durante la división celular [Oliver 1996]. En el periplasma se encuentra el peptidoglicano que comprende el 20% de la pared. El lipopolisacárido, es una bicapa de fosfolípidos y polisacáridos que se encuentra en la capa de peptidoglicano externa, unida a éste por lipoproteínas.

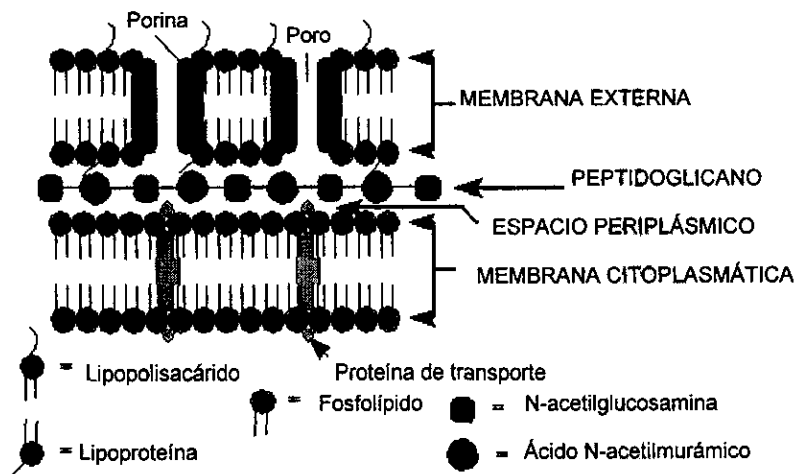


Fig. 2. Pared celular de Gram-negativos.

La síntesis de la pared celular es el blanco de algunos agentes antibacterianos como los beta lactámicos, a los que pertenecen las penicilinas y cefalosporinas. Estos interfieren con la síntesis de la pared celular mediante la inhibición de las enzimas que catalizan su ensamblaje de forma irreversible.

Los precursores de la pared celular se sintetizan en el citoplasma y el ensamble se lleva a cabo en el periplasma [Van-Heijenoort 1996]. El proceso de la biosíntesis de la pared celular de mureína es un proceso complejo que involucra diferentes pasos que se llevan a cabo en el citoplasma y en la membrana citoplásmica. El proceso clave en la construcción de la capa de peptidoglicano

que forma la pared celular es el entrecruzamiento enzimático entre cadenas adyacentes de peptidoglicano. En bacterias como *E. coli* y *Salmonella*, el entrecruzamiento se hace mediante un enlace peptídico entre un residuo D-Ala de una hebra y el grupo amino del residuo del ácido meso diaminopimérico de otra hebra de peptidoglicano [Van Heijenoort 1996]. El entrecruzamiento forma una red de capas de peptidoglicano, que proporcionan fuerza mecánica a las células bacterianas, protegiéndolas de lisis por presión osmótica [Salton 1964]. Las enzimas que llevan a cabo el entrecruzamiento, o la transpeptidación, son DD-peptidasas, que son el blanco de acción de los antibióticos beta lactámicos, también [Frère 1995, Kelly y cols. 1995] conocidas como proteínas unidoras de penicilina (PBPs). Éstas son un grupo de enzimas bacterianas que se encuentran en la membrana interna. El proceso de entrecruzamiento termina con la transpeptidación, que involucra tres pasos previos para hacer el pentapéptido que es el precursor del peptidoglicano (Fig. 3). Primero la D-Ala se forma mediante la interconversión del enantiómero L por la alanina racemasa [Adams 1976], después la ligación es catalizada por la ligasa D-Ala:D-Ala que hidroliza el ATP a ADP y Pi, formando un enlace amida entre los dos monómeros de D-Alaninas [Neuhaus y cols. 1981, Daub y cols. 1988]. El dipéptido se une mediante la enzima que añade D-Ala-D-Ala al cosustrato UDP-muramil tripéptido para formar el pentapéptido que es el precursor para el entrecruzamiento final [Michaud y cols. 1987].

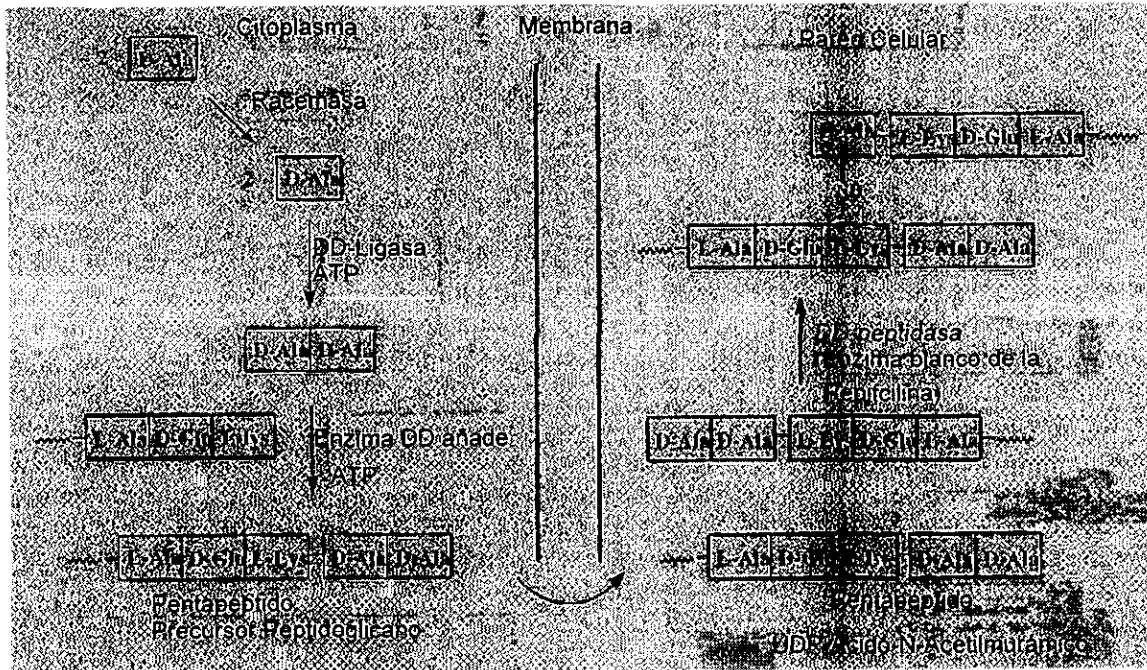


Fig. 3. Enzimas en la biosíntesis de la pared celular de las bacterias.

## 1.2. Antibióticos.

Un antibiótico es cualquier sustancia liberada por un microorganismo, bacteria u hongo, que es capaz de matar o inhibir el crecimiento de un microorganismo diferente, lo que le da una ventaja para competir por los recursos locales. Es posible sintetizar y producir a gran escala estas sustancias químicas, para utilizarlas contra microorganismos patógenos en nuestro ambiente. La actividad antimicrobiana se mide por la determinación de la cantidad mínima de agente antimicrobiano necesaria para inhibir el desarrollo del microorganismo en estudio, al valor obtenido se le conoce como concentración mínima inhibitoria (CMI).

Existen varias formas en las que los antibióticos ejercen su actividad antimicrobiana (Fig. 4). Pueden ser bactericidas, matando directamente a los microorganismos o bacteriostáticos inhibiendo el crecimiento de los mismos [Harley y cols. 1993].

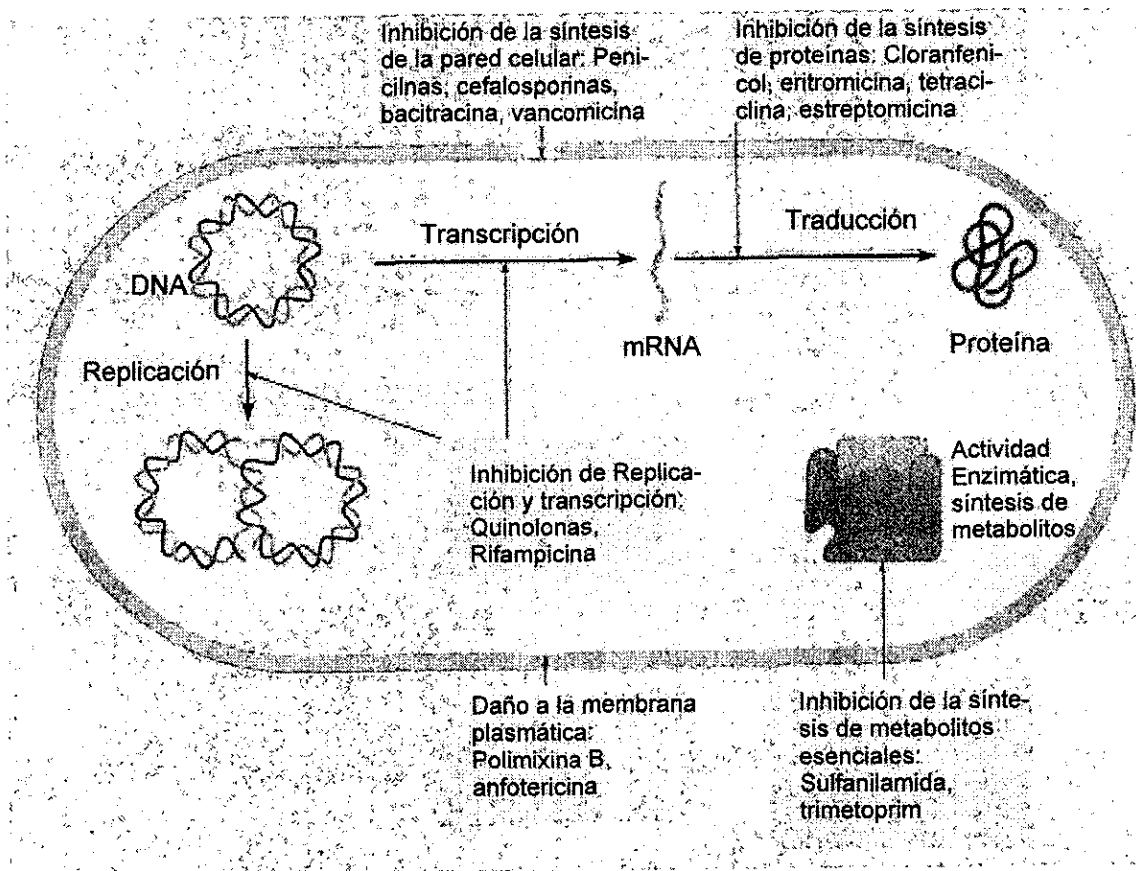


Fig. 4. Mecanismos de acción de los antimicrobianos.

### 1.2.1. Mecanismos de acción de algunos antibióticos.

**1.2.1.1. Inhibición de la síntesis de la pared celular:** Por ejemplo, la penicilina actúa como un sustrato análogo de la transpeptidasa, uniéndose a ésta covalentemente mediante el anillo beta lactámico, evitando el funcionamiento de la transpeptidasa, durante la unión de las cadenas de peptidoglicano [Mitsuhasi 1982]. La acilación de la enzima es irreversible y se dice que los beta lactámicos son inhibidores suicidas, una vez que se han unido a la transpeptidasa permanecen unidos a ésta sin importar la concentración del sustrato en el medio. Por lo tanto la pared celular se debilita y la célula ya no se divide. Debido a que las células humanas no tienen peptidoglicano en sus células, la

penicilina tiene poco efecto tóxico en éstas [Mitsubishi 1982], no obstante existen algunas reacciones alérgicas en algunas personas.

**1.2.1.2. Inibición de la síntesis de proteínas:** Existen varios antibióticos que actúan sobre los diferentes pasos de la síntesis de proteínas en los que intervienen los ribosomas (Fig. 5), como la eritromicina que es efectiva contra Gram-positivos, se une a su blanco de acción el rRNA 23S de la subunidad 50S. Así, al evitar el movimiento de translocación del ribosoma a lo largo del mRNA se inhibe la síntesis de proteínas, bloqueando la formación del complejo de iniciación [Lane 1998, Lewin 1994a] y la estreptomicina, que una vez que entra en la célula se une a la proteína S12 de la subunidad 30S del rRNA principalmente en las bacterias Gram-negativas [Lewin 1994a, Neu y cols. 1996]. Esto interfiere con la unión del tRNA de formilmetionina (primer residuo en las proteínas bacterianas) al ribosoma evitando el inicio de la síntesis de proteínas [Lane 1998, Lewin 1994b, Neu y cols. 1996], la cual es irreversible [Lane 1998]. Este antibiótico no se une a las subunidades 60S y 40S del ribosoma de las células humanas.

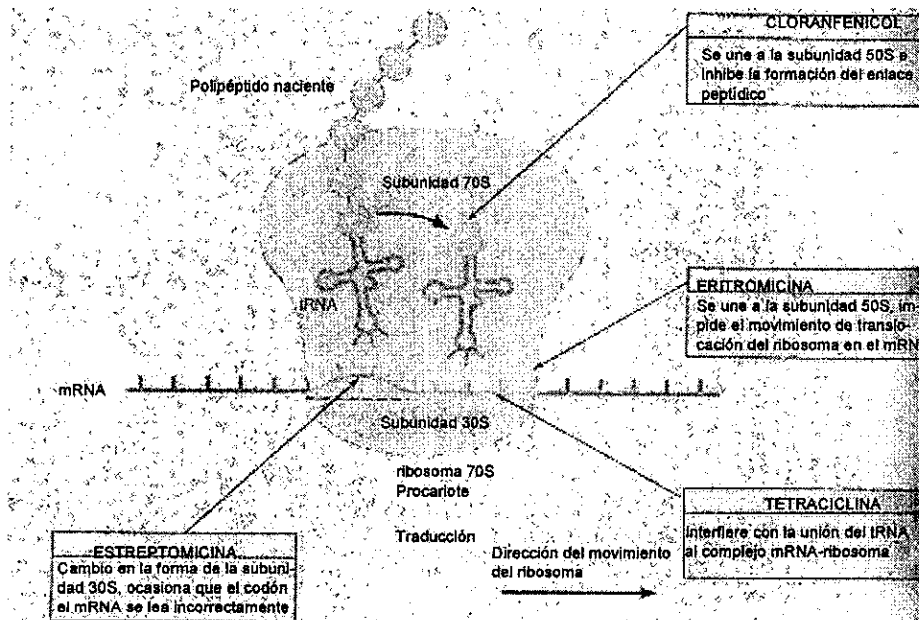


Fig. 5. Inhibición de la síntesis de proteínas por antibióticos.

**1.2.1.3. Lesiones en la membrana plasmática:** Todas las células están rodeadas de una membrana celular, aún cuando las membranas celulares de todas las células son muy similares, las de bacterias no presentan esteroides, a diferencia de las de eucariotes, esta pequeña diferencia permite la especificidad de los antimicrobianos. Por ejemplo, la polimixina se une a membranas que no tienen esteroides, posiblemente desplaza al  $Mg^{+2}$  o al  $Ca^{+2}$  de los grupos fosfatos de los fosfolípidos que están en la membrana, actuando como un detergente que desorganiza la permeabilidad de la membrana, y permite que los metabolitos salgan de la célula; sólo es efectiva en Gram-negativos [Lane 1998, Neu y cols. 1996]. No es muy recomendable usar este agente antimicrobiano ya que se une a varios blancos en los tejidos del cuerpo y son potentes toxinas para el riñón y el sistema nervioso [Neu y cols. 1996].

**1.2.1.4. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos:** Los antibióticos de la familia de la rifampicina inhiben la síntesis del RNA, porque se unen a la

subunidad beta de la RNA polimerasa de procariotes (que sólo tiene 4 subunidades), evita la adición del tercer o cuarto nucleótido, posiblemente bloqueando la transferencia del RNA naciente [Lewin 1994a]. En eucariotes existen tres polimerasas diferentes (con más subunidades que las procariotes). Las quinolonas ejercen su actividad bactericida interfiriendo con la DNA girasa, enzima topoisomerasa del tipo II, esencial para la replicación del DNA, transcripción y otras funciones celulares además de relajar o superenrollar el DNA. La diferencia que existe en las enzimas que se usan en procariotes y eucariotes para la síntesis de ácidos nucleicos, permiten la especificidad de este tipo de antibióticos.

