



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Estudio estructural de la β -lactamasa de espectro extendido Tla-1 mediante
cristalografía de rayos X”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Víctor Hugo Cifuentes Castro

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Enrique Rudiño Piñera
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Jesús Silva Sánchez
[Instituto de Salud Pública](#)
Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca. Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado

Presidente Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero

Secretario Dr. Rubén Paul Gaytán Colín

Vocal Dr. Lilián González Segura

Vocal Dra. Liliana Pardo López

Vocal Dra. Carmen Nina Pastor Colón

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Estructural del Departamento de medicina molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El proyecto contó con el apoyo de los donativos de CONACyT y le otorgó la beca al becario con el número 585131

Dedicatoria

A mis padres Ángel y Lety, a mis hermanos Mariana y Ángel; y a Betti por su apoyo incondicional durante la maestría y ayudarme a superar retos profesionales y personales, que fueron muchos durante esta etapa. Así como a mis tías, tíos y primos.

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Rudiño por su guía y por apoyarme durante el desarrollo de este proyecto, por darme las herramientas y libertades para llevar a cabo el proyecto y por sus enseñanzas en el área de la cristalografía de macromoléculas.

Al el Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella y el Dr. Jesús Silva Sánchez por sus observaciones y formar parte del comité de tutores.

A la Dra. Claudia Rodríguez Almazán por su apoyo y guía en experimentos clave para la realización de este proyecto.

A la técnico laboratorista Aurelia Ocampo Vargas por su apoyo durante la maestría.

A la Biól. Sonia Rojas Trejo por su apoyo para la cristalización.

A los miembros del jurado el Dr. Paul Gaytán Colin, la Dra. Lilian González Segura, la Dra. Liliana Pardo López, la Dra. Nina Pastor Colón y el Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero.

A los miembros del grupo de Bioquímica Estructural Arisbeth, Liz, Santos, Giovanni, Adelaida, Osvaldo, Murphy y Antony por su apoyo y compañía durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Lilian González Segura y la Dra. Adelaida Díaz Vilchis por coleccionar los datos de difracción de dos estructuras de la TLA-1.

A la Dra. Adela Rodríguez por su apoyo en la difracción de los cristales de TLA-1.

A los amigos que hice en esta maestría, como Marco, Brenda, Inés, Chuy, Naye, Xade así como muchos otros, por su compañía y los buenos momentos.

A mis amigos Luis, Alfonso, Mariana, Moni, Iván, Carlos, Jess por siempre apoyarme.

Finalmente quería agradecer a CONACyT por haberme apoyado con la beca durante estos años, así como a la PAEP por el apoyo para asistir al Congreso Nacional de ciencias bioquímicas

Contenido

Contenido	iv
1 Introducción	1
2 Marco teórico	2
2.1 Antibióticos β -lactámicos.....	2
2.2 β -lactamasas	5
2.2.1 Clasificación de las β -lactamasas	5
2.3 β -lactamasas de clase A.....	7
2.3.2 Clasificación estructural de las β -lactamasas de la Clase A.....	11
2.3.3 Asa Ω	12
2.4 ESBLs	13
3 TLA-1.....	15
4 Justificación.....	19
5 Hipótesis.....	20
6 Objetivos	21
6.1 Objetivo General	21
6.2 Objetivos Específicos.....	21
7 Materiales y métodos	22
7.1 Comparación de la secuencia de TLA-1 con otras β -lactamasas	22
7.2 Construcción y transformación	22
7.2.1 Construcción pJ411::TLA-1	22
7.2.2 Transformación	22
7.2.3 Secuenciación del gen sintético.....	23
7.3 Pruebas de expresión.....	23
7.3.1 Inducción.....	23
7.3.2 Ruptura.....	23
7.4 Purificación	24
7.4.1 Intercambio iónico.....	24
7.4.2 Exclusión Molecular	25
7.5 Pruebas de actividad.....	25
7.6 Cristalografía.....	26
7.6.1 Cristalización.....	26
7.6.2 Remojado de los cristales en ácido clavulánico	28

7.6.3 Difracción.....	29
7.6.4 Obtención de la estructura cristalográfica	29
7.6.5 Análisis de la estructura	30
8 Resultados y Discusión	31
8.1 Análisis de secuencias.....	31
8.2 Transformación con el vector pJ411	32
8.3 Secuenciación.....	33
8.4 Pruebas de expresión.....	33
8.5 Purificación	36
8.5.1 Cromatografía de Intercambio iónico.....	36
8.5.2 Cromatografía de exclusión molecular.....	37
8.6 Prueba de Actividad.....	38
8.7 Cristalización.....	38
8.7.1 Barrido de condiciones.....	38
8.7.2 Optimización.....	39
8.8 Difracción.....	40
8.9 Determinación de la estructura.....	41
8.10 Análisis de la estructura	44
8.10.1 Análisis general de la estructura.....	44
8.10.2 Comparación de TLA-1 con otras β -lactamasas de la Clase A.....	47
8.11 Comparación con TLA-3	51
8.12 Estructura cristalográfica de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico	54
9 Conclusiones	64
10 Perspectivas.....	66
11 Literatura consultada.....	67

1 Introducción

La introducción de la bencilpenicilina en pruebas clínicas hace 50 años representa uno de los grandes éxitos de la terapia química. Hoy en día los antibióticos β -lactámicos siguen siendo utilizados de manera frecuente debido a su efectividad y bajo costo [1]. El blanco de los antibióticos β -lactámicos son las enzimas encargadas de la síntesis de la pared de mureína, las proteínas de unión a penicilina (PBP), enzimas específicas de bacterias que las ha convertido en una proteína diana para el diseño de antibióticos. Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que, debido a que el enlace β -lactama es lábil y reactivo, acilan a la serina del sitio activo de las PBPs [2]. Las bacterias dependen de la pared celular compuesta de peptidoglicano para mantener su forma y rigidez. La acilación de la serina del sitio activo de las PBP detienen la síntesis de la pared celular inhibiendo a las PBP; debido a esto, la célula bacteriana se hace permeable al agua, ocasionando un desbalance osmótico y dando como resultado su propia lisis [3].

Durante las últimas décadas, el uso desmesurado de antibióticos β -lactámicos generaron el surgimiento de organismos resistentes. Éstos utilizan diferentes mecanismos de resistencia, siendo el principal mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos, como penicilinas y cefalosporinas, la producción de β -lactamasas, las cuales catalizan la hidrólisis del anillo β -lactámico y de esta manera impiden que los antibióticos puedan interactuar con las PBPs [4], [5]. Las β -lactamasas se clasifican en clases A-D, donde las clases A, C y D poseen una serina reactiva y la clase B posee Zn^{+2} en el sitio activo [6].

Los primeros antibióticos β -lactámicos, como penicilinas y las primeras cefalosporinas resultaron susceptibles a hidrólisis por β -lactamasas de clase A como TEM-1. Por esta razón, a lo largo de décadas se han desarrollado distintos antibióticos β -lactámicos, para enfrentar el incremento de microorganismos productores de β -lactamasas [7]. Las cefalosporinas de espectro extendido han sido desarrolladas para lidiar con la resistencia a antibióticos β -lactámicos mediada por β -lactamasas de clase A. Estas moléculas evaden la hidrólisis de las β -lactamasas debido a que poseen un grupo $C7\beta$ aminotiazoloxiimino amida en su cadena lateral lo que aumenta su tamaño y evita así la hidrólisis [8]. El desarrollo de estos antibióticos más resistentes y eficientes contra β -lactamasas han permitido la selección de β -lactamasas capaces de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido con una mayor eficiencia que las penicilinas; las cuales se han denominado como β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs).

Las ESBLs han sido de interés médico y han sido ampliamente estudiadas desde que fueron descritas por primera vez en 1983. La mayoría de las ESBLs pertenecen a la clase A, que a su vez se ha dividido en subclase A1 y subclase A2. El conocimiento de la estructura de las β -lactamasas nos ha permitido conocer mejor como es que estas funcionan y cómo son inhibidas [9][10]. El estudio del funcionamiento de las β -lactamasas de subclase A1 ha permitido elucidar el papel de algunos de los residuos importantes para el fenotipo de ESBL, así como resistencia a inhibidores, la hidrólisis de otros antibióticos β -lactámicos y ha permitido diseñar antibióticos. Éstas β -lactamasas obtienen el fenotipo de ESBL por mutaciones puntuales. La subclase A2 ha sido la menos estudiada ya que representantes de esta subclase se han encontrado con menor frecuencia en aislados clínicos. La subclase A2 tiene el fenotipo de ESBL de manera intrínseca, ya que los cambios que definen a esta clase son la expansión del sitio activo debido a una inserción en la horquilla entre la lámina β -3 y β -4 y un cambio estructural en el asa Ω lo que permite el acomodo de sustratos más voluminosos, como cefalosporinas. Esto las hace de interés médico y en el mismo sentido, las poblaciones de organismos productores de β -lactamasas de la subclase A2 han ido en aumento. Sólo se ha determinado la estructura cristalográfica de tres β -lactamasas de la subclase A2 [11]–[13]. En el presente estudio se expresó, purificó, cristalizó y se obtuvo la estructura cristalográfica de una β -lactamasa de la subclase A2 llamada TLA-1, y se analizaron las implicaciones de estos hallazgos con el fin de encontrar las diferencias con las otras β -lactamasas de subclase A2, que puedan explicar sus características particulares, como por ejemplo, la menor afinidad a dos de los tres inhibidores clásicos de β -lactamasas y poder obtener más información de este grupo poco estudiado [14].

2 Marco teórico

2.1 Antibióticos β -lactámicos

Las células procariotas se caracterizan por tener una pared celular, también conocida como pared de mureína, formada principalmente por peptidoglicano, la cual les confiere la forma y otorga fuerza mecánica a la pared celular. El peptidoglicano se encuentra formado por polímeros con motivos alternados de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos a una cadena de pentapéptidos L-Ala-D-Glu-X-D-Ala-D-Ala. Las cadenas de peptidoglicano se entrecruzan formando enlaces peptídicos entre ellos, dando así rigidez a la pared de péptido-glicano. Esta reacción es catalizada por un grupo de enzimas llamadas PBPs, las cuales son el blanco de los antibióticos β -lactámicos. Sin una pared celular una bacteria solo es capaz de sobrevivir en un medio que tenga la misma presión osmótica que ella [8],[9]. Las PBPs se encuentran involucradas en diferentes

procesos, desde regulación genética, hasta la duplicación celular; y son las responsables del ensamblaje, mantenimiento y regulación de la estructura de peptidoglicano [15]. Estas proteínas en su gran mayoría se encuentran ancladas en la membrana interna de la bacteria, con su sitio activo expuesto al periplasma. Las PBP's tienen diversas actividades reportadas, que abarcan las actividades de transpeptidasa, transglicosilasa y carboxipeptidasa [8],[10],[11]. Las transpeptidasas que pertenecen a las PBP's en su gran mayoría son peptidasas con una serina reactiva en el sitio activo; a pesar de esto, estas enzimas no tienen ninguna similitud estructural ni en secuencia con las proteasas de serina catalítica. Las PBP's con actividad de transpeptidasa cortan el último enlace peptídico del pentapéptido de la cadena de peptidoglicano, mediante un mecanismo de acilación. Una vez que la proteína se encuentra acilada es atacada por el grupo amino terminal de una cadena de peptidoglicano adyacente, resultando en el entrecruzamiento (Fig. 1) [15], [7], [19].

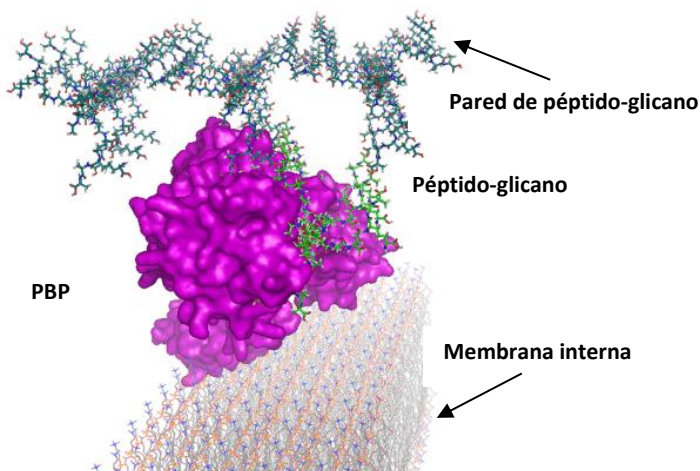


Figura 1. Mecanismo propuesto por Sauvage *et al.* para la construcción de la pared de péptido-glicano, donde la PBP (magenta) toma cadenas de péptido-glicano nuevas (verde) y las une mediante una transpeptidación a la pared de péptido-glicano que está siendo formada. Imagen tomada y modificada de Sauvage *et al.* 2008

Los antibióticos β -lactámicos son moléculas que inhiben a las PBP's, ya que el enlace β -lactámico (Fig. 2a) es lábil y reactivo; éste acila a la serina del sitio activo de las proteínas de unión a penicilina (PBP), y no permite el entrecruzamiento [2]. Los antibióticos β -lactámicos son considerados como inhibidores peptidomiméticos ya que el enlace β -lactámico es muy similar al enlace D-Ala-D-Ala del pentapéptido de la pared de mureína (Fig. 2b) [20]. Cada antibiótico presenta diferentes patrones de inhibición de transpeptidasas lo que resulta en diferentes fenotipos [7]. Al inhibir las

transpeptidasas, el recambio de la pared de mureína así como la construcción de esta es detenida lo que ocasiona un choque osmótico, dando como resultado la lisis de la bacteria [3].

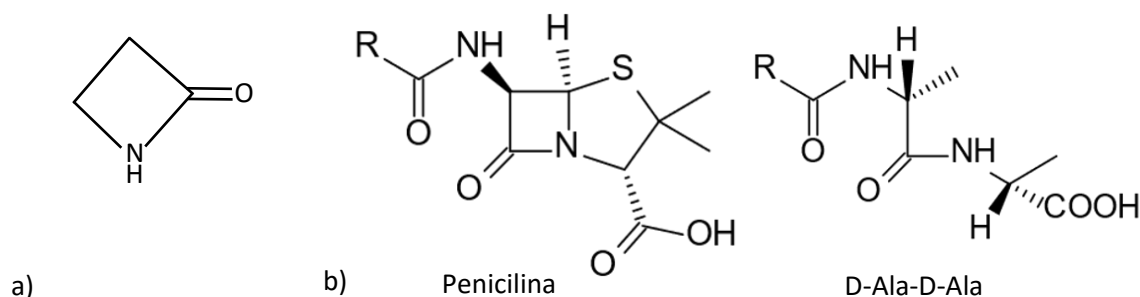


Figura 2. Estructura de los antibióticos β -lactámicos. a) Estructura del grupo β -lactama común en todos los antibióticos β -lactámicos b) Comparación entre el grupo β -lactama y el dipéptido D-Ala-D-Ala presente en todas las paredes celulares. Modificado de Fisher & Mobasherry 2009.

La era de los antibióticos β -lactámicos comenzó cuando fueron reportados por Alexander Fleming en 1928. El descubrimiento de estas moléculas permitió tratar infecciones durante la Segunda Guerra mundial [7][21]. Los antibióticos β -lactámicos son los agentes quimioterapéuticos elegidos para tratar un amplio número de infecciones, pero su potencial terapéutico ha sido amenazado debido a que numerosas cepas bacterianas han sobrevivido a la presión selectiva ejercida por estos, desarrollando así mecanismos diversos para la resistencia a antibióticos [7][22]. La propagación de bacterias resistentes a antibióticos es una amenaza para la morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Debido a esto ha habido esfuerzos por parte de distintas instituciones como la *World Health Organizatiton* (WHO), con la iniciativa para el desarrollo de fármacos para enfermedades abandonadas, así como otras organizaciones han desarrollado programas para incentivar el desarrollo de nuevos antibióticos. Debido a la importancia de la necesidad de nuevos antibióticos WHO creó una lista en la que enumeraba por prioridad las bacterias resistentes a antibióticos para investigar y desarrollar nuevos fármacos. Este ha sido el primer esfuerzo para hacer este tipo de lista a nivel mundial, con el motivo de priorizar y facilitar la investigación en esta área. En esta lista las primeras cuatro especies son *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos; *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. con resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Cabe resaltar en esta lista que la mayoría de los organismos presentan resistencia a antibióticos β -lactámicos [23], [24]. Diferentes programas como el *antimicrobial surveillance program* de SENTRY y el *Global antimicrobial surveillance program* de WHO han reportado un aumento de bacterias con resistencia a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos en distintas partes del mundo [25], [26]. Debido a que este es un problema de salud a nivel mundial, la investigación de los elementos que permiten la resistencia a estos antibióticos,

como β -lactamasas, se ha incrementado. Los principales mecanismos de resistencia a antibióticos son degradación del antibiótico β -lactámico, bombas de flujo y modificación de la PBP, para reducir la afinidad por el antibiótico. El mecanismo predilecto por las bacterias es el desarrollo de enzimas capaces de degradar estos antibióticos. Estas enzimas son llamadas β -lactamasas [7].

2.2 β -lactamasas

Las β -lactamasas (EC 3.5.2.6) son enzimas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de diferentes antibióticos β -lactámicos. Debido a la presión selectiva constante a la que se encuentran sometidas estas enzimas, existen una gran variedad de β -lactamasas [27]. Diferentes β -lactamasas tienen especificidades distintas hacia los tipos de antibióticos β -lactámicos. Es esta variedad en sus sustratos, así como la plasticidad para poder cambiar de sustrato preferente con pocas mutaciones, que convierte a las β -lactamasas en un tema de interés a nivel de salud pública, ya que pueden brindar resistencia a distintos grupos de antibióticos β -lactámicos [28]. Las β -lactamasas son el principal mecanismo de resistencia a antibióticos y el más eficiente, en algunas β -lactamasas la actividad llega a estar limitada por difusión [29]. Estas enzimas se encuentran agrupadas en cuatro clases (clases A-D), con excepción de la clase B, todas pertenecen a la familia de las hidrolasas de serina reactiva. Se ha acumulado evidencia estructural de que las β -lactamasas descendieron de las PBPs; y se ha demostrado que cada clase de β -lactamasa se derivó de una clase diferente de PBP, lo que nuevamente evidencia la gran variabilidad que existe de β -lactamasas [15], [30]. Las PBPs y las β -lactamasas comparten el mismo mecanismo de acilación, pero a diferencia de las β -lactamasas, las PBPs no poseen un mecanismo de desacilación [15].

2.2.1 Clasificación de las β -lactamasas

Debido a la importancia médica que tienen estas enzimas se han propuesto múltiples clasificaciones a lo largo de los años tomando en cuenta distintos criterios, actualmente las más usadas son la clasificación de Bush, también llamada funcional, y la clasificación propuesta por Ambler, también llamada molecular. La clasificación funcional, se basa en su perfil catalítico y de inhibición, y a que las β -lactamasas no pueden degradar todos los antibióticos con anillo β -lactámicos, esta clasificación es principalmente usada a nivel clínico. La clasificación molecular se basa en el mecanismo catalítico y en la secuencia primaria [31].

2.2.1.1 Clasificación funcional

En la clasificación funcional de Bush las β -lactamasas se encuentran divididas según su sustrato e inhibición [31]–[33]. Esta clasificación esta subdividida en cuatro grupos: el grupo 1 incluye a las

cefalosporinas que no son inhibidas por ácido clavulánico ni EDTA, son cromosomales, y se encuentran principalmente representadas en la familia *Enterobacteraceae*, e hidrolizan de manera más eficiente cefalosporinas que la benzilpenicilina. Cuando son producidos en altas cantidades, los miembros del grupo 1 pueden otorgar resistencia a carbapenémicos. El grupo 2 incluye a las cefalosporinas, las penicilinas y las β lactamasas de amplio espectro; representan al grupo más grande de β -lactamasas y se encuentran divididos en diversos subgrupos que dependen de los substratos preferidos, así como de su habilidad de hidrolizar diferentes grupos de antibióticos β -lactámicos. El subgrupo 2a representa a las β -lactamasas de espectro limitado, 2b contiene a las β -lactamasas que son capaces de hidrolizar penicilinas y las primeras cefalosporinas; 2be es donde se encuentran las β -lactamasas de espectro extendido; 2br es el subgrupo en donde se han encontrado β -lactamasas con resistencia a inhibidores clásicos; 2ber presentan el fenotipo de espectro extendido y de resistencia a inhibidores, los grupos 2c y 2ce representan a las β -lactamasas capaces de degradar carbenicilina y carbenicilina de espectro extendido respectivamente, el subgrupo 2d y 2de representan a las β -lactamasas capaces de degradar oxacilina y oxacilina de espectro extendido; en el subgrupo 2e se encuentran las cefalosporinas y en el grupo 2f las carbapenemasas [31]–[35]. El grupo 3 está formado por las metalo- β -lactamasas y actualmente han sido muy estudiadas por ser capaces de hidrolizar casi todos los antibióticos β -lactámicos y no ser inhibidos por los inhibidores clásicos. El grupo 3 se divide en dos subgrupos, el subgrupo 3a se caracteriza por tener dos iones de Zn^{+2} en su sitio activo, mientras que el subgrupo 3b se caracteriza por tener solo un ion de Zn^{+2} en su sitio activo [32], [36].

2.2.1.2 Clasificación molecular

Esta clasificación basada en el mecanismo catalítico y secuencia primaria fue propuesta por Ambler en 1969 [6], [37]. En cuanto al mecanismo catalítico, Ambler las divide en dos grandes grupos, las que utilizan una serina catalítica y las que utilizan iones de Zn^{+2} para realizar la catálisis. En la clasificación según la secuencia primaria, Ambler las divide en cuatro clases: A, B, C y D; de las cuales las clases A, C y D comparten similitudes estructurales con las PBPs, estas tres son las que cuentan con una serina conservada en su sitio activo; y la clase B, que se diferencia de las demás ya que requiere cationes de metales divalentes, Zn^{+2} en específico, para llevar a cabo la reacción [3], [38]. En la Tabla 1 se muestran las dos diferentes clasificaciones, así como la relación que existe entre la clasificación funcional y molecular de β -lactamasas, lo que permite tener un panorama amplio de estas dos clasificaciones utilizadas extensivamente en la literatura.

Tabla 1 Comparación entre las clasificaciones de β -lactamasas. Modificado de Bush *et al.* 2010

Bush-Jacoby <i>et al.</i> (2009)	Clase molecular	Substratos distintivos	Inhibidos por	
			Ácido Clavulánico o Tazobactam	EDTA
1	C	Cefalosporinas	No	No
1e	C	Cefalosporinas	No	No
2a	A	Penicilinas	Sí	No
2b	A	Penicilinas y las primeras cefalosporinas	Sí	No
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido Mnobactams y penicilinas	Sí	No
2br	A	Penicilinas	No	No
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido Mnobactams y penicilinas	No	No
2c	A	Carbanecilina	Sí	No
2ce	A	Carbenicilina y cefepime	Sí	No
2d	D	Cloxacilina	Variable	No
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No
2df	D	Carbapenems	Variable	No
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Sí	No
2f	A	Carbapenems	Variable	No
3a	B	Carbapenems	No	Sí
3b	B	Carbapenems	No	Sí

2.3 β -lactamasas de clase A

De las cuatro clases, la más estudiada es la clase A por poseer mayor cantidad de miembros descritos en la literatura y por ser encontrada con una mayor incidencia en análisis clínicos. Las β -lactamasas de la clase A han sido encontradas tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, ya sea en el periplasma, unidos a la célula o secretado fuera de ésta; y el gen que codifica para este tipo de enzimas puede ser encontrado tanto en plásmidos como en el cromosoma, y cuenta

con carbapenemasas, cefalosporinasas, penicilinasas y β -lactamasas de espectro extendido [6][39]. El uso extendido de antibióticos con anillo β -lactámico, ha promovido la selección de poblaciones bacterianas con capacidad de producir enzimas que catalizan la hidrólisis de éstos [40]. Se ha visto un incremento en los porcentajes globales de microorganismos productores de ESBLs; de un 5.8% reportado en el 2004, hasta un 15.5% en 2013. A nivel mundial, los principales cultivos aislados de microorganismos productores de ESBLs han sido de *Klebsiella pneumoniae* con 20.4% y *Escherichia coli* con un 14%, datos que corresponden a infecciones nosocomiales [41]. Se ha reconocido que la producción de ESBLs no solo es relevante en infecciones nosocomiales sino también en muchas otras infecciones por ejemplo las del tracto urinario [42], convirtiéndose en uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial [40]. El programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY ha reportado una alta prevalencia de microorganismos productores de ESBLs en América latina [43]. Específicamente en México se han encontrado cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de ESBLs, específicamente de las familias SHV, TLA y CTX-M; las cuales se han reportado en hospitales de varios estados de México [13], [14].

Debido a su importancia en salud pública, las β -lactamasas de clase A han sido ampliamente estudiadas mediante resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés), mutagénesis, cristalografía y dinámica molecular, esto con el fin de conocerlas mejor y poder diseñar mejores fármacos [45]–[56]. La obtención de esta información ha permitido caracterizar y conocer de manera profunda a las β -lactamasas de clase A, elucidando el mecanismo catalítico, el mecanismo de inhibición y la forma en la que se une y reconoce a los diferentes antibióticos [54], [57]–[64]. Las β -lactamasas de clase A se distinguen de las demás, a nivel estructural y de secuencia por tener cuatro motivos conservados, los cuales son: S70-X-X-K73, S130-X-N132, K234-T235/S234-G235 y un asa Ω , que se caracteriza por la conservación del residuo Glu166. El motivo S70-X-X-K73 incluye a la serina catalítica la cual se acila y desacila durante la hidrólisis del antibiótico β -lactámico. Las β -lactamasas de clase A siguen un mecanismo catalítico ácido-base e involucra un ataque nucleofílico por parte de la Ser70, después de una activación por la Lys73, en el carbono del grupo carbonilo del anillo β -lactámico, resultando en un intermediario tetraédrico que se colapsa y da como resultado un complejo acil-enzima (Fig. 3). La desacilación y la regeneración de la β -lactamasa ocurren mediante la activación de una molécula de agua por parte del Glu166, la cual realiza un ataque nucleofílico desacilando la serina y dando como resultado al antibiótico desactivado. La molécula de agua activada ataca al carbono del carbonilo en el intermediario acil-enzima y dona un protón a la Ser70, terminando así el ciclo catalítico [38], [16]. Como es de esperarse, los cuatro motivos conservados en las secuencias de las β -lactamasas de la Clase A

cumplen funciones importantes para realizar la hidrólisis del anillo β -lactámico y todos se encuentran en el bolsillo catalítico. Como ya se ha mencionado antes, los residuos clave para la catálisis son la Ser70, la Lys73 y el Glu166; el primero es el residuo catalítico, mientras que el segundo es el residuo encargado de estabilizar el alcóxido la Ser70 lo que permite la acilación y el último residuo es encargado de activar el agua encargada de la desacilación [57]. La función de los otros residuos conservados también ha sido caracterizada. La Ser130 es de importancia para el transporte de protones de la Lys73 y así tener este último residuo en un estado desprotonado lo que le permite activar a la Ser70. También se ha reportado que la Ser130 puede estabilizar una conformación específica de la Lys73, para que este último no interfiera en la reacción de desacilación, y es por esta función que es común encontrar a la Ser130 en diferentes conformaciones [59]. Los residuos conservados Lys234 y Thr235 contribuyen a la formación de puentes salinos y estabilización del sustrato en la cavidad del sitio activo; estos residuos han sido importantes al analizar la unión del sustrato así como de los inhibidores de esta enzima [45], [65].

