



# Мутационный спектр β-лактамаз

## Mutational spectrum of β-lactamases

Дарья Проскуракова, Дарья Николаева, Софья Гарушянц

### Abstract

β-lactamases are enzymes that destroy β-lactam antibiotics, hence contributing to drug resistance in bacteria. In *Escherichia coli* mutations in some key positions abolish the enzyme activity [Firnberg et al., 2014]. We analyzed whether such harmful mutations could be rescued by additional mutations, a process known as epistasis [Jacquier et al., 2013]. We also compared β-lactamases of *E. coli* and bacteria from other phyla, specifically looking for amino acid substitutions in functionally conserved positions.

While we have found no direct evidence for epistasis, in some species we have observed proteins with substitutions in positions, where mutations in the *E. coli* proteins abolish the function. Hence, sequence and structure context seem to influence the effect of mutations.

### Introduction

β-лактамазы – это ферменты, позволяющие бактериям противостоять действию β-лактамных антибиотиков. β-лактамазы широко распространены у бактерий разных филумов. Из эксперимента [Firnberg et al., 2014] мы знаем, что существуют ключевые позиции, мутации в которых нарушают активность фермента у *E. coli*. Известно также [Jacquier et al., 2013], что у некоторых мутантов встречается эпистаз – явление, при котором вторая мутация маскирует действие первой, так что активность фермента не нарушается.

Мы исследовали природные β-лактамазы из других энтеробактерий, а также из других филумов бактерий с целью анализа замен в функционально важных позициях и поиска событий эпистаза.

### Materials and Methods

1) Для анализа были взяты аминокислотные последовательности β-лактамаз представителей филумов Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Firmicutes, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus (206 последовательностей).

Material for analysis: protein sequences of β-lactamases from Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Firmicutes, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus phyla (206 sequences).

2) Выравнивания β-лактамаз были построены программой Muscle.

Alignment was built with program Muscle.

3) Ретикулограмма 38 штаммов энтеробактерий (Fig. 2) была построена по филогенетическим деревьям (алгоритм Neighbor-Joining):  
- для аминокислотных последовательностей β-лактамаз  
- для видов (построено по последовательностям генов белков EF-G, EF-TuA, фактора инициации трансляции 3, β-субъединицы РНК-полимеразы, рибосомальных белков L2, L3, L4, L6, S2, S4, S5)

Reticulogram showing horizontal gene transfer of β-lactamases in 38 enterobacterial strains (Fig. 2) was constructed using two phylogenetic trees (algorithm: Neighbor-Joining):  
- tree of β-lactamase protein sequences  
- tree of species built on gene sequences of proteins EF-G, EF-TuA, translation initiation factor 3, RNA-polymerase β-subunit, ribosomal proteins L2, L3, L4, L6, S2, S4, S5

4) Филогенетическое дерево видов было построено алгоритмом максимального правдоподобия для аминокислотных последовательностей β-лактамаз (Fig. 3).

Algorithm for phylogenetic tree (Fig. 3): Maximum Likelihood

5) Пространственные структуры белков анализировались с помощью программы Jmol (Fig. 1).

Structural analysis: Jmol (Fig. 1)

6) Для поиска эпистаза использовался пакет R RMRCM.

Epistasis search: R package RMRCM

### Conclusions

1) Горизонтальный перенос гена β-лактамазы широко распространен даже за пределами филума Proteobacteria.

2) Вариабельность в некоторых ключевых позициях фермента у представителей других филумов свидетельствует о большом влиянии контекста структуры и последовательности на эффект мутаций.

3) Несмотря на вариабельность в некоторых позициях, примеров эпистаза не наблюдается.

Лаборатория бактериальной и функциональной геномики  
Laboratory of Bacterial and Functional Genomics