**1.2.1.5. Inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales:** El antimetabolito es una sustancia que evita que la célula lleve a cabo una reacción metabólica, y puede actuar de dos formas: Una por inhibición competitiva de las enzimas metabólicas, donde una enzima es bloqueada por un inhibidor que se une a su sitio activo y no le permite reaccionar. Esto inhibe la función de la enzima. Como en el caso del antimetabolito sulfanilamida, que es un análogo del ácido p-aminobenzoico (PABA), en muchos microorganismos el PABA es el sustrato para la síntesis de ácido fólico y éste a su vez funciona como coenzima para la síntesis de purinas y pirimidinas. La sulfanilamida detiene la síntesis de ácido fólico, actuando como un inhibidor competitivo y el microorganismo cesa su crecimiento [Case y cols. 1993], además bloquea la síntesis de ácidos nucleicos. Los seres humanos no sintetizan ácido fólico, por lo que no se ven afectados.

### **1.2.2. Mecanismos de resistencia.**

En un intento por adaptarse a los cambios ambientales debido a la introducción de los antibióticos, la bacteria adquiere resistencia a estos agentes a través de

diversos mecanismos dependiendo del blanco. En un ambiente clínico alterado por el uso de antibióticos algunas de las bacterias que eran susceptibles a los antibióticos, ahora son resistentes al menos a uno de ellos. La consecuencia del uso de los antibióticos en la terapia, es que las bacterias han desarrollado mecanismos para resistir a éstos. Estas cepas y sus descendientes también resistentes son capaces de ocasionar infecciones no curables por antibióticos [Levy 1992].

La aparición de mutaciones espontáneas en el cromosoma pueden ocasionar resistencia a antibióticos. Modificaciones en la secuencia primaria del DNA del gen de una proteína blanco del antibiótico pueden alterar la unión del mismo.

**Resistencia inherente.** Algunas bacterias son resistentes a algunos antibióticos simplemente porque no permiten su entrada. Algunas bacterias Gram-negativas son resistentes a penicilina por la estructura de su pared celular [Levy 1992].

**Inactivación del antibiótico.** Algunas bacterias resisten porque son capaces de inactivar al antibiótico, por modificación química o hidrólisis. Por ejemplo, las bacterias que presentan beta lactamasas hidrolizan antibióticos beta lactámicos.

**Modificación del blanco de acción.** Cuando se altera el blanco de acción las bacterias dejan de ser susceptibles a los antibióticos. Por ejemplo un cambio en la subunidad 50S del rRNA puede conferir resistencia a cloranfenicol [Levy 1998]; cambios en las PBPs disminuyen la sensibilidad a penicilina.

### 1.2.3. Transferencia de la resistencia.

La resistencia puede transferirse rápidamente entre cepas y especies por el intercambio de material genético (Fig. 6) y la diseminación de ésta parece inevitable [Phillippon 1989].

**Plásmidos.** Comúnmente en los plásmidos se encuentra la "información" para la resistencia a los antibióticos [Levy 1998]. Muchos de ellos tienen genes que



codifican enzimas que destruyen o alteran los antibióticos [Harley y cols. 1993]. Los plásmidos pueden sufrir alteraciones con la pérdida o la ganancia de nuevos genes. Además, son capaces de combinarse con otros plásmidos, así la resistencia a diversos antibióticos puede estar en un sólo plásmido. Los determinantes de resistencia pueden transferirse de una célula a otra por conjugación, esto permite transferir plásmidos que codifiquen para la resistencia a antibióticos a otras células [Levy 1992]. La célula donadora, que tiene funciones tra copia todo el plásmido(s) y lo pasa a través del pili a la cepa receptora, esparciendo el plásmido resistente por conjugación. Esto resulta en un incremento exponencial en el número de cepas con el plásmido que confiere resistencia [Levy 1992]. También puede transferirse por fagos.

**Transposones.** Los genes de resistencia se pueden encontrar en transposones. Estos “pequeños” fragmentos de DNA pueden “saltar” de un replicón a otro. De esta forma el gen de resistencia puede diseminarse mediante un plásmido o fago [Levy 1992].

**Bacteriófagos.** Los fagos pueden proveer de un mecanismo de transferencia de los genes de resistencia a antibióticos, ya que una vez que inyectan su DNA en la bacteria, éste puede incorporarse en el cromosoma bacteriano. Cuando el profago deja el DNA cromosomal del hospedero puede llevarse fragmentos de éste y si se incluyen genes de resistencia a antibióticos éstos pueden replicarse una vez que el virus lo haga. Los nuevos virus pueden integrar su DNA así como los genes de resistencia al cromosoma de otra célula hospedero diferente [Levy 1992].

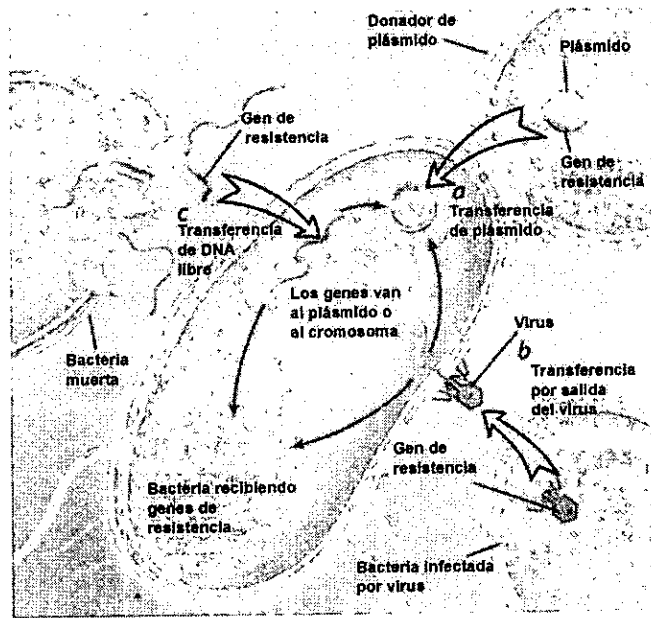


Fig. 6 Transferencia de la resistencia [Levy 1998].

#### 1.2.4. Antibióticos beta lactámicos.

La penicilina es uno de los antibióticos de la clase denominada beta lactámicos (Fig. 7), producida por el hongo *Penicillium*. Las cefalosporinas son producidas por el hongo *Cephalosporium*. A través de diferentes sustituciones en los grupos R y R', se han obtenido antibióticos que han mejorado la actividad de la penicilina o la cefalosporina.

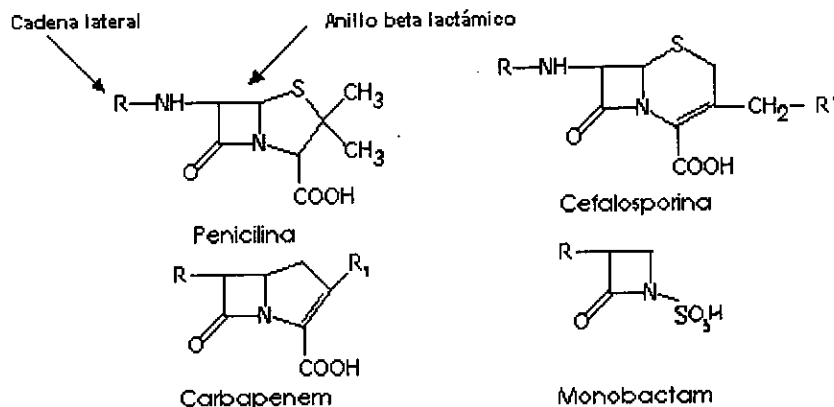


Fig. 7 Estructura básica de antibióticos beta lactámicos.

La estructura de la cefalosporina difiere de la penicilina en que tiene un anillo de seis miembros unido al anillo beta lactámico en lugar de uno de cinco.

La penicilina tiene una estructura similar a la D-alanil-D-alanina de los péptidos involucrados en el entrecruzamiento del peptidoglicano (Fig. 8). Los enlaces del anillo beta lactámico son similares a los enlaces entre los dos residuos de alanina que se separan en la transpeptidación [Mitsuhashi 1982]. En las proteínas se encuentran solamente los L-aminoácidos, y los D-aminoácidos están presentes en las paredes celulares de ciertos microorganismos, por lo tanto los antibióticos beta lactámicos no interfieren con nuestro metabolismo.

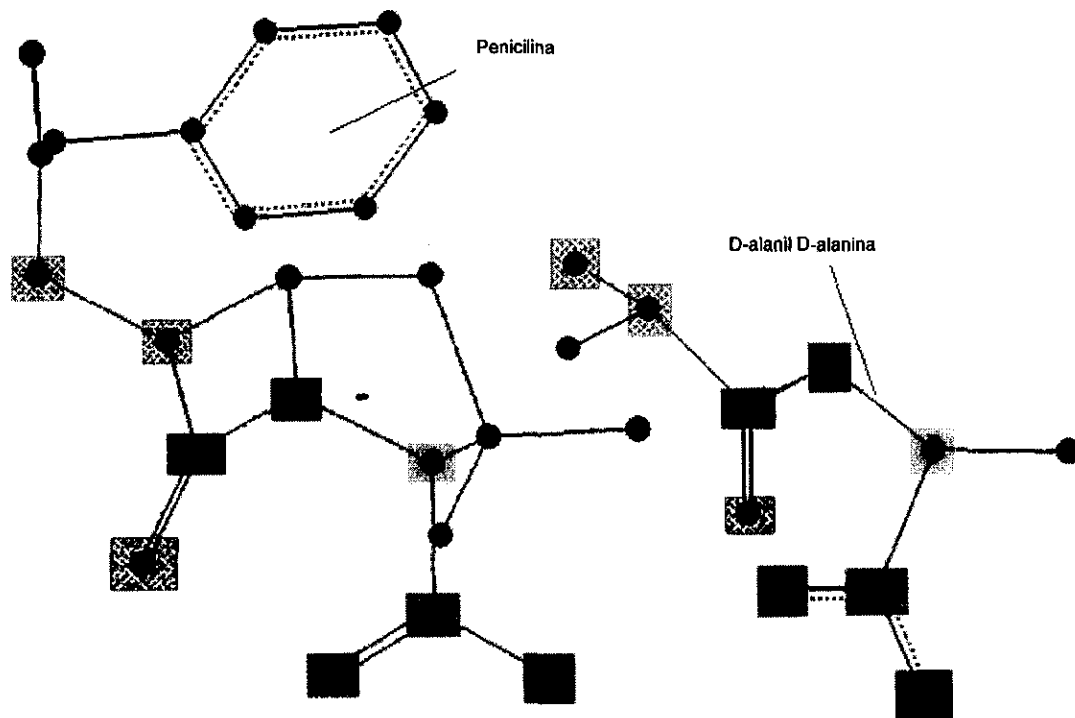


Fig. 8. Penicilina y D-alanil-D-alanina [Corey y cols. 1997].

Es en el dominio de la transpeptidasa que las PBPs son inhibidas por la penicilina y otros beta lactámicos [Herzberg y cols. 1991a]. La transpeptidación (Fig. 9) consiste en la acilación de la enzima transpeptidasa por la D-alanil D-

alanina de un péptido, seguida por la transferencia del grupo acilo a un grupo amino de otra unidad, para crear un nuevo péptido cruzado [Frère y cols. 1985], uniendo las cadenas para formar una estructura rígida:

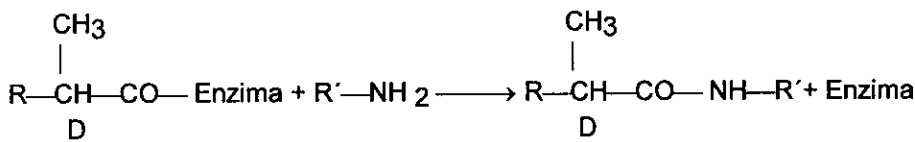
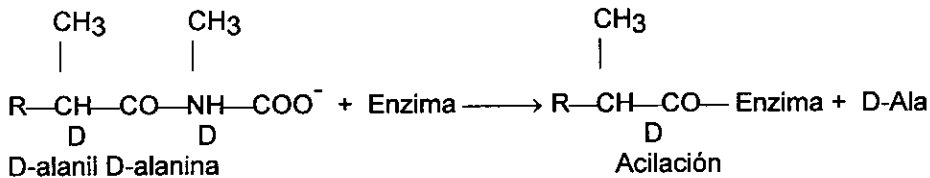


Fig. 9. Transpeptidación para formar el peptidoglicano.

Se ha propuesto que la penicilina actúa como un inhibidor suicida por su parecido con el péptido D-Ala-D-Ala [Tipper y cols. 1965], Fig. 8.

Existen cefalosporinas de primera generación como cefalotín, de segunda generación como cefuroxima, de tercera generación ceftazidima y cefotaxima (Fig. 10). Cefpirome es la primera cefalosporina de cuarta generación. El aztreonam es un antibiótico monobactámico de amplio espectro (un beta lactámico monocíclico). El ácido clavulánico es un inhibidor de beta lactamasas usado en combinación con un beta lactámico.

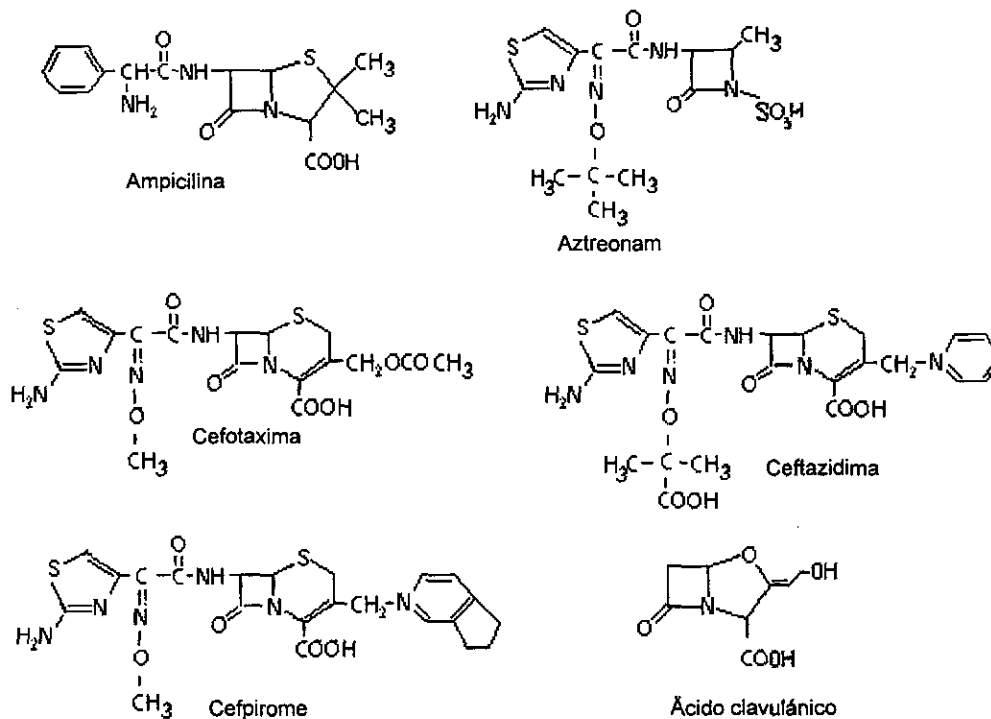


Fig. 10. Antibióticos beta lactámicos e inhibidor utilizados.

### 1.3. Resistencia mediada por beta lactamasas.

Las beta lactamasas son enzimas bacterianas que se encuentran ampliamente distribuidas, son responsables de la resistencia a penicilinas, cefalosporinas y compuestos relacionados. Aquellas que hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro, como ceftazidima, se les conoce como beta lactamasas de amplio espectro. Los organismos que producen las beta lactamasas tienen los genes integrados en plásmidos, lo que origina que puedan transmitirse fácilmente entre las Enterobacterias [Sirot y cols. 1991]. Como resultado son resistentes a una gran variedad de antibióticos beta lactámicos [Meyers y cols. 1993, Bradford y cols. 1994].

### 1.3.1. Clasificación de las beta lactamasas.

Se han propuesto varias clasificaciones de las beta lactamasas [Jelsch y cols. 1993], de acuerdo a su espectro de sustratos hidrólizables, susceptibilidad a inhibidores, considerando genéticamente si están codificadas en cromosoma o en plásmidos [Livermore 1995] y recientemente su filogenia.

Bush y cols.[1995] clasifican a las beta lactamasas de acuerdo al perfil de sustratos que hidrolizan entre los que considera penicilina, oxacilina, carbenicilina, cefaloridina, cefalosporinas de amplio espectro e imipenem y susceptibilidad a inhibición por ácido clavulánico [Livermore 1995]. La desventaja de esta clasificación fenotípica, es que las mutaciones pueden alterar la especificidad por el sustrato [Jacoby y cols. 1991, Philippon y cols. 1989] y la susceptibilidad al inhibidor [Vedel y cols. 1992], cambiando el grupo al cual la enzima se asigna. La clasificación de las beta lactamasas en base a la homología de su secuencia de aminoácidos propuesta por Ambler [Ambler 1980, Joris y cols. 1988, Ambler y cols. 1991], es más adecuada y no varía por las mutaciones [Livermore 1995]. Este tipo de clasificación es simple y comprende sólo cuatro clases A, B, C y D.