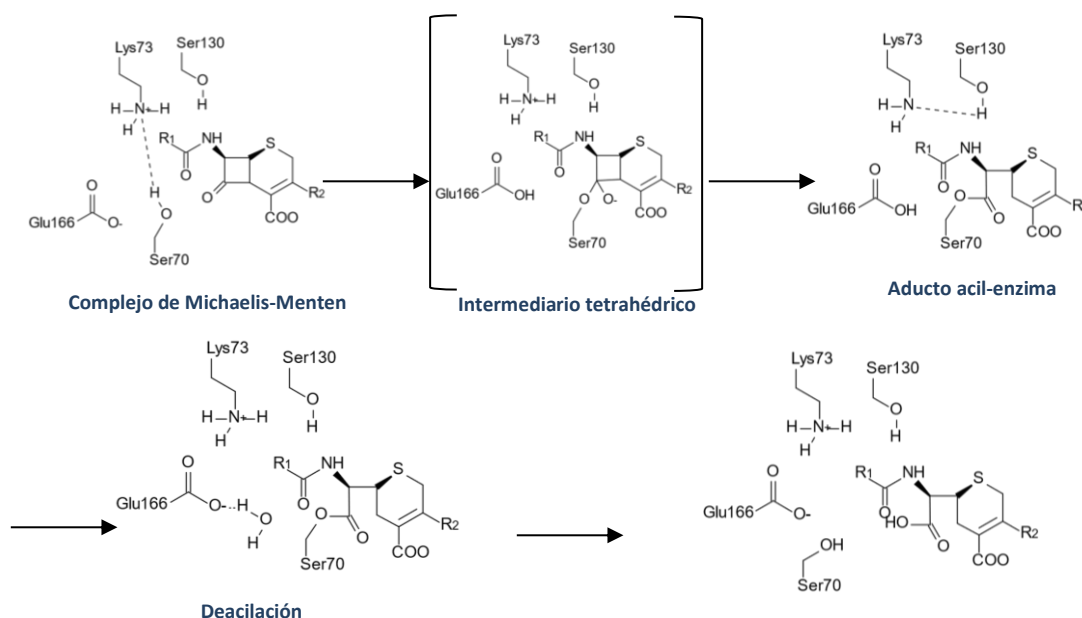


Figura 3. Mecanismo catalítico de las β -lactamasas de clase A, modificado de Matagne et al. 1998

Como ya se mencionó previamente, las β -lactamasas de Clase A son inhibidas por moléculas llamadas inhibidores clásicos. Estos inhibidores son llamados así debido a que el primer paso de la inhibición consiste en la acilación del compuesto por medio de la Ser70, al igual que los sustratos. Los inhibidores clásicos son el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Fig. 5). Estos inhibidores son los más usados a nivel clínico y suelen usarse en combinación con otros antibióticos β -lactámicos con los cuales muestran sinergismo [66]. El ácido clavulánico fue aislado por primera

vez de *Streptomyces clavuligerus* y es un compuesto β -lactámico capaz de inhibir β -lactamasas [67]. La estructura del ácido clavulánico contiene todas las características de un sustrato de una β -lactamasa, con dos diferencias significativas: tiene un átomo de oxígeno en lugar de un átomo de azufre en la posición 1 y un doble enlace en la posición 2. El tazobactam y el sulbactam son ambos sulfonas, y esto impide el rompimiento del anillo β -lactámico. Debido a la importancia médica, se han estudiado los mecanismos de inhibición ampliamente y esta información ha sido usada para el

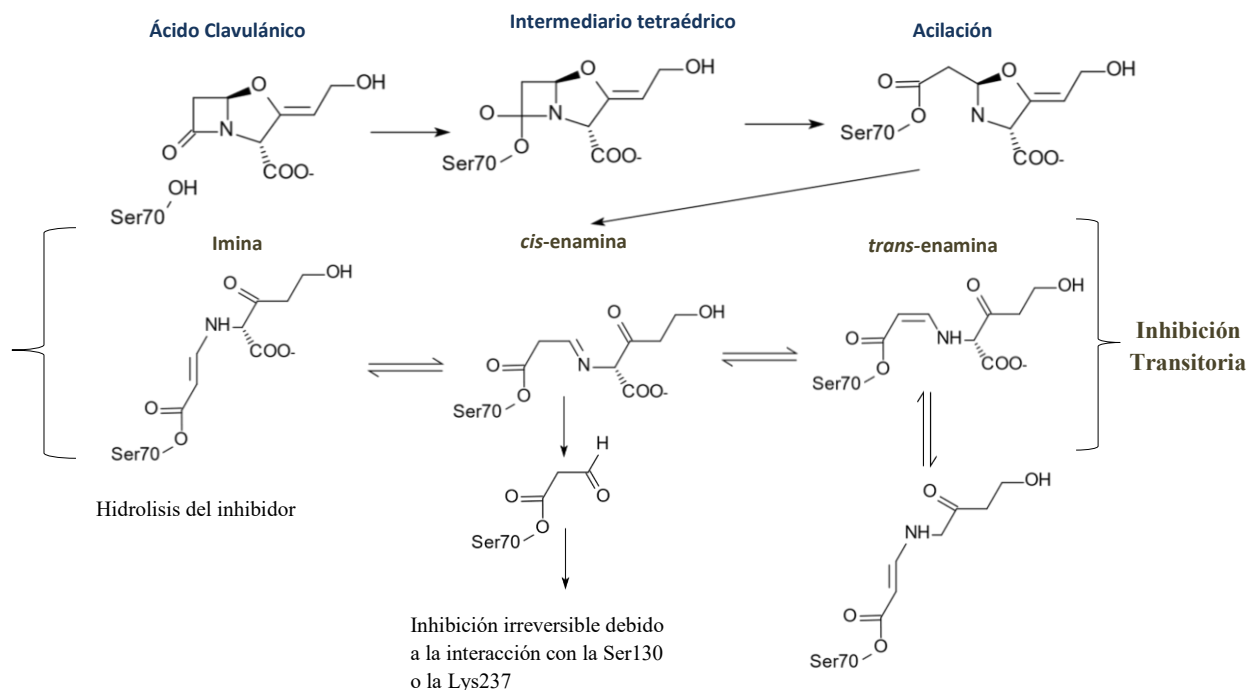


Figura 4. Mecanismo de inhibición propuesto por Kuzin, donde se proponen tres resultados de la interacción del inhibidor: la hidrólisis del inhibidor, una inhibición transitoria y una inhibición irreversible dado por la acilación de la Ser130

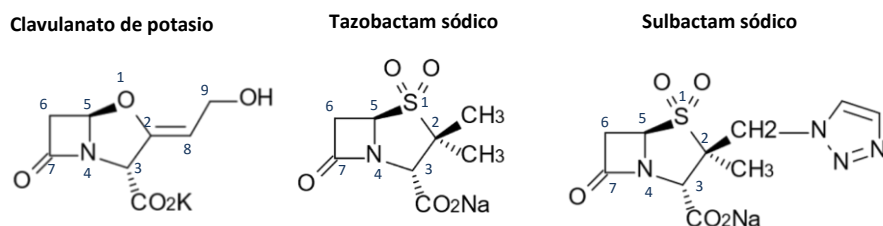


Figura 5. Inhibidores de mecanismo de β -lactamasas comunes

diseño de fármacos. El mecanismo de inhibición es complejo y está compuesto de varios intermediarios, los cuales pueden dar dos resultados, una inhibición transitoria y una inhibición irreversible; en el caso de las sulfonas también existe la opción de la hidrólisis del inhibidor como sustrato (Fig. 4) [62], [63]. La inhibición comienza al igual que la catálisis, con la activación de la Ser70 por parte de la Lys 73 para romper el anillo β -lactámico y generar un intermediario acil-

enzima. En el caso del ácido clavulánico, el siguiente paso consiste en una serie de reacomodos los cuales resultan en un intermediario iminio y consecuentemente la ruptura del anillo oxazol. En este punto la reacción puede tener dos resultados, la inactivación irreversible debido a la captura de la Ser130, y la otra parte que lleva a la formación de una especie enamina [67]. En el caso de las sulfonas, después de la formación del intermediario acil-enzima sigue el rompimiento del anillo tiazolidina, si el grupo acil-enzima sigue la ruta de desacilación un intermediario tiemina es formado y se hidroliza de manera espontánea. Otro camino que puede seguir la reacción es debido a la tautomerización la cual da como resultado la formación de una enamina, generando una inhibición transitoria en el mecanismo propuesto por Kuzin *et. al* 2003 y puede resultar en una inhibición irreversible debido a una unión covalente con la Ser130 o con la Lys237 (Fig. 4) [67], [69]–[73]. Aunque la inhibición de las β -lactamasas por inhibidores clásicos ha sido muy estudiada aún hay muchos aspectos que se desconocen sobre el mecanismo de inhibición y que es interesante entender, como la función de la Ser130 en la reacción de inhibición. Otro aspecto muy poco entendido es la resistencia a inhibidores que no se conoce bien el mecanismo. Estudios de β -lactamasas resistentes a inhibidores han señalado que la Ser130 es uno de los residuos más importantes para la resistencia a antibióticos [63], [74]. Mediante dinámica molecular se ha propuesto que las mutantes en la Ser130 causan una desestabilización del asa SDN y que puede ser esto la causa de resistencia a inhibidores [46]. Otras mutantes resistentes a inhibidores han sido reportadas, pero solo la de Ser130 ha sido reportada en las familias TEM, SHV y CTX-M.

Las β -lactamasas clase A se han vuelto de importancia como molécula modelo para distintos estudios, desde bioquímicos, clínicos y estructurales, así como modelo para diseñar mejores métodos computacionales para realizar simulaciones, donde se han utilizado para probar el método llamado *docking* de Boltzmann, el cual permite evaluar estados ocultos, que no se pueden observar en las estructuras cristalográficas, y como modelo en estudios de replegamiento para poder evaluar y describir diversos estados conformacionales, en especial estados de glóbulo fundido [28], [75], [76].

2.3.2 Clasificación estructural de las β -lactamasas de la Clase A

En el 2016, Philippon propuso una clasificación de las β -lactamasas de clase A, basada tanto en secuencia como en elementos estructurales [77]. En esta clasificación Philippon propuso dos subclases de β -lactamasas de clase A, la subclase A1 y la subclase A2. La mayor parte de las β -lactamasas de clase A pertenecen a la subclase A1; esta subclase ha sido estudiada a profundidad y los principales representantes son los grupos de β -lactamasas TEM, SHV y CTX-M. La subclase A2 ha sido muy poco estudiada y las únicas estructuras conocidas de esta subclase son la de PER-

1 y PER-2 [11], [12]. Estas estructuras demostraron ser diferentes, ya que la conformación del enlace peptídico entre el Glu166 y el residuo 167 es *trans* en lugar de *cis*, conformación que se encuentra conservada en la subclase A1. Aunque se ha observado que en las familias TEM y CTX-M el residuo 167 puede ser una Pro, en otras familias como SHV es una Thr y lo que se ha visto es que este cambio de conformación se da por el cambio de la Asn en la posición 136, en la subclase A1, por una Asp, en la subclase A2, en la posición 136 (Fig. 6a). Otra diferencia es que en la subclase A2 existe una inserción en el asa entre la lámina β -3 y β -4 (fig. 6b). Se cree que estas características confieren una ampliación en la entrada de la cavidad del sitio activo, lo que permite la hidrólisis de sustratos más voluminosos como las cefalosporinas. Otro hecho importante es que las ESBLs de la subclase A2 no comparten los residuos que otorgan el fenotipo de ESBLs en la subclase A1, lo cual se profundizará más adelante [12], [77].

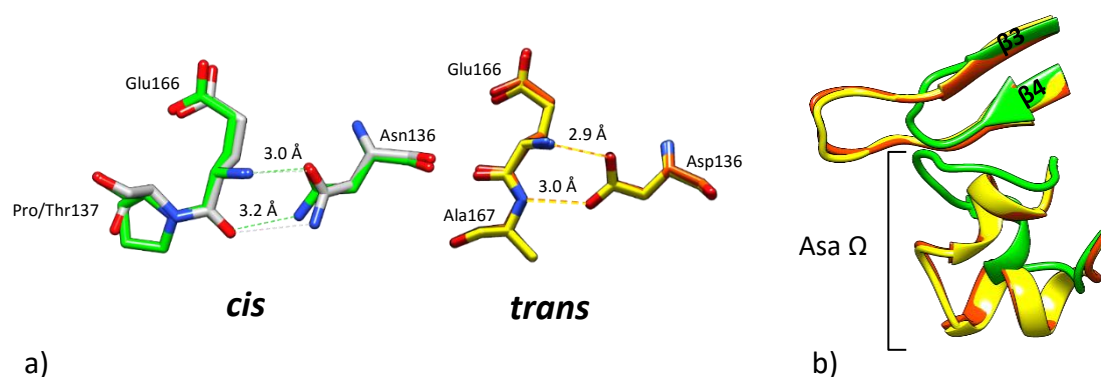


Figura 6. Comparación de la conformación del asa Ω entre las β -lactamasas de subclase A1 y la subclase A2. a) Comparación entre el enlace *trans* entre Glu166-Ala167 y sus respectivos puentes de hidrogeno con Asp136 en PER-1 (amarillo) (PDB 1E25) y PER-2 (en naranja) (PDB 4D2O); y el enlace *cis* encontrado normalmente entre los residuos 166 y 167 de otras β -lactamasas de miembros de la subclase A1 representados por TEM-1 (verde) (PDB 1CK3) y SHV-1 (gris) (PDB 1SHV). b) Comparación de la entrada del sitio activo entre miembros de la subclase A2 representados por PER-1 (amarillo) (PDB 1E25) y PER-2 (naranja) (PDB 4D2O); y un miembro de la subclase A1 representadas por TEM-1 (verde) (PDB 1SHV).

2.3.3 Asa Ω

El asa omega (Ω) es una estructura secundaria no regular que se encuentra en proteínas globulares casi de manera exclusiva en la superficie. Se caracterizan por una cadena que forma un asa en tres dimensiones que es similar a la letra Ω del alfabeto griego. Originalmente su descripción fue basada en la observación de estructuras secundarias no regulares compactas. Estas no contienen patrones regulares de puentes de hidrógeno, sin embargo, contienen un número moderado de estos lo que los hace relativamente estables [78], [79]. Se sabe que el asa Ω se encuentra involucrada de manera frecuente en la función de la proteína y en el reconocimiento molecular, y se ha sugerido que pueden estar involucradas en el proceso de plegamiento. En la definición original el tamaño del asa es de 6 a 16 residuos, sin embargo se han descrito ejemplos con longitudes mayores [80].

Como se ha mencionado antes, en las β -lactamasas de clase A el asa Ω es de suma importancia ya que se encuentra asociado al sitio activo debido a que contiene un residuo catalítico clave, el Glu166. El asa Ω de las β -lactamasas de clase A se caracteriza por tener una conformación *cis* en el enlace peptídico entre el Glu 166 y el residuo 167, la conformación en *cis* se encuentra altamente conservada en la mayoría de las β -lactamasas de clase A, aunque existen excepciones a esta regla donde el enlace es *trans* [18], [19]. La subdivisión de la clase A se basa en la adquisición de una conformación *trans* en lugar de *cis* lo que ha convertido a esta subclase en un tema de interés [11], [12], [77].

Se ha reportado que el asa Ω es de gran importancia para el reconocimiento del sustrato y se piensa que es uno de los factores que determinan el perfil catalítico de cada β -lactamasa de Clase A, ya que mutaciones puntuales en la vecindad de esta asa, así como inserciones en tándem demuestran un cambio drástico en el perfil, dando como resultado el fenotipo de ESBL [81]. También se ha demostrado que las mutaciones que otorgan el fenotipo de ESBL son aquellas que hacen que el asa Ω sea más rígida [28]. En cambio, hay otros reportes que indican que estas mutaciones hacen que el asa Ω sea más flexible y se ensanche, lo que permite que antibióticos más grandes puedan ser hidrolizados[81], [53].

2.4 ESBLs

Dentro de la clase A de Ambler y el grupo 2be de Bush, se encuentran las β -lactamasas de espectro extendido (ESBL); éstas se han detectado en diversos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, aunque se han encontrado en otras familias representadas por las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Originalmente el término de β -lactamasa de espectro extendido era usado para designar a aquellas β -lactamasas que se derivaran del grupo funcional 2b y por medio de mutaciones puntuales obtuviera el fenotipo de espectro extendido (como las β -lactamasas de la familia TEM-1 y SHV-1). La nueva definición acuñada por Livermore en 2008 señala que las ESBLs son todas aquellas β -lactamasas capaces de hidrolizar y conferir resistencia a los antibióticos que tienen aminotiazol-oxima [82], [20].

Las β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs) son aquellas capaces de conferir resistencia bacteriana a penicilinas y cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación debido a que tienen la habilidad de hidrolizar el grupo β -lactámico de estos antibióticos [40]. La mayoría de las ESBLs pertenecen a la subclase estructural A1 y son representadas por las familias TEM, SHV y CTXM. Estas familias obtuvieron el fenotipo de ESBL debido a mutaciones puntuales que fueron cambiando su perfil catalítico hasta poder hidrolizar cefalosporinas, y la mayoría de éstas se

encuentran cerca del sitio catalítico o del asa Ω [28]. Aunque la mayor parte de las ESBLs aisladas son de los tipos TEM, SHV o CTX-M, muchas ESBLs no se encuentran relacionadas a ninguna de las tres familias establecidas, y no son derivadas de mutantes puntuales de ninguna familia previamente reportada [20]. Estas enzimas son llamadas ESBLs menores porque no son tan abundantes como las familias SHV, TEM y CTX-M y varias pertenecen a la subclase estructural A2 [23][75]. Algunas como la familia PER han empezado a aparecer de manera más frecuente en regiones de Turquía. Las β -lactamasas de la subclase A2 presentan actividad de ESBL de manera intrínseca, algunos ejemplos son las familias TLA, PER, y VEB [5], [40].

El fenotipo de ESBL en las β -lactamasas de Clase A ha sido estudiado extensamente, y se ha observado que diferentes β -lactamasas han llegado de manera convergente, por distintos mecanismos, a este fenotipo. Las enzimas de la familia TEM y SHV han sido las más estudiadas y se ha determinado que las mutaciones que generan el fenotipo de ESBL se encuentran en residuos clave del asa Ω o de la horquilla entre la lámina β -3 y β -4. Las mutaciones más comunes que otorgan el fenotipo de ESBL en la familia TEM se encuentran en las posiciones, 104, 164, 238, y 240 mientras que en la familia SHV se encuentran en las posiciones 238, 240 y 179 según la nomenclatura de Ambler (Fig. 7a). Se piensa que estas mutaciones generan una expansión del sitio activo, aunque simulaciones por dinámica molecular y por *docking* de Boltzmann han sugerido que es más bien una rigidez en el asa Ω lo que permite que se acomoden cefalosporinas en el sitio activo [1], [28]. Un ejemplo de un mecanismo diferente es el caso de las enzimas CTX-M, ya que se ha reportado que un acomodo distinto del sustrato permite un cambio conformacional que rompe un

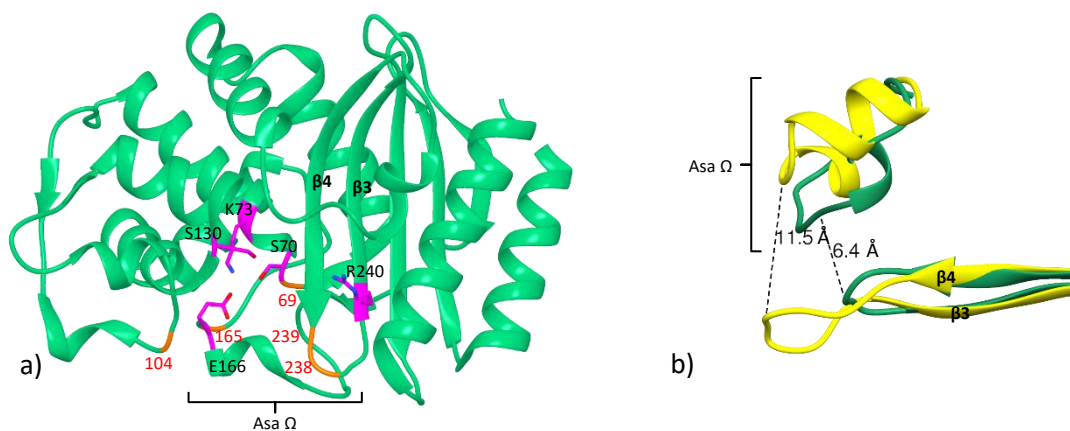


Figura 7. Modificaciones que causan el fenotipo ESBL en las distintas subclases de β -lactamasas. a) Se muestran en naranja las posiciones más comunes donde caen mutaciones que otorgan el fenotipo de ESBL en TEM (verde), nombrados con la numeración de Ambler; en magenta se muestran los residuos involucrados en la catálisis. b) Comparación de la entrada del sitio activo entre TEM-1 (verde), como representante de la subclase A1 y PER-1 (amarillo), como representante de la subclase A2, conformada por el asa Ω y la horquilla entre las láminas β 3 y β 4. En negro se encuentran marcadas las distancias entre estos dos elementos estructurales.

punto de hidrógeno entre la Asn170 y Asp240; esta ruptura de los puentes de hidrógeno ocasiona una expansión del sitio activo y permite, a su vez, un mejor acomodo del sustrato en el bolsillo catalítico [21], [54]. Otro mecanismo reportado para la obtención del mecanismo ESBL es el de las β -lactamasas de la subclase A2, que como ya se ha mencionado antes tienen una conformación diferente en el asa Ω así como una inserción en la horquilla entre la lámina β -3 y β -4 lo que permite una expansión del sitio activo y por lo tanto un mejor acomodo de los antibióticos como las cefalosporinas (Fig. 7b) [37], [38], [46].

3 TLA-1

Durante los años 1992 y 1993 en México, varios aislamientos clínicos resistentes a múltiples fármacos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, fueron identificados como productores de ESBL debido a su susceptibilidad a antibióticos β -lactámicos en presencia de ácido clavulánico. De estos aislamientos se detectó la existencia de una β -lactamasa mediada por plásmido y con un pI teórico de 8.9, la cual no se encontraba relacionada con las familias TEM, SHV o CTM-X [21].

En el año 2000, Silva y colaboradores caracterizaron esta β -lactamasa de espectro extendido (ESBL), designándola TLA-1 [84]. Esta enzima se caracteriza por hidrolizar cefotaxima, tiene un pI de 9 y un peso molecular de 31.4 kDa. El plásmido en el cual se encuentra la secuencia que codifica para esta proteína es de 150 kpb. Fue llamado RZA92 y cotransfiere resistencia a antibióticos beta lactámicos, kanamicina, tetraciclina, estreptomycin y cloranfenicol. La ESBL TLA-1 se identificó como una beta-lactamasa de clase A, según la clasificación de Ambler, ya que tiene los cuatro elementos conservados: Ser⁷⁰-X-X-Lys⁷³, Ser¹³⁰-X-Asn¹³², Glu¹⁶⁶ en el asa Ω y Lys²³⁴-Thr²³⁵. También se realizaron experimentos cinéticos con TLA-1 con antibióticos β -lactámicos, encontrándose que tiene una mayor eficiencia catalítica relativa con la cefalotina, seguido por cefotaxima y bencilpenicilina (Fig. 8). Fue inhibida más fuertemente por tazobactam que por ácido clavulánico o sulbactam (Fig. 5). Las actividades hidrolíticas fueron similares a la de CME-1 y VEB-1 [84]. Los parámetros cinéticos de TLA-1 son interesantes ya que sus constantes

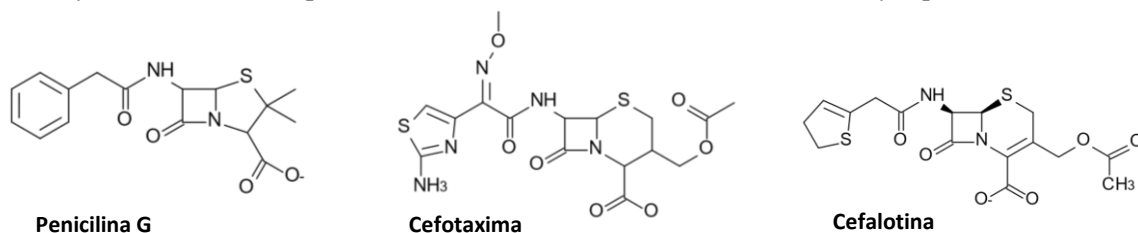


Figura 8. Estructuras de los antibióticos β -lactámicos que actúan como mejores sustratos para TLA-1, reportado por Silva *et al.*

de inhibición para tazobactam y ácido clavulánico son de un orden de magnitud mayor a las de PER-1 y PER-2, las estructuras representativas de la subclase A2 [5], [12], [83].

A lo largo de los años se han obtenido varias estructuras tridimensionales, la mayoría cristalográficas, de ESBLs, entre ellas está la PER-1 la cual fue reportada en el año 2000 por Tranier y colaboradores [83]. La secuencia de PER-1 es la que muestra mayor identidad con TLA-1 en estructuras que se encuentran almacenadas en el *Protein Data Bank* (PDB). La estructura de PER-1 demostró tener características distintivas comparadas con otras ESBLs las cuales son: una conformación diferente en el asa Ω la cual, consta de un cambio en la conformación de *cis* a *trans* en el enlace peptídico entre los residuos Glu 166 y Lys 167, conformación que no había sido observada en ninguna estructura anterior a esta, la otra característica distintiva son tres inserciones. El cambio de conformación de *cis* a *trans* en el asa Ω se debe a la mutación de una asparagina altamente conservada en la posición 136 por un ácido aspártico en PER-1, esto ocasionó a su vez que se formaran dos hélices en el asa Ω , a pesar de este cambio estructural la nomenclatura de esta asa se mantiene (Fig. 6). Esta región contiene estructuras secundarias altamente organizadas, que consiste en la formación de dos hélices cortas y una lámina β antiparalela. Este nuevo plegamiento del asa Ω da como consecuencia un incremento significativo en el tamaño del sitio de unión. Tranier clasificó a TLA-1 dentro del grupo de las ESBLs parecidas a PER [83].

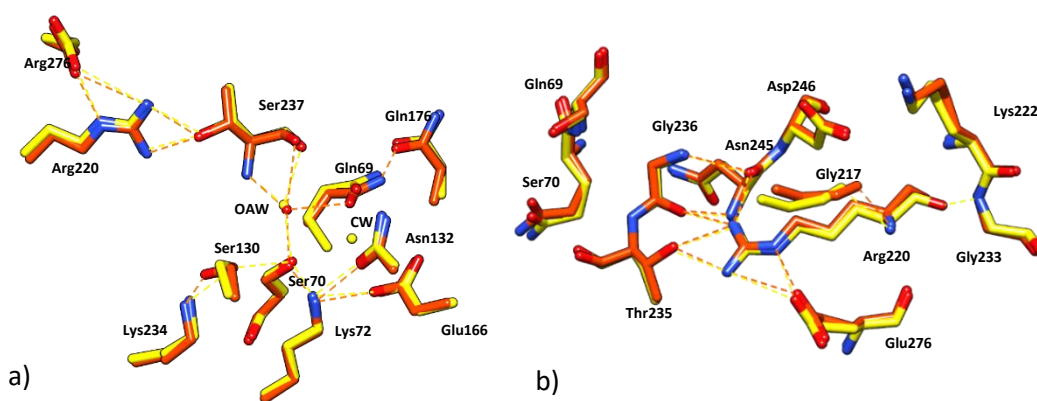


Figura 9. Sitio activo de las β -lactamasas PER-1 y PER-2. a) Comparación del sitio activo de PER-1 (amarillo) (PDB 1E25) y PER-2 (rojo) (PDB 4D2O), donde se marcan los principales puentes de hidrógeno, donde se incluyen el agua oxianión (AOA) (en amarillo para PER-1 y en rojo para PER-2) y el agua catalítica (AC) (amarillo), así como la red de puentes de hidrógeno Ser70-Gln69-OAW-Thr237-Arg220; solo se muestran las cadenas laterales. b) Posición de la Arg220 que permite la formación de una red de puentes de hidrógeno con residuos circundantes.