### Results

#### Enterobacteria

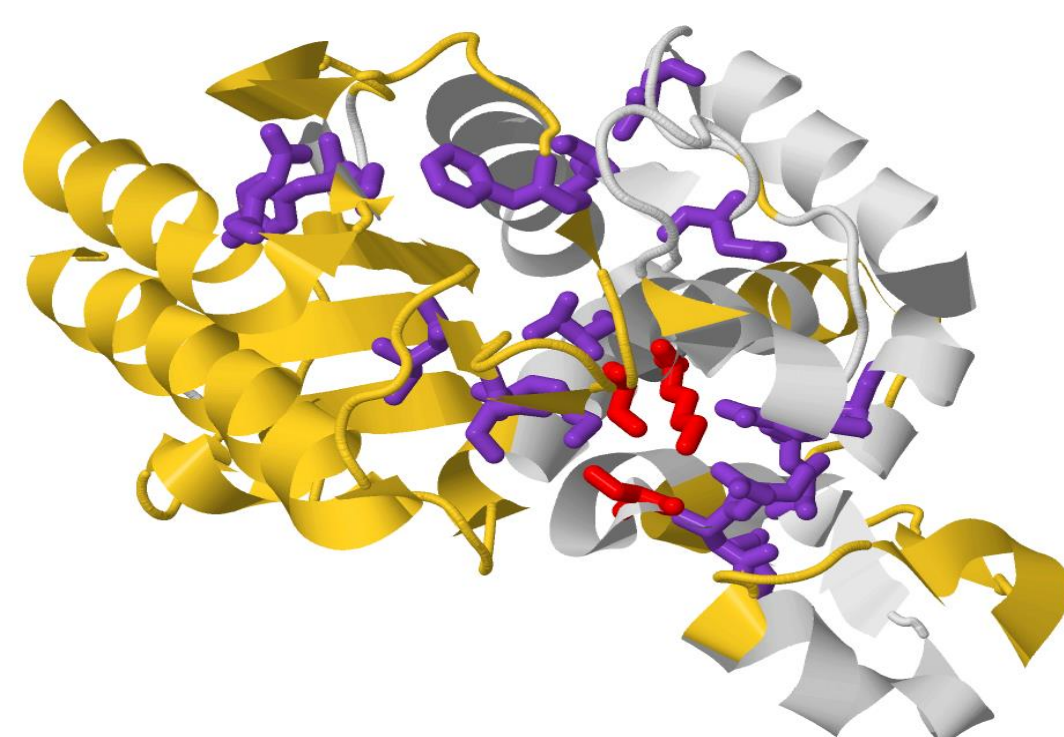


Fig. 1A

Большинство ключевых позиций (синий) расположены в консервативных участках структуры (серый). Однако некоторые позиции встречаются в вариабельных участках (желтый), но мутации там происходят внутри функциональных классов аминокислот и, видимо, не нарушают активность β-лактамаз.

Most key positions (blue) are located in conserved regions (light grey), but some of them are located in regions variable among enterobacteria (yellow). In the latter case, changed amino acids retain their physical and chemical properties such as size, charge and hydrophobicity, hence they would not damage the enzyme activity.