Algunas de las nomenclaturas de tres letras usadas para nombrar a algunas de las beta lactamasas mediadas por plásmidos han perdido su significado histórico: por ejemplo SHV significa sulfhidril variable que indica que el p-cloromercuribenzoato (que une grupos sulfhidrilos) inhibe la hidrólisis de cefaloridina pero no de benzilpenicilina [Matthew 1979], PSE para enzimas específicas de *Pseudomonas* [Matthew 1979], y SAR para África del Sur [Reid y cols. 1986]. Desde que estos nombres se propusieron, se sabe que el residuo del sitio activo de SHV-1 es una serina y no un sulfhidrilo y que las enzimas PSE se encuentran en enterobacterias. SAR-2 se denominó así por que se parecía a SAR-1, pero es un aislamiento que proviene de la India [Young y cols. 1989].

### **1.3.1.1. Serín beta lactamasas.**

Todas las beta lactamasas que tienen serina en el sitio activo, se denominan colectivamente serín beta lactamasas [Palzkill y cols. 1994, Medeiros 1997]. Las serín proteasas son enzimas que tienen un mecanismo catalítico común, caracterizado por tener un residuo de Ser reactivo en el sitio activo que es esencial para la actividad enzimática, esta Ser es mucho más reactiva que otros residuos de Ser en la proteína. El mecanismo de hidrólisis de las serín proteasas involucra un sistema de cargas conocido como tríada catalítica. La Ser no es un nucleófilo fuerte, por lo que una His y un Asp que le ayudan a tener una carga negativa que es necesaria para el ataque al grupo carbonilo (Voet y cols. 1990). No obstante las serín beta lactamasas no tienen los residuos de la tríada catalítica (His-Asp), Herzberg y colaboradores [1991a] proponen que el ataque del OH de la Ser catalítica en el carbono carbonilo del beta lactámico lleva a un estado de transición tetrahédrico cargado negativamente, que es estabilizado por el oxígeno carbonilo del beta lactámico en el agujero del oxianón (en forma análoga a las serín proteasas) y que los residuos Lys73 y Glu166 juegan el papel de donadores de protones.

Las serín beta lactamasas comparten secuencias de aminoácidos altamente conservadas con las PBPs, D-alanil-D-alanina peptidasas [Medeiros 1997]. El substrato natural de las PBPs es un dipéptido de la pared celular D-alanin-D-alanina [Medeiros 1997]. La conformación del extremo carboxilo terminal de este dipéptido es similar estructuralmente al anillo beta lactámico, permitiendo que la penicilina G interfiera en la formación de la pared celular [Tipper y cols. 1965].

#### **1.3.1.1.1. Beta lactamasas clase A.**

La mayoría de las beta lactamasas de la clase A [Ambler 1980, Pastor y cols. 1990], son codificadas en plásmidos y están ampliamente distribuidas en





#### 1.3.1.1.1. Beta lactamasas tipo TEM.

La enzima TEM-1 es una beta lactamasa de la clase A mediada por plásmidos, que es muy común en bacterias Gram-negativas [Medeiros 1984, Saves y cols. 1995, Petrosino y cols. 1996] y está codificada por el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> [Sutcliffe 1978, Medeiros 1984, Roy y cols. 1985, Cooksey y cols. 1990] que se encuentra también en los transposones Tn2 y Tn3 [Datta y cols. 1965].

La proteína madura está formada por 263 residuos de aminoácidos [Huang y cols. 1996]. La beta lactamasa mediada por plásmidos más común entre las enterobacterias es TEM-1 [Livermore 1995]. La primer enzima TEM-1 fue reportada de un aislamiento clínico de *E. coli* en 1965. Las enzimas tipo TEM-1 hidrolizan eficientemente penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación, pero no son activas contra cefalosporinas de tercera generación [Saves y cols. 1995]. No obstante, son capaces de evolucionar y conferir resistencia rápidamente a los nuevos beta lactámicos, como ceftazidima y cefotaxima [Sougakoff 1989]; estas enzimas mutantes tienen de una a tres sustituciones de aminoácidos [Huang y cols. 1996], Tabla I. Las primeras beta lactamasas de amplio espectro (ESBL) datan de 1982 a 1983 [Kliebe y cols. 1985] y pueden hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de tercera generación.

Tabla I. Beta lactamasas tipo TEM de amplio espectro [Bush y cols. 1997].

BETA LACTAMASA	OTRO NOMBRE	21	39	42	69	104	153	164	182	237	238	240	265	276	pI
TEM-1	RTEM-1	L	Q	A	M	E	H	R	M	A	G	E	T	N	5.4
TEM-3	CTX-1, TEM-14 TEM-18	K			K					S					6.3
TEM-4		F				K					S		M		5.9
TEM-5	CAZ-1							S		T		K			5.5
TEM-6						K		H							5.9
TEM-7			K					S							5.4
TEM-8	CAZ-2		K			K		S			S				5.9
TEM-9	RHH-1	F				K		S					M		5.5
TEM-10	MGH-1, TEM-E3 TEM-23							S				K			5.6
TEM-11	CAZ-10		K					H							5.6
TEM-12	YOU-2, CAZ-3 TEM-E2							S							5.2
TEM-15	TEM-17					K					S				6.0
TEM-16	CAZ-7		K			K		H							6.3
TEM-19											S				5.4
TEM-20									T		S				5.4
TEM-21			K			K	R				S				6.4
TEM-22			K			K				G	S				6.3
TEM-24	CAZ-6		K			K		S		T		K			6.5
TEM-25	CTX-2	F									S		M		5.3
TEM-26	YOU-1					K		S							5.6
TEM-27								H				K	M		5.9
TEM-28								H				K			6.1
TEM-29								H							5.4
TEM-42			K	V							S	K	M		5.8
TEM-43						K		H	T						6.1
TEM-46	CAZ-9		K			K		S				K			6.5
TEM-50	CMT-1				L	K					S			D	5.6
TEM-52						K			T		S				6.0

Los residuos invariantes en las beta lactamasas de la clase A son: Glu37, Gly45, Phe66, Ser70, Lys73, Leu81, Asp101, Pro107, Ser130, Asp131, Ala134, Asn136, Gly 143, Gly144, Gly156, Asp157, Arg164, Glu166, Leu169, Asn170, Pro174, Asp179, Thr180, Leu199, Leu207, Pro226, Asp233, Lys234, Gly236, Pro252 (Fig. 11), la mayoría de ellos se encuentran en la región del sitio activo [Pastor y cols. 1990], la numeración que se da se basa en TEM-1.

### 1.3.2. Estructura de las beta lactamasas.

Se conocen las estructuras cristalográficas de cuatro beta lactamasas de la clase A, estas son *Staphylococcus aureus* PC1 (Fig. 12) [Moult y cols. 1985,

Herzberg y cols. 1987, Herzberg 1991, Palzkill y cols. 1994], *Bacillus licheniformis* 749/C (Fig. 13) [Moews y cols. 1990, Knox y cols. 1991], *Streptomyces albus* G [Dideberg y cols. 1987, Lamotte-Brasseur y cols. 1991] y *Escherichia coli* TEM-1 (Fig. 14) [Strynadka y cols. 1992, Jelsch y cols. 1993]. También de tres metalo beta lactamasas de la clase C *Bacillus cereus* (Fig. 15) [Carfi y cols. 1995], *Citrobacter freundii* 1203 [Oefner y cols. 1990] y *Enterobacter cloacae* P99 (Fig. 16) [Lobkovsky y cols. 1993] y la PBP de *Streptomyces* R61 (Fig. 17) [Kelly y cols. 1995] una DD-peptidasa extracelular soluble en agua, de bajo peso molecular [Galleni 1995, Joris y cols. 1988].



Fig. 12. Beta lactamasa de *Staphylococcus aureus* PC1 [Herzberg 1991].



Fig. 13. Beta lactamasa de *Bacillus licheniformis* 749/C [Knox y cols. 1991].

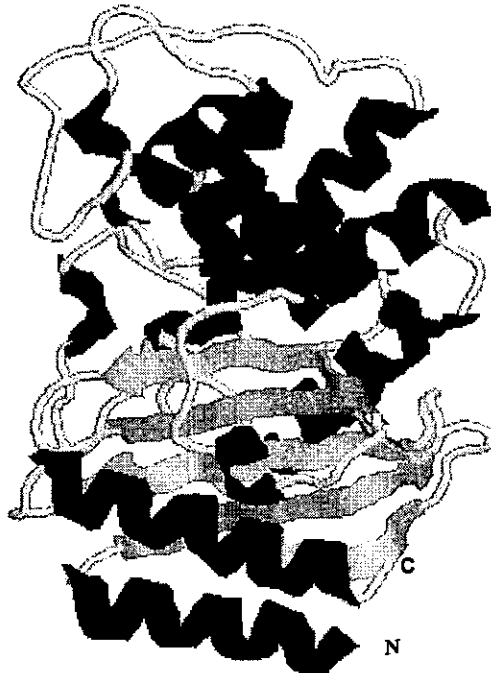


Fig. 14. Beta lactamasa TEM-1 de *Escherichia coli* [Jelsch y cols. 1993].



Fig. 15. Metalo beta lactamasa de *Bacillus cereus* [Carfi y cols. 1995].



Fig. 16. Metalo beta lactamasa de *Enterobacter cloacae* P99 [Lobkovsky y cols. 1993].



Fig. 17. DD-peptidasa de *Streptomyces albus* R61 [Kelly y cols. 1995].

Algunas de las estructuras tridimensionales de beta lactamasas de la clase A, C y la DD-peptidasa de *Streptomyces* R61 [Frère 1995], muestran que estas enzimas tienen estructuras tridimensionales similares [Huang y cols. 1996]. Estos datos junto con la homología en la secuencia sugieren un origen evolutivo común para estas enzimas que reconocen penicilina [Huang y cols. 1996]. Estas enzimas tienen dominios  $\alpha$  y  $\alpha/\beta$ , y el sitio activo se encuentra en la interfase de estos dos dominios [Frère 1995].

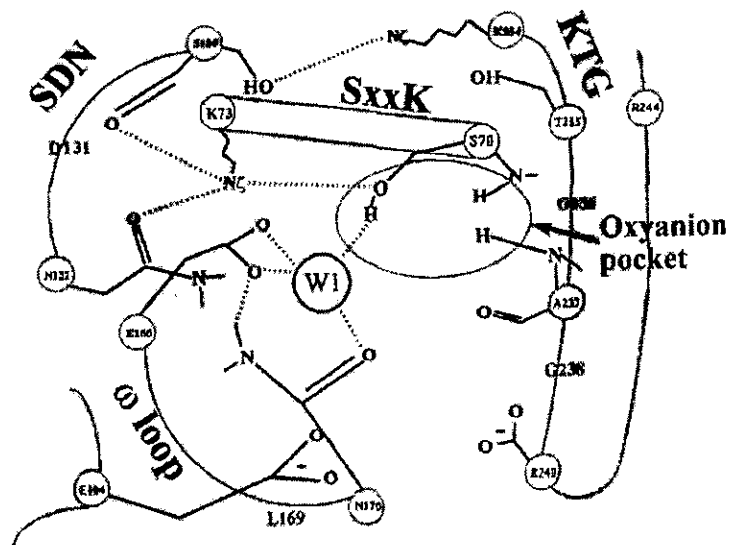
Se han encontrado tres firmas estructurales conservadas (con cadenas laterales de residuos de aminoácidos muy similares o idénticas), que parecen proveer la mayor parte de los grupos involucrados en la catálisis, Tabla II. La firma más cercana al extremo N-terminal que lleva la serina del sitio activo (Ser70 en la clase A y Ser 64 en la clase C) está en la primera vuelta de una alfa hélice larga. Es una tétrada de aminoácidos cuya secuencia es Ser-Xaa-Xaa-Lys [Frère

1995, Medeiros 1997], está justo después del primer cruce de la cadena polipeptídica de todo el dominio  $\alpha$  al  $\alpha/\beta$  [Frère 1995]. La segunda firma es una tríada que se encuentra en un asa corta entre las  $\alpha$ -hélices 4 y 5. El primer residuo es una Ser en la clase A y Tyr en las clases C y D y la SR61 DD-peptidasa [Frère 1995] (Ser130 en la clase A y Tyr 150 en la clase C), que estabiliza la cavidad del sitio activo por puentes de hidrógeno con la Lys 234 situada en la hebra beta que forma el lado opuesto de la cavidad [Juteau y cols. 1992]. El segundo residuo es diferente en las tres clases, el tercero es Ser en la clase A y Asn en todas las demás. La cadena lateral del primer y tercer residuo apuntan hacia el sitio activo, formando una pared de la cavidad, mientras que el segundo está en el centro de la proteína. La tercera firma se encuentra en la lámina más interna en la hebra 3 [Frère 1995, Medeiros 1997] -entre la Ser del sitio activo y el extremo carboxi terminal [Joris y cols. 1988]- forma la parte opuesta de la pared del sitio activo Lys(His)Thr(Ser)-Gly en todas las beta lactamasas e His-Thr-Gly en la SR61 DD-peptidasa (Lys234 en la clase A y Lys315 en la clase C) [Frère 1995, Medeiros 1997]. Esto se puede observar en los alineamientos de las secuencias de todas las beta lactamasas A,C y D y en las PBP's [Frère 1995]. La  $\alpha$  hélice 2 posiciona la serina del sitio activo en la depresión más profunda de la cavidad. Los grupos OH y amino de la Ser70 y el grupo amino de la Ala237 forman el agujero del oxianión, de forma similar a la estructura de las serín proteasas, dentro del cual debe encajar el beta lactámico, Fig. 18 [Medeiros 1997].

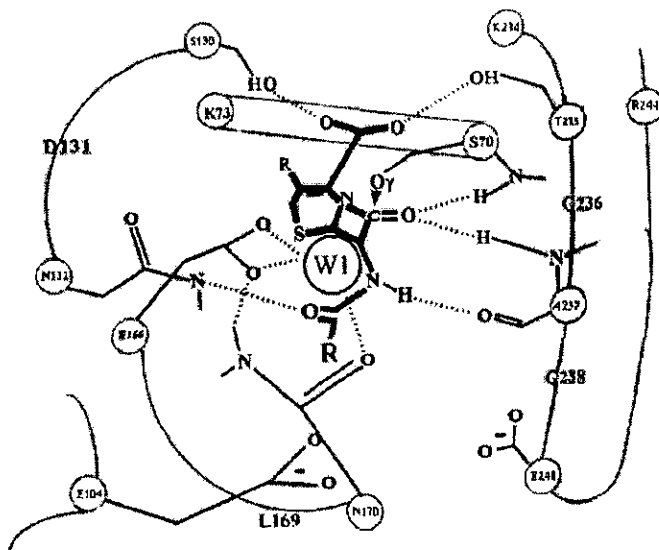
Tabla II. Firmas funcionales del sitio activo de las serín beta lactamasas  
[Frère 1995].

Clase	Firma 1	Firma 2	Firma 3
A	70 S*-X-X-K	130 S-D-N S-D-S	234 K-T-G K-S-G R-S-G R-T-G
C	64 S*-X-X-K	150 Y-A-N	314 K-T-G
D	70 S*-X-X-K	144 Y-G-N	214 K-T-G





A



B

- A. Esquematzación de la red de puentes de hidrógeno y los residuos de aminoácidos de las firmas del sitio de unión de una beta lactamasa de la clase A. Los residuos E166 y N170 del asa omega posicionan una molécula de agua cerca de la S70.
- B. Interacciones de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de una molécula de cefalosporina y las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos del sitio activo. Los grupos amino de la S70 y A237 sostienen el carbonilo del anillo beta lactámico en el agujero del oxianión.

Fig. 18. Sitio activo de una beta lactamasa de la clase A (Medeiros 1997).

En todas las beta lactamasas de la clase A se encuentra un cuarto dominio situado en una asa denominada "asa omega". En el arreglo denso de enlaces de hidrógeno en el sitio activo, Dos de sus residuos, el Glu166 y la Asn170, son esenciales para posicionar la molécula de agua cerca de la serina del sitio activo [Lamotte-Brasseur y cols. 1991]. La asa omega (que tiene de 20 a 40 residuos) se encuentra en el fondo del sitio de unión, ayuda a distinguir la clase A de la clase C y de las DD-peptidasas. El asa omega está compuesta de los residuos 160-181 en las beta lactamasas de la clase A, de los residuos 187-225 en las de la clase C y los residuos 197-242 en las DD-peptidasas. Una torsión del asa omega en las beta lactamasas clase C y las DD-peptidasas invierte la dirección del asa con respecto a las beta lactamasas de la clase A [Konx 1996]. La consecuencia funcional de esta diferencia en la dirección, es la introducción de una base catalítica, el Glu166, en las beta lactamasas de la clase A [Lobkovsky y cols. 1993].