En el año 2014, Ruggiero y colaboradores reportaron la estructura de PER 2, la cual comparte una identidad de secuencia de 42% con TLA-1. En este trabajo Ruggiero describe la misma conformación del asa Ω que Tranier así como una inserción entre la lámina $\beta 3$ y $\beta 4$, lo que le confiere una ampliación en la entrada del bolsillo en el sitio activo, al igual que el reportado para otras β -lactamasas [12]. En este mismo trabajo Ruggiero describe características que probablemente se encuentren involucradas con la estabilización del sitio activo. Describen una molécula de agua que estabiliza la extensión del asa entre las láminas $\beta 3$ y $\beta 4$. Tranier también describe dos redes de puentes de hidrógeno importantes, los cuales, propone que estabilizan el sitio activo. La primera red se da entre la Lys222, la Arg220 y la Thr237 (Fig. 9a). La segunda red se da entre el Gln69, una molécula de agua y la Ser 70 (Fig. 9b). Este descubrimiento es importante,

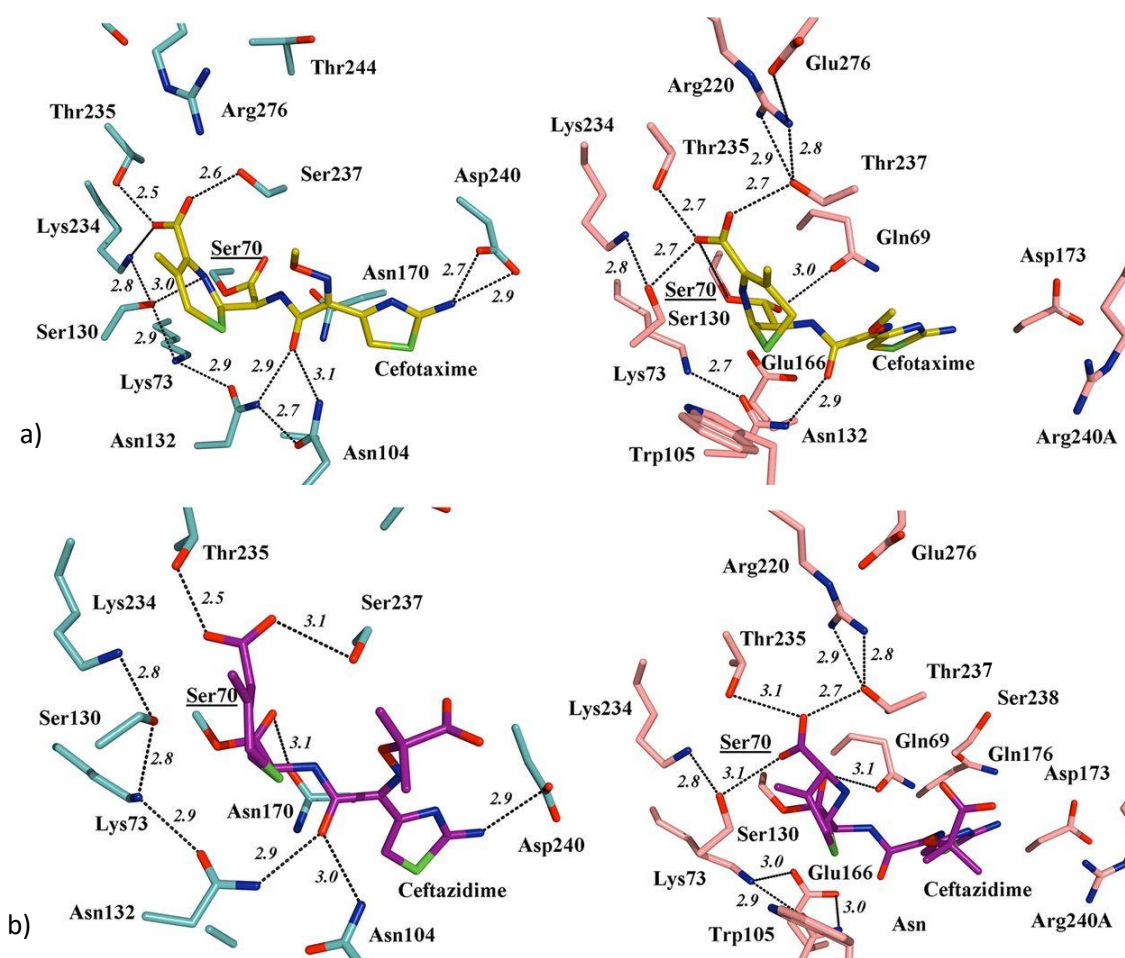


Figura 10. Comparación de TOHO-1 en complejo con cefotaxima y ceftazidima, con simulaciones de minimización de energía de PER-2 unidas a cefotaxima y ceftazidima. a) A la izquierda, sitio activo de TOHO-1 (aqua) en complejo con cefotaxima (amarillo), indicando los puentes de hidrógeno (PDB 1IYO). A la derecha, se encuentra el modelo de la simulación de PER-2 (rosa) y el posicionamiento probable de la cefotaxima en el sitio activo. b) A la izquierda, sitio activo de TOHO-1 en complejo con la ceftazidima (magenta) donde se encuentran indicados los puentes de hidrógeno (PDB 2ZQD). A la derecha se encuentra el modelo de la simulación con PER-2 donde se muestra la posición predicha de la molécula. Tomada de Ruggiero *et al* 2014

porque resalta el interés en dos residuos que se habían estudiado antes, el residuo Gln69, que en PER-1 se propuso como un segundo ligando para la molécula de agua de desacilación durante la catálisis; y la Arg220 se ha determinado como importante en la unión a antibióticos. Como parte final de este trabajo, se describe un modelo simulado de PER-2 en complejo con oximino-cefalosporinas, cefotaxima (Fig. 10a) y ceftazidima (Fig. 10b); Ruggiero utilizó las estructuras de TOHO-1, de la familia CTX-M, para indicar la posición inicial de cada ligando. Una vez obtenida, se realizaron minimizaciones de energía donde el modelo sugiere que el antibiótico se encuentra estabilizado por los siguientes residuos: Gln69, Ser130, Asn132, Glu166, Thr235 y Thr237 por medio de puentes de hidrógeno (Fig. 10). Este modelo predice la existencia de una cavidad catalítica mayor que permite el acomodo del antibiótico. Ruggiero también sugiere como importantes para el acomodo del antibiótico a los aminoácidos Asp173, Gln176, la Arg240A y la Ser238 [23]. Tanto PER-1, PER-2 y TLA-1 pertenecen a la misma subclase de β -lactamasas de clase A, la cual ha sido muy poco estudiada y se ha demostrado que estructuralmente son diferentes a las β -lactamasas de clase A más estudiadas [16].

En los últimos años se han reportado en México, múltiples aislamientos clínicos de microorganismos productores de TLA-1 relacionados con infecciones nosocomiales, siendo estos *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter cloacae* lo que le da importancia creciente al estudio de esta β -lactamasa [43].

4 Justificación

En razón de que las β -lactamasas son las principales responsables de conferir resistencia a antibióticos β -lactámicos, son consideradas de importancia médica porque la presión selectiva ejercida por estos antibióticos ha ocasionado que las bacterias seleccionen β -lactamasas que les confieren la habilidad de hidrolizar antibióticos que antes no le eran posible. El estudio de las β -lactamasas ha permitido entender la manera en la que estas enzimas se adaptan para poder hidrolizar diferentes sustratos, así como analizar su funcionamiento, lo que ha permitido desarrollar antibióticos capaces de inhibir a estas enzimas. El estudio estructural de las β -lactamasas de clase A ha permitido discriminar entre dos subclases, de las cuales, la subclase A2 ha sido muy poco estudiada y cada vez ha sido reportada con mayor frecuencia en organismos con resistencia a cefalosporinas de tercera generación [85]. Otro factor de interés es la asa Ω en la subclase A2 [28]. La β -lactamasa de espectro extendido TLA-1 ha aumentado su prevalencia en microorganismos productores de ESBLs en México, lo que la hace de interés médico. Su perfil de inhibición es diferente al de las otras β -lactamasas de la subclase A2, por tener una K_i un orden de magnitud mayor para ácido clavulánico y tazobactam que la reportada para PER-1 y PER-2 [43]. Recientemente se ha reportado otra β -lactamasa en Japón con una identidad de secuencia arriba del 90% llamada TLA-3 [86]. También se han encontrado genes que codifican para β -lactamasas con una identidad de secuencia mayor al 90% en metagenomas en zonas periurbanas y en zonas rurales en Centroamérica [87]. Esto sugiere que este tipo de β -lactamasas, aunque han sido poco estudiadas, podrían tener una mayor importancia que la que se sugiere.

5 Hipótesis

La β -lactamasa de espectro extendido TLA-1 comparte similitudes de secuencia con PER-1 y PER-2 como la misma conformación el mismo residuo que otorga la conformación *trans* en el asa Ω y la inserción en el asa entre la lámina β -3 y β -4, lo que las agrupa dentro de la misma subclase A2. Sin embargo, contiene diferencias puntuales alrededor o en el asa que le otorgan su perfil catalítico y de inhibición.

6 Objetivos

6.1 Objetivo General

Determinar cristalográficamente la estructura tridimensional de la TLA-1 de *Escherichia coli* J53-2, con el fin de conocer las diferencias y similitudes que tiene este grupo de ESBLs descrita de manera reciente con otras lactamasas de distintos grupos.

6.2 Objetivos Específicos

- Diseñar un protocolo de sobreexpresión y purificación para la obtención de TLA-1 en calidad y pureza suficientes para realizar estudios cristalográficos.
- Obtener cristales de TLA-1.
- Obtener patrones de difracción de TLA-1 con una resolución suficiente para analizar su estructura.
- Determinar la estructura de TLA-1 de *E. coli*, mediante cristalografía de rayos X.
- Analizar las estructuras generadas y analizar las diferencias estructurales con otras ESBLs.

7 Materiales y métodos

7.1 Comparación de la secuencia de TLA-1 con otras β -lactamasas

Para la comparación de TLA-1 con otras secuencias de β -lactamasas se realizó un alineamiento múltiple con el servidor de ClustalW2 y se obtuvo la predicción de la estructura secundaria utilizando el servidor ESript (<http://esript.ibcp.fr/ESript/cgi-bin/ESript.cgi>) [88].

7.2 Construcción y transformación

7.2.1 Construcción pJ411::TLA-1

Se mandó sintetizar el gen de TLA-1, flanqueado por los sitios de corte de NdeI y Sall, a la compañía DNA 2.0. El producto fue clonado en el vector de expresión pJ411 el cual mide 4848 bp (Fig. 11). El vector contiene, un “cassette” de resistencia a kanamicina, un sitio de unión a ribosoma (RBS) fuerte, regulado por el operón lactosa y contiene el promotor T7. Una vez recibido, el producto fue resuspendido en 20 μ l de agua estéril quedando a una concentración final de 250 ng/ μ l.

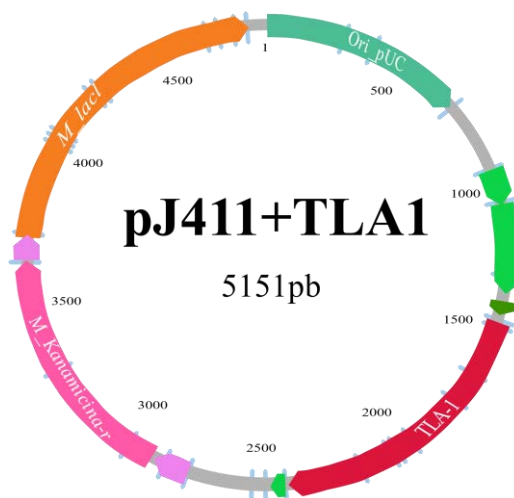


Figura 11. Mapa del vector pJ411 proporcionado por la compañía DNA 2.0

7.2.2 Transformación

Se realizó la transformación bacteriana usando electroporación a 1.6 V con 0.7 μ l de plásmido pJ411. Se probaron las siguientes cepas de *E. coli*: BL21(DE3), C41, C43, Origami y Rosetta, esto con la finalidad de evaluar la cepa que mejor sobreexpresa a la enzima. Las colonias fueron seleccionadas por su supervivencia frente a la presencia de kanamicina a 30 μ g/ml.

7.2.3 Secuenciación del gen sintético

Una vez que se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3), se aisló el plásmido usando el “GenJet Plasmid Extraction Kit” para mandarlo a secuenciar. Los oligonucleótidos usados para la secuenciación se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleotidos usados para secuenciar el gen de TLA-1 en el vector pJ411

Nombre del oligonucleótido usado	Secuencia	Posición
Fw-TLA-1	5'-GGG GGA ATC ATA TGA AAA AAC ATC-3'	1-24
Rv-TLA-1	5'-CCT AAATTA GTC GAC CTA TTT CCC-3'	932-908
TLA-1 542	5'-AAT TGG ACA ACT CCC GAC GCT ACC-3'	542-566
TLA-1 566	5'-GGT AGC GTC GGG AGT TGT CCA ATT-3'	566-542

Tabla 2. Oligonucleotidos usados para secuenciar el gen de TLA-1 en el vector pJ411

7.3 Pruebas de expresión

7.3.1 Inducción

Se realizó una prueba de inducción para cada cepa, y así evaluar la sobreexpresión de TLA-1 utilizando las condiciones recomendadas por el proveedor. El protocolo que se siguió fue el siguiente: se inoculó un matraz con medio LB y 30 µg/ml de kanamicina, con uno de los gliceroleros de las cepas mencionadas previamente, y se dejó crecer durante 12 h a 37°C con una agitación de 200 rpm. Una vez pasado el tiempo de cultivo se inoculó un matraz con medio LB con 30 µg/ml de kanamicina en una relación 50:1000 con el preinóculo. Seguido, se dejó crecer la cepa de *E. coli* a una DO₆₀₀ de 0.6 durante 2 horas a 37° C con una agitación de 250 rpm y se indujo con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1 mM, en medio LB.

Una vez elegida la cepa que mejor expresó, se realizaron pruebas donde se evaluó la inducción con IPTG a tres diferentes OD₆₀₀ (0.6, 0.7 y 0.8), utilizando una concentración de IPTG de 0.5 mM. Esta concentración se eligió ya que se realizó un barrido donde se determinó que esta era la menor concentración de IPTG donde se obtenía el mismo nivel de expresión. Al mismo tiempo se probaron tres tiempos de sobreexpresión: 4, 6 y 8 h. Se evaluaron las temperaturas de 18, 20, 30 y 37°C para la expresión de TLA-1 con la cepa que mejor sobreexpresara, con el fin de optimizar la producción de TLA-1.

7.3.2 Ruptura

Para el paso de ruptura se usaron dos protocolos; ambos constan de una modificación del protocolo reportado por Silva *et. al* en el 2000 [84]. El primer protocolo consiste en lavar dos veces la pastilla obtenida a partir de 200 ml de cultivo en 10 ml de amortiguador de lisis A (30 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, pH 8); una vez resuspendido, se centrifugó a 4,500 rpm usando un rotor JA 10 en

una centrífuga Beckman, a 4°C por 40 min. Después se resuspendió la pastilla lavada en 10 ml de amortiguador de lisis B (amortiguador de fosfatos de sodio 100 mM, pH 7.4). El segundo protocolo es similar, solo se omite el amortiguador de lisis B.

Seguido de los pasos de lavado y resuspensión se lisan las células mediante sonicación. Ésta fue llevada a cabo al 30% de amplitud, y se dieron 12 s de sonicación y 55 s de descanso durante 12 ciclos. Una vez lisadas las células se centrifugaron a 18,000 rpm durante 50 min en un rotor JA 20 en una centrífuga Beckman a 4°C. En este punto se hizo migrar la proteína de interés en una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de (SDS-PAGE) al 12% para evaluar su solubilidad. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se dializó contra 500 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7 durante 4 h.

7.4 Purificación

La purificación se realizó mediante cromatografía de líquidos, y se evaluaron dos protocolos. El primero involucra dos pasos de purificación por intercambio iónico y el segundo un paso de intercambio iónico y uno de exclusión molecular.

7.4.1 Intercambio iónico

Para la purificación se utilizó la resina de intercambio iónico. Este tipo de resinas permite separar las proteínas según su carga neta. La separación de la proteína dependerá de la carga que posea la resina y esto depende del grupo funcional presente en la resina. Las resinas de intercambio iónico se dividen en intercambio catiónico y aniónico; las primeras se encuentran cargadas negativamente y las de intercambio aniónico se encuentran cargadas positivamente. A su vez cada una de éstas se divide en intercambio fuerte o débil; esta división se basa en el grado de ionización de la resina: si se ioniza completamente es fuerte y si se ioniza parcialmente es débil. En este protocolo se utilizó la resina de intercambio catiónico débil CM-sefarsosa para aprovechar el punto isoeléctrico alto de TLA-1. Se eligió una columna de intercambio iónico débil debido a que se puede controlar el grado de ionización del grupo carboximetilo en la resina, lo que favorece una selectividad más fina. Para la cromatografía se usó una bomba peristáltica y un colector de fracciones de Bio-Rad.

Se utilizó un gradiente en pasos con las siguientes concentraciones de NaCl, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 400 mM y 500 mM. Cada concentración de sal se pasó por cinco volúmenes de columna. De manera seguida se evaluaron las fracciones obtenidas mediante un gel de SDS-PAGE al 12% y mediante pruebas cualitativas de actividad.

7.4.2 Exclusión Molecular

Como segundo paso se utilizó una columna de exclusión molecular, la cual separa a las macromoléculas según su tamaño. Este tipo de resinas son porosas y permiten que las moléculas de alta masa molecular pasen fácilmente, mientras que las moléculas de baja masa molecular pasan por los poros lo que hace que su trayectoria sea más larga y por lo tanto el tiempo en el que tardan en eluir es mayor. Para el paso de filtración en gel primero se preparó la muestra dializando de ser necesario y se concentra a aproximadamente 5 mg/ml; posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min para separar los agregados que pudiera tener la muestra. Se utilizó la resina Superdex 75 (GE) y como amortiguador se usó Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM a pH 7 filtrado con una membrana de 0.22 μm .

7.5 Pruebas de actividad

Durante el proceso de purificación se realizaron pruebas de actividad cualitativas para confirmar que la proteína sobreexpresada y purificada tuviera actividad de β -lactamasa, de manera similar a la reportada por Silva *et. al* [5]. Como sustrato se utilizó una cefalosporina cromogénica llamada nitrocefina. Este compuesto fue descrito por primera vez en 1971 por O'Callaghan *et. al* y permite realizar un ensayo espectrofotométrico rápido y confiable, así como ensayos cualitativos para monitorear la actividad de β -lactamasas [68], [89], [90]. Sin hidrolizar, la nitrocefina tiene un color amarillo y un

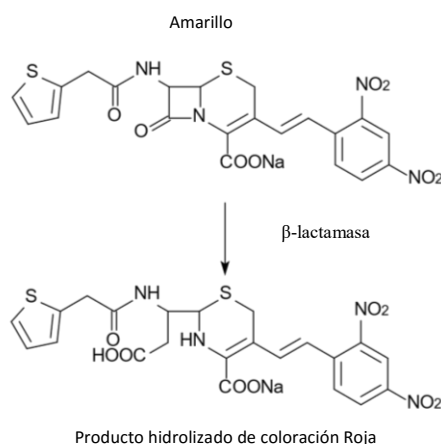


Figura 12. Reacción de hidrólisis de nitrocefina modificada de O'Callaghan por β -lactamasas.

pico de absorción máximo a una longitud de onda de 386 nm. En cambio, si hay presencia de β -lactamasas el anillo β -lactámico es hidrolizado y el pico de absorción máximo cambia de 386 nm a 482 nm y se torna de color rojo, lo que permite una medición cuantitativa y poder hacer ensayos cualitativos, debido al cambio drástico de coloración (Fig. 12) [89].

Los ensayos de actividad se realizaron utilizando una solución inicial de nitrocefina 1 mM, la cual fue diluida a 100 μM . La concentración de proteína fue de 10 mg/ml, de la cual se tomó 0.5 μl y se completó con amortiguador Tris-HCl a pH 7 para un volumen final de 40 μl . Se colocaron 10 μl de nitrocefina, se probó que esta concentración permitiera obtener una señal clara, ya que el objetivo de esta prueba solo es comprobar, de manera rápida, que la proteína sobreexpresada tiene actividad de β -lactamasa.

7.6 Cristalografía

La cristalografía de rayos X es la técnica más utilizada actualmente para la determinación de la estructura tridimensional de macromoléculas. Esta se basa en el fenómeno de difracción de rayos X.

7.6.1 Cristalización

El primer paso para lograr obtener una estructura a partir de cristalografía es la obtención de un cristal. La formación de un cristal se logra mediante la precipitación controlada de la proteína de interés por un agente precipitante, como por ejemplo NaCl o polietilenglicol (PEG). Para que ocurra la precipitación controlada se requiere llevar a la proteína a un estado de supersaturación, lo que significa que para obtener un cristal se necesita tener una concentración alta de proteína, debido a que es en el estado de supersaturación donde se puede pasar la barrera energética e iniciar la formación de núcleos para el crecimiento del cristal. Una vez formado el sitio de nucleación comienza el crecimiento del cristal donde las moléculas de proteína se van a acomodar de una manera ordenada y repetida en el espacio [91], [92]. En este caso para la cristalización se concentró la muestra hasta aproximadamente 10 mg/ml en un amortiguador Tris-HCL pH 7.4.

7.6.1.1 Barrido de condiciones

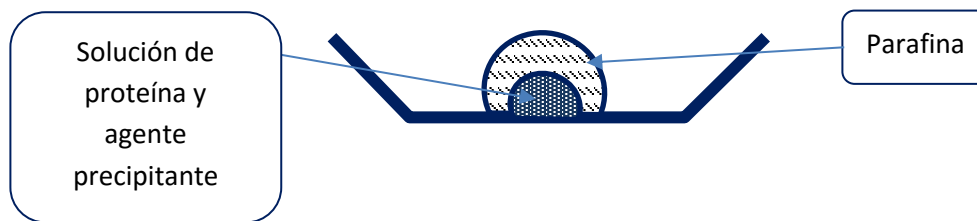


Figura 13. Diagrama del método de cristalización por microbatch

Para el barrido de condiciones de cristalización se utilizó la técnica de *microbatch*. El principio de esta técnica consiste en añadir un agente precipitante a la solución de proteína, este agente lleva a la proteína a un estado de supersaturación (Fig. 13). En este método en particular utilizamos el sistema diseñado por Chayen que consiste en crecer cristales de proteína en gotas de 2 μ l con partes iguales de proteína y agente precipitante; a las gotas se le añade un aceite que funciona para sellar la gota y prevenir la evaporación [93]. Se eligió esta técnica para el barrido de condiciones debido a que es una de las técnicas usadas en el laboratorio y la que menos agente precipitante necesita. En este trabajo para la técnica de *microbatch* se utilizó un 1 μ l de solución de TLA-1 y 1 μ l de agente precipitante para alcanzar una supersaturación de manera inmediata, luego se le colocaron 13 μ l de aceite de parafina.

7.6.1.2 Barrido de condiciones de cristalización

Para realizar la primera aproximación de las condiciones de cristalización en las cuales se puede obtener cristales de proteína, se inició por hacer un barrido de diferentes condiciones utilizando distintos *kits* de cristalización. Se utilizaron los *kits* de Rigaku (*Wizard* I, II, III y IV) así como los *kits* de Hampton Research (*index* I y II, *crystal screen* I y II, *Membfac* y *PEG-Ion*). Estas pruebas de cristalización se incubaron a una temperatura de 18 °C y los *kits* de Rigaku *Wizard* I y II a 4°C. Una vez puestas las pruebas de cristalización se revisaron cada dos semanas hasta observar cristales en una de las múltiples condiciones.

7.6.1.3 Optimización

Para realizar la optimización se utilizaron las técnicas de difusión de vapor gota apoyada y gota colgante. Las técnicas de difusión de vapor consisten en que la solución de proteína/precipitante se equilibra en un sistema cerrado con un reservorio con la condición de precipitación (Fig. 14). En esta técnica, una solución con la proteína purificada se mezcla con un mismo volumen de agente precipitante, lo que le da al precipitante una concentración del 50% de la requerida para la cristalización de la proteína. Debido a que, la solución de cristalización está a una menor concentración que la del reservorio, causa difusión de vapor de la gota al reservorio. La evaporación de la gota hace que las concentraciones de la proteína y del agente precipitante aumenten, moviendo las condiciones hacia la condición de nucleación. Cuando el sistema llega a un equilibrio, la transferencia neta de agua se detiene y la gota alcanza condiciones similares a la condición de precipitación. Esta técnica se utilizó porque se ha reportado que se pueden obtener cristales de un mayor volumen a los obtenidos en *batch*. Cristales más grandes son preferibles para el experimento de difracción de rayos X debido a que en los equipos caseros esto llega a ser una limitante. Se cree que esto es debido a que al difundir el vapor de la gota al reservorio las condiciones van cambiando de manera gradual. Algo más que cambia dentro de la gota es la concentración de proteína ya que al formar el cristal la concentración de la proteína disminuye en comparación al resto de la gota, moviendo las condiciones hacia la región de crecimiento [92].

La técnica de gota colgante utilizada consiste en poner 1 ml de agente precipitante en el reservorio; y 1 μ l de proteína y 1 μ l de agente precipitante en un cubreobjetos siliconizado, el cubreobjetos se voltea y se pone sobre el reservorio con la condición de cristalización y se sella con grasa de vacío. La técnica de gota sentada consiste en poner 1 ml de la condición de cristalización en el reservorio

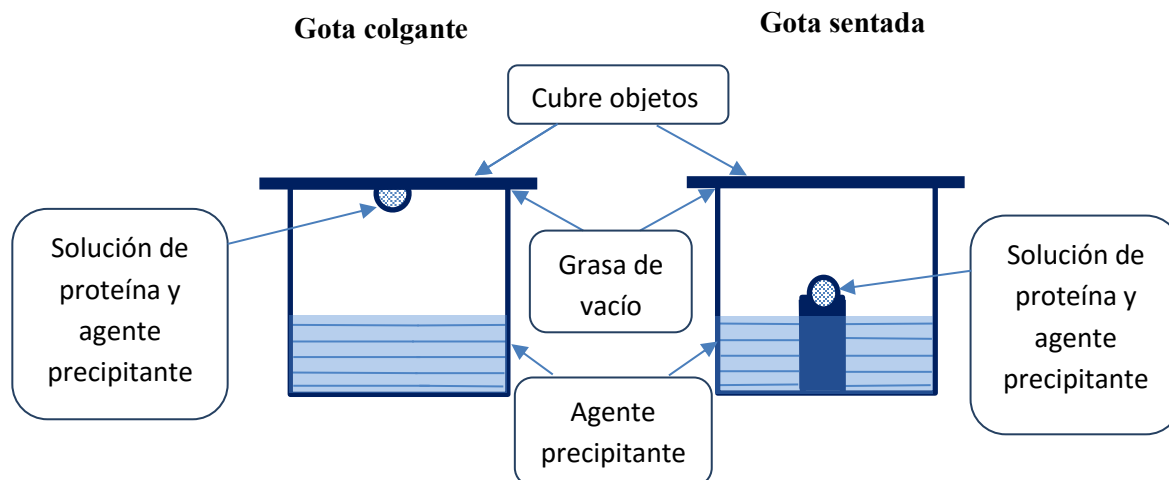


Figura 14. Diagrama de los métodos por difusión de vapor

y una gota de la solución de proteína y de agente precipitante en un soporte en el reservorio, finalmente se sella el sistema con grasa de vacío y un cubreobjetos. La ventaja que posee la técnica de gota apoyada es que el volumen de la gota depende del tamaño del soporte, a diferencia de gota colgante que depende de la tensión superficial.

7.6.2 Remojado de los cristales en ácido clavulánico

Con el motivo de obtener la estructura cristalográfica de TLA-1 en complejo en ácido clavulánico se remojaron cristales de TLA-1 con ácido clavulánico. La técnica de remojado consta en obtener cristales de la proteína de interés y ponerlos en una solución con el ligante; esto se puede hacer ya sea añadiendo una solución con el ligante en la gota donde se cristalizó la proteína o cambiando la proteína a una condición con el ligando. Por simplicidad se optó por la primera opción. Se preparó una solución de ácido clavulánico a 60 mM en la condición de cristalización (2.4 M de sulfato de amonio, 100 mM de fosfato de sodio dibásico/ácido cítrico, pH 4.7). Se procuró hacer la solución para el remojado el mismo día en el que se iban a sobreenfriar los cristales, esto para evitar algún cambio en el ácido clavulánico debido al pH ácido de la solución de cristalización. Se dejó remojando durante 3 min y se sobreenfriaron los cristales con nitrógeno líquido a 77.3 K.

7.6.3 Difracción

El objetivo principal del experimento de difracción es obtener patrones de difracción donde las reflexiones se encuentren bien definidas y del cual se pueda obtener una densidad electrónica.

Cada cristal se sobreenfrió con nitrógeno líquido para ser transportado. La difracción se realizó con dos fuentes de luz; en el ánodo rotatorio del Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM, UNAM) y en el *Advanced Photon Source* (APS), *Argonne National Laboratory* (Argonne, IL, U.S.A.) en Chicago.

7.6.4 Obtención de la estructura cristalográfica

Para obtener la densidad electrónica a partir de un patrón de difracción se utiliza una sumatoria de Fourier donde $\rho(x, y, z)$ es la densidad electrónica, V es el volumen de la celda unidad, F_{hkl} es la amplitud, hkl son a los índices de Miller, corresponden a las coordenadas en el plano recíproco y a la frecuencia de una onda de tres dimensiones del rayo X después de haber pasado por el cristal; y finalmente x, y y z son las coordenadas espaciales en el plano real.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Una vez obtenidos los patrones de difracción se requiere hacer varios pasos antes de obtener la densidad electrónica, ya que se necesitan medir y calcular distintos datos para poder realizar la sumatoria de Fourier. Primero se necesita analizar la posición de las reflexiones para así poder dilucidar la red cristalina y el grupo espacial; a este proceso se le conoce como indexado y nos permite encontrar los valores de hkl . El grupo espacial indica la simetría de la celda unidad y sus contenidos, y nos permite obtener los parámetros de la celda unidad, así como el volumen V . Después se analizan las intensidades de las reflexiones, proceso conocido como integrado, ya que a cada una de las intensidades se toma como una curva, la cual es integrada. Al resultado de la integración se le realiza una raíz cuadrada para obtener las amplitudes de cada punto. Una vez obtenidos estos datos se realiza el proceso de escalamiento, el cual consiste en comparar las reflexiones que se encuentran en el mismo índice y que fueron medidas más de una vez para hacer un reescalado de los datos; este proceso resulta en una compresión de los datos ya que a las reflexiones únicas se les dan intensidades únicas. El indexado, integrado y escalado de los datos de TLA-1 obtenidos en el LANEM y en el APS en Chicago se realizaron con el programa HKL3000 y XDS respectivamente [94], [95]. Para determinar la resolución a la cual se iban a cortar los datos se decidió tomar como criterios el $I/\sigma I$ que corresponde a la relación señal/ruido y se consideró que esta debía ser mayor a 2.00. El segundo estadístico que se decidió utilizar es el Coeficiente de

Correlación de Pearson $\frac{1}{2}$ (CC1/2), y se consideró que este debía de ser mayor a 80.00; se eligió este estadístico debido a que se ha mencionado como un buen estadístico que no se ve afectado negativamente por la multiplicidad como es el caso del R_{sym} . Este estadístico evalúa la correlación que existe entre las intensidades de la primera mitad del *set* de datos contra la segunda mitad. Se ha comprobado que este estadístico no subestima la calidad de los datos, lo que permite aprovechar más datos y obtener una estructura a mayor resolución.