#### Other phyla

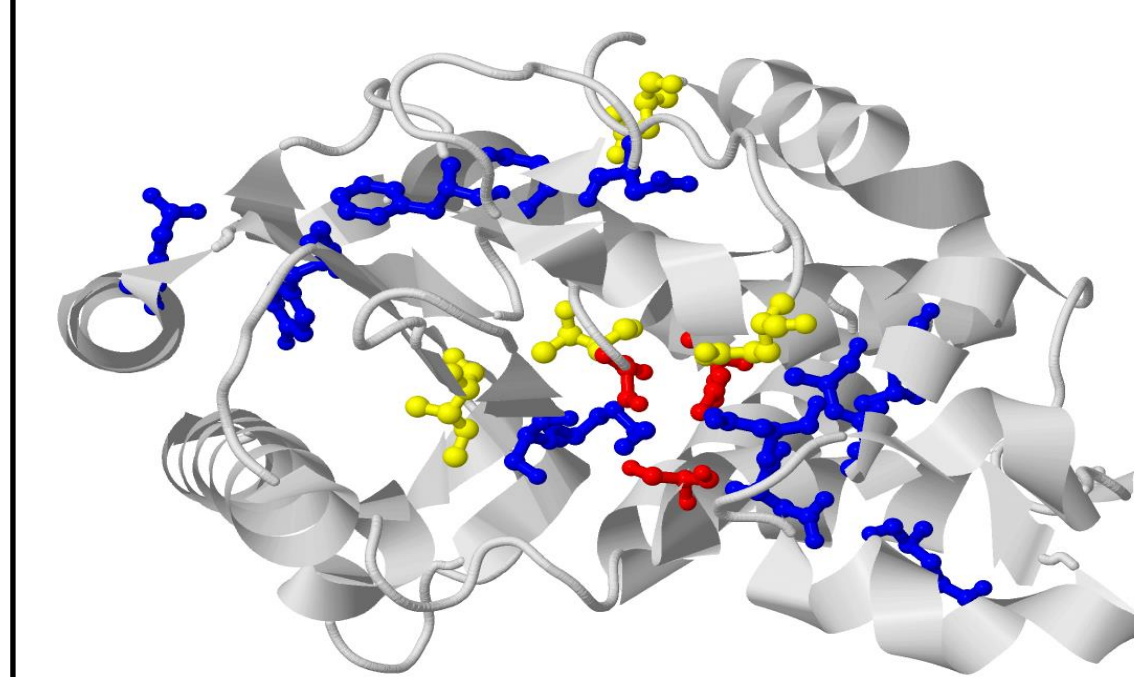


Fig. 1B

Большинство ключевых позиций (синий) допускают замен даже у других филумов (синий). Но вблизи активного центра (красный) есть позиции, в которых часто происходят замены (желтый), что свидетельствует о влиянии контекста на проявление мутаций.

Most key positions are conserved even in other phyla (blue). However, some of the key positions near active site are variable in other phyla (yellow), indicating a context influence on the effect of mutations.

Fig. 2

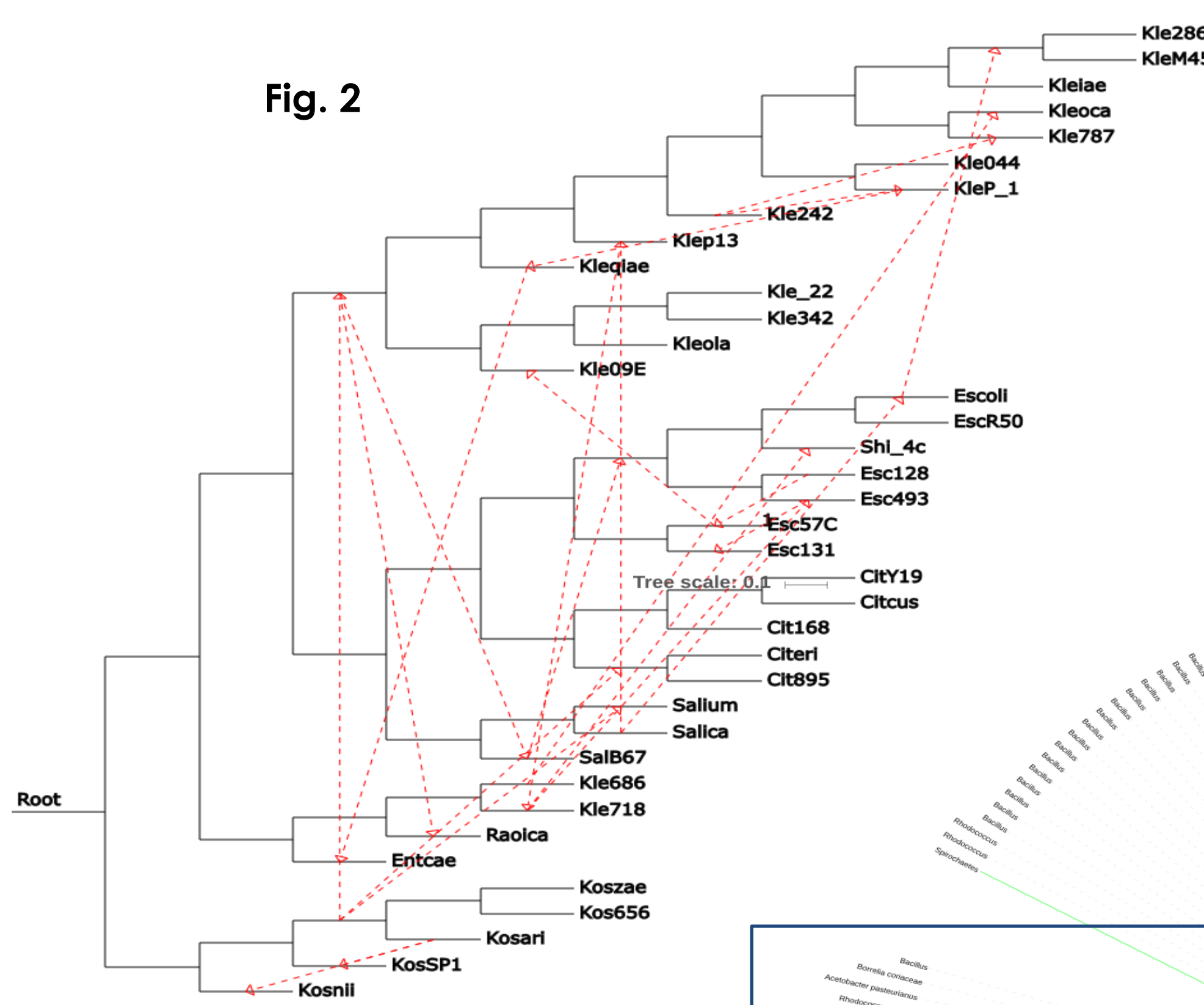


Fig. 2. Ретикулограмма. Среди энтеробактерий присутствуют множественные горизонтальные переносы гена β-лактамазы (красные пунктирные стрелки).