### **1.3.3. Mecanismo de acción de las beta lactamasas.**

Las beta lactamasas son proteínas globulares monoméricas, pequeñas, solubles [Pluckthun y cols. 1987]. Muchas enzimas de la clase A de organismos Gram-negativos son "penicilinasas" [Jelsch y cols. 1993] y de la clase C son "cefalosporinasas" [Jaurin y cols. 1981], mientras que las de la clase D son "oxacilinasas" [Huovinen y cols. 1988] y las metalo beta lactamasas de la clase B se consideran de "amplio espectro" [Frère 1995].

La mayoría de las beta lactamasas estudiadas se expresan constitutivamente [Forsman 1989]. En algunas enterobacterias Gram-negativas, como *Citrobacter freundii* y *Serratia marcescens*, la expresión de la beta lactamasa cromosomal es inducida por compuestos beta lactámicos [Sykes y cols. 1976].

Muchas enzimas de la clase A y algunas de la clase C, están codificadas por genes en elementos transmisibles (plásmidos, transposones) [Medeiros 1997]. Las beta lactamasas son enzimas que comúnmente son secretadas al periplasma [Du Bois y cols. 1995] en bacterias Gram-negativas y al medio extracelular en Gram-positivas [Ghuysen 1991]. Catalizan la hidrólisis del enlace amida del anillo beta lactámico de antimicrobianos como penicilinas y cefalosporinas, transformándolos en compuestos inactivos [Jelsch y cols. 1992] que son derivados acídicos que no tienen propiedades antibacterianas [Medeiros 1984]. El corte del enlace amida en el anillo beta lactámico se debe al ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la Ser70 al carbonilo del anillo beta lactámico (Fig. 19). Esto produce un intermediario acil-enzima [Strynadka y cols. 1992], cargado negativamente que es estabilizado por la interacción del oxígeno carbonilo del beta lactámico con el agujero del oxianión, en forma análoga a las serín proteasas [Herzberg y cols. 1991a]. Algunas enzimas utilizan zinc para romper el anillo beta lactámico [Livermore 1995]. El mecanismo exacto de acilación es controversial pero se sabe que la Lys73 y la Ser130 juegan un papel importante [Gibson y cols. 1990]. La desacilación del intermediario ocurre por el ataque de una molécula de agua en el grupo carbonilo del átomo de carbono del complejo acil-enzima para liberar el producto y regenerar la enzima libre [Adachi y cols. 1991, Knox y cols. 1981, Strydanka 1992]. La molécula de agua es activada por el ataque del Glu166, que actúa como una base general [Strydanka 1992]. Las secuencias de los residuos aminoácidos importantes en la catálisis, se encuentran conservadas en todas las beta lactamasas de la clase A (Fig. 10) [Ambler y cols. 1991].

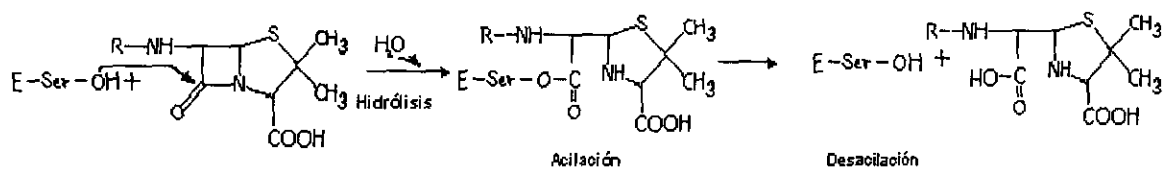


Fig. 19. Hidrólisis del antibiótico beta lactámico.

#### 1.4. Ingeniería de proteínas.

Los experimentos de ingeniería de proteínas, han demostrado la posibilidad de cambiar drásticamente la especificidad y la actividad catalítica de diversas enzimas [Douglas 1992], además nos permiten entender las bases moleculares de la función de las proteínas [Shao y cols. 1996]. La información estructural, la comparación de secuencias homólogas de proteínas de especificidad conocida y los datos de mutagénesis sitio dirigida de las proteínas, son útiles para identificar los residuos de aminoácidos que permitirán alterar la especificidad y el diseño racional de nuevas funciones [Shao y cols. 1996].

En los últimos años, la mutagénesis sitio dirigida y otras formas de ingeniería de proteínas se han usado para cambiar la especificidad de algunas enzimas [Osuna y cols. 1994]. Como, la disulfuro oxidoreductasa, proteasas, enzimas que procesan azúcares y nucleasas, así como la especificidad de hormonas y sus receptores [Douglas 1992]. La enzima xilosa isomerasa se modificó con sustituciones de Thr141Ser o Trp139Phe y Val186Ser, para que procesara más rápidamente la D-glucosa que la D-xilosa, estas enzimas mutadas procesan tres veces más rápidamente la D-glucosa que la D-xilosa, mientras que la enzima silvestre procesa la D-glucosa a solo 0.06 veces la velocidad a la que procesa la D-Xilosa [Douglas 1992].

En la beta lactamasa la sustitución del residuo muy conservado Glu166, usando la benzil penicilina como sustrato, muestra una disminución en la velocidad de acilación-desacilación, de aproximadamente 2000 veces. La sustitución de

Glu166 por Asn, Gln o Ala, retarda la deacilación, permitiendo la acumulación del intermediario acil-enzima. Por ejemplo, en *Bacillus licheniformis* 749C, la sustitución de Glu166 por Ala ocasiona un decremento de  $10^6$  en la actividad catalítica de la enzima usando penicilina y cefalosporinas como sustratos. La mutación tiene un pequeño efecto en la velocidad de acilación, y la desacilación se detiene [Douglas 1992].

Actualmente, los efectos funcionales de una mutación sencilla no pueden ser predecidos con seguridad, aún cuando se conoce la estructura cristalográfica de la proteína blanco [Douglas 1992], ya que muchas funciones de las proteínas no se encuentran limitadas a un pequeño número de residuos de aminoácidos, y pueden verse afectadas por residuos fuera del sitio activo [Shao y cols. 1996].

Desafortunadamente, no se cuenta con mucha información sobre los experimentos que no han resultado satisfactorios en ingeniería de proteínas, los cuales podrían ser de gran utilidad [Shao y cols. 1996].

El residuo de Asp179 se encuentra enterrado en la estructura de la beta lactamasa [Jelsch y cols. 1993], tiene un papel estructural, forma un puente salino con Arg164 cerrando el asa omega [Knox y cols. 1995]. El puente salino R164-D179 se encuentra muy conservado en las beta lactamasas de la clase A [Jelsch y cols. 1993]. Se ha reportado una mutante de *S. aureus* (T711 :D179N) afectada en el plegamiento [Craig y cols. 1985], la estructura cristalográfica de esta mutante comparada con la silvestre muestra que se rompe el puente salino y se distorsiona el asa omega [Herzberg y cols. 1991b]. El reemplazo del residuo D179 por cualquiera de los 19 aminoácidos restantes incrementa los niveles de resistencia a ceftazidima y reduce los de ampicilina, con ligeros incrementos a cefepime y aztreonam [Vakulenko y cols. 1995].

La Arg164 es un residuo 100% conservado en las beta lactamasas de la clase A [Ambler y cols. 1991], se encuentra situado en la vecindad del sitio activo en el

asa omega, formando dos puentes salinos con el Glu171 y el Asp179 [Jelsch y cols. 1993, Palzkill y cols. 1994]. No interactúa directamente con el sustrato, sin embargo se ha encontrado en aislados clínicos (Tabla I) que en este sitio mapean sustituciones de Arg164 por Ser [Webber y cols. 1990] o His [Arlet y cols. 1995] que solas o en combinación con otros residuos como Glu104 [Naumovski y cols. 1992], Glu240 [Bradford y cols. 1996] y Ser244 [Imitiaz y cols. 1994, Blazquez y cols. 1995] entre otros, le confieren resistencia a ceftazidima.

Existen en la naturaleza beta lactamasas mutantes resistentes a cefalosporinas de tercera generación, con sustituciones en las posiciones 237 y 238 [Collatz y cols. 1990]. Los cambios de Ala237Thr en las beta lactamasas tipo TEM y de Gly238Ser en la beta lactamasa tipo SHV muestran que estas mutaciones favorecen la hidrólisis de cefalosporinas de tercera generación, que no realiza la enzima TEM o SHV [Lee y cols. 1991].

El residuo Gly238 se localiza en una lámina beta plegada que forma una de las paredes de la cavidad catalítica [Raquet y cols. 1994] del sitio activo. La sustitución de Gly238Ser confiere resistencia a cefotaxima [Lee y cols. 1991, Venkatachalam y cols. 1994], pero no a ceftazidima.

El aminoácido Gly238 se había sustituido previamente por Ser [Viadiu 1994], se ha observado en aislamientos clínicos que le permite a la enzima hidrolizar cefotaxima a niveles bajos de 0.12µg/ml, un CMI por arriba del de la enzima silvestre.

La sustitución de Glu240 por Lys incrementa el CMI a ceftazidima [Blázquez 1995, Cantu y cols. 1996]. La doble mutación Gly238Ser y Glu240Lys se ha descrito solo en enzimas tipo SHV pero no en tipo TEM, exhibe altos niveles de resistencia a cefotaxima y ceftazidima [Mugnier y cols. 1996].

## 2. JUSTIFICACIÓN

En este trabajo se realizó una mutagénesis combinatoria de dos residuos, Arg164X y Gly238Ser de la beta lactamasa TEM-1. En forma individual los cambios confiere resistencia a ceftazidima y cefotaxima respectivamente. Con la finalidad de ver si las dobles mutaciones confieren resistencia a ambos sustratos o si se obtiene un efecto sinérgico hacia uno u otro antibiótico o a ambos, además de conocer un poco más sobre la estructura y función de la proteína se realizó el trabajo. Es importante mencionar que estos dos tipos de antibióticos son usados frecuentemente en la clínica para el tratamiento de diversas enfermedades de origen bacteriano.

La mutagénesis sitio dirigida por medio de PCR nos permite modificar en el gen el o los codones que queremos cambiar, también introducir variabilidad. Y amplificamos en forma cíclica un fragmento de DNA utilizando oligonucleótidos sintéticos que están hacia los lados de esa región. Los oligonucleótidos pueden tener mutaciones, que son introducidas al fragmento de DNA durante la amplificación, además nos permite introducir sitios de restricción que posteriormente nos permitirán clonar el fragmento de DNA amplificado. El oligonucleótido mutagénico que se utilizó en este trabajo tiene un codón degenerado al cual se le introdujeron una mezcla del codón silvestre y de 32 codones que codifican para los 20 aminoácidos incluyendo invariablemente un codón de terminación.

Esta metodología nos permite modificar los genes sustituyendo una posición determinada con los 20 posibles aminoácidos y producir proteínas distintas que pueden tener nuevas especificidades. También nos permite conocer un poco más sobre la relación estructura-función de una proteína al contar con la estructura cristalográfica de la misma.

### 3. HIPOTESIS

La introducción de mutaciones en residuos que constituyen el sitio activo de la beta lactamasa TEM-1 de *Escherichia coli*, permitirá a la enzima hidrolizar cefalosporinas de tercera generación.

### 4. OBJETIVOS

#### Objetivo General

- Producir mutantes de la beta lactamasa TEM-1 que confieran resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, por alteración combinatoria de los residuos Arg164 y G238.

#### Objetivos Específicos:

- Realizar mutagénesis a saturación del residuo 164 en combinación con la sustitución G238S.
- Caracterizar las mutantes resistentes. Analizar el papel de Arg164 en combinación con Gly238 en la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro.

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1. Reactivos y materiales

Las enzimas de restricción, T4 DNA ligasa, los kits de secuenciación versión 2, y Thermosecuenciación, fueron obtenidos de Amersham, U.K. El kit para PCR Gene Amp con amplitaq DNA polimerasa de Perkin Elmer. El kit de Gene-Clean de BIO101. Los oligonucleótidos para la mutagénesis y la secuencia se obtuvieron de la unidad de síntesis y secuenciación de macromoléculas del Instituto de



### **3. HIPOTESIS**

La introducción de mutaciones en residuos que constituyen el sitio activo de la beta lactamasa TEM-1 de *Escherichia coli*, permitirá a la enzima hidrolizar cefalosporinas de tercera generación.

### **4. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

- Producir mutantes de la beta lactamasa TEM-1 que confieran resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, por alteración combinatoria de los residuos Arg164 y G238.

#### **Objetivos Específicos:**

- Realizar mutagénesis a saturación del residuo 164 en combinación con la sustitución G238S.
- Caracterizar las mutantes resistentes. Analizar el papel de Arg164 en combinación con Gly238 en la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro.

### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1. Reactivos y materiales**

Las enzimas de restricción, T4 DNA ligasa, los kits de secuencia versión 2, y Thermosecuencia, fueron obtenidos de Amersham, U.K. El kit para PCR Gene Amp con amplitaq DNA polimerasa de Perkin Elmer. El kit de Gene-Clean de BIO101. Los oligonucleótidos para la mutagénesis y la secuencia se obtuvieron de la unidad de síntesis y secuenciación de macromoléculas del Instituto de

### 3. HIPOTESIS

La introducción de mutaciones en residuos que constituyen el sitio activo de la beta lactamasa TEM-1 de *Escherichia coli*, permitirá a la enzima hidrolizar cefalosporinas de tercera generación.

### 4. OBJETIVOS

#### Objetivo General

- Producir mutantes de la beta lactamasa TEM-1 que confieran resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, por alteración combinatoria de los residuos Arg164 y G238.

#### Objetivos Específicos:

- Realizar mutagénesis a saturación del residuo 164 en combinación con la sustitución G238S.
- Caracterizar las mutantes resistentes. Analizar el papel de Arg164 en combinación con Gly238 en la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro.

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1. Reactivos y materiales

Las enzimas de restricción, T4 DNA ligasa, los kits de secuencia versión 2, y Thermosecuencia, fueron obtenidos de Amersham, U.K. El kit para PCR Gene Amp con amplitaq DNA polimerasa de Perkin Elmer. El kit de Gene-Clean de BIO101. Los oligonucleótidos para la mutagénesis y la secuencia se obtuvieron de la unidad de síntesis y secuenciación de macromoléculas del Instituto de

Biotecnología de la UNAM. Los minigeles phastgel para isoelectroenfoque con rango de pH de 5-8 de Pharmacia.

La nitrocefina de Oxoid. La ampicilina, kanamicina y aztreonam de Bristol Myers Squibb de México, S.A. de C.V. El ácido clavulánico de Smith Kline and Beecham Pharmaceuticals. La ceftazidima de Glaxo de México. Cefotaxima y Cefpirome de Roussel UCLAF. Los antibióticos fueron donados por las compañías antes mencionadas (Fig. 9).

## **5.2. Cepa y plásmidos.**

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* JM101 [Yanish-Perron y cols. 1985]. Recibimos la donación del plásmido pKGS Bla, éste proviene de un vector suicida (pKGS) que tiene clonado el gen que codifica para la enzima EcoRI [Kuhn 1986], al cual le subclonaron en la región que codifica para dicha endonucleasa (en los sitios BglII/HindIII), el gen de la beta lactamasa TEM-1. Se tiene clonada la enzima silvestre y otra construcción con la mutación G238S [Viadiu 1994]. En este trabajo se utilizó sólo el vector que tiene la mutación G238S como gen parental (Fig. 20).