Una vez terminado el escalamiento se realiza la obtención de las fases. Existen tres maneras de calcular las fases: reemplazo isomórfico, dispersión anómala y reemplazo molecular. En este proyecto se optó por utilizar el reemplazo molecular, el cual consiste en tomar los valores de las fases de una estructura cuya estructura haya sido determinada previamente y que tenga una identidad de secuencia por arriba del 40% y usarlos para determinar la densidad electrónica. Este proceso utiliza métodos de estadística bayesiana para poder encontrar un modelo adecuado, y como parámetro de calidad se utiliza el *Log Likelihood Gain* (LLG). Para este proyecto en particular se utilizó la estructura de PER-1 (PDB 1E25) la cual tiene una identidad de secuencia de 43% con TLA-1. Para la obtención de fases se utilizó el programa Phaser de la suite CCP4 [96], [97].

Una vez obtenida la densidad electrónica se hicieron afinamientos de la estructura, primero un afinamiento de cuerpo rígido mediante Refmac5, seguido por un afinamiento de cuerpo móvil con la suite de Phenix y finalmente se hace un afinamiento manual con Coot [98]–[100]. El afinamiento de cuerpo móvil, así como el afinamiento manual son iterativos y se realizaron hasta obtener una estructura con parámetros de *Rwork/Rfree*, RMSD de ángulos y RMSD de enlaces aceptables, lo que significa que *Rwork/Rfree* debe estar debajo de 0.26 y con una distancia entre *Rwork* y *Rfree* menor a 0.05, el RMSD de ángulos no debe de ser mayor a 4° y un RMSD enlaces no debe de ser mayor a 0.03 Å.

7.6.5 Análisis de la estructura

Los alineamientos estructurales de los C α , los análisis de puentes de hidrógeno y los análisis de superficie electrostática se realizaron con el programa Chimera UCSF [101], [102]. Para la superficie electrostática, primero se obtuvieron los archivos PQR utilizando el servidor en línea PDB2PQR el cual, utiliza el servidor PROPKA3.0 para calcular el pKa de los residuos en la proteína [103]. Posteriormente se utilizó el archivo PQR para generar un mapa de superficie electrostática con extensión .dx utilizando APBS [104]–[106]. Los programas CCP4mg y PyMol fueron usados para el análisis de los mapas de densidad electrónica [107], [108]. Los análisis de la unión del ligando se hicieron con Ligplot+ [109], [110].

8 Resultados y Discusión

8.1 Análisis de secuencias

Lo primero que se hizo fue el análisis de la secuencia de TLA-1, donde se puede observar que TLA-1 comparte la extensión característica de 6 aminoácidos entre las láminas $\beta 8$ y $\beta 9$ (referidos como láminas $\beta 3$ y $\beta 4$ en la literatura) particular de la subclase A2 (Fig. 15). También se observa que comparten una similitud de un 50% en el asa Ω con los otros dos miembros de esta subclase. Otra característica de los miembros que pertenecen a la subclase A2 es que comparten los residuos, Gln69 y Arg220, estos son de importancia ya que se ha visto que participan en la formación de una red de puentes de hidrógeno en la familia PER y que por lo tanto se consideran de interés para la

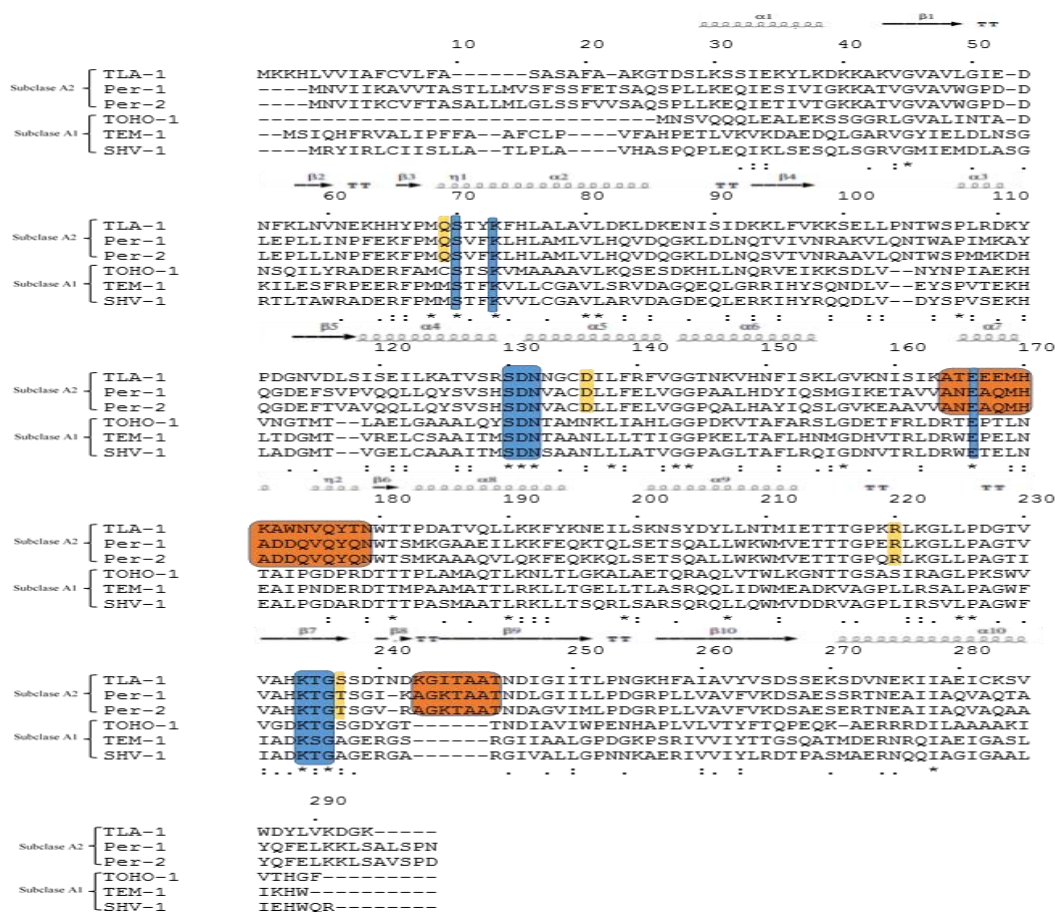


Figura 15. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TLA-1 con otras β -lactamasas de clase A, dos de subclase A2 y tres de la subclase A1, cuya estructura ha sido determinada. La localización de la estructura secundaria fue tomada del PDB. El código de colores es el siguiente, en azul se encuentran los motivos característicos de la clase A, en naranja se encuentran marcadas la extensión del asa entre la lámina $\beta 3$ y $\beta 4$ y el asa Ω de las β -lactamasas de la subclase A2, y en amarillo se encuentran marcados los residuos que se han considerado importantes para la subclase A2 en los estudios de Tranier y de Rugeiro.

estabilización de la entrada del sustrato y el tercer residuo que forma esta red es una Thr que en TLA-1 se encuentra mutada por una Ser por lo que mantiene la misma característica química, y se puede asumir que TLA-1 presenta esta misma red [12], [52]. Otro residuo característico que se ve conservado en la subclase A2 y no en la subclase A1 es la presencia de un Asp en lugar de una Asn en la posición 132. Esto es importante ya que se considera que este es el causante del cambio de conformación en el enlace peptídico en *trans* entre los residuos 166 y 167 en el asa Ω característico de la subclase A2. Este cambio de conformación tiene una consecuencia la formación una hélice α de aproximadamente siete aminoácidos de longitud (la cual corresponde a la hélice $\alpha 7$ en la figura 15) y a una hélice 3_{10} de aproximadamente cuatro aminoácidos (que corresponde en la figura a la hélice $\eta 2$ en la figura 15), a pesar de la formación de una estructura secundaria definida, se le sigue llamando asa Ω en este y en trabajos anteriores, con la finalidad de poder comparar esta zona de la proteína con las β -lactamasas de la subclase A1 [12], [13], [83], [111]. Un cambio que también puede ser de interés es la Arg129 la cual, en PER-2 es una His cerca del sitio activo, especialmente por su cercanía a la Ser130.

8.2 Transformación con el vector pJ411

Se logró transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con el vector sintético (proporcionado por la compañía DNA 2.0) de manera exitosa. La transformación con las cepas Rosetta y Origami no fue exitosa y por lo tanto no se usaron. Debido a esto se decidió evaluar la expresión en las cepas

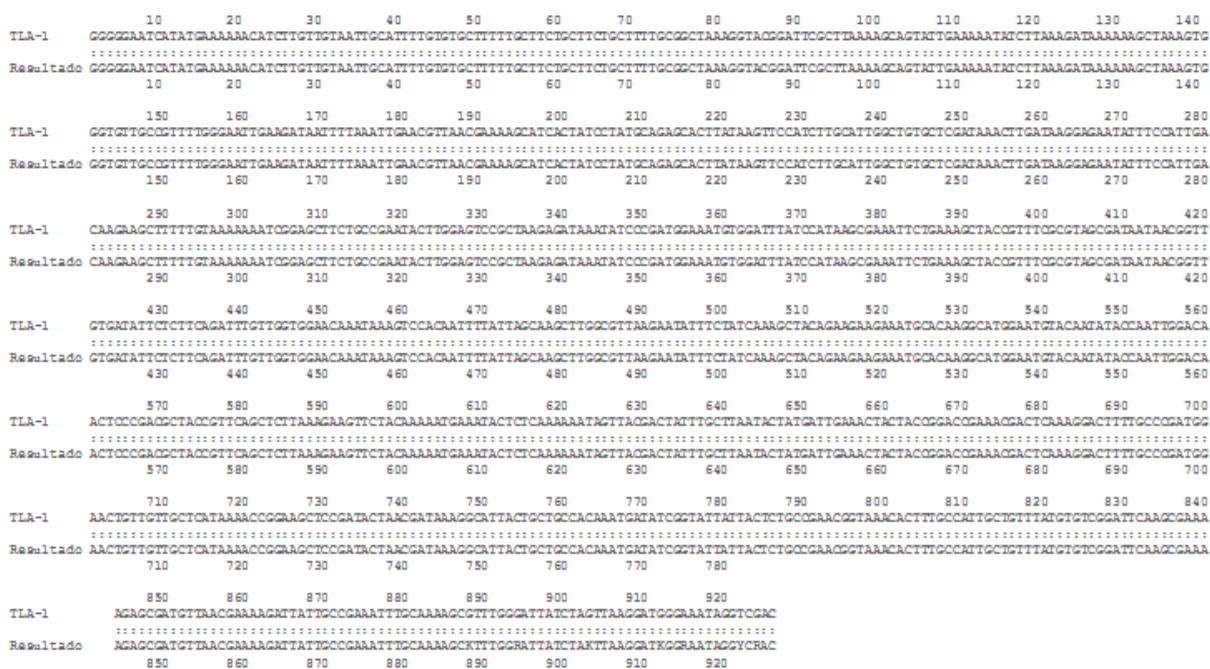


Figura 16. Alineamiento de la secuencia obtenida contra el gen de TLA-1 reportado por Silva et al 2000

BL21(DE3), C41 y C43. Al mismo tiempo se transformó una cepa de MC1061 para conservar el vector.

8.3 Secuenciación

Con el fin de comprobar la secuencia dentro del plásmido se purificó el vector pJ411 a partir de células de MC1061 y se mandó a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt. El resultado de la secuenciación se muestra en la figura 16. Se obtuvo una secuencia con un 100% de similitud, pero un 99.2% de identidad. Esto se debe a que no se pudieron leer de manera correcta los últimos nucleótidos, pero al revisar con el electroferograma proporcionado por la unidad de síntesis y secuenciación se pueden observar los picos correspondientes a los nucleótidos de la secuencia original de TLA-1, lo que corrobora que el gen en el vector pJ411 es el gen de la β -lactamasa de espectro extendido TLA-1 (Fig. 16).

8.4 Pruebas de expresión

Una vez lograda la transformación se realizaron pruebas de expresión para evaluar si las cepas de *E. coli* probadas producían la proteína de interés. Esto se realizó utilizando las condiciones recomendadas por el proveedor (Fig.17a). La única cepa de *E. coli* que sobreexpresó proteína fue BL21(DE3); se puede observar que esta cepa transformada con el vector pJ411 produce una proteína que se encuentra entre 28 y 36 kDa, en aproximadamente 30 kDa, lo que corresponde a la

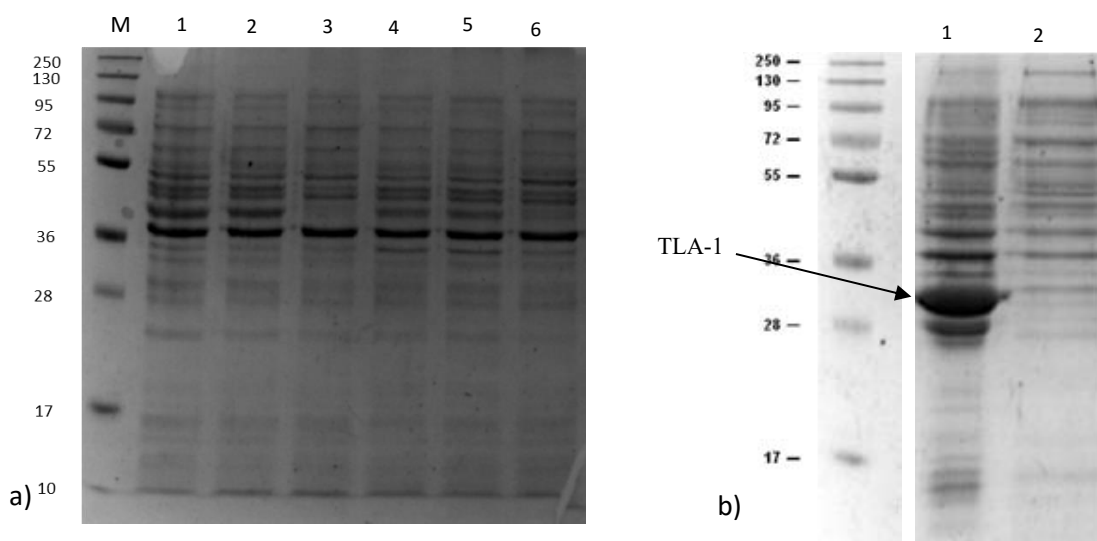


Figura 17. Prueba de inducción de diferentes cepas de *E. coli*. a) inducción de las cepas C41 y C43, donde los carriles 1, 2 y 3 corresponden a la cepa C41, con el vector e inducida, con el vector sin inducir y finalmente sin el vector y sin inducir, respectivamente; y los carriles 4, 5 y 6 corresponden a la cepa C43 con el vector e inducida, con el vector y sin inducir y finalmente sin el vector y sin inducir. b) Inducción de BL21(DE3) con el plásmido pJ411 con el gen de TLA-1 donde 1 corresponde a la cepa de BL21(DE3) con el vector e inducida con IPTG y 2 corresponde a la cepa de BL21(DE3) con el vector y sin inducir con IPTG

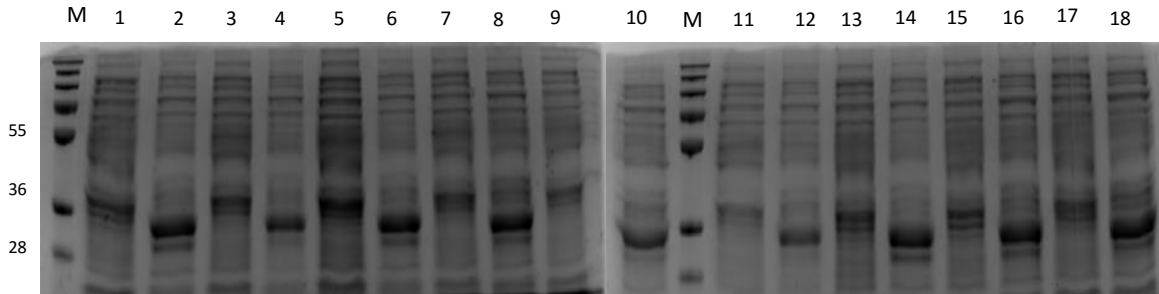


Figura 18. SDS-PAGE al 12% del sobrenadante y la pastilla de los cultivos, inducidos a diferentes OD 600 con diferentes tiempos de expresión, donde los carriles 1 y 2 corresponden a una inducción a una OD600 de 0.6 sin y con IPTG, 3 y 4 a una inducción a una OD600 de 0.7 sin y con IPTG, 5 y 6 a una inducción con una OD600 de 0.8 sin y con IPTG; con una expresión de 4 horas. Los carriles 7 y 8 a una inducción con una OD600 de 0.6 sin y con IPTG, 9 y 10 a una inducción con una OD600 de 0.7 sin y con IPTG, 11 y 12 a una inducción con una OD600 de 0.8 sin y con IPTG, con una expresión de 6 horas. Los carriles 13 y 14 a una inducción con una OD600 de 0.6 sin y con IPTG, 15 y 16 a una inducción con una OD600 de 0.7 sin y con IPTG; y el 17 y 18 a una inducción con una OD600 de 0.8 sin y con IPTG con una expresión de 8 horas.

masa de TLA-1 (Fig. 17b). Después se realizaron pruebas de expresión para optimizar la sobreproducción de proteína recombinante en BL21(DE3). En la figura 18 se muestran los resultados de la prueba de expresión. Se indujo el cultivo con IPTG a diferentes OD₆₀₀, donde se probaron OD₆₀₀ desde 0.6 hasta 0.8 y se observó que cuando el cultivo es inducido a 0.6, 0.7 y 0.8 existe sobreexpresión de la proteína recombinante, y no se observan diferencias claras entre estas condiciones. A continuación, se realizaron pruebas a diferentes temperaturas; se probaron 20°C, 30°C y 37°C, y se pudo observar que hubo una mejor expresión a 20°C (Fig. 19). Cabe resaltar que se intentó poner la misma cantidad de células en todos los pozos, esto con el fin de poder comparar la expresión de TLA-1 en las diferentes condiciones. Una vez encontradas las condiciones se prosiguió a romper las células y evaluar si las condiciones optimizadas permitían que la proteína

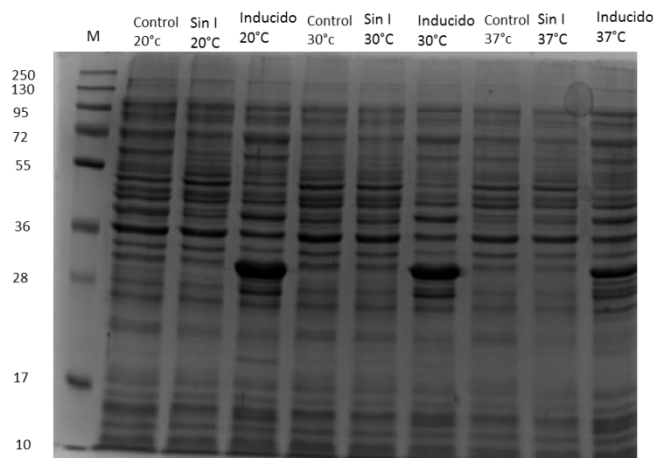


Figura 19. SDS-PAGE al 12% de la prueba de expresión a distintas temperaturas, donde el control es *E. coli* BL21(DE3) sin el plásmido, Sin I es *E. coli* BL21(DE3) con el gen de TLA-1 sin inducir y finalmente Inducido es la cepa con el gen de TLA-1 inducido con IPTG

TLA-1 se expresara de manera soluble. Se observó que al romper las células utilizando el protocolo donde se usa el amortiguador de ruptura A y B la proteína recombinante se iba a cuerpos de inclusión (Fig. 20).

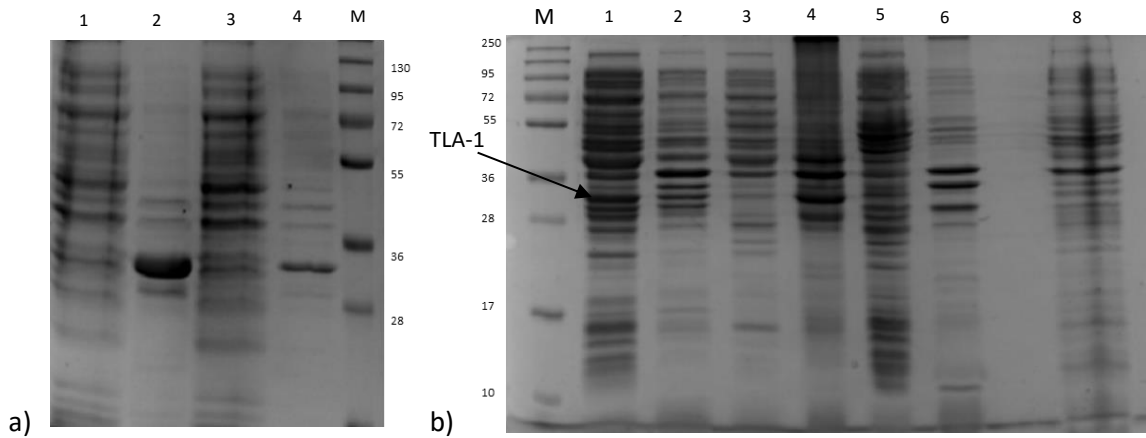


Figura 20. Comparación entre los protocolos de ruptura de la célula. a) Se muestra la fracción soluble e insoluble obtenida mediante el protocolo donde se utilizaron los amortiguadores de lisis A y B donde M corresponde al marcador de peso molecular, el carril 1 al sobrenadante de la sobreexpresión a 37 °C, 2 a la pastilla del cultivo sobreexpresado a 37 °C, 3 al sobrenadante del cultivo expresado a 18 °C y 4 a la pastilla del cultivo sobreexpresado a 18 °C. b) Se muestra la fracción soluble e insoluble tanto de los controles como de la muestra al ser tratada solo con el amortiguador de lisis A donde M corresponde al marcador de peso molecular, el carril 1 y 2 corresponden al sobrenadante y fracción insoluble, respectivamente, de la muestra de BL21(DE3) con el vector pJ411 sobreexpresado a 18 °C, el 3 y 4 al sobrenadante y fracción insoluble, respectivamente, de la muestra de BL21(DE3) con el vector pJ411 sobreexpresado a 37 °C, el carril 5 y 6 al sobrenadante y pastilla, respectivamente, de la cepa BL21(DE3) sin el vector y fue inducido y sobreexpresado a 18 °C y el carril 7 corresponde a la cepa BL21(DE3) con el vector y sin inducir a 18 °C.

Para evitar la formación de cuerpos de inclusión se probó una temperatura de 18 °C y se dejó expresando durante 48 horas, pero se obtuvieron los mismos resultados (Fig. 20a). No fue hasta que se probó utilizar solo el amortiguador de ruptura A (Tris-HCl 30 mM, NaCl 50 mM a pH 8) que se pudo obtener la proteína recombinante soluble (Fig. 20b). Se puede observar en el carril 1 de la figura 20b, el cual corresponde al sobrenadante de la muestra sobreexpresada a 18 °C, que hay una banda enriquecida en aproximadamente 30 kDa la cual no se observa en los otros carriles que corresponden al sobrenadante de la sobreexpresión a 37°C y el sobrenadante de la cepa sin vector e inducida. Estas evidencias sugieren que es la combinación del uso del amortiguador de lisis A con la temperatura lo que permite obtener la proteína soluble, ya que si se usa el amortiguador de lisis A a 37° se sigue obteniendo la proteína de manera insoluble (Fig. 20b). Esto se debe a que el crecimiento del cultivo bacteriano a 18 °C es más lento, y se ha reportado que esto permite un mejor plegamiento donde las proteínas que se expresaban en cuerpos de inclusión se expresan ahora de manera soluble. Otro elemento que puede llegar a afectar la solubilidad es la concentración de NaCl en el amortiguador de lisis. Esto es relevante debido a que el amortiguador de lisis A contiene NaCl lo que permite estabilizar la proteína cuando es liberada de la célula. Un

último factor que podría ayudar es el uso de un pH mayor, ya que se ha observado en estudios anteriores que un pH básico puede llegar a evitar la formación cuerpos de inclusión ya que se cree que le otorga inestabilidad las interacciones iónicas [112]–[114].

8.5 Purificación

8.5.1 Cromatografía de Intercambio iónico

El primer protocolo que se probó fue el de intercambio catiónico mediante SP sefarosa. Al obtener el cromatograma se puede observar al principio dos picos mayoritarios, y al evaluar mediante un SDS-PAGE al 12% se pudo ver que la proteína se encontraba en la fracción de 150 mM de NaCl pero no se observa un pico claro en el cromatograma (Fig. 21).

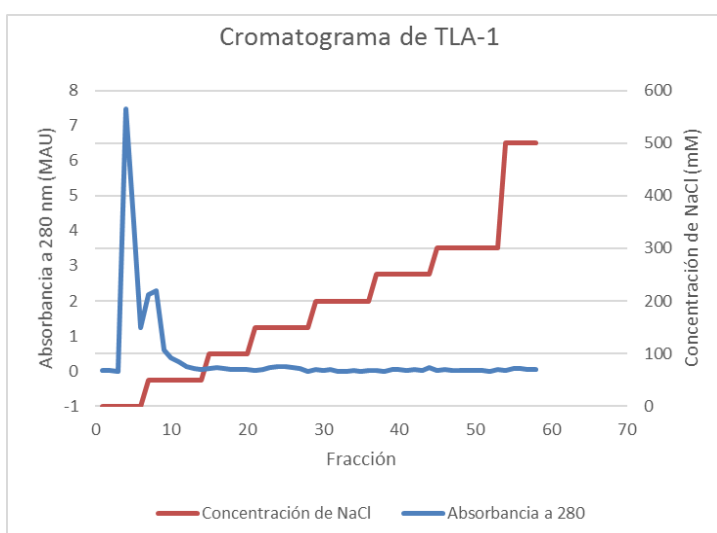


Figura 21. Cromatograma de obtenido a partir de la purificación de TLA-1 por medio de la resina CM-sefarosa

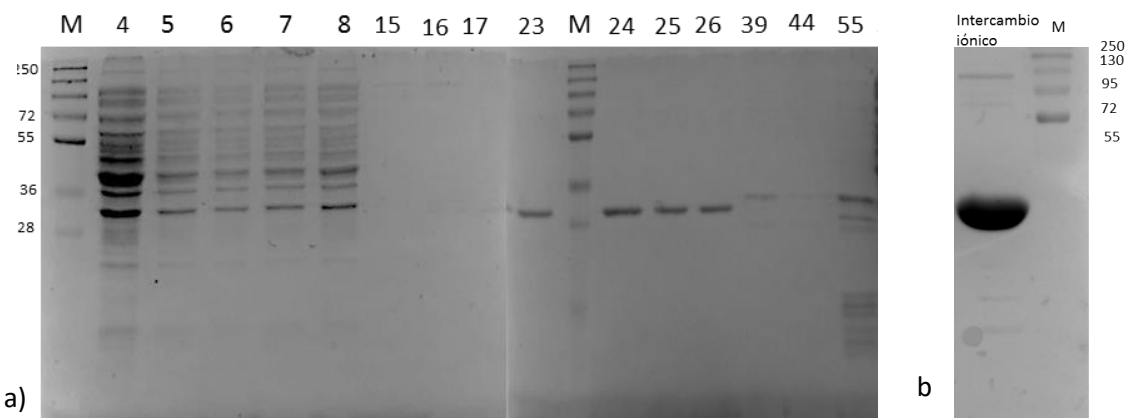


Figura 22. a) SDS-PAGE al 12% de la purificación por medio de una cromatografía de intercambio iónico de TLA-1, M corresponde al marcador de peso molecular, los números corresponden a la fracción evaluada. b) SDS-PAGE de la proteína concentrada, para evaluar la pureza

Se tomaron todas las fracciones y se corrió un SDS-PAGE al 12% para determinar en qué concentración de NaCl había eluido la proteína. Se puede observar en la figura 22a que la proteína eluyó en las fracciones 23-26 lo que corresponde a una concentración de NaCl de 150 mM. Se juntaron las fracciones 23-26 que fueron las que, en el gel, mostraban un enriquecimiento en la banda correspondiente al peso de TLA-1 (Fig. 22b). Para poder evaluar la pureza se concentró la proteína y se obtuvo un 95% de pureza de acuerdo un análisis de densitometría realizado.