Reticulogram. Horizontal gene transfer (HGT) of β-lactamase genes is highly frequent in enterobacteria (red dotted arrows).

Fig. 3A

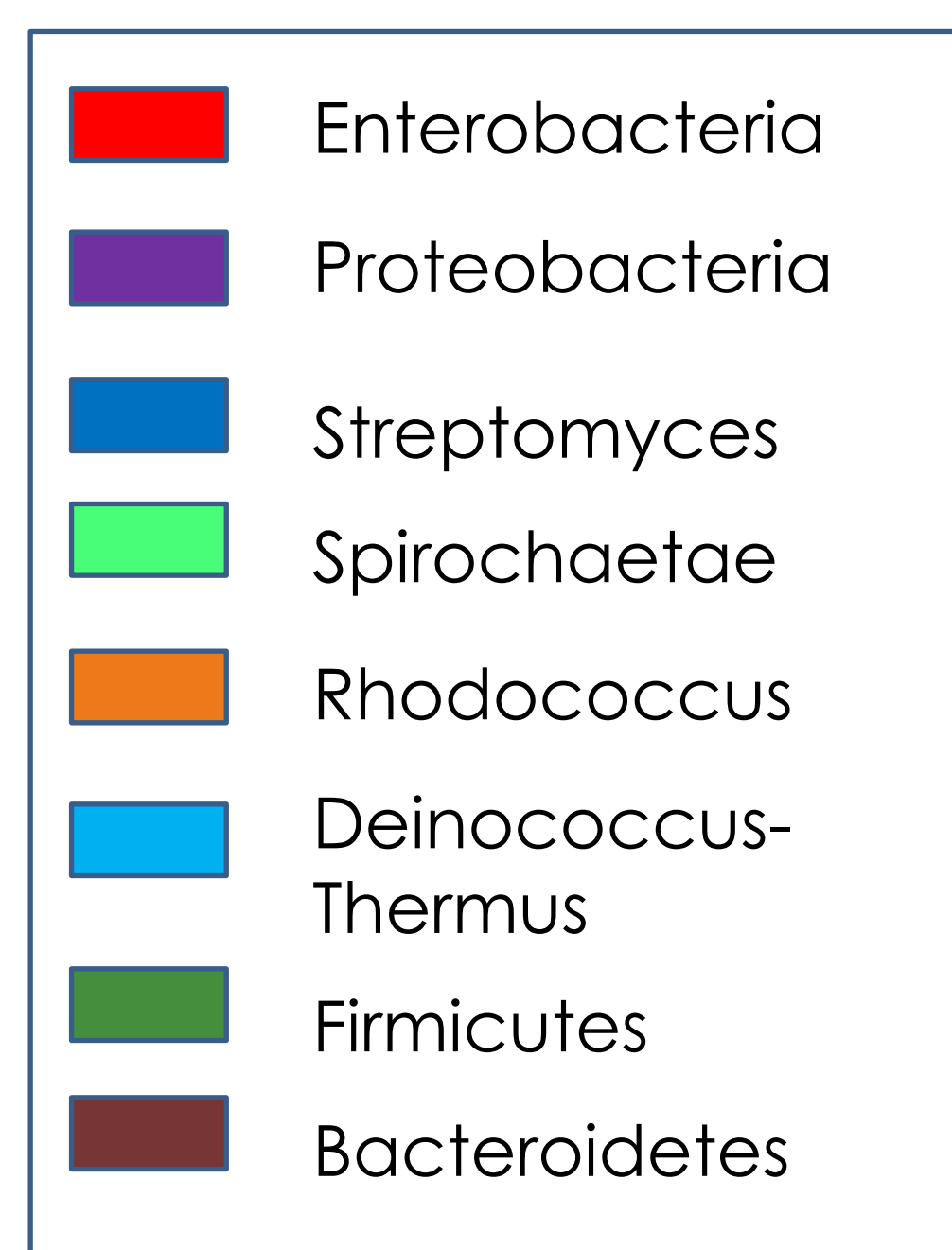


Fig. 3B

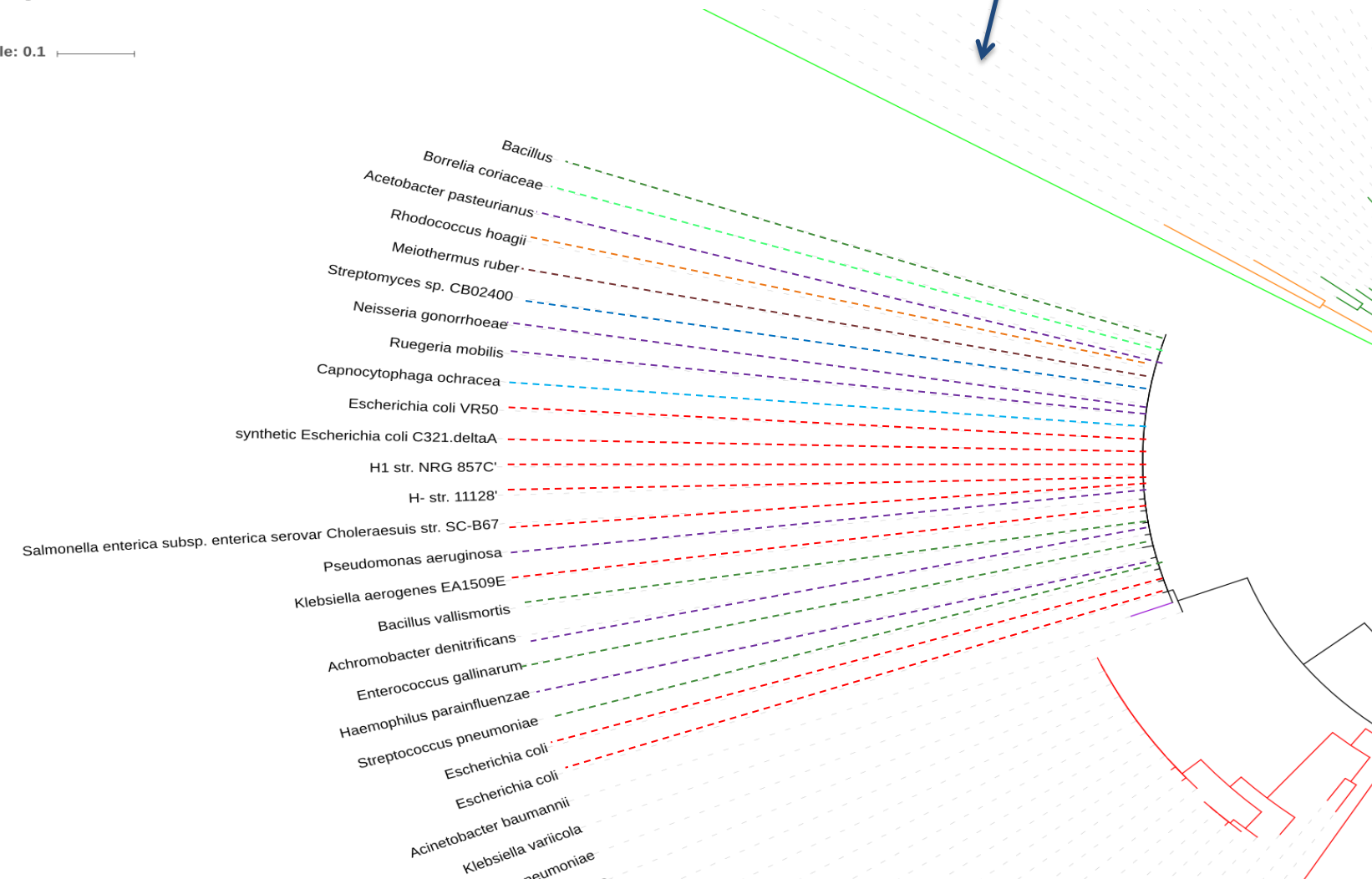


Fig. 3A Несоответствие филогении свидетельствует о наличии горизонтальных переносов и между филумами.

Inconsistency of the β-lactamase tree and the bacterial phylogeny demonstrates that long-distance HGT between phyla is quite common.

Fig. 3B Пример горизонтальных переносов между представителями разных филумов.

An example of HGT between different phyla.