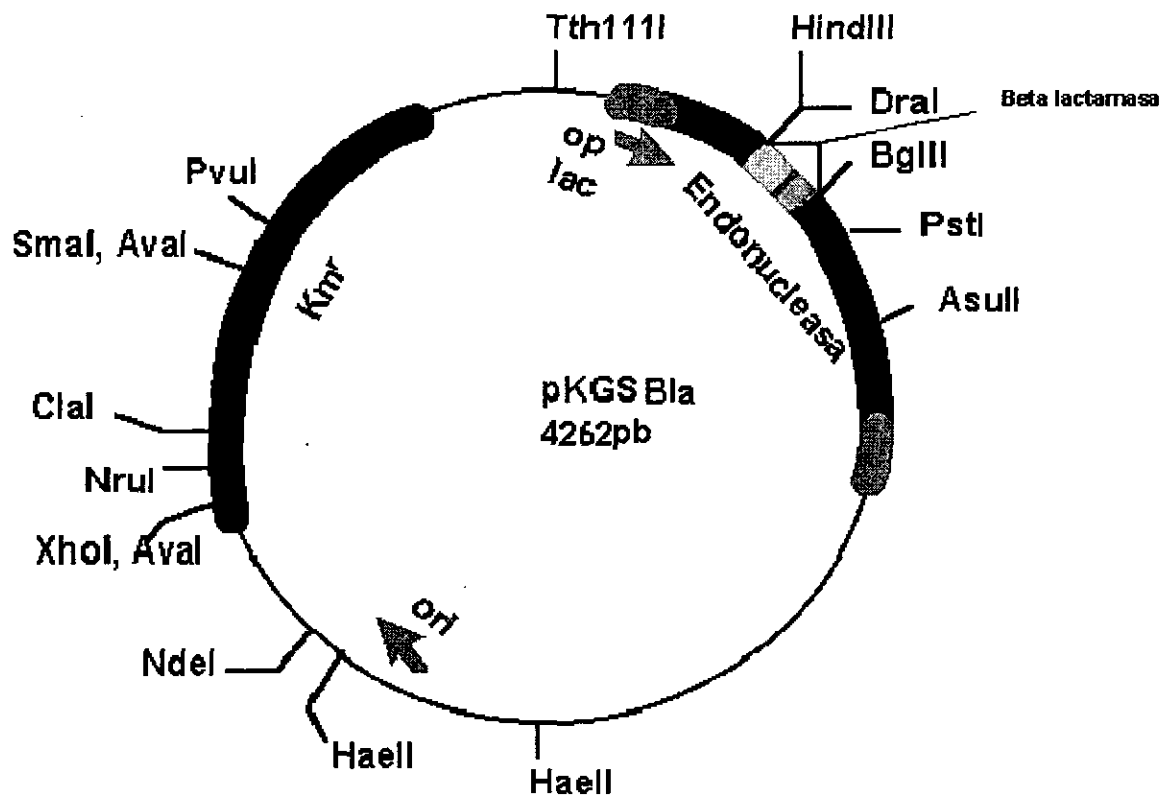


Fig. 20. Vector pKGS Bla con la mutación G238S en el gen de la beta lactamasa [modificado de Khun y cols. 1986].

### 5.3. Oligonucleótidos.

Se sintetizaron cuatro oligonucleótidos para la mutagénesis, la cual se llevo a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos se describen a continuación. Un oligonucleótido denominado Tap New 35 amero que es complementario al extremo 3' del gen de la beta lactamasa tipo TEM-1 del plásmido pBR322, en 15 pares de bases, y tiene en el extremo 5' 20 pares de bases (resaltadas con negrillas) que no son complementarias a TEM-1 e incluye un sitio de restricción de BglIII que no se encuentra en el gen. Otro oligo es complementario al extremo 5' del gen de la beta lactamasa cerca del sitio HindIII. El oligo tapón 20 amero es igual a los 20 pares de bases del oligo Tap New (resaltado en negrillas). Y el oligo

mutagénico R164, que tiene la mutación para el residuo R164 por los 20 posibles aminoácidos (negrillas) (Fig. 21).

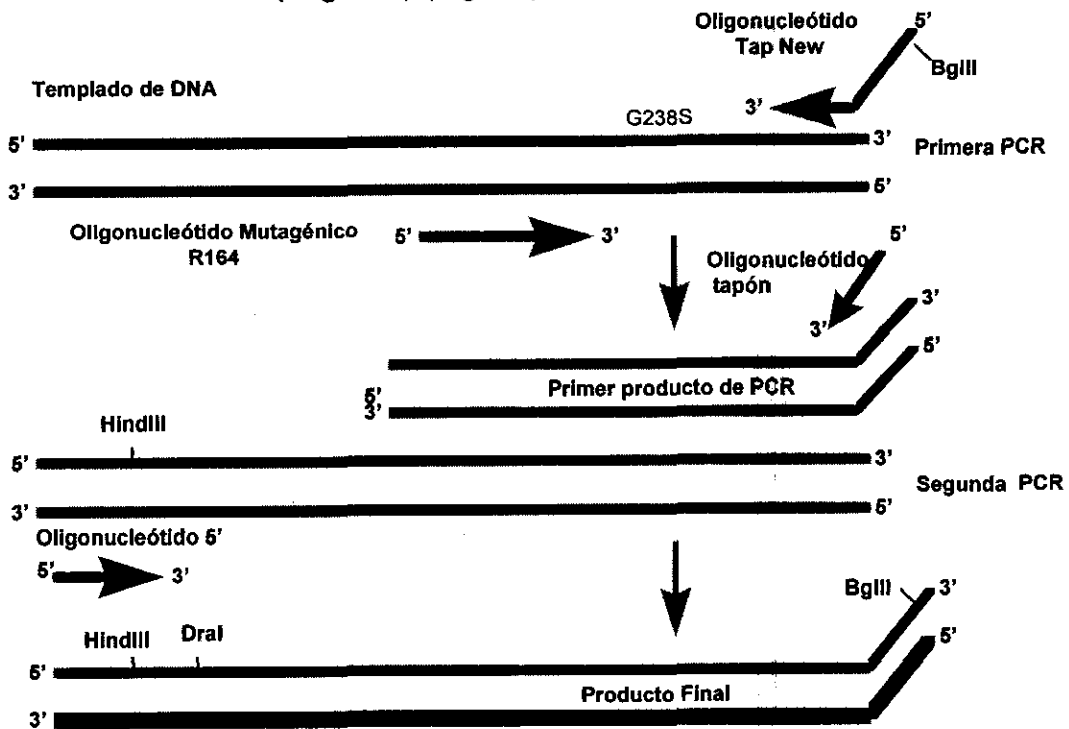


Fig. 21 Mutagénesis combinatoria por PCR.

1) Extremo 3' :

TapNew 35 amero

5' **GGAATAGCCGATCGAGATCTT**GAGTAAACTTGGTC 3'

BglIII

|— No complementaria al gen —| |— Complementaria al gen —|

2) Tapón:

20 amero:

5' **GGAATAGCCGATCGAGATCT** 3'

BglIII

|— No complementaria al gen —|

3) 5' :

26 amero:

5' GCAATTTAACTGTGATAAACTACCGC 3'

4) Oligonucleótido mutagénico R164:

5' CGCCTTGATNNG/CTGGGAACCG 3'

Para la secuencia se utilizaron 7 oligonucleótidos (ver en la sección de secuencia). N = G,A,T,C.

#### **5.4. Mutagénesis.**

Se hicieron dos reacciones de amplificación. En la primera se introdujeron las mutaciones en el codon para el residuo 164. El oligonucleótido lleva una mezcla NNG/C (N equivale a una cantidad igual de cada uno de los cuatro nucleótidos y G/C una cantidad igual de G y C) que representa los 20 posibles aminoácidos en 32 codones (incluyendo un codón de término). En la primera reacción de PCR se utilizaron las siguientes condiciones : 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos, sin enzima para eliminar las DNAsas, después se añade la enzima y son 5 ciclos a 92°C 1'30", 50°C 1'30", 72°C 3'. 20 ciclos : 92°C 1'30", 57°C 1'30", 72°C 3'. En la segunda se extendió todo el gen, con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos sin enzima, después se añade la enzima y se procede con 5 ciclos: 92°C 1'30", 45°C 1'30", 70° 3'. 20 ciclos: 92°C 1'30", 50°C 1'30", 70° 3'. 1 ciclo: 72°C 15' (Fig. 21).

En los experimentos de PCR se tuvieron que ajustar las condiciones, el número de ciclos a 20 y la concentración de  $Mg^{+2}$  (a 3 mM) para obtener el fragmento específico de 1227 pb.

### 5.5. Digestión y ligación.

Los productos de PCR se digirieron con BglII/DraI (Fig. 22), se limpiaron con Gene-Clean, para usarlos en la ligación (Fig. 23). El vector pKGS Bla (Fig. 20) se digirió con BglII/DraI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina, para disminuir la ligación sobre si mismo. Sobre este vector cortado se subclonaron y ligaron los productos de PCR usando la ligasa del fago T4 a 16°C toda la noche (Fig. 23).



Fig. 22 Fragmento de PCR con la doble mutación R164X:G238S.

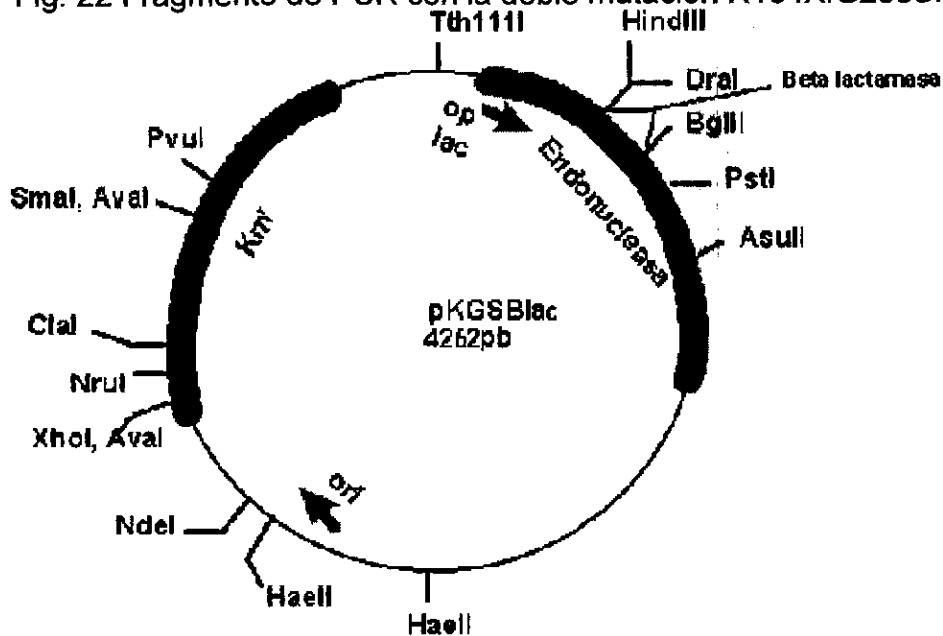


Fig. 23 Vector con las sustituciones R164X:G238S.

### 5.6. Células competentes.

Las células de *E. coli* JM101 se dejaron creciendo en agitación toda la noche en 1 ml de medio Luria a 37°C. Se hizo una dilución de 1:1000 del cultivo anterior en medio fresco. Se tomaron 100 µl de esta dilución dejando crecer en 200 ml de medio Luria, más o menos durante 4 h o hasta tener una densidad óptica de

0.4 leida a 600nm. Se colocaron las células en hielo de 15 a 30 minutos. Se centrifugaron a 2,400g durante 10 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió y centrifugó repetidamente primero en 30 ml de agua desionizada estéril, en 15 ml de agua desionizada estéril, luego en 15 ml de glicerol al 20% y por último en 300µl de glicerol al 20%. Se hicieron alícuotas de 50µl y se congelaron a -70°C o en nitrógeno líquido [Inoue 1990].

### **5.7. Electroporación.**

Las células competentes se dejaron descongelar en hielo. Al tubo con 50µl de células se le añadió de 20ng de DNA de la ligación en un volumen de 1-2µl (Fig. 23), se dejaron incubando en hielo durante 1 minuto. Se colocó esta muestra en una celda para electroporación de 0.2cm, se le dió un pulso de 12.5 kV/cm con un tiempo constante de 3.8 seg. En la celda se agregó 1 ml de medio SOC y se resuspendieron las células rápidamente con pipeta Pasteur. Las células se incubaron en un tubo estéril a 37°C con agitación durante 1 hora, para permitir que se recuperaran.

### **5.8. Selección.**

Después de la electroporación y que las células se recuperaron, éstas se platearon con espátula de vidrio sobre cajas con medio sólido Muller Hinton, con kanamicina a 50µg/ml en combinación con cefotaxima a 0.0625-3.5µg/ml o ceftazidima a 0.0625-3.5µg/ml. Se incubaron a 37°C toda la noche. Se seleccionaron aquellas cepas que crecieron en cefotaxima a 0.125 µg/ml (arriba de esta concentración no se obtuvieron células) y en ceftazidima de 1-3.5µg/ml.



### **5.9. Concentración mínima inhibitoria (CMI).**

Se realizó el CMI de las clones seleccionadas. Primero, se prepararon cajas con medio sólido de Muller Hinton con diferentes concentraciones de los antibióticos: cefotaxima, ceftazidima, cefpirome y aztreonam de 0.0312-128 $\mu$ g/ml; ampicilina de 60-31,250 $\mu$ g/ml; incrementando la concentración de antibiótico en logaritmo de base 2. También se prepararon cajas con ácido clavulánico (inhibidor de beta lactamasas) a una concentración de 2 $\mu$ g/ml en combinación con los antibióticos anteriores. Por otro lado, las células para hacer el CMI se crecieron durante toda la noche en 3 ml de medio líquido Muller Hinton y se hicieron diluciones de éstas de 1:10,000. En las cajas con antibiótico se colocaron 5  $\mu$ l de la dilución de células y se dejaron incubando toda la noche a 35°C. Se registró la concentración de antibiótico en la cual se inhibió el crecimiento.

### **5.10. Secuencia.**

Se purificó el DNA plasmídico de las mutantes resistentes a ceftazidima y de algunas que no lo eran, para checar si eran silvestres o mutantes, por la técnica de precipitación por polietilenglicol [Ausubel y cols. 1990]. Se realizó la secuencia de la región del gen de la beta lactamasa que contiene el residuo 164 con el kit de sequenase versión 2, utilizando <sup>35</sup>S-ATP. Se emplearon 4  $\mu$ g de DNA y se siguieron las instrucciones de acuerdo al fabricante. Para leer todo el gen de la beta lactamasa se utilizó el kit de thermosequenase, junto con los terminadores marcados con <sup>33</sup>P, y se usaron 500ng de DNA, en este caso la secuencia se hizo por PCR lineal. Las condiciones del aparato termociclador para las reacciones con thermosequenase fueron las siguientes:

30 ciclos: 95°C 50", 55°C 50", 72° 1'30".

Se utilizaron diferentes oligonucleótidos como iniciadores:

1) Joel:

5' GCTAGAGTAAGTAGTTCG 3'

2) BglI:

5' GCGCTCGGCC 3'

3) Met 104:

5' TGAGTACTCACCAGTCACAG 3'

4) HincII:

5' GCGGCGACCGAGTTGCTCTTG 3'

5) S/c:

5' TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA 3'

6) Pacol:

5' GGCGAGTTACATGATCCCCC 3'

7) Mutagénico R164:

5' CGCCTTGATNNG/CTGGGAACCG 3'

Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% con 8M de urea. Después el gel se adhirió a papel para cromatografía, se secó y se expuso durante 24 hr a película para autorradiografía sensible a la emisión de las partículas beta del  $^{35}\text{S}$  y  $^{33}\text{P}$ . Posteriormente se revelaron y se leyó la secuencia.

### 5.11. Extractos crudos de las beta lactamasas.

Se crecieron bacterias *Escherichia coli* JM101 que contenían el plásmido pKGS con las mutaciones en el gen de la beta lactamasa, en 3 ml de medio Luria durante toda la noche. Se centrifugaron las bacterias a 4°C a 2,400g para obtener las proteínas, el tubo con la pastilla se colocó en hielo y se resuspendió en un buffer de fosfato de sodio 0.1M pH 7.4, se centrifugó con las mismas

condiciones anteriores y la pastilla nuevamente se resuspendió en 200 $\mu$ l del mismo buffer, se mantuvo en hielo. Los extractos se sonicaron 4 veces durante 10 seg y el sobrenadante (guardar a -20°C) se utilizó el mismo día o al siguiente, para hacer los ensayos de isoelectroenfoque.