8.5.2 Cromatografía de exclusión molecular

En el segundo protocolo de purificación sólo se pasó una vez la muestra por la columna de intercambio iónico. Después de este paso, se concentró a 5 mg/ml y se pasó por la columna de exclusión molecular. En el cromatograma (Fig. 23a) solo se observan dos picos. Se evaluaron los

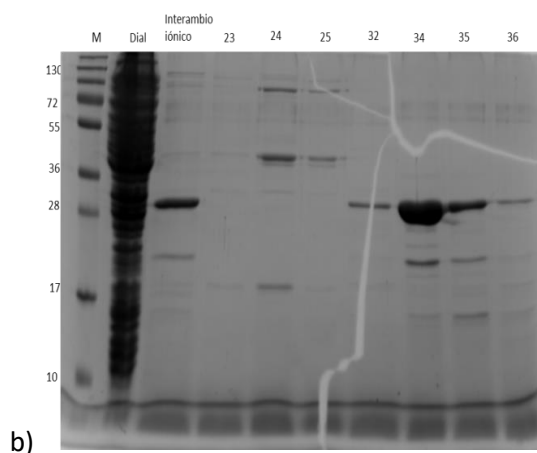
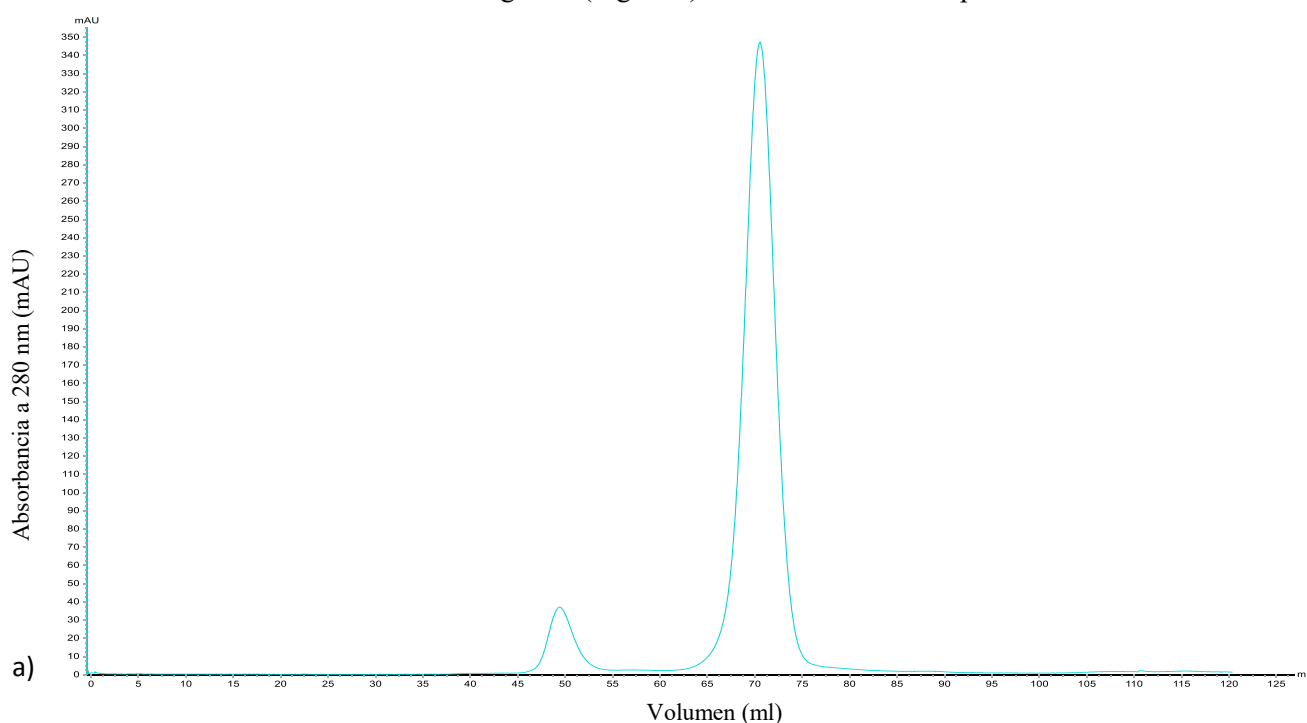


Figura 23. Purificación de TLA-1 por cromatografía de exclusión molecular a) Se puede observar el cromatograma con dos picos b) Se presenta un SDS-PAGE de los picos presentes en la purificación.

picos obtenidos mediante SDS-PAGE y se puede observar que la pureza obtenida por este método es menor a la obtenida por el método anterior ya que muestra un 85% de pureza (Fig. 23b). Se optó por mantener este último protocolo debido a que se obtuvo la cantidad suficiente para poner pruebas y se obtuvieron cristales al hacer el barrido de condiciones como una prueba. Se utilizaron las fracciones con la banda enriquecida en 30 kDa para los experimentos que siguen.

8.6 Prueba de Actividad

Una vez purificada, se realizó una prueba de actividad cualitativa con nitrocefina (Fig.19) donde se probó un control negativo (vial de la izquierda) y la muestra purificada por el segundo método de purificación, descrito en la sección anterior (vial de la derecha). Se puede observar en la figura 20 que el vial de la derecha muestra actividad de β -lactamasa, ya que, como se explica en la sección 7.4, las β -lactamasas hidrolizan el anillo β -lactámico de la nitrocefina, lo cual induce un cambio de coloración de amarillo a rojo. Este cambio de coloración es evidencia de que la muestra purificada en la sección anterior tiene actividad de β -lactamasa (Fig. 24).



Figura 24. Prueba de actividad cualitativa con nitrocefina, del lado izquierdo se encuentra el control negativo el cual solo contiene amortiguador, mientras que del lado derecho se encuentra la solución con la β -lactamasa TLA-1 después de la columna de intercambio iónico.

8.7 Cristalización

8.7.1 Barrido de condiciones

Una vez purificada y confirmada la actividad de β -lactamasa, se concentró la proteína a aproximadamente 10 mg/ml para realizar el barrido de condiciones de cristalización. El barrido se realizó mediante el método de *batch* ya que esto permite gastar una menor cantidad de proteína y de agente precipitante. Para realizar el barrido de diferentes condiciones de cristalización se probaron dos temperaturas, la primera a 18 °C donde se utilizaron los *kits* de *Wizard* del I al IV y de Hampton (mencionados en la sección 7.6.1.2); la segunda temperatura probada fue 4 °C y se utilizaron los *kits* *Wizard* I y II. En total se probaron más de 500 condiciones de cristalización, de

las cuales solo se obtuvieron cristales en una de las condiciones, la cual fue la condición nueve del *kit Wizard II* a 18 °C; ésta contiene sulfato de amonio 2 M y fosfato de Sodio dibásico 100 mM /Ácido cítrico a pH 4.5. Los cristales observados tenían una longitud de aproximadamente 250 µm en el eje más largo y 125 µm en el eje más corto (Fig. 25). Previamente se han reportado múltiples

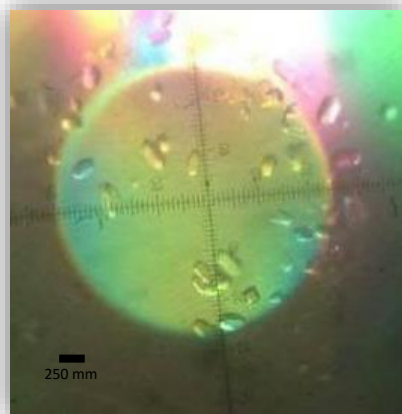


Figura 25. Cristales obtenidos en el barrido con la condición nueve del *kit II* de *Wizard* de Rigaku (sulfato de amonio 2 M fosfato de sodio dibásico 100 mM /ácido cítrico pH 4.5) condiciones de cristalización para otras β-lactamasas y en su gran mayoría utilizan sulfato de amonio como agente precipitante [58].

8.7.2 Optimización

Una vez que se obtuvo una condición en la que se observaron cristales, se realizó la optimización variando la concentración de proteína y de sulfato de amonio. La optimización se realizó utilizando la técnica de gota colgante y gota sentada. El intervalo de concentración de proteína probado fue de 6 a 12 mg/ml y el intervalo de concentración de sulfato de amonio fue de 1.2 a 2.9 M. En la técnica de gota sentada se obtuvieron nueve condiciones optimizadas donde se encontraron cristales. Los cristales más grandes obtenidos en gota sentada tuvieron una longitud de 250 x 200 µm lo que los hace buenos candidatos para el experimento de difracción. En gota colgante se obtuvieron siete condiciones optimizadas. Los cristales obtenidos fueron de menor tamaño a los que se obtuvieron en gota sentada; debido a esta razón se prefirió usar los cristales obtenidos en gota sentada. Al coleccionar los cristales y destapar las gotas se observó que se empezaban a formar cristales de sulfato de amonio, los cuales destruían los cristales de TLA-1. Esto es debido a que se utilizó un volumen de 2 µl por gota, lo que hace que la evaporación de la gota sea muy rápida, y debido a que la condición de cristalización tiene una gran concentración de sulfato de amonio, esto ocasiona que los elementos de la condición de cristalización se concentren, favoreciendo la formación de cristales de sulfato de amonio. Por esto se optó en aumentar el volumen de la gota, reduciendo así la velocidad de evaporación, algo que fue facilitado debido a que la técnica de gota

sentada permite poner un mayor volumen. Se repitió la optimización, esta vez utilizando un volumen de 8 μ l por gota, los intervalos de concentración de proteína probados fueron de 10 mg/ml

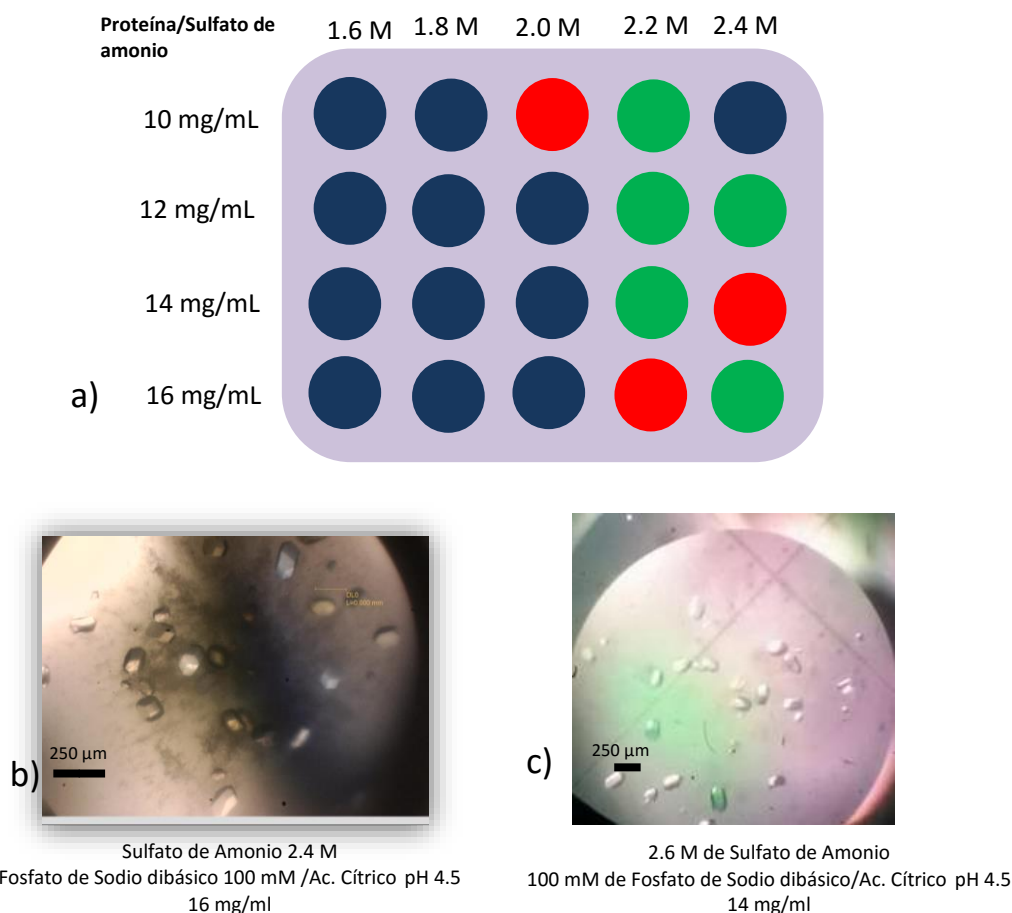


Figura 26. Optimización de la condición de cristalización. a) Diagrama de la optimización de la condición de cristalización, en verde se marcan las condiciones donde se encontraron cristales, en rojo las condiciones de donde se tomaron los cristales que se mandaron a difractar y en azul todas las condiciones donde no se obtuvieron cristales. b) Cristales obtenidos en la condición de Sulfato de Amonio 2.4 M, fosfato de sodio dibásico 100 mM /ácido cítrico pH 4.5 a una concentración de proteína de 16 mg/ml. c) Cristales obtenidos en la condición de 2.6 M de Sulfato de Amonio, 100 mM de fosfato de sodio dibásico/ácido cítrico pH 4.5 a una concentración de proteína de 14 mg/ml.

a 16 mg/ml y los intervalos de concentración de sulfato de amonio fueron de 1.6 M a 2.4 M (Fig. 26a). Los mejores cristales obtenidos fueron los que correspondían a la gota con una concentración de proteína de 16 mg/ml y una concentración de sulfato de amonio 2.4 M (Fig. 26b); y a la gota que contiene una concentración de proteína de 14 mg/ml con una concentración de sulfato amonio de 2.6 M, por lo que fueron los que se eligieron para mandar a difractar (Fig. 26c).

8.8 Difracción

Para la difracción primero se sobreenfriaron los cristales con nitrógeno líquido a 73.3 K. No se utilizó crioprotector debido a que, cuando la solución crioprotectora entró en contacto con la

solución de proteína con agente precipitante se formaban cristales de sulfato de amonio, esto debido a la concentración alta de sulfato de amonio de la condición de cristalización.

El primer cristal que se difractó y del cual se obtuvo un patrón de difracción con reflexiones claras provenientes de una sola matriz cristalina, creció en *batch* en las condiciones 2 M de sulfato de amonio y 100 mM de fosfato de sodio dibásico/ácido cítrico a pH 4.5. La colecta de datos de difracción de este cristal se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Estructuras de Macromoléculas (LANEM) en el Instituto de Química de la UNAM con la Dra. Adela Rodríguez en un equipo de difracción de ánodo rotatorio. Este cristal difractó a 2.8 Å de resolución.

El segundo *set* de datos se obtuvo de los cristales que se obtuvieron del cristal crecido con una concentración de proteína de 16 mg/ml y una concentración de sulfato de amonio de 2.2 M. Éste se difractó en la línea 19BM del *Advanced Photon Source* (APS) en Chicago. Este cristal difractó a 2.2 Å de resolución.

El tercer *set* de datos del cual se obtuvo la estructura de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico se obtuvo a partir de un cristal el cual creció en una concentración de proteína de 16 mg/ml y una concentración de sulfato de amonio de 2.2 M, en una gota de 4 µl. Se colocó a la gota una cantidad de volumen igual de la solución de ácido clavulánico a 60 µM (4 µl) en la condición de cristalización, esto para que quedara a una concentración final de 30 µM, la cual corresponde a diez veces la K_i [5]. Se dejó remojando durante aproximadamente tres minutos y fue sobreenfriado con nitrógeno líquido. La difracción se llevó a cabo en la línea 19BM del APS en Chicago. Este cristal difractó a 2.5 Å de resolución.

8.9 Determinación de la estructura

Para la estructura que se obtuvo en el LANEM se utilizó la suite HKL3000 para analizar las reflexiones y encontrar el grupo espacial; este procedimiento se hizo en el LANEM por la Dra. Adela Rodríguez. Los datos fueron obtenidos a 2.8 Å y fueron escalados utilizando el programa Scala, de la suite de CCP4. Una vez que se obtuvieron los datos escalados se realizó el reemplazo molecular para encontrar las fases utilizando el programa Phaser, de la suite CCP4. Para el reemplazo molecular se utilizó el modelo por homología de TLA-1, generado con el servidor en línea CPHmodels, el cual utilizó la estructura de PER-1 como molde. Una vez realizado el reemplazo molecular, se efectuaron una serie de afinamientos con diferentes programas. Como primer paso se hizo un afinamiento de cuerpo rígido, con el programa Refmac. Como segundo paso se utilizó el programa Phenix para efectuar el afinamiento de cuerpo móvil. Posteriormente se realizaron los ajustes manuales utilizando el programa Coot; se repitieron los pasos de afinamiento

de cuerpo móvil y los ajustes manuales, esto se hizo hasta reducir los parámetros de *R_{free}/R_{work}* hasta 0.22/0.25. Esta estructura solo fue usada para realizar la sustitución molecular en la estructura obtenida en el APS, esto con el fin de facilitar los afinamientos posteriores con las siguientes estructuras.

La estructura del cristal que fue difractado en el APS se resolvió utilizando la suite de programas XDS para hacer el indexado de los datos, la obtención del grupo espacial, el análisis de las reflexiones y el escalado. Una vez completado el escalado se usó Phaser de la suite CCP4 para hacer la sustitución molecular, la cual se realizó utilizando la estructura de TLA-1 a 2.8 Å que se había obtenido previamente en el LANEM. Para el afinamiento se utilizó el mismo procedimiento

Tabla 3 Tabla cristalográfica de las estructuras de TLA-1 y de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico

	TLA-1	TLA-1 + ácido clavulánico
Colecta de datos		
Grupo espacial	P 1 21 1	P 41 21 1
<i>Parametros de celda</i>		
a, b, c (Å)	99.06, 99.01, 99.7	98.64, 98.64, 100.40
α, β, γ (°)	90, 90.04, 90	90, 90, 90
Moléculas por unidad asimétrica	4	1
Resolución	40-2.2 (2.3-2.2)	40-2.5 (2.6-2.5)
Número de reflexiones totales	490,116 (61,657)	323,653 (35,817)
Número de reflexiones únicas	97,662 (12,124)	17,306 (1930)
Rsym (%)	6.94 (57.90)	18.6 (112)
Rmeas (%)	7.7 (64.7)	19.1 (115.2)
Multiplicidad	5.01 (5.08)	14 (13)
Integridad	99.90 (99.90)	97.4 (99.6)
I/ σ I	16.7 (4.08)	16.23 (2.9)
CC 1/2	99.90 (83.9)	99.8 (85.8)
Refinamiento		
Rwork/Rfree (5%)	0.183/0.207	0.202/0.266
RMS ángulos	1.685	0.908
RMS enlaces	0.027	0.008
Error de coordenadas (Máx. Lik)	0.27 Å	0.39 Å
Factores B promedio (Å)		
Proteína	38.192	36.908
SO4	61.370	60.260
H2O	47.950	47.278
Cl	47.495	38.865
ACT	-	53.192
TEM	-	47.452
CLV	-	58.301
CLA1	-	50.679
CLA2	-	57.405
Total	39.638	37.502
Number of protein atoms	8779	8785
Number of water atoms	1194	168
Solvent percentage	68.80%	68.80%

descrito en el párrafo anterior. Como resultado se obtuvo que el cristal tiene un grupo espacial de

P 1 2₁ 1 con cuatro monómeros en la unidad asimétrica y la estructura fue resuelta a 2.2 Å con parámetros de *R_{free}/R_{work}* de 0.18/0.20. Debido a que la segunda estructura que se obtuvo tiene una mejor resolución, fue la que se utilizó en los análisis de la estructura de TLA-1.

El procedimiento para la resolución y el afinamiento de la estructura del cristal que fue remojado con ácido clavulánico fue igual a la descrita en el párrafo anterior. La única diferencia es que para la sustitución molecular se utilizó la estructura de TLA-1 a 2.2 Å. Como resultado se obtuvo que el cristal tiene un grupo espacial de P 4₁ 2₁ 2 con un monómero en la unidad asimétrica y la estructura fue determinada a 2.5 Å con parámetros de *R_{free}/R_{work}* de 0.20/0.26. La diferencia en el grupo espacial de la estructura se debe a que la unión del ligando afecta la simetría del cristal, lo que permite que la estructura con ligando tenga una mayor simetría que la estructura sin ligando, esto podría ser debido a que la unión del ligando podría estabilizar partes de la proteína. En la Tabla 3 se muestran los parámetros cristalográficos de las dos estructuras.

8.10 Análisis de la estructura

8.10.1 Análisis general de la estructura

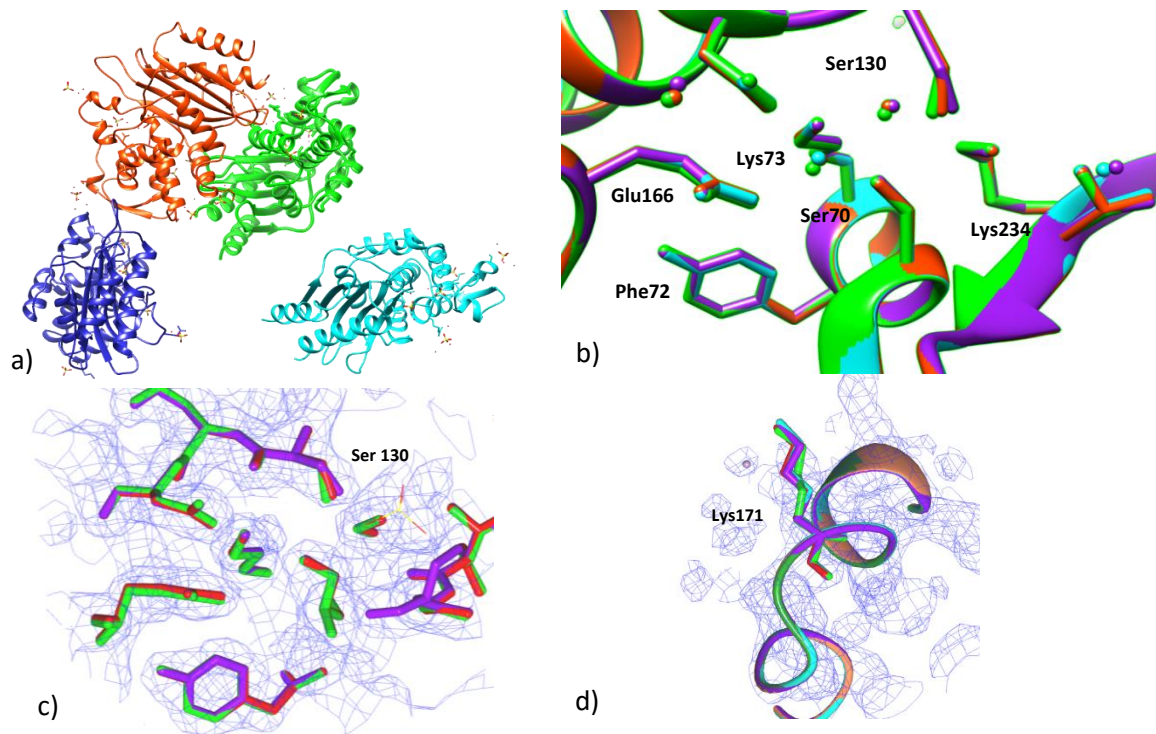


Figura 27. Comparación de las diferentes copias en la unidad asimétrica. a) Acomodo de las cuatro copias en la unidad asimétrica b) Comparación del sitio activo de los cuatro monómeros de la unidad asimétrica c) Comparación del sitio activo de las cuatro copias en la unidad asimétrica, visualizado con el mapa $2F_c-F_o$ de densidad electrónica a 1σ d) Visualización de la Lys171 de las cuatro copias de la unidad asimétrica con el mapa de densidad electrónica $2F_c-2F_o$ a 1σ .

Al observar la estructura general de TLA-1, ésta mantiene las características estructurales de las β -lactamasas de clase A: un dominio todas α y un dominio α/β , así como el sitio catalítico en la intercara entre los dominios [33]. También se puede observar que mantiene los motivos conservados en la misma conformación que todas las β -lactamasas de clase A, lo que nos hace pensar que el pH en el que cristalizó TLA-1 no influyó en la estructura general. Algo que llama la atención sobre los cristales de TLA-1 es su alto contenido de solvente, encontrándose en un 69%, y el promedio de solvente en un cristal reportado en el PDB es aproximadamente 45% al igual que el de la mayoría de las estructuras de β -lactamasas pertenecientes a la clase A.

Debido a que se obtuvieron cuatro copias en la unidad asimétrica, como primer paso de análisis de la estructura se prosiguió en analizar cambios significativos entre cada copia (Fig. 27a). Al comparar el sitio activo de cada una se observó que no existía cambio de posición en ninguno de los aminoácidos con excepción de la Ser130 (Fig. 27b y c). Al observar la densidad electrónica se ve que las serinas de las cadenas de la unidad asimétrica caen dentro de la densidad calculada (Fig.

27c). Pan *et al* 2017 propuso que la Ser130 se encuentra involucrada en el tránsito de protones durante el ciclo catalítico de las β -lactamasas por lo que sería interesante realizar más estudios para ver si estos cambios pueden llegar a ser significativos [115]. Existe un cambio de conformación en la Ser130 que está documentado en varias estructuras de β -lactamasas, como en PER-2, donde se pueden ver cambios en la conformación de la Ser130 entre las cadenas de la unidad asimétrica [12]. También se ha llegado a proponer que la Ser130 puede llegar a formar parte de la catálisis, pero esto aún no ha sido bien demostrado [55]. Para ver si existe algún movimiento significativo de la Ser130 habría que obtener una estructura a mayor resolución.

Al analizar el gráfico de Ramachandran se pueden observar ocho residuos que se encuentran en zonas no favorecidas, dos por cada cadena de la unidad asimétrica. Estos son los residuos Arg220 y Lys171 de las cuatro cadenas (Fig. 28). Los ángulos fuera de las zonas favorecidas en el gráfico de Ramachandran que adopta la Arg220 se han observado en todas las estructuras de la subclase A2 de β -lactamasas, y se reportó que en PER-2 la Arg220 formaba parte de una red de puentes de hidrógeno en el sitio activo y que podía ser determinante para el perfil catalítico y de inhibición (Fig. 28a) [12], [13], [83]. Las mutantes de Arg220 en PER-2 demostraron tener una menor afinidad para dos de los tres principales inhibidores utilizados: ácido clavulánico y tazobactam [52]. También se reportó que las mutantes en Arg220 cambian su perfil catalítico disminuyendo la eficiencia catalítica hacia las oxi-amino-cefalosporinas por un orden de magnitud, lo que indica que este residuo, así como la posición que toma en el sitio activo son de importancia para el funcionamiento de esta enzima [52]. El otro residuo que presenta ángulos ψ y ϕ desfavorables en el gráfico de Ramachandran es la Lys171 (Fig. 27d y 28b). Al analizar la posición de este residuo en la proteína se puede observar que se encuentra en el asa Ω , dejándolo expuesto al solvente, y solo se encuentra una molécula de agua en la cercanía de esta Lys. Al comparar la posición de los residuos en la zona del asa Ω con los de TLA-3, se puede observar que su posición es ligeramente diferente, lo que explica los ángulos de la Lys171. Al analizar los contactos que podrían explicar este cambio, se observó que en TLA-3 existe un sodio en el centro del asa Ω , y en TLA-1 se observa que el agua se encontraría haciendo cinco contactos, lo cual no es posible. Debido a esta observación se colocó un ion Na^+ en esta posición. En TLA-3 dicho ion se encuentra a una distancia de 2.8 Å, siendo coordinado por el carbonilo de Ala160, Trp172, Met169 y una molécula de agua. En TLA-1 este ion Na^+ se encuentra coordinado por los mismos contactos, pero al comparar las distancias de los contactos que realiza, esos van desde 2.8 hasta 3.2 Å, lo que sugiere que el Na^+ se encuentra coordinado de una manera más laxa en comparación con TLA-3. Algo que podría explicar la diferencia entre los ángulos ψ y ϕ de la Lys 171 de TLA-1 y TLA-3 parece ser un ion

sulfato cercano a la Asn174 y a la Ala172 en TLA-3, lo podría alterar los ángulos de este residuo, permitiendo un acomodo de la Lys171 donde ψ y ϕ se encuentran en zonas permitidas; mientras que en TLA-1 este sulfato no se encuentra en la estructura y permite estos ángulos. Ésta parece ser la principal diferencia con la estructura de TLA-3 ya que los residuos del asa Ω y los componentes de la condición de cristalización son similares [13].