#### **5.12. Isoelectroenfoque.**

El ensayo se realizó utilizando 10 $\mu$ l del sobrenadante de los extractos crudos. Usando minigeles de 6 pozos, con un rango de pH de 5-8, en el aparato Phast-System. Para revelar la presencia de beta-lactamasa, los geles se colocaron sobre un papel filtro whatman humedecido en un buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4 que contenía nitrocefina (500 $\mu$ g/ml). Un cambio de color de amarillo a rojo indica la presencia de dicha enzima. Se utilizaron las beta lactamasas TEM-3 y TEM-4 como control, de las cuales se conoce su punto isoeléctrico.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Mutagénesis.**

En el caso de cefotaxima se tomaron clonas que crecieron a 0.125 $\mu$ g/ml, CMI igual al de la cepa parental que tiene la mutación previa de G238S. No se encontraron mutantes con concentraciones mínimas inhibitorias superiores a 0.25 $\mu$ g/ml para este antibiótico. En el caso de ceftazidima se escogieron aquellas que crecieron arriba de 1 $\mu$ g/ml, ya que el CMI de la parental y la silvestre fue de 0.250 $\mu$ g/ml (Tabla VI).

condiciones anteriores y la pastilla nuevamente se resuspendió en 200 $\mu$ l del mismo buffer, se mantuvo en hielo. Los extractos se sonicaron 4 veces durante 10 seg y el sobrenadante (guardar a -20°C) se utilizó el mismo día o al siguiente, para hacer los ensayos de isoelectroenfoque.

#### **5.12. Isoelectroenfoque.**

El ensayo se realizó utilizando 10 $\mu$ l del sobrenadante de los extractos crudos. Usando minigeles de 6 pozos, con un rango de pH de 5-8, en el aparato Phast-System. Para revelar la presencia de beta-lactamasa, los geles se colocaron sobre un papel filtro whatman humedecido en un buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4 que contenía nitrocefina (500 $\mu$ g/ml). Un cambio de color de amarillo a rojo indica la presencia de dicha enzima. Se utilizaron las beta lactamasas TEM-3 y TEM-4 como control, de las cuales se conoce su punto isoeléctrico.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Mutagénesis.**

En el caso de cefotaxima se tomaron clonas que crecieron a 0.125 $\mu$ g/ml, CMI igual al de la cepa parental que tiene la mutación previa de G238S. No se encontraron mutantes con concentraciones mínimas inhibitorias superiores a 0.25 $\mu$ g/ml para este antibiótico. En el caso de ceftazidima se escogieron aquellas que crecieron arriba de 1 $\mu$ g/ml, ya que el CMI de la parental y la silvestre fue de 0.250 $\mu$ g/ml (Tabla VI).

TABLA III. Mutantes generadas en Cefotaxima y Ceftazidima

Antibiótico Utilizado	Mutantes Obtenidas	Mutantes Analizadas	Resistencia (µg/ml)
Ceftazidima	40 <sup>a</sup>	37	1 - 3.5
Cefotaxima	15 <sup>b</sup>	6	0.125

<sup>a</sup> de estas no pudimos recuperar 3 mutantes.

<sup>b</sup> analizamos sólo 6, porque pensamos que eran iguales a la parental.

Las mutantes escogidas resistentes a ceftazidima y cefotaxima se transfirieron a cajas con ampicilina, cefotaxima y ceftazidima.

## 6.2. Secuencia.

Al realizar la secuencia de las mutantes obtenidas, se exploró la región del residuo 164 y se determinaron las sustituciones que se muestran en la Tabla IV. Se realizó la secuencia de 37 clonas resistentes a ceftazidima y 6 clonas provenientes de la selección a cefotaxima.

Dos de las clonas obtenidas en la selección con cefotaxima presentan el codón silvestre en la posición 164.

Tabla IV. Clonas estudiadas con sustituciones en la posición 164

Nº de clonas	Aminoácido (R164)						
	Ser	His	Gly	Asn	Glu	Silenciosa	Silvestre
	17	3	3	3	2	11	4

Con el propósito de determinar los patrones de susceptibilidad de las clonas con las mutaciones a Gly, Ser, His, Asn o Glu en la posición 164 y las que presentaron el codón silvestre, se les realizaron los CMIs que incluyeron antibióticos como aztreonam (monobactámico), cefpirome (cefalosporina de cuarta generación), ceftazidima, cefotaxima (cefalosporinas de tercera generación) y ampicilina. Se decidió secuenciar todo el gen de algunas de estas mutantes que presentaban variación en los valores de resistencia, con respecto a la parental (Tabla VI), con el objeto de determinar mutaciones adicionales fuera de la región elegida inicialmente, que pudieran estar involucradas en tal variación (Fig. 24). Los resultados de los aminoácidos que cambiaron se presentan en la Tabla V.

Al secuenciar todo el gen de la cepa parental se encontró una mutación adicional en la región del péptido líder de A15Q. Se encontraron también algunas mutantes que presentaron cambios adicionales como V119E, R120G, I173V, A184V o E240K, que no fueron planeados al diseñar la mutagénesis (Fig. 24).

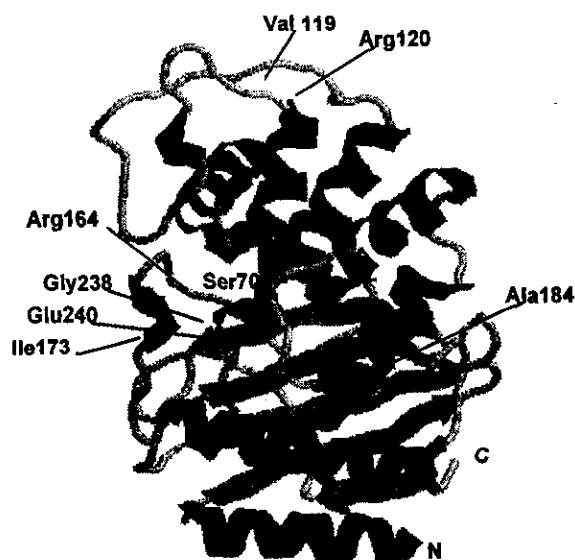


Fig. 24. Beta lactamasa TEM-1 de *Escherichia coli* (Jelsch y cols. 1993).

Para ampicilina se determinó que la clona 4, es la más susceptible, con las mutaciones A15Q, R164G, G238S, E240K. Para ceftazidima todas aquellas que presentan sustituciones en el residuo 164 son resistentes. Para cefotaxima sólo la mutante 41 con las sustituciones A15Q, G238S, E240K presentó un valor más alto que las demás mutantes incluso que la parental. La mutante 14 con las mutaciones A15Q, R164H, I173V y la mutante 26 con las substituciones A15Q, R164N, presentaron mayor resistencia a ceftirome. La mutante 41 con los reemplazos A15Q, A238S, E240K, presentó el valor más alto de resistencia a aztreonam.

Las mutantes que se analizaron (Tabla VI) muestran sensibilidad a la combinación de los antibióticos beta lactámicos con el inhibidor ácido clavulánico, los valores obtenidos son iguales a la parental.

Tabla V. Aminoácidos sustituidos en el gen de la beta lactamasa tipo TEM.

CLONA	POSICIÓN DEL AMINOÁCIDO									
	15	16	119	120	160	164	173	184	238	240
Silvestre	Ala	Ala	Val	Arg	Thr	Arg	Ile	Ala	Gly	Glu
	GCA	GCG	GTA	AGA	ACT	CGT	ATA	GCA	GGT	GAG
Parental	Gln								Ser	
	<b>CAA</b>								<b>AGC</b>	
4	Gln					Gly			Ser	Lys
	<b>CAA</b>					<b>GGG</b>			<b>AGC</b>	<b>AAG</b>
14	Gln					His	Val			
	<b>CAA</b>					<b>CAC</b>	<b>GTA</b>			
24	Gln					Glu		Val	Ser	Lys
	<b>CAA</b>					<b>GAG</b>		<b>GTA</b>	<b>AGC</b>	<b>AAG</b>
26	Gln					Asn				
	<b>CAA</b>					<b>AAC</b>				
36	Gln					Ser			Ser	Lys
	<b>CAA</b>					<b>TCG</b>			<b>AGC</b>	<b>AAG</b>
41	Gln								Ser	Lys
	<b>CAA</b>								<b>AGC</b>	<b>AAG</b>
49	Gln		Glu	Gly					Ser	Lys
	<b>CAA</b>		<b>GAG</b>	<b>GGA</b>					<b>AGC</b>	<b>AAG</b>



### **6.3. Concentración mínima inhibitoria.**

Después de hacer la secuencia de la región que contiene al residuo R164, de todas las mutantes mencionadas anteriormente, se escogieron aquellas que presentaban mutaciones en esa posición, encontrando Ser, His, Lys, Asn y Glu, entre las que se seleccionaron en ceftazidima. De las que se obtuvieron en la selección con cefotaxima se escogieron dos que tenían Arg164, una sensible a ceftazidima y la otra resistente. Se probaron varios antibióticos beta lactámicos incluyendo el inhibidor clavulánico, los datos se presentan en la Tabla VI.

Tabla VI. Susceptibilidad a antibióticos beta lactámicos de *E. coli* JM101, con las variantes de beta lactamasa obtenidas.

CEPA/ CLONA	Ab <sup>h</sup>	RESIDUO DE AMINOÁCIDO				pI	CMI (µg/ml) <sup>a</sup>						
		164	238	240			AMP	CAZ	CAZ/ CLA	CFX	CFX/ CLA	CEF	AZT
JM101		NP	NP	NP	NP		<60	0.125	0.06	0.06	<0.03	<0.03	0.06
TEM-1		Arg	Gly	Glu	5.4		7810	0.25	0.12	0.06	<0.03	0.06	0.06
Parental <sup>b</sup>		Arg	Ser	Glu	5.4		7810	0.25	0.12	0.12	0.06	0.12	0.06
4 <sup>c</sup>	Caz	Gly	Ser	Lys	5.6		1950	4	0.12	0.12	0.06	0.06	0.25
14 <sup>d</sup>	Caz	His	Gly	Glu	5.4		7810	8	0.12	0.12	0.06	0.5	0.25
24 <sup>e</sup>	Caz	Glu	Ser	Lys	5.6		3900	8	0.12	0.12	0.06	0.25	0.5
26 <sup>f</sup>	Caz	Asn	Gly	Glu	5.4		7810	8	0.12	0.12	0.06	0.5	0.5
36 <sup>c</sup>	Caz	Ser	Ser	Lys	5.6		7810	8	0.12	0.12	0.06	0.25	0.5
41 <sup>c</sup>	Cfx	Arg	Ser	Lys	5.6		3900	4	0.12	0.25	0.06	0.06	1
49 <sup>g</sup>	Cfx	Arg	Ser	Lys	5.9		3900	0.25	0.12	0.12	0.06	0.25	0.25

<sup>a</sup> AMP, ampicilina; CAZ, ceftazidima; CFX, cefotaxima; CEF, cefpirome; AZT, aztreonam; CLA, ácido clavulánico.

<sup>b</sup> Mutación adicional A15Q.

<sup>c</sup> Mutación adicional A15Q.

<sup>d</sup> Mutaciones adicionales A15Q, I173V.

<sup>e</sup> Mutaciones adicionales A15Q, A184V.

<sup>f</sup> Mutación adicional A15Q.

<sup>g</sup> Mutaciones adicionales A15Q, V119E, R120G.

<sup>h</sup> Antibiótico de selección.

NP No presenta.

pI punto isoeléctrico.

NOTA: Los intervalos de concentración para obtener el CMI para CAZ, CFX, AZT y CEF fueron de 0.0312 a 128µg/ml. Para AMP fue de 60 a 31,250µg/ml. Ácido clavulánico se usó consistentemente a 2µg/ml.

#### 6.4. Isoelectroenfoque.

En base a la diferencia en los niveles de resistencia de las mutantes seleccionadas (Tabla VI), se determinó el punto isoeléctrico de los extractos crudos de algunas mutantes (Tabla VI), ya que la variación en el punto

isoelectrico nos dice que hay un cambio de cargas en la proteína por cambios en aminoácidos, nosotros desconocíamos si existían mutaciones adicionales. Las mutaciones pueden originar cambios en el punto isoelectrico de una proteína, se determinó que la mutante con el pI más alto fue la 41, las mutantes 4, 24 y 36 tuvieron valores muy cercanos a la silvestre, mientras que las demás mantuvieron el mismo punto isoelectrico que la parental y la TEM-1.

## 7. DISCUSIÓN

Cuando una enzima sigue hidrolizando al sustrato original y además otros nuevos, se dice que amplía su espectro de hidrólisis. El objetivo principal de este trabajo fue generar mutantes de la enzima beta lactamasa TEM-1 resistentes a cefalosporinas de amplio espectro, como ceftazidima y cefotaxima, para conocer los posibles aminoácidos que participan en la ampliación del espectro de hidrólisis. Para lograr esto se realizó una mutagénesis sitio dirigida a saturación para reemplazar el residuo R164 y poder obtener un banco de mutantes con todas las posibles sustituciones de aminoácidos en la posición 164, en combinación con una mutación previa G238S.

Al inicio del presente estudio no se contaba con la estructura cristalográfica de la enzima TEM-1 de *Escherichia coli*, así es que el residuo 164 se escogió para la mutagénesis en base a que cambios en esta posición que se encuentran en la naturaleza dan resistencia a ceftazidima. También a su posición en el asa omega en la estructura cristalográfica de *Staphylococcus aureus* que se encontraba disponible en ese momento. El residuo 238 también se encuentra sustituido en algunas enzimas tipo TEM y SHV resistentes a cefalosporinas de amplio espectro. Ambos residuos se encuentran en la vecindad del sitio activo, lo que se confirma con la estructura tridimensional de TEM-1, donde Arg164 se

isoelectrico nos dice que hay un cambio de cargas en la proteína por cambios en aminoácidos, nosotros desconocíamos si existían mutaciones adicionales. Las mutaciones pueden originar cambios en el punto isoelectrico de una proteína, se determinó que la mutante con el pI más alto fue la 41, las mutantes 4, 24 y 36 tuvieron valores muy cercanos a la silvestre, mientras que las demás mantuvieron el mismo punto isoelectrico que la parental y la TEM-1.

## 7. DISCUSIÓN

Cuando una enzima sigue hidrolizando al sustrato original y además otros nuevos, se dice que amplía su espectro de hidrólisis. El objetivo principal de este trabajo fue generar mutantes de la enzima beta lactamasa TEM-1 resistentes a cefalosporinas de amplio espectro, como ceftazidima y cefotaxima, para conocer los posibles aminoácidos que participan en la ampliación del espectro de hidrólisis. Para lograr esto se realizó una mutagénesis sitio dirigida a saturación para reemplazar el residuo R164 y poder obtener un banco de mutantes con todas las posibles sustituciones de aminoácidos en la posición 164, en combinación con una mutación previa G238S.

Al inicio del presente estudio no se contaba con la estructura cristalográfica de la enzima TEM-1 de *Escherichia coli*, así es que el residuo 164 se escogió para la mutagénesis en base a que cambios en esta posición que se encuentran en la naturaleza dan resistencia a ceftazidima. También a su posición en el asa omega en la estructura cristalográfica de *Staphylococcus aureus* que se encontraba disponible en ese momento. El residuo 238 también se encuentra sustituido en algunas enzimas tipo TEM y SHV resistentes a cefalosporinas de amplio espectro. Ambos residuos se encuentran en la vecindad del sitio activo, lo que se confirma con la estructura tridimensional de TEM-1, donde Arg164 se

encuentra en el asa omega y Gly238 se encuentra en la hebra beta. La diferencia entre *S. aureus* con *E. coli* es que en la primera existe una inserción (Ile239). Por último estos residuos se encuentran muy conservados en las beta lactamasas de la clase A.

El método de selección empleado permite excluir a la enzima silvestre, que no hidroliza cefalosporinas de tercera generación. Cuando se usó cefotaxima como medio de selección sólo se escogieron aquellas mutantes que crecieron en 0.125µg/ml, pensando que no tendrían la mutación del residuo R164, y que serían iguales a la enzima parental (G238S). Al usar ceftazidima se seleccionaron aquellas que crecieron arriba de 1µg/ml, asumiendo que tendrían la mutación en el residuo R164.

Huang y colaboradores [1996], mutagenizaron los residuos contiguos 161-164 y no obtuvieron mutantes con sustituciones en la posición 164, aunque en las demás sí, utilizando solamente ampicilina a 1mg/ml como antibiótico de selección en lugar de ceftazidima o cefotaxima. Esto podría deberse a que cualquier sustitución en el residuo 164 conduciría a una enzima inactiva o también por la forma de selección. En un reporte anterior a éste, Palzkill y colaboradores [1994] realizaron una mutagénesis de cuatro residuos contiguos 161-164, al seleccionar en ampicilina a 1 mg/ml no obtuvieron reemplazos en la posición 164, pero cuando la selección la realizaron en 0.5 µg/ml de ceftazidima encontraron sustituciones de Arg164 por Ser, Gly, Asn, Cys y una deleción, los valores del CMI para ceftazidima fueron de 0.5 a 4 µg/ml (este último valor lo presentó una sola mutante) y para ampicilina de 2-64 µg/ml. No fueron detectadas las mutaciones no diseñadas en esa región, pero cuando mutagenizaron los residuos 165-167 y 168-170 y seleccionaron en ceftazidima, encontraron las deleciones. Ellos atribuyen que estas deleciones fueron artificio

del procedimiento de mutagénesis [Palzkill y cols. 1994]. Con estos resultados esperaríamos tener poca variación en el residuo 164.