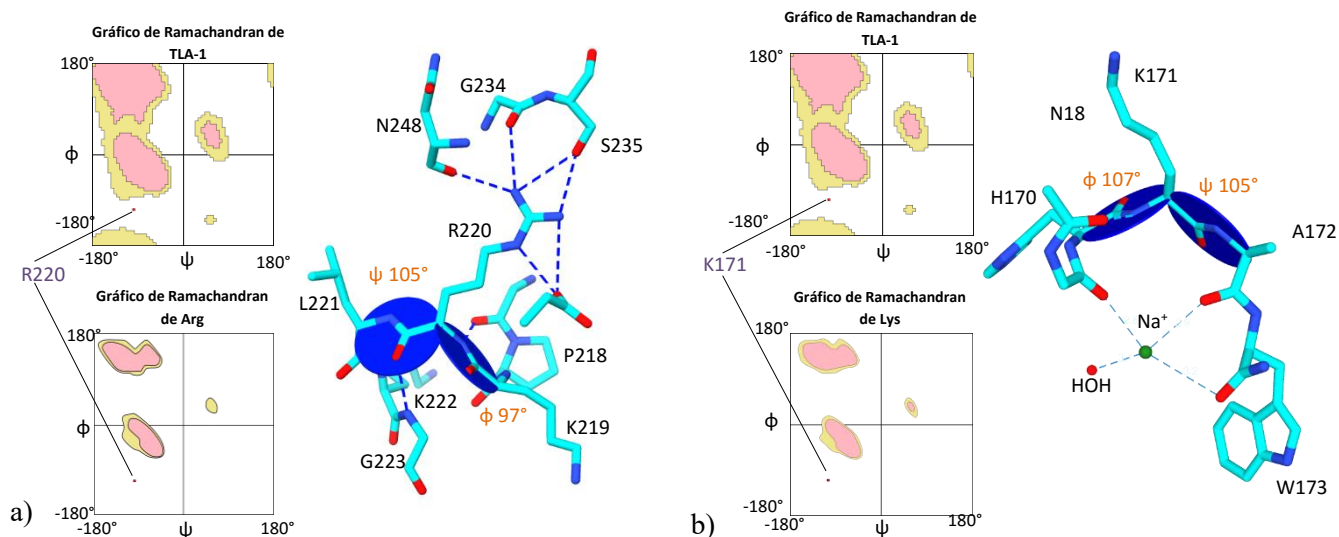


Figura 28. Análisis de los residuos encontrados fuera de los valores esperados en el gráfico de Ramachandran. a) Se muestra la posición de la Arg220 en el gráfico de Ramachandran de TLA-1 (esquina superior izquierda) y su posición en comparación a los ángulos diedros comunes de Arg en múltiples estructuras cristalográficas (esquina inferior izquierda), a la derecha se muestra la posición estructural que tiene la Arg220 en TLA-1 (cian), los ángulos diedros (en rojo), los planos (discos azules) y los puentes de hidrógeno más importantes (líneas punteadas azules) (derecha). b) Se muestra la posición de Lys171 en el gráfico de Ramachandran de TLA-1 (esquina superior izquierda) y su posición en comparación a los ángulos diedro comunes de Lys en múltiples estructuras cristalográficas (esquina inferior izquierda) a la derecha se muestra la posición estructural que tiene la Lys171 en TLA-1 (cian), los ángulos diedro (en rojo), los planos (discos azules) y los puentes de hidrógeno más importantes (líneas punteadas azules); así como los contactos (cian) del ion Na^+ (verde) cercano que permiten esta conformación. Los gráficos de Ramachandran de Arg y Lys fueron tomados y modificados de Hovmöller *et al.*

8.10.2 Comparación de TLA-1 con otras β -lactamasas de la Clase A

Para realizar una comparación de la estructura de TLA-1 con otras β -lactamasas reportadas se realizaron dos alineamientos estructurales por separado, el primero con β -lactamasas pertenecientes a la subclase A1 y el segundo β -lactamasas de la subclase A2. En la Figura 29a se puede observar el resultado del alineamiento estructural de TLA-1 con β -lactamasas de la subclase A1; el asa Ω y la horquilla entre la lámina β 3 y β 4 de TLA-1, marcadas en rojo, son claramente diferentes a las otras debido a la conformación diferente en el asa Ω y la horquilla entre la lámina β 3 y β 4. Al hacer el alineamiento estructural con los miembros reportados de la subclase A2 (Fig. 29b) se observa que todas comparten la inserción de la horquilla entre la lámina β 3 y β 4 y la conformación trans en el asa Ω , ocasionando como ha sido mencionado anteriormente, que la entrada al sitio activo sea más amplia. Al analizar detenidamente la comparación entre las cuatro β -lactamasas se puede observar que la horquilla entre la lámina β 3 y β 4 de TLA-1 y de *Bacteroides cellulosilyticus*

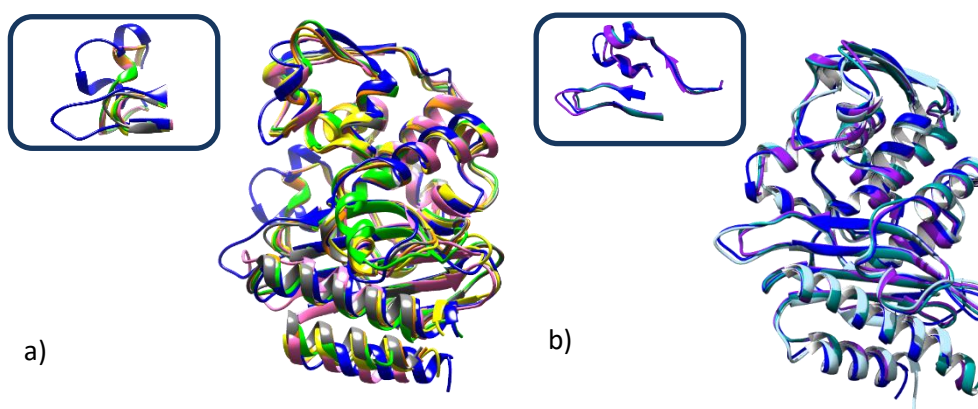


Figura 29. Alineamientos estructurales de TLA-1. a) Alineamiento estructural de TLA-1 (Azul oscuro) con miembros de la subclase A1: TEM-1 (PDB 1CK3) (naranja), PSE-4 (PDB 1G68) (amarillo), TEM-52 (PDB 1HTZ) (gris), SHV-1 (PDB 1SHV) (verde), β -lactamasa de *Mycobacterium fortuitum* (PDB 2CC1) (rosa) y en el cuadro se puede observar un acercamiento en el asa Ω y en el asa entre las láminas β 3 y β 4. b) Alineamiento estructural de TLA-1 (azul oscuro) con miembros de la subclase A2 PER-1 (1E25) en morado, PER-2 (4D2O) en cian obscuro y la β -lactamasa de *Bacteroides cellulosilyticus* (5TFQ) en cian, en el cuadro se observa el acercamiento al asa Ω y el asa entre las láminas β 3 y β 4.

Tabla 4. Desviación del valor cuadrático medio (RMSD) de C α de TLA-1 con diferentes β -lactamasas

β -lactamasa	Código PDB	RMSD (Å)	Subclase
TEM-1	1CK3	1.795	
PSE-4	1G68	1.671	
TEM-52	1HTZ	1.8	
SHV-1	1SHV	1.793	
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	2CC1	1.818	
GNCA4	5FQQ	1.536	A1
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	5TFQ	1.107	
PER-1	1E25	1.177	
PER-2	4D2O	1.103	A2

comparten una inserción después de la Asn241 en el recuadro 23b [11], [12], [77]. Al analizar los RMSDs de los alineamientos estructurales reportados en la Tabla 4 para TLA-1 y otras β -lactamasas, podemos concluir que la estructura general de TLA-1 se mantiene conservada. Algo que era de esperarse es que el RMSD del alineamiento estructural de TLA-1 contra las β -lactamasas de la subclase A2 es menor que los obtenidos contra la subclase A-1. Esto es evidente debido a que la subclase A2 se caracteriza por que comparten dos diferencias estructurales importantes: el cambio de conformación en el asa Ω y la inserción entre la lámina β_3 y β_4 . En general, se ha atribuido la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación a las ESBLs de las familias TEM y SHV a una expansión de la entrada al sitio activo por cambios puntuales en el asa Ω o cerca de ésta. Otra estrategia es implementada por las β -lactamasas de la familia CTX-M, las cuales, logran este fenotipo debido a un cambio conformacional ligero causado por la entrada de la cefalosporina; este cambio consta en un rompimiento de un puente de hidrógeno en la entrada del sitio activo, lo que ocasiona una expansión en el bolsillo catalítico. Se ha propuesto que los miembros de la subclase A2 logran este fenotipo debido a la conformación trans en el asa Ω y la extensión de la horquilla entre la lámina β_3 y β_4 , lo que ocasiona una expansión del sitio activo y esto, a su vez permite un mejor acomodo del grupo más grande que poseen las cefalosporinas, pero ha sido muy poco estudiado y estas hipótesis se han derivado sólo por simulaciones y minimizaciones de energía [12], [83]. Es de interés saber la estrategia que siguen esta subclase de β -lactamasas para hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido, así como diferencias y similitudes en el mecanismo de inhibición, ya que podría ser diferente a los reportados anteriormente y podrían llegar a causar un problema de salud pública.

Se realizó una comparación de la distancia entre el asa Ω y el ápice de la horquilla entre la lámina β_3 y β_4 entre TEM-1, PER-1, PER-2 y TLA-1 para ver si existían diferencias importantes en lo que está reportado como la entrada del sitio activo. Se tomó TEM-1, que es una β -lactamasa de subclase A1, como un control y para poder evaluar la expansión de la entrada del sitio activo al compararlas. La distancia entre el asa Ω y el ápice de la horquilla entre la lámina β_3 y β_4 de TEM-1 es de 6.48 Å, a diferencia de los miembros de la subclase A2, en las cuales, la distancia es de 11.50 Å, 12.12 Å y 13.81 Å para PER-1, PER-2 y TLA-1 respectivamente, lo que es aproximadamente el doble que en TEM-1. Al comparar solo los miembros de la subclase A2 se

observa claramente que la entrada del sitio activo de TLA-1 es casi 2 Å mayor que la de PER-1 y PER-2.

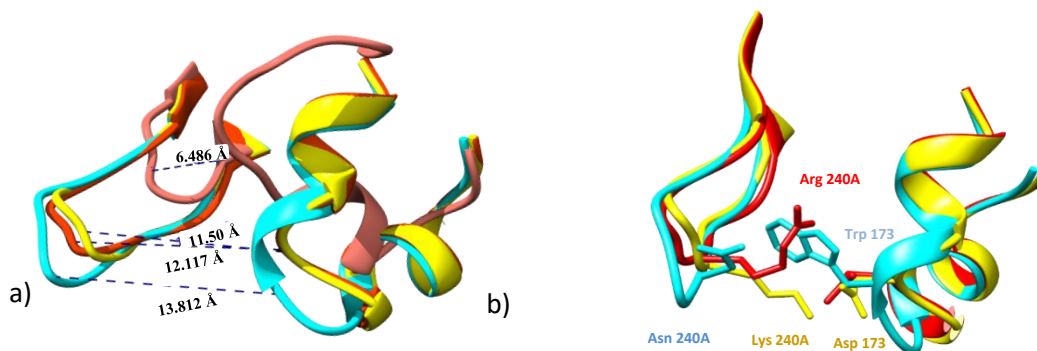


Figura 30. Análisis de la entrada del sitio activo. a) Comparación del tamaño de la entrada del sitio activo entre TEM-1 (PDB 1CK3) en rosa, PER-1 (PDB 1E25) en amarillo, PER-2 (PDB 4D2O) en rojo y TLA-1 en cian b) Comparación de los residuos presentes en la entrada del sitio activo de las enzimas de la subclase A2.

Se compararon los residuos que se encuentran en el asa Ω y la horquilla entre la lámina β -3 y β -4, debido a que se ha observado en β -lactamasas de la subclase A1 que residuos en esta zona podrían ser de interés. Se observó que hay un cambio drástico entre TLA-1 y las β -lactamasas PER (Fig. 30). En la posición 240 hay una Arg/Lys en los miembros reportados de la familia PER, que se le ha atribuido una función de compuerta, pero en TLA-1 y TLA-3 hay una Asn en esta misma posición. Sin embargo, el Trp173 presente en la familia TLA toma la misma posición espacial relativa a la Arg/Lys de la familia PER. En otras proteínas se ha reportado que el Trp puede llegar a cumplir una función de compuerta y puede llegar a regular la entrada del sustrato, lo que podría apoyar la función de compuerta hipotetizada anteriormente para los residuos Arg/Lys en la familia PER. Otra opción podría ser que estos residuos estén limitando el bolsillo catalítico funcionando como una pared, y que la entrada al sitio activo se encuentre en otra ubicación. Esta posibilidad no ha sido considerada con anterioridad ya que se ha pensado, de manera general, que las β -lactamasas de la subclase A1 representan también a las β -lactamasas de la subclase A2 pero esto no se ha verificado. No se sabe si el Trp en esta posición tenga un efecto significativo en la actividad en comparación con las otras β -lactamasas de la subclase A2 ya que poseen una eficiencia catalítica similar hacia cefalosporinas de tercera generación. Algo que parece destacar de las β -lactamasas de la subclase A2 es que el sitio de entrada del sustrato no se encuentra tan bien definido como en las de la subclase A1 lo que ha llevado a sugerir a algunos aminoácidos como compuertas, como es el caso de la Arg, Lys y Trp 105 en PER-1, PER-2 y TLA-1, respectivamente [11], [12], [52]. Otra opción es que la entrada al sitio activo de la subclase A2 se encuentre en otro lugar y que estos

residuos estén actuando como una pared en el sitio activo, más que como una compuerta, opción que no se ha considerado previamente.

Al comparar el sitio activo de TLA-1 con el sitio activo de PER-1 y PER-2 se muestra en la figura 31a que comparten la mayoría de los puentes de hidrógeno, siendo la única excepción la Ser130 de PER-2, la cual presenta una conformación diferente permitiéndole hacer un contacto con la Lys73, esta conformación de la Ser130 solo se mantiene en la cadena A ya que en la cadena B toma la misma conformación que en TLA-1 y PER-1. También se puede observar que, en su gran mayoría, comparten la misma red de puentes de hidrógeno. En la figura 31a se destaca uno de los cambios más drásticos en el sitio activo, el cual es un cambio en la posición 72 de una Phe en PER-1 y PER-2 por una Tyr en TLA-1. Esta Phe se encuentra bien conservada en la mayoría de las estructuras de β -lactamasas de clase A, siendo la excepción los miembros de la familia CTX-M ya que poseen una Ser en esta posición, y se ha hipotetizado que este residuo hace más compacto el sitio activo

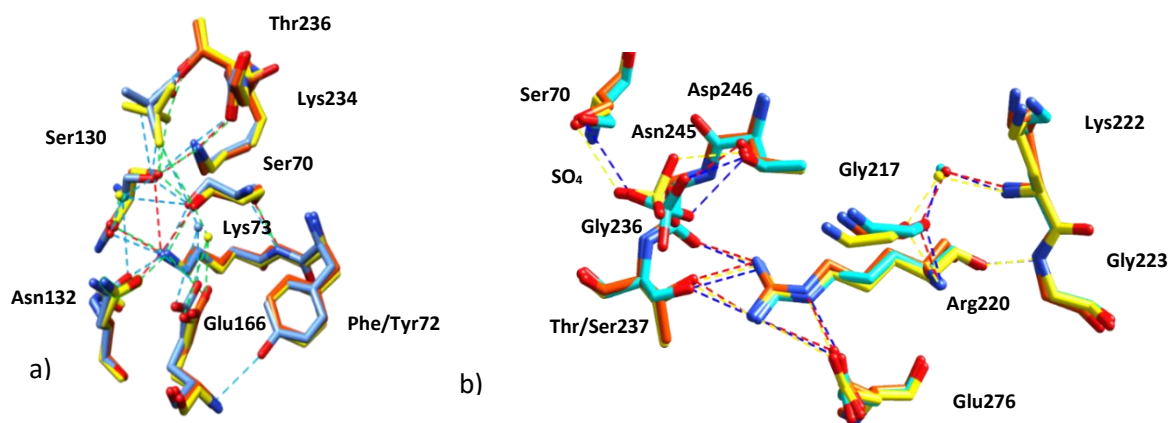


Figura 31. Comparación de las redes de puentes de hidrógenos PER-1, PER-2 y TLA-1. a) Comparación entre las redes de puentes de hidrógeno en el sitio activo PER-1 (amarillo) (PDB 1E25), PER-2 (rojo) (PDB 4D2O) y TLA-1 (cian). b) Comparación de la red de puentes de hidrógeno que conectan la Lys 222 con el sitio activo.

[54]. La presencia de la Tyr72 podría ser de importancia en el acomodo del sustrato o para una limitación del sitio activo, ya que en TOHO-1 se reportó que el grupo hidroxilo de la serina podría tener esta función. Un elemento más que llama la atención en la proximidad del sitio activo son la Arg129 presente en TLA-1; en esta posición se encuentra una His en PER-1 y PER-2, y elemento podría estar implicado en la desestabilización del asa SDN, y por lo tanto en la K_i menor de TLA-1.

En la figura 31b se compara la red de puentes de hidrógeno reportada por Ruggiero, de PER-1, PER-2 y TLA-1. Se piensa que esta red es la que da su posición particular a la Arg220 y que es importante para la catálisis de cefalosporinas [12], [52]. Se cree que esta red conecta la Thr237 con

la Arg220, y se ha comprobado con anterioridad que estos dos residuos son importantes para la catálisis. Algo que es interesante es que en TLA-1 en la posición 237 hay una Ser; esto no parece tener un impacto en la estructura en general ya que se mantienen los puentes de hidrógeno y el grupo metilo de la Thr237 en la familia PER no se encuentra haciendo contactos con residuos cercanos. Se observa que se conservan los mismos puentes de hidrógeno en las tres enzimas y parece estar conservada en las enzimas de la subclase A2.

8.11 Comparación con TLA-3

En el mes de agosto del 2017 Jin *et. al*, reportaron la estructura de TLA-3. Ésta comparte una identidad de secuencia del 96% con TLA-1. Las mutantes de β -lactamasas de Clase A suelen cambiar su perfil de manera drástica como es el caso de la familia TEM y SHV, donde mutaciones puntuales o de dos a tres residuos le otorgan el fenotipo ESBL o de resistencia a inhibidores [116]. Al comparar los parámetros cinéticos de TLA-3 contra los de TLA-1, se puede observar una clara diferencia en las constantes de inhibición de TLA-1 hacia ácido clavulánico y tazobactam, los cuales son de 3.4 mM y 5.0 mM, respectivamente y son un orden de magnitud mayor que las de TLA-3. Esto podría sugerir que TLA-1 tiene una resistencia moderada a inhibidores. Mutaciones que otorgan resistencia a inhibidores han sido reportadas anteriormente para las familias SHV y TEM; se ha observado que estas mutaciones se pueden llegar a encontrar en la vecindad de la Arg244 conservada en SHV y TEM, en la horquilla entre la lámina β 3 y β 4, en la Arg241, en la vecindad de la Ser130, así como una mutación en la Ser130 [48], [70]. Las mutaciones más reportadas son aquellas en la vecindad de la Ser130 [70]. Se han reportado múltiples enzimas

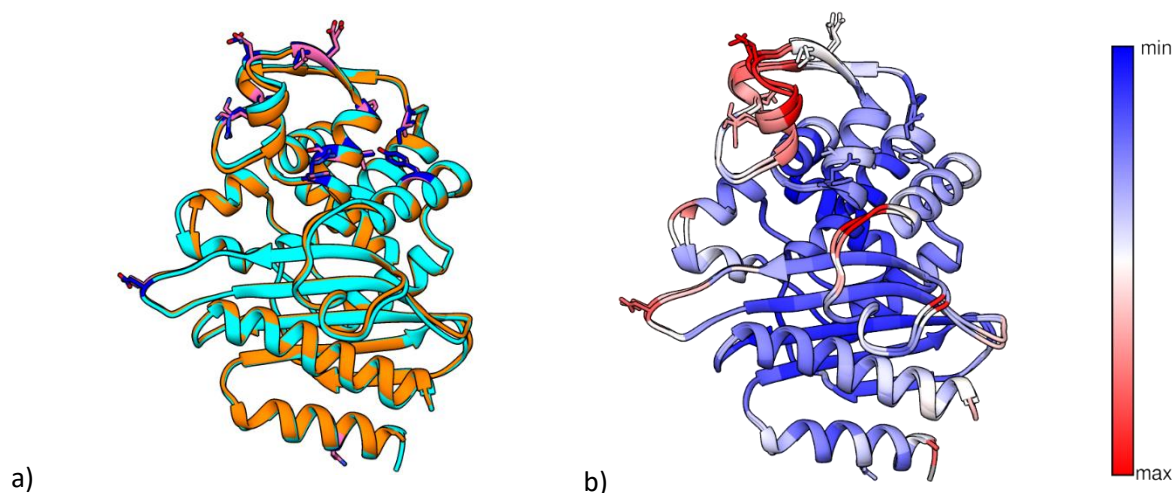


Figura 32. Comparación de TLA-1 con TLA-3 PDB 5GS8. a) Alineamiento estructural de TLA-1 (cian) contra TLA-3 (naranja), se encuentran marcadas en azul y en rosa aquellos residuos que son diferentes entre ellos. b) Alineamiento estructural de TLA-1 contra TLA-3 donde se representa la cadena principal coloreada por RMSD por residuo, donde se muestran las cadenas laterales de los residuos distintos.

Tabla 5 Residuos que son diferentes en TLA-1 y TLA-3

No. de residuo	TLA-1	TLA-3	Dominio
30	S	N	α/β
91	I	V	Todas α
101	E	D	Todas α
103	L	Q	Todas α
109	R	K	Todas α
112B	D	N	Todas α
115	V	L	Todas α
116	D	E	Todas α
119	I	F	Todas α
123	L	I	Todas α
125	A	S	Todas α
129	R	H	Todas α
206	Y	F	Todas α
242	D	N	α/β

resistentes a inhibidores, el mecanismo de resistencia a inhibición no se ha elucidado. Análisis de dinámica y de mutagénesis sugieren que muchos de los residuos cercanos a la Ser130 le otorgan estabilidad al asa donde se encuentra el motivo SDN, y que mutaciones en esta zona podrían causar una desestabilización que no ha sido percibida en los cristales [46], [70]. Al realizar un análisis de los cambios en TLA-1 con respecto a TLA-3 (Tabla 5) (Fig. 32a) se pueden observar cambios en zonas similares donde han sido reportados en las β -lactamasas resistentes a inhibidores (IRT). Uno de los cambios más notorios es una Asn en TLA-3 por un Asp en TLA-1 en la posición 242, mutación que cae en la horquilla entre la lámina β -3 y β -4. Existe una mutante similar con resistencia a inhibidores en la familia TEM donde la Arg240 es mutada por una Thr, a la cual se le designó como TEM-40 (K240T), en ambos casos la mutación se encuentra en el ápice de la horquilla, pero podría actuar de manera diferente a TLA-1 debido a que la horquilla es más larga que en TEM [117]. La mutación en la posición 243 de una Asn por un Asp podría estar involucrada con la entrada o reconocimiento de antibióticos β -lactámicos debido a la posición en la que se encuentra, y sería interesante estudiar este residuo más a fondo mediante diversas mutaciones para ver si tiene un efecto en el perfil de inhibición. Esto parece concordar con el análisis del cambio de RMSD por residuo de TLA-1 contra TLA-3, donde se puede observar que el RMSD en la posición 243 es diferente (Fig. 32b).

Otra zona que llama la atención es la vecindad de la Ser130 debido a que el cambio de una Ser por una Ala en la posición 125 disminuye la cantidad de puentes de hidrógeno en esta zona, lo que podría explicar el cambio de las constantes de inhibición de TLA-1 con respecto a TLA-3. Otro cambio presente es la Arg129 en TLA-1 el cual presenta, en las cuatro copias de la unidad asimétrica, un sulfato unido; en TLA-3 hay una His y no hay ningún ion sulfato en esta posición (Fig. 33). El cambio por un residuo más largo podría afectar en la estabilidad de la horquilla SDN lo que podría a su vez afectar la K_i de TLA-1 como se había propuesto en párrafos anteriores. El hecho de que esta TLA-1 es diferente a TLA-3, PER-1 y PER-2 en este mismo sitio podría indicar que la Arg129 en efecto podría ocasionar una inestabilidad en el asa SDN y esto podría ser el factor responsable de la menor K_i de TLA-1. Para comparar esto sería interesante hacer simulaciones de dinámica molecular donde se evalúe el movimiento del asa SDN. Otra diferencia importante que se puede observar es un cambio de posición en la Ser 130, ya que este cambio ocasiona una posición diferente del sulfato que se encuentra en el sitio activo. Este sulfato se une en el mismo lugar en el que se une el grupo carboxilo C4 de las cefalosporinas, así como el grupo sulfato de Avibactam. Por lo tanto, probablemente la modificación de la posición relativa del sulfato podría sugerir un cambio en la posición del inhibidor, lo que podría llegar a explicar la resistencia que tiene TLA-1 hacia inhibidores de mecanismo, relativo a TLA-3 [62]. Un análisis detallado de estos residuos podría sugerir la explicación de la resistencia a dos de los principales inhibidores: ácido clavulánico y tazobactam.

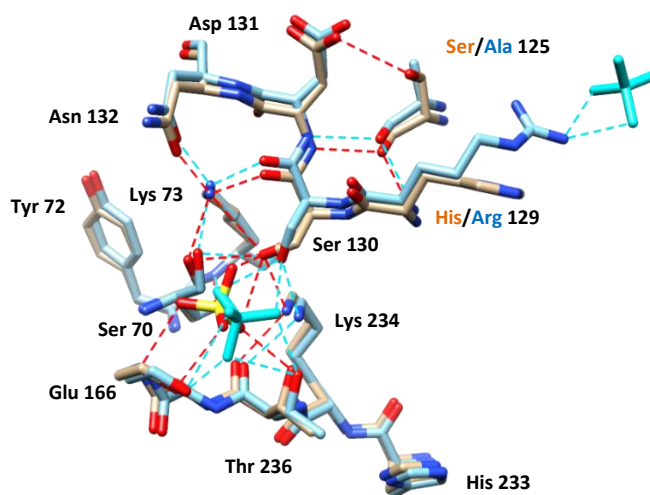


Figura 33. Comparación de la red de contactos polares del sitio activo de TLA-1 (cian) y TLA-3 (color arena).

8.12 Estructura cristalográfica de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico

Debido a que no existen estructuras cristalográficas de ninguna β -lactamasa de la subclase A2 unida a inhibidores clásicos de mecanismo y para intentar obtener datos que explicaran por qué TLA-1 tiene parámetros de inhibición diferentes a TLA-3, se obtuvo la estructura de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico a una resolución de 2.5 Å. En la estructura cristalográfica se lograron atrapar cuatro moléculas de ácido clavulánico. Se puede observar las moléculas de inhibidor en la figura 34a, donde se representa la cavidad del sitio activo y se encuentran dos intermediarios de la reacción de inhibición unidos covalentemente a dos serinas diferentes, Ser70 y Ser237. En la figura 34b se encuentra una molécula íntegra de ácido clavulánico, designada Cla1, la cual parece estar en una cavidad de la proteína que no tiene relevancia en la catálisis. Finalmente, en la figura 34c se puede observar una segunda molécula de ácido clavulánico íntegra en la superficie de la proteína (Fig. 34).

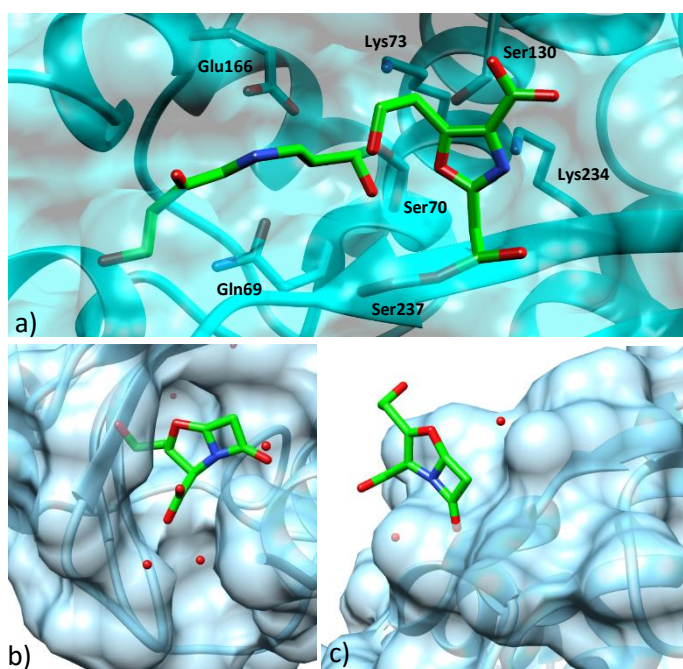


Figura 34. Ubicación de las moléculas de inhibidor en la proteína a) Representación de superficie del bolsillo catalítico donde se encuentran unidas dos moléculas de ácido clavulánico modificadas. b) Representación de superficie de la cavidad donde se encuentra unida la molécula Cla1. c) Representación de superficie de la zona donde se encuentra la molécula Cla2.

En el sitio activo de la proteína se pueden observar claramente dos moléculas; la primera es un intermediario de trans-enamina descarboxilada y la segunda es una molécula de ácido clavulánico en el intermediario acil-enzima (Fig. 34a). Se determinó que la molécula unida a la Ser70 era el intermediario trans-enamina descarboxilada; suponemos esto debido a que el enlace *trans* está asociado con la deslocalización entre el enlace C6-C7 lo que obliga al N4, C5, C6, C7, O8 y al O γ

de la Ser70 a ser coplanares, aparte que es el único intermediario que se ha reportado como descarboxilado y es el intermediario del mecanismo de inhibición más reportado en la literatura[69], [70]. Se puede observar que el mapa de densidad electrónica es continuo y que ésta molécula se ajusta bien con la densidad electrónica (Fig. 35a). La otra molécula encontrada en el

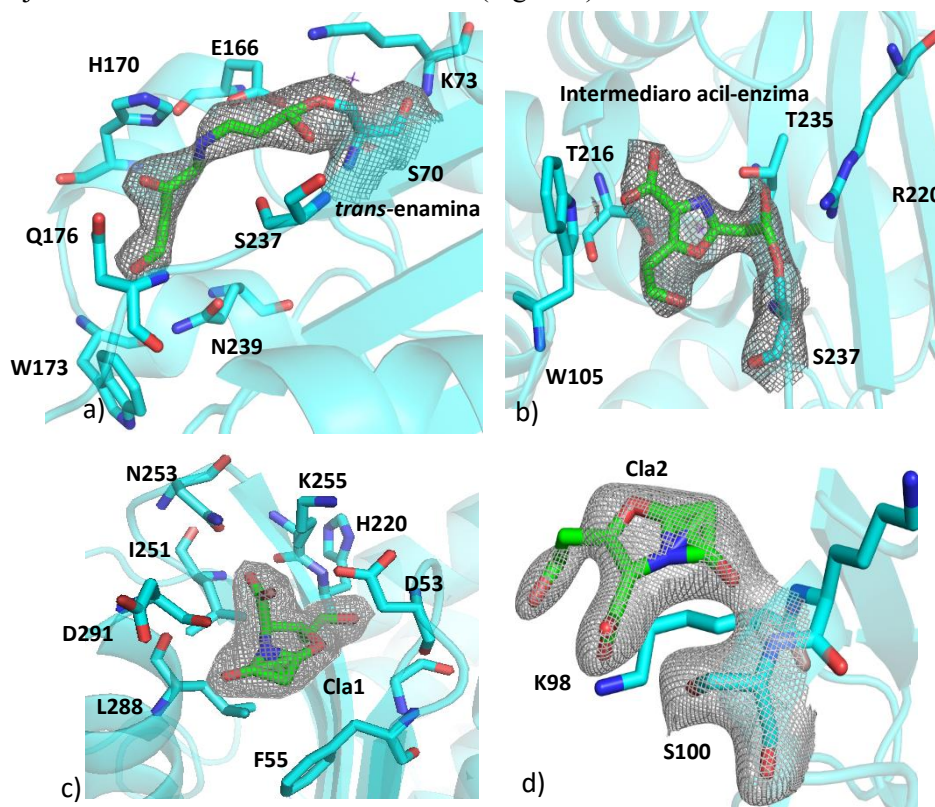


Figura 35. Mapa de densidad electrónica 2Fc-Fo (gris) de las moléculas de ácido clavulánico (verde) así como de sus intermediarios, representados a 1σ . a) demostración de la densidad electrónica de TEM unida de manera covalente a la Ser70 b) Densidad electrónica del intermediario acil-enzima unido a la Ser237. c) Densidad electrónica de la molécula de ácido clavulánico íntegro denominado como Cla1 d) Densidad electrónica de la molécula de ácido clavulánico íntegra denominada Cla2.

bolsillo catalítico de la proteína parece ser el intermediario acil-enzima y aparentemente se encuentra unido de manera covalente con la Ser237; esta interacción no ha sido reportada anteriormente. Se propone que es un enlace covalente debido a que en la molécula el intermediario acil-enzima es el único que se ajusta a la densidad electrónica, misma que se observa de manera continua entre el ácido clavulánico hidrolizado y la Ser237 (Fig. 35b). Aunque no es la única densidad continua en la vecindad de esta molécula, la unión covalente fue comprobada al realizar diferentes afinamientos con la molécula unida a las otras dos zonas donde se observó densidad continua, que es en los residuos Ser130 y Thr238. Al realizar estos afinamientos se pudo observar una aparición de densidades rojas en el mapa de diferencia. Otra manera de comprobar este enlace fue observando el mapa de diferencias con diferentes valores de σ , donde se probaron valores de 0.8 a 1.4 y pudimos observar que el único elemento que no se ajustaba al observar el mapa con un

valor de σ de 1, que era el OG8, aparecía al ver el mapa con un valor de σ de 0.8, ajustándose a la molécula modelada. A 1.4 de σ se puede observar que se pierde la densidad electrónica continua con la Ser130, mientras que a este mismo valor de σ la densidad electrónica se mantiene continua entre la Ser239 y la molécula de ácido clavulánico con el enlace hidrolizado. Más adelante se discutirá sobre la posible función de que exista un segundo sitio de acilación del ácido clavulánico, así como el posible mecanismo.

Existen dos moléculas de ácido clavulánico que se encuentran íntegras. La primera molécula de ácido clavulánico se encuentra en un bolsillo de la proteína, mientras que la segunda se localiza en la intercara entre dos vecinos cristalográficos (Fig. 35c y d). Ambas moléculas de ácido clavulánico

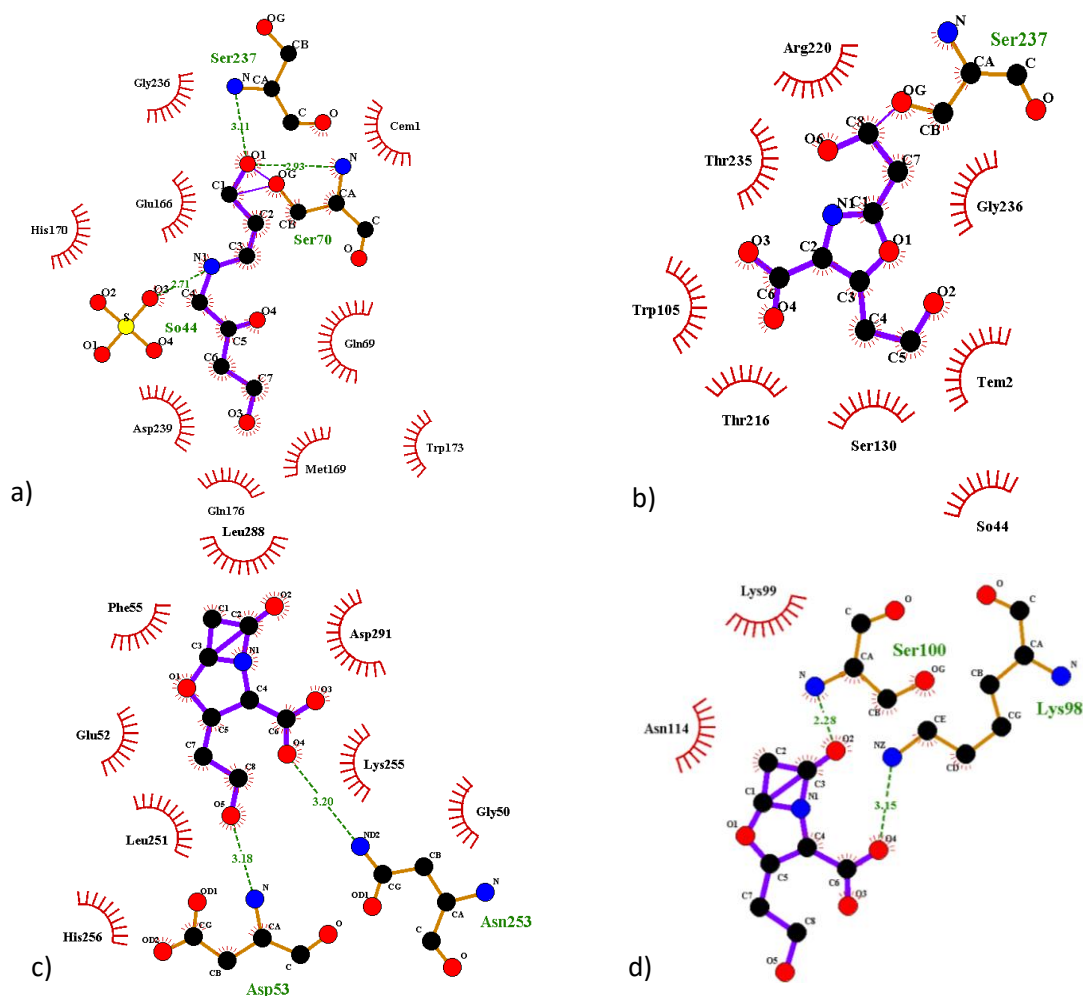


Figura 36. Representación en dos dimensiones de los contactos que realizan las moléculas modificadas de ácido clavulánico a) Contactos realizados por la molécula de TEM, donde las líneas punteadas representan puentes de hidrógeno. b) Contactos realizados por la molécula en el estado acil-enzima. c) Contactos de la molécula de ácido clavulánico íntegra, denominada Cla1, con la cavidad encontrada en TLA-1. d) Con la molécula de ácido clavulánico íntegra, denominada Cla2, encontrada en la superficie de la proteína.

están en sitios que no se encuentran implicados en la catálisis y parece ser que la primera molécula

se encuentra en un bolsillo que podría ser específico como se explicará más adelante mientras que la segunda molécula pudo haber sido capturada debido al exceso del inhibidor.

La molécula de ácido clavulánico en el intermediario de trans-enamina descaboxilada se encuentra realizando tres puentes de hidrógeno con TLA-1, específicamente con el N de la Ser 70 con el O1, el N de la Ser 237 con el oxígeno 1 y el OD2 de Asp 239 con el O4 (Fig. 36a). La molécula de trans-enamina se encuentra realizando contactos con residuos que previamente ya habían sido reportados en la interacción inhibidor proteína, como el residuo 69 y el Glu166. Una de las interacciones que llaman la atención con la molécula de trans-enamina es la que se presenta con el residuo Asp 239, la cual podría actuar limitando el movimiento de la molécula de trans-enamina, punto que se discutirá más adelante [69], [70].

La molécula de ácido clavulánico con el anillo β -lactámico hidrolizado se encuentra en el intermediario acil-enzima y está unido a la Ser237, realizando contactos con residuos que se han reportado como importantes en la catálisis, pero cuya función aún no se conoce, como con la Arg220 la cual se encuentra a distancia de 3.28 Å con el O6 y con la Ser237, con la cual se encuentra realizando el enlace covalente. Otro contacto con un átomo importante es con C4 y la Ser130, que al parecer no está realizando ningún puente de hidrógeno. Otro residuo que podría ser importante es el Trp105, como ya se había mencionado antes, ya que se encuentra interactuando con la molécula de ácido clavulánico (Fig 36b). Debido a que los residuos en las posiciones 220 y 237 han sido estudiados previamente en PER-2, sería interesante estudiar a la Ser237 de TLA-1 y ver cómo puede llegar a afectar la actividad y la inhibición, ya que en esta posición existe una Thr en la familia PER [52]. Un posible mecanismo por el cual se podría dar el intermediario acil-enzima es que ocurra de manera similar al ordinario con Ser70, donde la Lys73 proporciona el ambiente para que el O γ de la Ser70 realice un ataque nucleofílico y así poder hidrolizar el enlace C-N del antibiótico β -lactámico. En este caso la Arg222 podría proporcionar el ambiente propicio para dicho ataque nucleofílico por el O γ de la Ser237. Se propone a la Arg222 porque su importancia en la catálisis ha sido demostrada mediante experimentos de mutagénesis y se encuentra a una distancia de 3.28 Å de la Ser237. Una característica que destaca de la manera en la que está interaccionando este intermediario acil-enzima es que no hay puentes de hidrógeno con ningún residuo vecino, y los pocos puentes de hidrógeno se dan con moléculas de agua cercanas a la molécula. Los residuos con los cuales interacciona el intermediario acil-enzima se encuentran conservados en casi todas las secuencias β -lactamasas de la subclase A2 que se tomaron.

La molécula denominada Cla1 se encuentra haciendo puentes de hidrógeno con dos residuos, el Asp53 y la Asn253 a 3.18 y 3.2 Å respectivamente. Los otros residuos con los cuales se encuentra interactuando esta molécula son Glu52, Phe55, Leu288, Asp291, Lys255, Gly50, His256 y Leu251 (Fig. 36c). Esto es interesante y se evaluará más adelante si estos residuos se encuentran en otras β -lactamasas para poder hipotetizar si es factible que otras β -lactamasas aparte de TLA-1 y TLA-3 pueden tener esta cavidad.

Finalmente, la molécula de Cla2 es la que menos contactos está haciendo, con Ser100, Lys99, Lys98 y Asn114, donde solo los contactos con los residuos, Lys99 y la Ser100 son detectados como puentes de hidrógeno a 3.35 Å y a 2.28 Å (Fig. 36d).

El siguiente paso consistió en analizar los residuos involucrados en la interacción con el inhibidor y compararlos contra la enzima sin inhibidor. Al realizar este análisis se puede observar que, como había sido reportado de manera previa por estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), el movimiento de los residuos dentro del sitio activo es mínimo y se limita a un movimiento de la Ser130 y de la Ser70, los cuales rotaron aproximadamente 63° y 70° respectivamente. Se ha determinado previamente por NMR que el sitio activo de las β -lactamasas de clase A es muy rígido, lo que explica claramente lo que observamos en la estructura [56]. Al analizar los residuos cercanos a la molécula que se encuentra en el intermediario acil-enzima se puede observar que ninguno de los residuos parece estar en una posición diferente en la estructura con ácido clavulánico y sin el inhibidor, con excepción a los mencionados anteriormente (Fig. 37a).

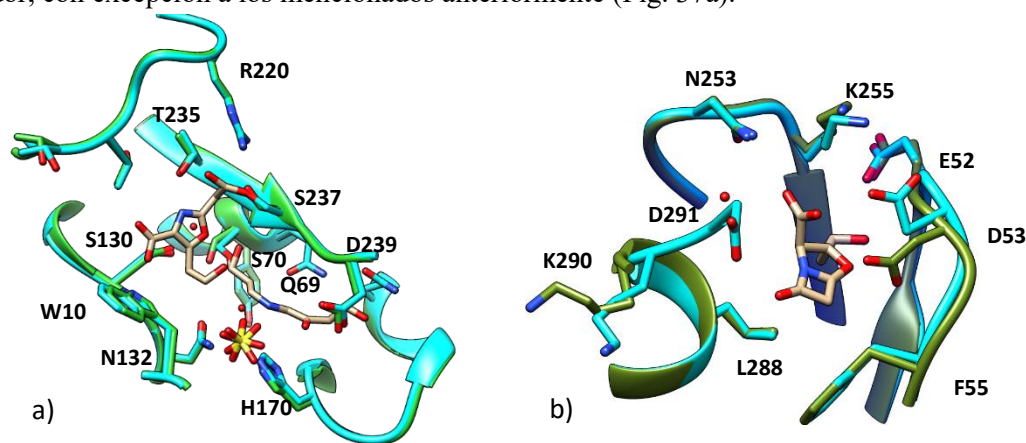


Figura 37. Alineamiento estructural de los sitios de unión donde se encontraron moléculas de ácido clavulánico entre TLA-1 con y sin ligando a) Comparación de los residuos del sitio activo entre TLA con ligando (cian) contra TLA-1 sin ligando (verde). b) Comparación de los residuos de la cavidad donde se encuentra el ácido clavulánico íntegro en TLA-1 con ligando (cian) contra TLA-1 sin ligando (verde).

Al comparar si existen cambios estructurales en el bolsillo donde se encuentra la molécula Cla1 sin y con el inhibidor se pudo encontrar que existe un cambio conformacional en el asa entre las láminas

β -1 y β -2 específicamente el Glu53 y la Asp54 cambian de manera radical de posición. El Asp53 cambia de posición para evitar el contacto con el oxígeno del anillo oxazolidina, esto ocasiona un cambio en la horquilla, cambiando la conformación de la Asp54. Otro cambio es que el Asp291 es estabilizado por el ácido clavulánico, lo cual se observa debido a que no hay densidad electrónica en la estructura sin ligando (Fig. 37b).

La molécula de Cla2 se encuentra en la interfaz de un vecino cristalográfico por lo que es de esperarse que no existan cambios importantes en esta zona al unirse el inhibidor. Algo que parece destacar es que en el mismo lugar donde se unió Cla2 en la estructura de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico, hay un ion sulfato en la estructura de TLA-1 sin inhibidor y existen dos aguas conservadas en ambas estructuras. Sin embargo, esta zona de unión parece ser un artefacto cristalográfico debido a que la molécula Cla2 se encuentra realizando un contacto con el vecino cristalográfico en la Asp244.

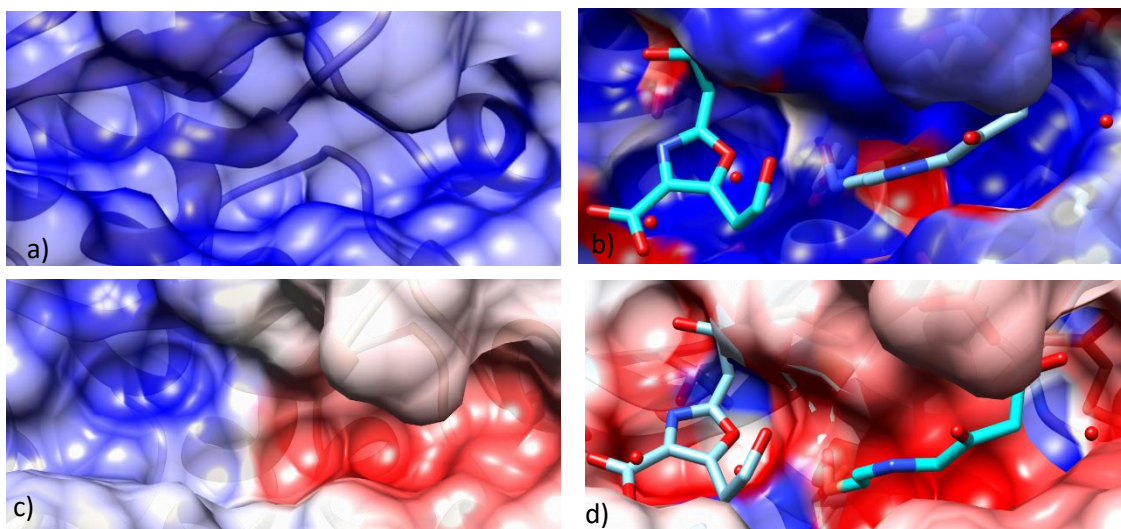


Figura 38. Representación de superficie electrostática de la cavidad catalítica. a) Superficie electrostática de la cavidad catalítica sin inhibidor a pH 4.5 b) Superficie electrostática de la cavidad catalítica en complejo con el inhibidor a pH 4.5 c) superficie electrostática de la cavidad catalítica a pH 7.0 d) Superficie electrostática de la cavidad catalítica en complejo con inhibidor a pH 7.0

Al analizar el potencial mapeado sobre la superficie molecular a pH 7 podemos observar que el sitio activo se encuentra dividido, la mitad que se encuentra cerca del asa Ω y de la horquilla entre la lámina β -3 y β -4 está cargada negativamente, mientras que la otra mitad se encuentra cargada positivamente (Fig. 38c). Al analizar el acomodo de la *trans*-enamino descarboxilada, así como de la molécula de ácido clavulánico con solo el anillo β -lactámico hidrolizado podemos observar que la primera molécula se acomoda en la mitad negativa, mientras que la segunda molécula en la mitad positiva (Fig. 38c y d). Para ver cómo el pH puede afectar la unión del inhibidor, se realizó análisis

de potencial mapeado sobre la superficie molecular de la proteína con y sin inhibidor. Podemos ver al comparar la superficie electrostática (Fig. 38) de la proteína con el inhibidor unido a pH 4.5 y a pH 7.0 que se mantienen parches en común que estabilizan a los dos intermediarios de ácido clavulánico, lo cual soporta la idea de que este intermediario puede encontrarse a otros pHs y no solo a pH 4.5 que es la condición del cristal. Al analizar los

Para ver si existía alguna diferencia significativa con la forma de unión del ácido clavulánico con otras β -lactamasas, se comparó la estructura de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico, con otras estructuras de β -lactamasas de clase A en complejo con este mismo ligando. Para el análisis comparativo se utilizaron las estructuras de la mutante E166A de SHV-1 (2A49) (Fig. 39b), de la β -lactamasa de *Bacillus licheniformis* BS3 (2Y91) (Fig. 39c) y la β -lactamasa de *Mycobacterium tuberculosis* (3CG5) (Fig. 39d). Aunque los residuos responsables de la catálisis se encuentran conservados entre todas las β -lactamasas de la clase A, los residuos para la estabilización y reconocimiento de los ligandos en el sitio activo son variables; debido a esto el análisis comparativo se limitará a comparar la posición del intermediario de ácido clavulánico. Algo que se encuentra reportado por estudios de cristalografía acoplada a RAMAN y cristalografía de rayos-X es que el intermediario *trans*-enamina es altamente móvil, razón por la cual la densidad electrónica no se encuentra completa en SHV-1 y la razón por la cual el intermediario *trans*-enamina en la estructura de la β -lactamasa de *Bacillus licheniformis* BS3 tiene dos conformaciones (Fig. 39b y c). Algo que llama la atención es que el intermediario *trans*-enamina en TLA-1 no parece ser tan móvil, ya que la densidad del intermediario se encuentra completa. Al comparar las estructuras previamente mencionadas, algo que parece resaltar en TLA-1 es, que el intermediario *trans*-enamina parece estar atrapado en el bolsillo catalítico por el Asp241 y se encuentra en la cavidad extendida que caracteriza a las β -lactamasas de la subclase A2. Esto podría explicar la estabilidad del intermediario *trans*-enamina. Otro intermediario *trans*-enamina que también parece estar estable es el de la β -lactamasa de *Mycobacterium tuberculosis*. Una de las principales diferencias entre TLA-1 y las otras β -lactamasas es la extensión de la cavidad ya que ésta permite el acomodo del intermediario *trans*-enamina. Al comparar la unión de TLA-1 con ácido clavulánico y de TLA-3 con avibactam se puede observar claramente que ambos antibióticos se acomodan de una manera similar en la parte extendida de la cavidad catalítica. Como ya se ha mencionado antes, ésta es característica de las β -lactamasas de la subclase A2, pero el grupo sulfato de la molécula de avibactam se encuentra en el mismo sitio donde se encuentra la segunda molécula de ácido

clavulánico en un intermediario acil enzima, haciendo evidente la importancia de este sitio en las β -lactamasas de la subclase A2.

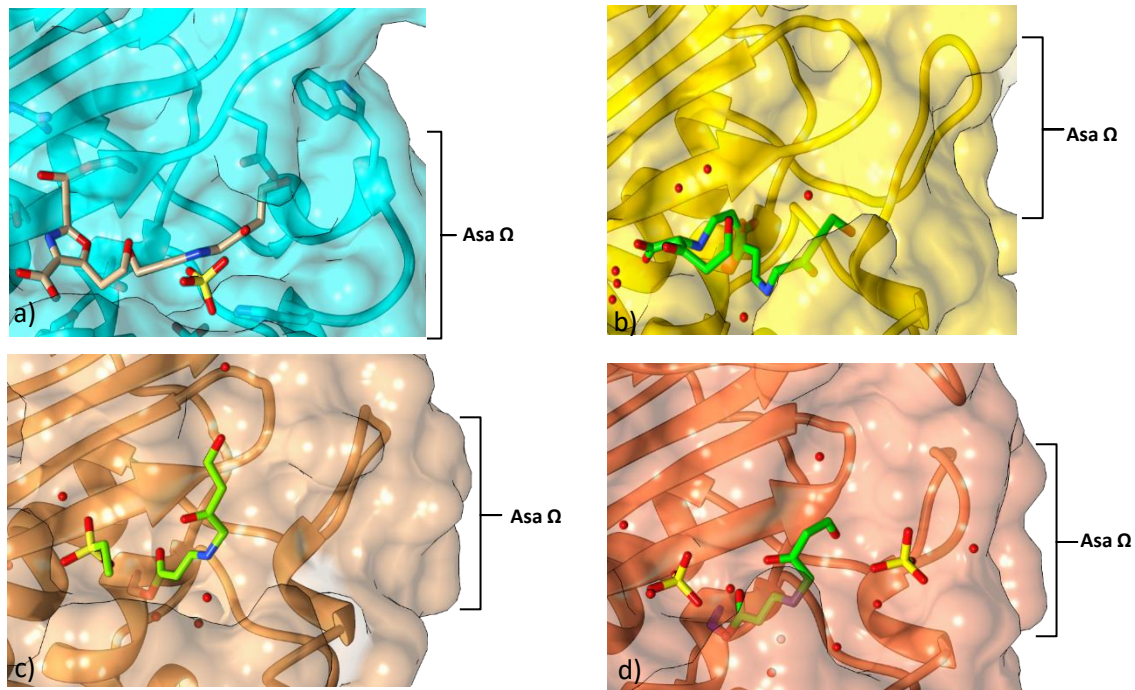


Figura 39. Representación de superficie de TLA-1 y las tres estructuras en complejo con ácido clavulánico reportadas en el PDB donde se resalta la posición del ácido clavulánico (verde), en negro se encuentra marcada señalada el asa Ω . a) TLA-1(cian) b) β -lactamasa de *Staphylococcus aureus* (PDB 1BLC) (amarillo) c) SHV-1 (PDB 2A49) (café) d) β -lactamasa de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB 3CG5) (coral)

Para averiguar si el segundo sitio de acilación en el sitio activo donde se encontró el intermediario acil-enzima se podría encontrar en otras β -lactamasas de la subclase A2, se realizó un alineamiento de secuencias donde se incluyeron PER-1 y PER-2 debido a que han sido las más estudiadas, TLA-3, CME-1, CIA-1 y CGA-1 (Fig. 40). El alineamiento muestra que los residuos Arg222 y la Thr235 se encuentran conservados y el residuo 237 es una Thr en la familia PER y una Ala en CGA-1, mientras en la familia TLA y en CME-1 y CIA-1 este residuo es una Ser. Otro residuo se encuentra conservado en todas las β -lactamasas de la subclase A2 analizadas es el Trp105, aunque vale la pena aclarar que en otras β -lactamasas de este grupo este residuo se ve reemplazado por una Tyr. Estos resultados son interesantes ya que esto permite realizar la hipótesis que el intermediario acil-enzima del ácido clavulánico con la Ser/Thr237 podría estar presente en otras familias de β -lactamasas de la subclase A2 y no solo en TLA ya que CME-1, CIA-1, CGA-1, PER-1 y PER-2 comparten un 50.5%, 50.5% 50.2%, 43% y 42% de identidad de secuencia con TLA-1 respectivamente. Esto último parece sugerir que este sitio de interacción se podría encontrar en otras proteínas de la subclase A2.

Una hipótesis que surge tras estos análisis es que moléculas de antibióticos β -lactámicos pequeñas se pueden unir en dos sitios en TLA-1, el primero en la Ser70 y el segundo en la Ser237. Considerando los modelos simulados realizados anteriormente y minimizaciones que se han hecho previamente con β -lactamasas de la subclase A2, éstos sugieren que los grupos variables de las penicilinas, así como de las cefalosporinas, se acomoda cercano a la Arg222 y a la Ser237, lo que impide la unión de una segunda molécula, pero en el caso de ácido clavulánico esta es una molécula más pequeña, lo que podría permitir que se una la segunda molécula [11], [12]. La función biológica

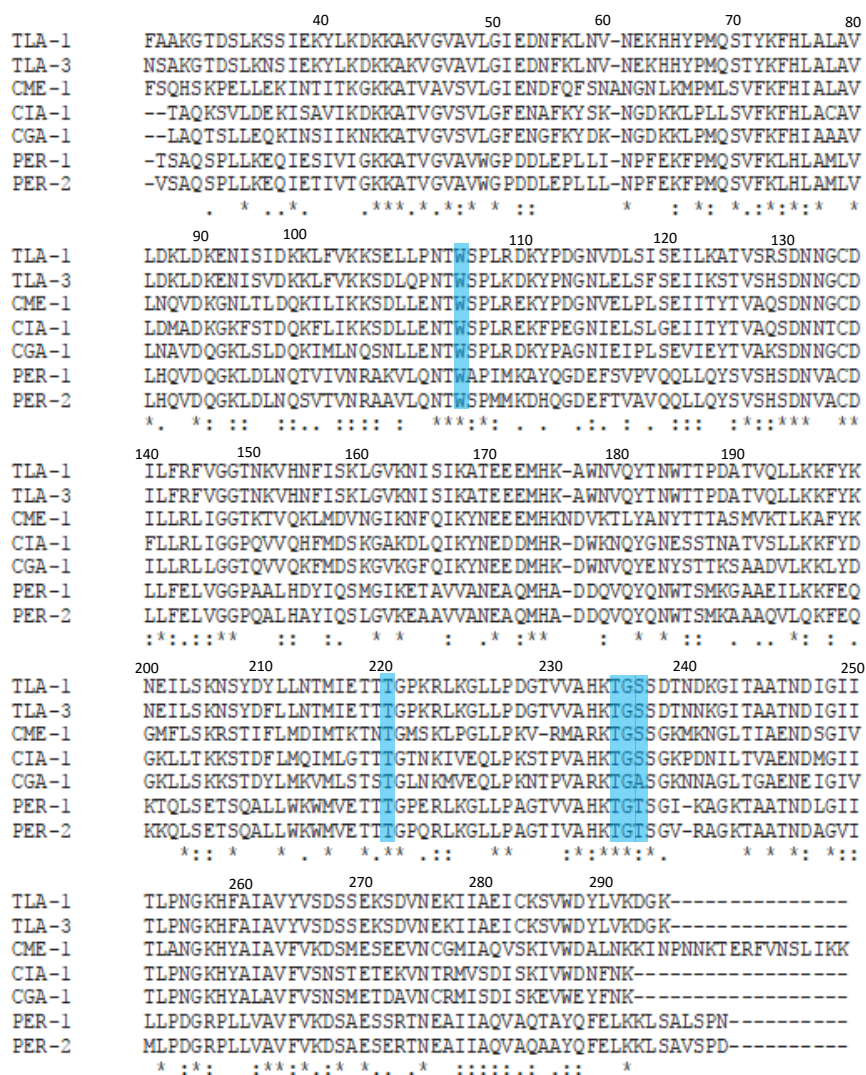


Figura 40 Alineamiento de secuencias representativas de la subclase A2 de β -lactamasas donde en azul se señalan los residuos que se encuentran realizando contactos con el intermediario acil-enzima entre la Ser 239 y el ácido clavulánico.

de un segundo sitio de unión para inhibidores no se ha reportado y es de interés médico para conocer mejor a este subgrupo tan poco estudiado. Ya que TLA-1 tiene dos moléculas de intermediarios del inhibidor unidas de manera covalente en el sitio activo, algo que no había sido reportado antes, esto

podría sugerir que TLA-1, y, posiblemente otras β -lactamasas de esta subclase, tengan la función de secuestrar moléculas de inhibidores clásicos de mecanismo como es el ácido clavulánico y el sulbactam, lo que les podría permitir soportar mayores concentraciones de inhibidores de β -lactamasas. Este tipo de mecanismo no ha sido reportado antes y sería interesante comprobar o refutar esta hipótesis.