Sin embargo, nosotros encontramos que de los 19 posibles reemplazos, se obtuvieron Gly, His, Glu, Asn, Ser, en sustitución de Arg164, en las mutantes seleccionadas en ceftazidima. Existe la posibilidad de que el tamaño de la muestra, 43 clonas, no haya sido suficientemente representativo o tal vez un buen porcentaje de reemplazos no permiten una beta lactamasa funcional, resistente a los beta lactámicos utilizados. La diferencia en los valores de los CMI's entre sus mutantes y las nuestras puede deberse a que existen otros residuos además del 164 mutados, tanto en nuestras mutantes como en las de ellos (no mencionan si secuenciaron todo el gen), a la cepa utilizada, al plásmido o a los antibióticos utilizados, ya que en nuestras mutantes los valores de resistencia a ceftazidima con las sustituciones en la posición 164 son de 4-8µg/ml a ceftazidima, pero a ampicilina son mayores que los de ellos.

Las mutantes 4, 23, 36, presentaron una mutación adicional no diseñada E240K y la mutante 24 además de esta sustitución ganó el cambio de A184V. Algunas mutantes como la 14 y 26 perdieron el cambio G238S, la 14 ganó además la sustitución I173V.

Las mutantes 41 y 49 no presentaron la mutación en el codón 164, pero si tienen los reemplazos G238S:E240K, además la mutante 49 ganó los reemplazos V119E y R120G.

El hecho de que varias mutantes en la posición 164 también mutaron en otros sitios, pudiera sugerir que se requieren mutaciones compensatorias, por ejemplo E240K, o la reversión S238G, para obtener enzimas funcionales capaces de hidrolizar ceftazidima y compuestos relacionados.

La mutante 36 que presenta la mutación en el residuo 164 por Ser, tiene niveles de resistencia a ampicilina y cefotaxima iguales a la parental, el CMI para

ceftazidima es 32 veces mayor que la parental, el valor para cefpirome es dos veces mayor, y los valores para aztreonam son elevados (8 veces más que la parental) lo cual es consistente con el hecho de que este antibiótico presenta una mayor afinidad por aquellas enzimas que tienen las sustituciones de R164S:E240K [Sowek y cols. 1991].

La mutante 4 que presenta la mutación R164G es la que tiene los valores más bajos para ampicilina 1,950 $\mu$ g/ml y de 4 $\mu$ g/ml para ceftazidima, comparando con las mutantes de Patzkill y colaboradores [1994] R164G los valores para ampicilina van de 2 a 32 $\mu$ g/ml y ceftazidima de 0.5 a 4 $\mu$ g/ml lo cual puede estar dado por la presencia de un residuo tan pequeño como la Gly.

La mutante 41 es resistente a aztreonam y ceftazidima por la doble mutación G238S:E240K, ya que no presenta sustitución en Arg164, y puede ser originada por la forma de selección ya que esta mutante fué seleccionada en cefotaxima.

La diferencia encontrada en los valores entre las mutantes 41 y 49 puede deberse a las mutaciones adicionales V119E :R120G presentes en esta última.

Al secuenciar todo el gen se detectó la presencia de una mutación adicional a la sustitución G238S en el gen de la cepa parental, un reemplazo en la región del péptido líder en la posición A15Q. Todas las mutantes que fueron secuenciadas en su totalidad presentaron esta mutación, debido a que se encuentra en el péptido líder que es algo que se procesa, seguramente no afecta el patrón de hidrólisis.

Los valores de punto isoeléctrico que presentan variación con respecto a TEM-1, corresponden a aquellas mutantes que presentan la doble mutación G238S:E240K, mientras que aquellas que no muestran esta doble mutación presentan los mismos valores que la beta lactamasa silvestre y la parental.

Los reemplazos de R164 pueden alterar la conformación o la orientación del asa omega, por la ruptura de los puentes salinos que forma con el E171 y D179,

afectando de alguna manera el perfil de sustratos hidrolizables por la enzima. Existe una preferencia por el cambio de R164S en el banco estudiado (39%), esto puede correlacionar con el análisis conformacional que realizaron Raquet y colaboradores [1994], de las cadenas laterales modificadas, en donde encontraron que es posible que se establezcan nuevos enlaces de hidrógeno entre el Asp179 y el O<sup>γ</sup> de la Ser164.

Se ha propuesto que el reemplazo de Lys por Glu en la posición 240 interactúa con el grupo carboxilo de la cadena lateral de ceftazidima [Huletsky y cols. 1993]. En la mutante 49, no hay hidrólisis de ceftazidima, posiblemente debido a la presencia de la doble mutación adicional V119E :R120G.

Las mutantes 4 y 41 que presentan la doble mutación G238S:E240K tienen valores de resistencia a ceftazidima 16 veces más que la parental. Consistente con lo propuesto por Huletsky y colaboradores [1993] para la mutación E240K en SHV. Las demás mutantes (Tabla III) presentaron valores a ceftazidima de 32 veces más que la parental y en este caso si puede deberse al reemplazo de R164 ya que en éstas encontramos mutantes que tienen y algunas que no tienen la doble mutación G238S:E240K.

Las mutantes 14 y 26 que no portan la doble mutación de G238S y E240K presentaron niveles de resistencia a cefpirome 4 veces mayor que la parental, lo cual puede deberse a los reemplazos en el residuo 164 por His y Asn respectivamente.

No encontramos sustituciones como R164K que pudieran restablecer la formación de alguno de los dos puentes salinos que se pierden al cambiar el residuo 164.

En base a la estructura ahora conocida posiblemente se hubieran podido mutagenizar varios residuos en forma combinatoria en el asa omega, buscando ampliar el espectro. Y en base a que sabemos que es importante la forma de



selección para determinado residuo, modificar aquellos residuos que están reportados como no tolerantes a sustituciones y buscar en el banco haciendo la selección con diferentes sustratos.

Las sustituciones en el residuo 164 le permiten a la enzima ampliar su espectro de hidrólisis, ya que ahora es capaz de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro como ceftazidima y aún de cuarta generación como ceftiprome, así como aztreonam un monobactámico. Estas propiedades no son conferidas por la sustitución de G238S por sí sola. La mutación adicional de E240K solo se presenta junto con la sustitución de G238S, no se encuentran de manera independiente en este trabajo, donde las mutaciones fueron dirigidas al residuo R164. Las dos clonas examinadas que no muestran sustitución en la Arg164 presentaron esta doble mutación. Y fueron seleccionadas en cefotaxima. Sin embargo, en un caso hay resistencia a ceftazidima (CMI= 4µg/ml) y en el otro no (CMI=0.25µg/ml).

En la estructura del complejo de la beta lactamasa TEM-1 con ceftazidima (Arg164, Gly238 y Glu240) no hay hidrólisis de ceftazidima, ya que existe una interacción de puentes de hidrógeno muy favorable entre el grupo amida del aminothiazol y el Glu240. Esto empuja la ceftazidima hacia la cavidad, mientras que el oxígeno del carbonilo del beta lactámico forma un enlace de hidrógeno con la Asn<sub>132</sub>, y el carboxilato del beta lactámico forma un puente de hidrógeno con la Ser<sub>130</sub> y Ala<sub>237</sub>.

En algunas mutantes (R164G, R164E, R164S) Glu240 cambia a Lys. Ahora la Lys forma un puente salino con el Glu171 (en la enzima silvestre lo hace con la Arg164). Además la Lys<sub>240</sub> ya no puede formar un puente de hidrógeno con el amido del aminothiazol. En consecuencia la ceftazidima se empuja hacia arriba en la cavidad del sitio activo, en donde puede ser hidrolizada, apoyada por el enlace de hidrógeno entre Ser<sub>238</sub> y el grupo oximino. Lo cual no concuerda con

los resultados de Huletsky y colaboradores [1993] en SHV donde la interacción de Lys240 es con el grupo carboxilo de ceftazidima.

Para comprender cuál es el papel de cada sustitución en la hidrólisis de los diferentes beta lactámicos, se deben realizar estudios sobre cinéticas midiendo  $V_{max}$ ,  $K_{cat}$  y  $K_m$  para cada una de las mutantes comparando cefotaxima y ceftazidima con cefpirome, aztreonam y ampicilina como sustratos.

## 8. CONCLUSIONES

Se obtuvieron mutantes seleccionadas en ceftazidima con reemplazos en la posición 164 por: Ser, His, Asn, Glu y Gly que hidrolizan ceftazidima. En la enzima silvestre TEM-1 la ceftazidima es estabilizada por puentes de hidrógeno entre el Glu240 y el grupo amida del aminotiazol, además de los que se forman entre el carboxilato y la Ser130 y Ala237 y el carbonilo del beta lactámico con Asn132. La ceftazidima no es hidrolizada porque la Ser70 catalítica está lejos del carbonilo del anillo beta lactámico. En TEM-1 la Arg164 forma dos puentes salinos con el Asp179 y el Glu171. Al cambiar la Arg164 por Ser, Glu o Gly, estos enlaces de hidrógeno tal vez no se forman. Curiosamente en estas mutantes el Glu240 también cambio por Lys, ahora Lys240 puede formar un puente salino con el Glu171 y se pierde la interacción que se pudiera formar entre el amido del aminotiazol y el Glu240. En consecuencia la ceftazidima puede ser empujada hacia arriba de la cavidad del sitio activo, donde ahora puede ser hidrolizada por la Ser70. Esta posición es favorecida por la

los resultados de Huletsky y colaboradores [1993] en SHV donde la interacción de Lys240 es con el grupo carboxilo de ceftazidima.

Para comprender cuál es el papel de cada sustitución en la hidrólisis de los diferentes beta lactámicos, se deben realizar estudios sobre cinéticas midiendo  $V_{max}$ ,  $K_{cat}$  y  $K_m$  para cada una de las mutantes comparando cefotaxima y ceftazidima con cefpirome, aztreonam y ampicilina como sustratos.

## 8. CONCLUSIONES

Se obtuvieron mutantes seleccionadas en ceftazidima con reemplazos en la posición 164 por: Ser, His, Asn, Glu y Gly que hidrolizan ceftazidima. En la enzima silvestre TEM-1 la ceftazidima es estabilizada por puentes de hidrógeno entre el Glu240 y el grupo amida del aminotiazol, además de los que se forman entre el carboxilato y la Ser130 y Ala237 y el carbonilo del beta lactámico con Asn132. La ceftazidima no es hidrolizada porque la Ser70 catalítica está lejos del carbonilo del anillo beta lactámico. En TEM-1 la Arg164 forma dos puentes salinos con el Asp179 y el Glu171. Al cambiar la Arg164 por Ser, Glu o Gly, estos enlaces de hidrógeno tal vez no se forman. Curiosamente en estas mutantes el Glu240 también cambio por Lys, ahora Lys240 puede formar un puente salino con el Glu171 y se pierde la interacción que se pudiera formar entre el amido del aminotiazol y el Glu240. En consecuencia la ceftazidima puede ser empujada hacia arriba de la cavidad del sitio activo, donde ahora puede ser hidrolizada por la Ser70. Esta posición es favorecida por la

selección para determinado residuo, modificar aquellos residuos que están reportados como no tolerantes a sustituciones y buscar en el banco haciendo la selección con diferentes sustratos.

Las sustituciones en el residuo 164 le permiten a la enzima ampliar su espectro de hidrólisis, ya que ahora es capaz de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro como ceftazidima y aún de cuarta generación como cefpirome, así como aztreonam un monobactámico. Estas propiedades no son conferidas por la sustitución de G238S por sí sola. La mutación adicional de E240K solo se presenta junto con la sustitución de G238S, no se encuentran de manera independiente en este trabajo, donde las mutaciones fueron dirigidas al residuo R164. Las dos clonas examinadas que no muestran sustitución en la Arg164 presentaron esta doble mutación. Y fueron seleccionadas en cefotaxima. Sin embargo, en un caso hay resistencia a ceftazidima (CMI= 4µg/ml) y en el otro no (CMI=0.25µg/ml).

En la estructura del complejo de la beta lactamasa TEM-1 con ceftazidima (Arg164, Gly238 y Glu240) no hay hidrólisis de ceftazidima, ya que existe una interacción de puentes de hidrógeno muy favorable entre el grupo amida del aminothiazol y el Glu240. Esto empuja la ceftazidima hacia la cavidad, mientras que el oxígeno del carbonilo del beta lactámico forma un enlace de hidrógeno con la Asn132, y el carboxilato del beta lactámico forma un puente de hidrógeno con la Ser130 y Ala237.

En algunas mutantes (R164G, R164E, R164S) Glu240 cambia a Lys. Ahora la Lys forma un puente salino con el Glu171 (en la enzima silvestre lo hace con la Arg164). Además la Lys240 ya no puede formar un puente de hidrógeno con el amido del aminothiazol. En consecuencia la ceftazidima se empuja hacia arriba en la cavidad del sitio activo, en donde puede ser hidrolizada, apoyada por el enlace de hidrógeno entre Ser238 y el grupo oximino. Lo cual no concuerda con

interacción de puente de hidrógeno que se establece entre la Ser238 y el grupo oximino del antibiótico.

Todas las mutaciones encontradas en el residuo 164 permiten la hidrólisis de ceftazidima. Mutaciones adicionales como G238S y E240K, tienen un efecto aditivo en la resistencia a beta lactámicos con sustituyentes oximino como la ceftazidima. Cefotaxima es hidrolizada pobremente ya que el grupo R2 puede ser estabilizado por puentes de hidrógeno con otros residuos como Arg244.

En las mutantes que revierten la mutación original (templado parental) Ser238Gly, no parece ser producto de la amplificación con PCR, ya que se presenta repetidamente en diferentes mutantes; se pierde la sustitución parental o se adquiere E240K. No se encontraron mutantes sencillas para los residuos G238 o E240, o se tienen las dos sustituciones (G238S, E240K) o no se tiene ninguna. Esto puede deberse a la presión de selección.

El hecho de que no se encontraran otros residuos de aminoácidos para la posición 164 puede deberse a que estas sustituciones no fueron funcionales y no se pudieron recuperar en el banco obtenido al hacer la selección. Posiblemente si se hubiera hecho la selección solo en kanamicina, se podrían haber recuperado aquellas variantes que aún cuando fueran mutantes en la posición 164, no presentaran resistencia al antibiótico beta lactámico usado como selección. Es importante la forma de selección por el tipo (estructura química) y concentración del antibiótico, para la obtención de las mutantes, ya que al seleccionar en ceftazidima se obtuvieron mutaciones en R164, mientras que en cefotaxima no se obtuvieron mutaciones, en esa posición. Todas las

mutantes obtenidas son sensibles a las combinaciones de los antibióticos con clavulánico, por lo tanto los efectos observados son debidos a las mutaciones en la beta lactamasa y no a otros mecanismos de resistencia.

## 8. REFERENCIAS

- Adachi, H., Ohta, T. and 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: 3186-3191.
- Ambler, R.P. 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 289:321-331.
- Ambler, R.P., Coulson, F.W., Frère, J.-M., Ghuysen, J.-M., Joris, B., Forsman, M. Levesque, R.C., Tiraby, G. and Waley, S.G. 1991. A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. *Biochem. J.* 276:269-272.
- Arlet, G., Brami, G., Décrè, D., Flippo, A., Gaillot, O., Lagrange, P.H. and Philippon, A. 1995. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM  $\beta$ -lactamases. *FEMS Microbiol. Lett.* 134:203-208.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1990. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. USA. pp. 1.7.7-1.7.11.
- Blazquez, J., Morosini, M.I., Negri, M.C., González-Leiza, M. and Baquero, F. 1995. Single amino acid replacements at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM beta lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:145-149.
- Bradford P. Cherubin CE, Idemyor V, Rasmussen BA, Bush K. 1994. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* from two Chicago hospitals: identification of the extended spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing beta-lactamases in a single isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38: 761-766.
- Bradford, P.A., Jacobus, N.V., Bhachech, N. and Bush, K. 1996. TEM-28 from an *Escherichia coli* clinical isolate is a member of the His-164 family of TEM-1 extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:260-262.
- Bush, K., Jacoby, G. and Medeiros, A. 1995. A functional classification scheme for beta lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211-1233.
- Bush, K. and Jacoby, G. 1997. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum beta lactamases.  
<http://www.lahey.hitchcock.org/pages/lhc/studies/webt.htm#TEM>

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cantu, C., Huang, W., and Palzkill, T. 1996. Selection and characterization of amino acid substitutions at residues 237-240 of TEM-1 beta-lactamase with altered substrate specificity for aztreonam and ceftazidime. *J. Biol. Chem.* 271:2538-2545.