9 Conclusiones

Se logró sobreexpresar, purificar a un 85% y cristalizar a la β -lactamasa de espectro extendido TLA-1. Los cristales fueron de calidad suficiente para obtener patrones de difracción que permitieron la obtención de estructuras cristalográficas a una resolución de 2.2 a 2.8 Å.

La obtención de la estructura a 2.2 Å permitió hacer el análisis y comparación estructural de TLA-1 contra TLA-3 y miembros de la familia PER, del cual se concluyó, que no hay diferencias estructurales obvias que podrían explicar las características cinéticas particulares que posee TLA-1, como por ejemplo su K_i de un orden de magnitud mayor, siendo necesario realizar más estudios. Sin embargo, estas comparaciones nos permitieron proponer distintos residuos que podrían ser de interés para un estudio a futuro y que podrían explicar las características cinéticas de TLA-1. Estos residuos son, por ejemplo, el Trp173 que no se encuentra en miembros de la familia PER y se localiza donde se ha reportado la entrada al sitio activo en las β -lactamasas de clase A; o la Arg129 que sólo se encuentra en TLA-1 y que podría ser responsable de la K_i característica TLA-1. Otros elementos de interés que surgieron después del análisis del sitio activo son las redes de puentes de hidrógeno, las cuales son iguales a las previamente reportadas para la familia PER y para TLA-3, siendo la única diferencia un cambio de una Ser por una Thr en la posición 237, lo que podría ser importante, porque los análisis posteriores revelaron que esta serina podría ser acilada en la reacción de inhibición, y es de interés analizar si existen cambios cinéticos al cambiarla por una Thr como en la familia PER. Se propone que la K_i menor puede surgir de una desestabilización de la horquilla SDN, como se ha propuesto en otros modelos, lo que le da importancia al estudio de residuos cercanos a esta horquilla como la Arg139 y la Ala125.

La estructura de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico permitió proponer hipótesis interesantes, como la existencia un segundo sitio de acilación en los miembros de la familia PER, TLA y otras familias de β -lactamasas de la subclase A2, ya que este sitio se encuentra altamente conservado y, en las familias que se analizaron, solo cambia un aminoácido, la Ser237 por una Thr. Una de las hipótesis que esto nos hace suponer es que los miembros de la familia TLA y otras familias de β -lactamasas serían capaces de capturar dos moléculas de ácido clavulánico, lo que podría llegar a influir en la resistencia del organismo a inhibidores de β -lactamasas y estas enzimas también podrían tener una función de captura de inhibidores.

El segundo sitio de acilación por parte de la Ser237 es específico para inhibidores clásicos, ya que el grupo R1 en cefalosporinas y penicilinas es capaz de ocupar este sitio, mientras que los

inhibidores de mecanismo no poseen este grupo R1, razón por la cual es posible que se puedan unir dos moléculas de inhibidor.

El estudio de las β -lactamasas ha sido de interés médico durante décadas y encontrar un posible mecanismo de inhibición diferente es de importancia, así como la posible existencia de otra función, como la captura de inhibidores. Por lo tanto, se debe estudiar más a fondo esta subclase de β -lactamasas ya que podrían ser de importancia médica en un futuro.

10 Perspectivas

Realizar análisis de espectrometría de masas con TLA-1 y mutantes en la Ser70 y Ser237 en complejo con ácido clavulánico para validar la existencia de los enlaces covalentes propuestos en la estructura cristalográfica, así como comprobar si la segunda cavidad encontrada sirve para atrapar ácido clavulánico [118].

Realizar análisis cinéticos y de inhibición con mutantes de la Ser237 para observar la importancia que puede tener este residuo en el segundo sitio de acilación. Una de las mutantes de interés sería la S237T ya que es la que se encuentra en la familia PER y previamente se ha reportado este residuo como importante en la subclase A2 de β -lactamasas. Así mismo sería interesante realizar mutantes de los residuos que se encuentran haciendo contactos electrostáticos con la molécula de ácido clavulánico y observar el efecto que estos podrían tener.

Hacer mutantes en la Ser70 para obtener estructuras en complejo con un sustrato, como cefotaxima, para poder analizar si existen más diferencias entre las subclases A1 y A2 de β -lactamasas. El complejo con el sustrato también ayudaría a elucidar qué es lo que permite el fenotipo de ESBL en estas enzimas y comprobar si sólo es la expansión del bolsillo catalítico, como se ha propuesto con anterioridad.

Realizar pruebas de inhibición de mutantes en Arg129 y Ala125, por His y Ser respectivamente, los cuales son los residuos presentes en TLA-3, y así observar si éstos son los responsables de la inhibición a nivel μ M de sulbactam y ácido clavulánico que presenta TLA-1.

Realizar análisis de concentración mínima inhibitoria (MIC) con un antibiótico β -lactámico (como cefotaxima) y un inhibidor (como ácido clavulánico) de una bacteria que exprese TLA-1 y otra β -lactamasa de Clase A para ver si TLA-1 tiene algún efecto en la MIC debido a que la estructura del complejo parece sugerir que TLA-1 es capaz de capturar tres moléculas de inhibidor.

11 Literatura consultada

- [1] A. Matagne, J. Lamotte-Brasseur, and J.-M. Frère, "Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity," *Biochem. J.*, vol. 330, pp. 581–598, 1998.
- [2] D. M. Livermore, "Fourteen years in resistance," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 39, no. 4, pp. 283–294, 2012.
- [3] B. M. A. Hujer, and R. Bonomo, "What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases," *Drug Resist. Updat.*, vol. 9, no. 3, pp. 142–156, 2006.
- [4] K. Buildings *et al.*, "A standard numbering scheme for the Class A β -lactamases," *Biochem. J.*, vol. 276, no. December 1990, pp. 269–272, 1991.
- [5] J. Silva *et al.*, "TLA-1 : a New Plasmid-Mediated Extended-Spectrum β -Lactamase from Escherichia coli," vol. 44, no. 4, pp. 997–1003, 2000.
- [6] R. P. Ambler, "The Structure of β -lactamases," *Philos. Trans. R. Soc. London B*, vol. 289, pp. 321–331, 1980.
- [7] C. Hubschwerlen, "7.17 β -Lactam Antibiotics," *Compr. Med. Chem. II*, vol. 7, pp. 479–518, 2007.
- [8] D. Kalman and S. Barriere, "Review of the pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use of cephalosporins," *Tex. Heart Inst. J.*, vol. 17, no. 3, pp. 203–215, 1990.
- [9] M. G. P. Page, "Extended-spectrum β -lactamases: Structure and kinetic mechanism," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 14, no. SUPPL. 1, pp. 63–74, 2008.
- [10] M. Nukaga, K. Mayama, A. M. Hujer, R. A. Bonomo, and J. R. Knox, "Ultrahigh resolution structure of a class A beta-lactamase: on the mechanism and specificity of the extended-spectrum SHV-2 enzyme.," *J. Mol. Biol.*, vol. 328, no. 1, pp. 289–301, 2003.
- [11] S. Tranier, A.-T. Bouthors, L. Maveryraud, G. Valérie, W. Sougakoff, and J.-P. Samama, "The high-resolution crystal structure for class A β -lactamase PER-1 reveals the bases for its increase in breadth of activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 36, pp. 28075–28082, 2000.
- [12] M. Ruggiero *et al.*, "Crystal structure of the extended-spectrum β -lactamase PER-2 and insights into the role of specific residues in the interaction with β -lactams and β -lactamase inhibitors," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 10, pp. 5994–6002, 2014.
- [13] Y. S. Wanchun, Jin, Jun-ichi Wachino, Yoshihiro Yamaguchi, Kouji Kimura, Anupriya Kumar, Mototsugu Yamada, Akihiro Morinaka and and Y. A. Minoru Yonezawa, Hiromasa Kurosaki, "Structural insights into the TLA-3 extended-spectrum β -lactamase and its inhibition by avibactam and OP0595," *Antimicrob. Agents Chemother.*, no. July, pp. 2–39, 2017.
- [14] A. Singh, V. Upadhyay, and A. K. Panda, "Solubilization and refolding of inclusion body proteins," *Insoluble Proteins Methods Protoc.*, vol. 99, no. 4, pp. 283–291, 2014.
- [15] I. Massova and S. Mobashery, "MINIREVIEW Kinship and

- Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and β -Lactamases," vol. 42, no. 1, pp. 1–17, 1998.
- [16] J. Lamotte-Brasseur, G. Dive, O. Dideberg, P. Charlier, J. M. Frère, and J. M. Ghuysen, "Mechanism of acyl transfer by the class A serine beta-lactamase of *Streptomyces albus* G.," *Biochem. J.*, vol. 279 (Pt 1, pp. 213–21, 1991.
- [17] N. H. Georgopapadakou, "MINIREVIEW Penicillin-Binding Proteins and Bacterial Resistance to β -Lactams," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 37, no. 10, pp. 2045–2053, 1993.
- [18] J.-M. Ghuysen, "SERINE B-LACTAMASES AND PENICILLIN-BINDING PROTEINS," *Annu. Rev. Microbiol*, vol. 45, pp. 37–67, 1991.
- [19] E. Sauvage, F. Kerff, M. Terrak, J. A. Ayala, and P. Charlier, "The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 32, no. 2, pp. 234–258, 2008.
- [20] X. Zeng and J. Lin, "Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria," *Front. Microbiol.*, vol. 4, no. MAY, pp. 1–9, 2013.
- [21] J. Delmas *et al.*, "Structural insights into substrate recognition and product expulsion in CTX-M enzymes," *J. Mol. Biol.*, vol. 400, no. 1, pp. 108–120, 2010.
- [22] M. S. Wilke, A. L. Lovering, and N. C. Strynadka, " β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 8, no. 5, pp. 525–533, 2005.
- [23] G. Tillotson, "A crucial list of pathogens," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 3099, no. 17, pp. 30753–30754, 2017.
- [24] E. Tacconelli *et al.*, "Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 18, no. March, 2017.
- [25] S. Shaikh, J. Fatima, S. Shakil, S. M. D. Rizvi, and M. A. Kamal, "Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 90–101, 2015.
- [26] WHO, "Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance," *Bull. World Health Organ.*, vol. 61, no. 3, pp. 383–94, 2014.
- [27] M. Gniadkowski, "Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation.," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 14 Suppl 1, pp. 11–32, 2008.
- [28] H. KM, H. CMW, D. S, G. ML, and B. GR, "Modeling proteins' hidden conformations to predict antibiotic resistance.," *Nat. Commun.*, vol. 7, pp. 1–10, 2016.
- [29] M. T. Martin and S. G. Waley, "Kinetic characterization of the acyl-enzyme mechanism for f-lactamase I," vol. 925, pp. 923–925, 1988.
- [30] H. Öztürk, E. Ozkirimli, and A. Özgür, "Classification of beta-lactamases and Penicillin Binding Proteins using ligand-centric network models," *PLoS One*, vol. 10, no. 2, pp. 1–23, 2015.
- [31] K. Bush, G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros, "A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 39, no. 6, pp. 1211–

- 1233, 1995.
- [32] K. Bush, "Groups 1, 2a, 2b, and 2b'," vol. 33, no. 3, pp. 264–270, 1989.
- [33] K. Bush, "The ABCD's of β -lactamase nomenclature," *J. Infect. Chemother.*, vol. 19, no. 4, pp. 549–559, 2013.
- [34] K. Bush and G. A. Jacoby, "Updated Functional Classification of β -Lactamases," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 3, pp. 969–976, 2010.
- [35] A. M. Queenan, W. Shang, R. Flamm, and K. Bush, "Hydrolysis and inhibition profiles of β -lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 1, pp. 565–569, 2010.
- [36] K. Bush, "o tN," vol. 33, no. 3, pp. 271–276, 1989.
- [37] R. P. Ambler and R. J. Meadway, "Chemical Structure of Bacterial Penicillinases," *Nature*, vol. 224, pp. 177–178, 1969.
- [38] F. K. Majiduddin, I. C. Materon, and T. G. Palzkill, "Molecular analysis of beta-lactamase structure and function.," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 292, pp. 127–137, 2002.
- [39] B. Joris *et al.*, "The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the Streptomyces R61 DD-peptidase family.," *Biochem. J.*, vol. 250, no. 2, pp. 313–324, 1988.
- [40] M. E. Falagas and D. E. Karageorgopoulos, "Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms," *J. Hosp. Infect.*, vol. 73, no. 4, pp. 345–354, 2009.
- [41] D. J. Hoban, R. R. Reinert, S. K. Bouchillon, and M. J. Dowzicky, "Global in vitro activity of tigecycline and comparator agents: Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial 2004–2013," *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 14, no. 1, p. 27, 2015.
- [42] F. Reyna-Flores *et al.*, "Molecular epidemiology of Escherichia coli O25b-ST131 isolates causing community-acquired UTIs in Mexico.," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 76, no. 3, pp. 396–8, 2013.
- [43] J. Silva-Sanchez *et al.*, "Extended-spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Causing Nosocomial Infections in Mexico. A Retrospective and Multicenter Study," *Arch. Med. Res.*, vol. 42, no. 2, pp. 156–162, 2011.
- [44] D. Alcantar-Curiel *et al.*, "Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum beta -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 38, no. 8, pp. 1067–1074, 2004.
- [45] M. L. Winkler *et al.*, "Design and Exploration of Novel Boronic Acid Inhibitors Reveals Important Interactions with a Clavulanic Acid-Resistant Sulfhydryl-Variable (SHV) β -Lactamase," *NIH Public Access*, vol. 56, no. 3, pp. 1084–1097, 2014.
- [46] S. O. Meroueh *et al.*, "Molecular Dynamics at the Root of Expansion of Function in the M69L Inhibitor-Resistant TEM -Lactamase from Escherichia coli," no. 3, pp. 9422–9430, 2002.
- [47] D. Roccatano *et al.*, "Dynamical

- aspects of TEM-1 β -Lactamase probed by molecular dynamics," *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, vol. 19, no. 5, pp. 329–340, 2005.
- [48] M. H. Baig *et al.*, "Insight into the effect of inhibitor resistant S130G mutant on physico-chemical properties of SHV type beta-lactamase: A molecular dynamics study," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, pp. 1–19, 2014.
- [49] C. C. H. Chen and O. Herzberg, "Structures of the acyl-enzyme complexes of the *Staphylococcus aureus* β -lactamase mutant Glu166Asp:Asn170Gln with benzylpenicillin and cephaloridine," *Biochemistry*, vol. 40, no. 8, pp. 2351–2358, 2001.
- [50] J. F. Petrosino and T. Palzkill, "Systematic mutagenesis of the active site omega loop of TEM-1 β -lactamase," *J. Bacteriol.*, vol. 178, no. 7, pp. 1821–1828, 1996.
- [51] J. C. Hermann, J. Pradon, J. N. Harvey, and A. J. Mulholland, "High level QM/MM modeling of the formation of the tetrahedral intermediate in the acylation of wild type and K73A mutant TEM-1 class A β -lactamase," *J. Phys. Chem. A*, vol. 113, no. 43, pp. 11984–11994, 2009.
- [52] M. Ruggiero *et al.*, "Mutations at Arg220 and Thr237 in PER-2 β -lactamase: impact on conformation, activity and susceptibility to inhibitors," *Antimicrob. Agents Chemother.*, no. March, p. AAC.02193-16, 2017.
- [53] V. Stojanoski *et al.*, "A triple mutant in the Ω -loop of TEM-1 β -lactamase changes the substrate profile via a large conformational change and an altered general base for catalysis," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 16, pp. 10382–10394, 2015.
- [54] C. J. Adamski *et al.*, "Molecular basis for the catalytic specificity of the CTX-M extended-spectrum β -lactamases," *Biochemistry*, vol. 54, no. 2, pp. 447–457, 2015.
- [55] M. Morin, S and Gagne, "NMR Dynamics of PSE-4 β -Lactamase : An Interplay of ps-ns Order and μ s-ms Motions in the Active Site," vol. 96, no. June, pp. 4681–4691, 2009.
- [56] S. Morin and S. M. Gagné, "NMR dynamics of PSE-4 β -lactamase: An interplay of ps-ns order and μ s-ms motions in the active site," *Biophys. J.*, vol. 96, no. 11, pp. 4681–4691, 2009.
- [57] a Dubus, J. M. Wilkin, X. Raquet, S. Normark, and J. M. Frère, "Catalytic mechanism of active-site serine beta-lactamases: role of the conserved hydroxy group of the Lys-Thr(Ser)-Gly triad.," *Biochem. J.*, vol. 301 (Pt 2, pp. 485–494, 1994.
- [58] A. S. Ibuka *et al.*, "Crystal structure of extended-spectrum beta-lactamase Toho-1: insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and substrate specificity expansion.," *Biochemistry*, vol. 42, no. 36, pp. 10634–43, 2003.
- [59] X. Pan *et al.*, "Crystallographic snapshots of Class A β -lactamase catalysis reveal structural changes that facilitate β -lactam hydrolysis," *J. Biol. Chem.*, pp. 1–23, 2017.
- [60] D. He, J. Chiou, Z. Zeng, E. W.-C. Chan, J.-H. Liu, and S. Chen, "Comparative Characterization of CTX-M-64 and CTX-M-14 Provides Insights into the Structure and Catalytic Activity of the CTX-M Class of Enzymes," *Antimicrob.*

- Agents Chemother.*, vol. 60, no. 10, pp. 6084–6090, 2016.
- [61] V. P. Sandanayaka and A. S. Prashad, "Resistance to beta-lactam antibiotics: structure and mechanism based design of beta-lactamase inhibitors," *Curr. Med. Chem.*, vol. 9, no. 12, pp. 1145–1165, 2002.
- [62] Y. Yang, B. A. Rasmussen, and D. M. Shlaes, "Class A beta-lactamases--enzyme-inhibitor interactions and resistance.," *Pharmacol. Ther.*, vol. 83, no. 2, pp. 141–151, 1999.
- [63] T. Sun, C. R. Bethel, R. A. Bonomo, and J. R. Knox, "Inhibitor-resistant class a β -lactamases: Consequences of the ser130-to-gly mutation seen in apo and tazobactam structures of the SHV-1 variant," *Biochemistry*, vol. 43, no. 44, pp. 14111–14117, 2004.
- [64] A. Miani, M. S. Helfand, and S. Raugei, "Ab initio Raman spectra of β -lactamase inhibitor intermediates bound to E166a SHV β -lactamase," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 5, no. 8, pp. 2158–2172, 2009.
- [65] C. C. H. Chen and O. Herzberg, "Inhibition of p-Lactamase by Clavulanate Studies Trapped Intermediates in Cryocrystallographic," pp. 1103–1113, 1992.
- [66] I. Massova and S. Mobashery, "Molecular Bases for Interactions between -Lactam Antibiotics and -Lactamases," vol. 30, no. 4, pp. 162–168, 1997.
- [67] F. J. Pérez-Ilarena, G. Bou, and A. Coruña, "-Lactamase Inhibitors : The Story so Far," pp. 3740–3765, 2009.
- [68] T. Viswanatha, L. Marrone, V. Goodgellow, and G. I. Dmitienko, "Assays for B-Lactamase Activity and Inhibition Thammaiah," in *New Antibiotic Targets*, S. W. Champney, Ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2008, pp. 239–260.
- [69] P. S. Padayatti *et al.*, "High resolution crystal structures of the trans-enamine intermediates formed by sulbactam and clavulanic acid and E166A SHV-1 β -lactamase," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 41, pp. 34900–34907, 2005.
- [70] M. A. Totir *et al.*, "The Effect of the Inhibitor-Resistant M69V Substitution on the Structures and Populations of Trans-Enamine β -Lactamase Intermediates," *Biochemistry*, vol. 45, no. 39, pp. 11895–11904, 2008.
- [71] A. P. Kuzin, M. Nukaga, Y. Nukaga, A. Hujer, R. A. Bonomo, and J. R. Knox, "Inhibition of the SHV-1 β -lactamase by Sulfones: Crystallographic observation of two reaction intermediates with Tazobactam," *Biochemistry*, vol. 40, no. 6, pp. 1861–1866, 2001.
- [72] H. Heidari-Torkabadi *et al.*, "'mind the Gap': Raman Evidence for Rapid Inactivation of CTX-M-9 β -Lactamase Using Mechanism-Based Inhibitors that Bridge the Active Site," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 40, pp. 12760–12763, 2015.
- [73] H. Heidari Torkabadi, C. R. Bethel, K. M. Papp-Wallace, P. A. J. De Boer, R. A. Bonomo, and P. R. Carey, "Following drug uptake and reactions inside escherichia coli cells by raman microspectroscopy," *Biochemistry*, vol. 53, no. 25, pp. 4113–4121, 2014.
- [74] F. Jacob, B. Joris, S. Lepage, J. Dusart, and J. M. Frère, "Role of the conserved amino acids of the 'SDN'

- loop (Ser130, Asp131 and Asn132) in a class A beta-lactamase studied by site-directed mutagenesis.," *Biochem. J.*, vol. 271, no. 2, pp. 399–406, 1990.
- [75] G. Georgiou, P. Valax, M. Ostermeier, and P. M. Horowitz, "Folding and Aggregation of Tem Beta-Lactamase - Analogies With the Formation of Inclusion-Bodies in Escherichia-Coli," *Protein Sci.*, vol. 3, no. 11, pp. 1953–1960, 1994.
- [76] J. Vandenameele *et al.*, "Folding of class a β -lactamases is rate-limited by peptide bond isomerization and occurs via parallel pathways," *Biochemistry*, vol. 49, no. 19, pp. 4264–4275, 2010.
- [77] A. Philippon, P. Slama, and R. Labia, "A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases , a Broadly," vol. 29, no. 1, pp. 29–57, 2016.
- [78] S. Banerjee, U. Pieper, G. Kapadia, L. K. Pannell, and O. Herzberg, "Role of the omega-loop in the activity, substrate specificity, and structure of class A beta-lactamase.," *Biochemistry*, vol. 37, no. 97, pp. 3286–3296, 1998.
- [79] J. S. Fetrow, "Omega loops: nonregular secondary structures significant in protein function and stability.," *FASEB J.*, vol. 9, no. 9, pp. 708–17, 1995.
- [80] M. Pal and S. Dasgupta, "The nature of the turn in omega loops of proteins," *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 51, no. 4, pp. 591–606, 2003.
- [81] H. Yi *et al.*, "High adaptability of the omega loop underlies the substrate-spectrum-extension evolution of a class A β -lactamase, PenL," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. November, p. 36527, 2016.
- [82] D. M. Livermore, "Defining an extended-spectrum β -lactamase," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 14, no. SUPPL. 1, pp. 3–10, 2008.
- [83] S. Tranier, A.-T. Bouthors, L. Maeyraud, G. Valerie, W. Sougakoff, and J.-P. Samama, "The high-resolution crystal structure for class A β -lactamase PER-1 reveals the bases for its increase in breadth of activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 36, pp. 28075–28082, 2000.
- [84] J. Silva *et al.*, "TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from Escherichia coli," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 44, no. 4, pp. 997–1003, 2000.
- [85] T. Naas, L. Poirel, and P. Nordmann, "Minor extended-spectrum β -lactamases," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 14, no. SUPPL. 1, pp. 42–52, 2008.
- [86] W. Jin, J. I. Wachino, K. Kimura, K. Yamada, and Y. Arakawa, "New plasmid-mediated aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-Ia, and ESBL, TLA-3, from a *Serratia marcescens* clinical isolate," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 70, no. 5, pp. 1331–1337, 2014.
- [87] M. Sun *et al.*, "Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats SI," *Nat. SI*, vol. 61, no. 16, pp. 5985–5991, 2016.
- [88] X. Robert and P. Gouet, "Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. W1, pp. 320–324, 2014.
- [89] C. H. O'Callaghan, A. Morris, S. M. Kirby, and A. H. Shingler, "Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate.,"

- Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 1, no. 4, pp. 283–288, 1972.
- [90] G. W. Ross, K. V. Chanter, A. M. Harris, S. M. Kirby, M. J. Marshall, and C. H. O'Callaghan, "Comparison of assay techniques for β -lactamase activity," *Anal. Biochem.*, vol. 54, no. 1, pp. 9–16, 1973.
- [91] G. Rhodes, "Protein Crystals," *Crystallogr. Made Cryst. Clear*, pp. 31–47, 2006.
- [92] J. Drenth and J. Mesters, *Principles of protein X-ray crystallography: Third edition*. 2007.
- [93] N. E. Chayen, P. D. Shaw Stewart, D. L. Maeder, and D. M. Blow, "An automated system for micro-batch protein crystallization and screening," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 23, no. 4, pp. 297–302, 1990.
- [94] W. Minor, M. Cymborowski, Z. Otwinowski, and M. Chruszcz, "HKL-3000: The integration of data reduction and structure solution - From diffraction images to an initial model in minutes," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 62, no. 8, pp. 859–866, 2006.
- [95] W. Kabsch, "Xds," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. 2, pp. 125–132, 2010.
- [96] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read, "Phaser crystallographic software," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 40, no. 4, pp. 658–674, 2007.
- [97] M. D. Winn *et al.*, "Overview of the CCP4 suite and current developments," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 67, no. 4, pp. 235–242, 2011.
- [98] P. D. Adams *et al.*, "PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. 2, pp. 213–221, 2010.
- [99] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, and E. J. Dodson, "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 53, no. 3, pp. 240–255, 1997.
- [100] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, and K. Cowtan, "Features and development of Coot," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. 4, pp. 486–501, 2010.
- [101] E. F. Pettersen *et al.*, "UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis," *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004.
- [102] M. F. Sanner, A. J. Olson, and J.-C. Spehner, "Reduced surface: An efficient way to compute molecular surfaces," *Biopolymers*, vol. 38, no. 3, pp. 305–320, 1996.
- [103] T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon, and N. A. Baker, "PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. WEB SERVER ISS., pp. 665–667, 2004.
- [104] P. Rezácová, D. Borek, S. F. Moy, A. Joachimiak, and Z. Otwinowski, "Crystal structure and putative function of small Toprim domain-containing protein from *Bacillus stearothermophilus*," *Proteins*, vol. 70, no. 2, pp. 311–319, 2008.
- [105] E. Jurrus *et al.*, "Improvements to the APBS biomolecular solvation software

- suite," *Protein Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 112–128, 2018.
- [106] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, and J. A. McCammon, "Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 18, pp. 10037–10041, 2001.
- [107] S. McNicholas, E. Potterton, K. S. Wilson, and M. E. M. Noble, "Presenting your structures: The CCP4mg molecular-graphics software," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 67, no. 4, pp. 386–394, 2011.
- [108] W. DeLano, "Pymol: An open-source molecular graphics tool," *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr.*, vol. 700, 2002.
- [109] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, and J. M. Thornton, "Ligplot - a Program To Generate Schematic Diagrams of Protein Ligand Interactions," *Protein Eng.*, vol. 8, no. 2, pp. 127–134, 1995.
- [110] R. A. Laskowski and M. B. Swindells, "LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 51, no. 10, pp. 2778–2786, 2011.
- [111] A. Philippon, P. Slama, and R. Labia, "A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly," vol. 29, no. 1, pp. 29–57, 2016.
- [112] S. Ventura and A. Villaverde, "Protein quality in bacterial inclusion bodies," *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 4, pp. 179–185, 2006.
- [113] a Mukhopadhyay, "Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms.," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 56, pp. 61–109, 1997.
- [114] A. Villaverde and M. M. Carrió, "Protein aggregation in recombinant bacteria: Biological role of inclusion bodies," *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, no. 17, pp. 1385–1395, 2003.
- [115] a K. Patra, R. Mukhopadhyay, R. Mukhija, a Krishnan, L. C. Garg, and a K. Panda, "Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*.,," *Protein Expr. Purif.*, vol. 18, pp. 182–92, 2000.
- [116] W. Jin, J. -i. Wachino, K. Kimura, K. Yamada, and Y. Arakawa, "New plasmid-mediated aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-I_{an}, and ESBL, TLA-3, from a *Serratia marcescens* clinical isolate," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 70, no. 5, pp. 1331–1337, 2015.
- [117] P. Stapleton, P. Wu, A. King, K. Shannon, G. French, and I. A. N. Phillips, "Incidence and Mechanisms of Resistance to the Combination of Amoxicillin and Clavulanic Acid in *Escherichia coli*," vol. 39, no. 11, pp. 2478–2483, 1995.
- [118] P. Power *et al.*, "Novel fragments of clavulanate observed in the structure of the class A β -lactamase from *Bacillus licheniformis* BS3," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, no. 10, pp. 2379–2387, 2012.