Carfi, A., Pares, S., Duée, E., Galleni, M., Duez, C., Frère, J.M. Dideberg, O. 1995. The 3-D structure of a zinc metallo beta lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J.* 14: 4914-4921.

Case, C.L., B.R. Funke, and G.J. Tortora. 1993. *Microbiology: An Introduction*. Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., California.

Collatz, E., Labia, R. and Gutmann, L. 1990. Molecular evolution of ubiquitous beta lactam antibiotics. *Mol. Microbiol.* 4:1615-1620.

Cooksey, R., Swenson, J., Clark, N., Gay, E. and Thornsberry. 1990. Patterns and mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance among isolates of *Escherichia coli* from hospitals in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 739-745.

Corey Atteridge y Mark Tromblay. 1997.

<http://www.middlebury.edu/~ch0337/atteridge/penicillin/penicillin.html>

Craig, S., Hoellecker, M., Creighton, T.E., and Pain, R.H. 1985. Single amino acid mutations block a late step in the folding of beta lactamase from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 185 :681-687.

Datta, N: and Kontomichalou, P. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature.* 208: 239-241.

Daub, E., Zawadzke, L.E., Botstein, D. & Walsh, C.T. (1988) *Biochemistry* 27, 3701-3708

Dideberg, O. Charlier, P., Wery, J.-P., Dehottay, P., Dusart, J., Erpicum, T., Frère, J.-M. and Ghuysen, J.-M. 1987. The crystal structure of the  $\beta$ -lactamase of *Streptomyces albus* G at 0.3nm resolution. *Biochem. J.* 245: 911-913.

Douglas, K.T. 1992. Alteration of enzyme specificity and catalysis. *Current Opinion Biotech.* 3:370-377.

Du Bois, S.K., Marriott, M.S. and Amyes, S.G.B. 1995. TEM and SHV -derived extended spectrum-  $\beta$ -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J. Antimicrob. Chem.* 35:7-22.

Frère, J.-M., B. Boris. 1985. Pencillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *Crit. Rev. Microbiol.* 11: 299-396.



Frère, J.-M. 1995. Beta lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.* 16: 385-395.

Ghuysen, J.-M. 1991. Serine  $\beta$ -lactamases and penicillin binding proteins. *Ann. Rev. Microbiol.* 45: 37-67.

Gibson, R.M., Christensen, H. and Waley, S.G. 1990. Site-directed mutagenesis of  $\beta$ -lactamase I. Single and double mutants of Glu166 and Lys73. *Biochem. J.* 272: 613-619.

Harley, J.P., D.A. Klein, and L.M. Prescott. 1993. *Microbiology*. Wm.C.Brown Publishers, Dubuque, Iowa.

Herzberg O and Moulton J. 1987. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: crystal structure of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5Å resolution. *Science* 236:694-701.

a Herzberg O and Moulton J. 1991. Penicillin-binding and degrading enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1:946-953.

b Herzberg O, Kapadia, G., Blanco, B., Smith, T.S., and Coulson, A. 1991. Structural basis for the inactivation of the P54 mutant of  $\beta$ -lactamase for *Staphylococcus aureus* PC1. *biochemistry*. 30 :9503-9509.

Herzberg O. 1991. Refined crystal structure of  $\beta$ -lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 217: 701-719.

Huang, W., Petrosino, J., Hirsch, M., Shenkin, P.S. and Palzkill, T. 1996. Amino acid sequence determinants of  $\beta$ -lactamase structure and activity. *J. Mol. Biol.* 258: 688-703.

Huletsky, A., Knox, J.R. and Levesque, R.C. 1993. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J. Biol. Chem.* 268 :3690-3697.

Huovinen, P., Huovinen, S. and Jacoby, G.A. 1988. Sequence of PSE-2  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 134-136.

Imitiaz, U., Manavathu, E.K., Mobashery, S. and Lerner, S.A. 1994. Reversal of clavulanate resistance conferred by a Ser244 mutant of TEM-1 beta lactamase as a result of a second mutation (Arg to Ser at position 164) that enhances activity against ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:1134-1139.

Jacobs, C., Huang, L.-J., Bartowsky, E., Normak, S. and Park, J. 1994. Bacterial cell wall recycling cytosolic muropeptides as effectors for beta lactamase induction. *EMBO J.*, 13:4684-4694.

Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A. 1991. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1697-1704.

Jaurin, B. and Grundstrom, T. 1981. *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K12 has a different evolutionary origin from that of  $\beta$ -lactamases of the penicillinase type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 4897-4901.

Jelsch, C., Lenfant, F., Masson, J.M., and Samama, J.P. 1992.  $\beta$ -lactamase TEM-1 of *E. coli*. *FEBS Lett.* 299:135-142.

Jelsch Ch, Mourey L, Masson JM and Samama JP. 1993. Crystal structure of *Escherichia coli*. TEM-1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins* 16:364-383.

Joris, B., Ghuysen, J.-M., Dive, G., Renard, A., Dideberg, O., Charlier, P., Frère, J.-M., Kelly, J.A., Boyington, J.C., Moews, P.C., Konx, J.R. 1988. The active-site serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-Peptidase family. *Biochem. J.* 250:313-324.

Juteau, J.M., Billings, E., Knox, J.R., Levesque, R.C. 1992. Site-saturation mutagenesis and three dimensional modelling of ROB-1 define a substrate binding role of Ser130 in class A beta-lactamase. *Protein Eng.*5:693-701.

Kelly, J.A. Kuzin, A.P. 1995. The refined crystallographic structure of a D-peptidase penicillin-target enzyme at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 254: 223-226.

Khun, I., Stephenson, F.H., Boyer, H.W., and Greene, P.J. 1986. Positive-selection vectors utilizing lethality of the EcoRI endonuclease. *Gene* 44:253-263.

Kliebe, C., Nies, B.A., Meyer, J.F., Tolxdorff-Neutzling, R.M. and Wiedemann. 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28:302-307.

Knox, J.R. and Moews, P.C. 1991.  $\beta$ -lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C refined at 2Å resolution and analysis of hydration. *J. Mol. Biol.* 220: 435-455.

Knox, J.R., Moews, P.C., Escobar, W.A. and Fink, A.L. 1993. A catalytically-impaired class A  $\beta$ -lactamase: 2Å structure and kinetics of *Bacillus licheniformis* E166A mutant. *Protein Eng.* 6: 11-18.

Knox, J.R. 1995. Extended spectrum and inhibitor resistant TEM-type beta lactamase: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39:2593-2601.

Lamotte-Brasseur, J., Dive, G., Dideberg, O., Charlier, P., Frère, J.-M. and Ghuysen, J.M. 1991. Mechanism of acyl transfer by the class A serine beta-lactamase of *Streptomyces albus* G. *Biochem. J.* 279: 213-221.

Lane, J.W. 1998. Department of Chemistry/Biochemistry, University of Wisconsin-Superior, WI 54880. Comunicación Personal.

Lee, K.Y., Hoopkins, J.D., O'Brien, T.F. and Syvanen, M. 1991. Gly238Ser substitutions change the substrate specificity of the SHV class A beta-lactamase. *Proteins.* 11:46-51.

Levy, S. B.,M.D. 1998. The challenge fo antibiotic resistance. *Scientific American.* <http://www.sciam.com/1998/0398issue/0398levy.html>

Levy, S. B.,M.D. 1992 *The Antibiotic Paradox. How miracle drugs are destroying the miracle.* Plenum Press. New York

a Lewin, B. 1994. Ribosomes provide a translation factory. p. 233-252. *Genes V.* Chapt. 9. En Oxford University Press Inc., New York.

b Lewin, B. 1994. Control at initiation: RNA polymerase-promoter interactions. p. 376-411. *Genes V.* Chapt. 14. En Oxford University Press Inc., New York.

Livermore, D.M. 1995.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:557-584.

Livermore, D.M. 1995. Beta lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microb. Rev.* 8:557-584.

Lobkovsky, E., P.C. Moews, H. Liu, H. Zhao, and J.-M. Frère. 1993. Evolution of an enzyme activity: crystallographic structure at 2 Å resolution of the cephalosporinase from the *ampC* gene of *Enterobacter cloacae* P99 and comparison with a class A penicillinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11257-11261.

Matthew, M. 1979. Plasmid mediated  $\beta$ -lactamases of gram negative bacteria: distribution and properties. *J. Antimicrob. Chemother.* 5:349-358.

Medeiros, A.A. 1984.  $\beta$ -lactamases. *Br. Med. Bull.* 40: 18-27.

Medeiros, A.A. 1997. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 24(Suppl. 1):S19-S45.

Meyers KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ. 1993. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Annals of Internal Medicine*, 119: 353-358.

Michaud. C., Blanot, D., Flouret, B. & Van Heijenoort, J. (1987) *Eur. J. Mol. Biol.* 209, 281-295

Mitsuhashi, Susumu. 1982. *Drug Resistance in Bacteria*. Japan Scientific Societies Press.

Moult, J. Sawyer, L., Herzberg, O. 1985. The crystal structure of of  $\beta$ -lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 0.5 nm resolution. *Biochem. J.* 225: 167-176.

Moews, P.C.Knox, J.R., Dideberg, O, Charlier, P., Frère, J.M. 1990. Beta lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C at 2 Å resolution. *Proteins.* 7:156-171.

Mugnier, P., Dubrous, P., Casin, N., Arlet, G. and Collatz, E. 1996. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2488-2493.

Naumovski, L., Quinn, J.P., Miyashiro, D., Patel, M., Bush, K., Singer, S.B., Graves, D., Palzkill, T. and Arvin, A.M. 1992. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum beta lactamase in isolates from cancer patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1991-1996.

Neuhaus, F.C. & Hammes, W.P. (1981) *Pharmacol. Ther.* 14, 265-319.

Neu, H.C., and Gootz, T.D. 1996. *Antimicrobial Chemotherapy*. En: Baron, S., Albrecht, T., Castro, G., Couch, R.B., Davis, Ch.P., Dianzani, F., McGinnis, M.R., Niesel, D.W., Olson, L.J., Woods, G.L. (Ed.), *Medical Microbiology*. 4<sup>th</sup> ed., Chapt. 11. The University of Texas Medical Branch at Galveston.

Oefner, C., D'Arcy, A., Daly, J.J., Gubernator, K., Charnas, R.L., Jeinze, I., Hubschwerlen, C. and Winkler, F.K. 1990. Refined crystal structure of  $\beta$ -lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for  $\beta$ -lactam hydrolysis. *Nature*, 343:284-288.

Oliver, D.B. 1996. Periplasm. p.88-99. En: F.C. Neidhardt, J. L. Ingraham, E. C.C. Lin, K.B. Low, Jr., B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup>, ed., Vol. 68. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Second Edition.

Osuna, J., Flores, H. and Soberón, X. 1994. Microbial systems and directed evolution of protein activities. *Critical Rev. Microbiol.* 20(2):107-116.

Palzkill, T. and Botstein, D. 1992. Identification of amino acid substitutions that alter the substrate specificity of TEM-1  $\beta$ -lactamase. *J. Bacteriol.* 174: 5237-5243.

Palzkill T, Quyen-Quyen L, Venkatachalam KV, LaRocco M and Ocera H. 1994. Evolution of antibiotic resistance: several different amino acid substitutions in an active site loop alter the substrate profile of beta lactamase. *Mol. Microbiol.* 12:217-229.

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

Petrosino, J.F. and Palzkill T. 1996. Systematic mutagenesis of the active site omega loop of TEM-1  $\beta$ -lactamase. *J. Bacteriol.* 178: 1821-1828.

Philippon, A., Labia, R. and Jacoby, G.A. 1989. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1131-1136.

Pluckthun A. and Knowles R. 1987. The consequences of stepwise deletions from signal-processing site of beta-lactamase. *J. Biol. Chem.* 262:3951-3957.

Raquet, X., Lamotte-Brasseur, J., Fonzé, E., Goussard, S. Courvalin, P. and Frère, J.M. 1994. TEM beta lactamase mutants hydrolyzing third generation cephalosporins. *J. Mol. Biol.* 244:625-639.

Reid, A.J., and Aymes, S.G.B. 1986. Plasmid penicillin resistance in *Vibrio cholerae*: identification of a new  $\beta$ -lactamase SAR-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:245-247.

Roy, C., Segura, C., Tirado, M., Reig, R., Hermida, M., Teruel, D. and A. Foz. 1985. Frequency of plasmid-determined  $\beta$ -lactamases in 680 consecutively isolated strains of *Enterobacteriaceae*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 4: 146-147.

Sanders, C.C., and Sanders, W.E. Jr. 1992.  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* 15: 824-839.

Saves, I., Brutlet-Schiltz O., Swarén, P., Lefèvre, F., Masson, J.-M., Promé, J.-C. and Samama, J.-P. 1995. The asparagine to aspartic acid substitution at position 276 of TEM-35 and TEM-36 is involved in the  $\beta$ -lactamase resistance to clavulanic acid. *J. Biol. Chem.* 270: 18240-18245.

Shao, Z. and Arnold, F.H. 1996. Engineering new functions and altering existing functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 513-518.

Sirot D, Champs CD, Chanal C, Labia R, Darfeuille-Michaud A, Perrous R. Sirot J. 1991. Translocation of antibiotic resistance determinants including an extended-spectrum beta-lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 1576-1581.

Sougakoff, W., Goussard, S. and Courvalin, P. 1989. Characterization of the plasmid genes *blaT-4* and *blaT-5* which encode the broad spectrum beta lactamase TEM-4 and TEM-5 in Enterobacteriaceae. *Gene*. 78:339-348.

Sowek, J.A., Singer, S.B., Ohringer, S., Malley, M.F., Dougherty, T.J., Gougoutas, J.Z. and Bush, K. 1991. Substitution of lysine at position 104 or 240 of TEM-1pTZ18R beta-lactamase enhances the effect of serine-164 substitution on hydrolysis or affinity for cephalosporins and the monobactam aztreonam. *Biochem.* 30:3179-3188.

Strynadka, N.C.J., Adachi, J., Jensen, S.E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C. and James, M.N. 1992. Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in  $\beta$ -lactam hydrolysis at 1.7Å resolution. *Nature (London)* 359: 700-705.

Sutcliffe, J.G. 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75: 3737-3741.

Sykes, R.B. and Matthew, M. 1976. The  $\beta$ -lactamase of gram negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2: 115-157.

Tipper, D.J., Strominger, J.L. 1965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-d-alanyl-d-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 54:1133-1141.

Vakulenko, S.B., Tóth, M., Taibi, P., Mobashery, S., and Lerner, S.A. 1995. Effects of Asp-179 mutations in TEM<sub>pUC19</sub> beta-lactamase on susceptibility to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 :1878-1880.

Van-Heijenoort, Jean. 1996. Murein synthesis. p.1025-1034. En: F.C. Neidhardt, J. L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, Jr., B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umberger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup>, ed., Vol. 68. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Vedel, G., Belaouaj, A., Lilly, G., Labia, R. Philippon, A., Nevot, P. and Paul G. 1992. Clinical isolates of *Escherichia coli* producing TRI  $\beta$ -lactamases: novel

TEM enzymes conferring resistance to  $\beta$ -lactamase inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* 30:449-462.

Venkatachalam, K.V., Huang, W., LaRocco, M., and Palzkill, T. 1994. Characterization of TEM-1 beta lactamase mutants from positions 238 to 241 with increased catalytic efficiency for ceftazidime. *J. Biol. Chem.* 269:23444-23450.

Viadiu, H. 1994. Modificación de la especificidad de la beta lactamasa por mutagénesis combinatoria. Tesis de maestría en Biotecnología, UACPyP del CCH, Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos.

Voet, D. and Voet, J.G. 1990. Enzymatic catalysis. En: John Wiley and Sons (ed.). *Biochemistry*, 1a ed., Cap. 14. 355-391.

Webber, D.A., Sanders, C.C., Bakken, J.S. and Quinn, J.P. 1990. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 162:460-465.

Yanish-Perron, C., Viera, J., and Messing, J. 1985. *Gene* 33:103-199.

Young, H.-K., Nandivada, L.S., and Amyes S.G.B. 1989. Antibiotic resistance in the tropics. I. The genetics of bacterial ampicillin resistance in tropical areas. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:38-41.