



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Clonación y expresión de la lipasa termófila y alcalófila
de *Bacillus pumilus* GMA1.

TESIS

Que para obtener el Título de

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P r e s e n t a

ADRIANA ESTELA IBARRA RODRÍGUEZ



México, D.F.

2004



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

JURADO

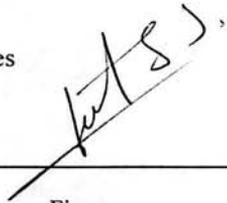
Presidente	Prof. Eduardo Bárzana García
Vocal	Prof. Elpidio García Ramírez
Secretario	Prof. Ismael Bustos Jaimes
1er. Suplente	Prof. Francisco Ruiz Terán
2do. Suplente	Prof. Luis Tonatihut Sánchez Linares

Lugar donde se desarrolló este trabajo:

Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor del tema:

Dr. Ismael Bustos Jaimes



Firma

Sustentante:

Adriana Estela Ibarra Rodríguez



Firma

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Adriana Estela Ibarra Rodríguez

FECHA: 20/Mayo/05

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

En especial, y en primer lugar, al Dr. Ismael Bustos Jaimes, por depositar su confianza en mí para la realización de este proyecto.

Al Dr. Mario L. Calcagno y al Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, por permitirme trabajar en sus instalaciones y adoptarme como parte de la comuna, en especial a Alejandro Sosa, Martín, Víctor, Armando y Juan.

A la Dra. Amelia Farrés, por facilitarnos la cepa de *B. pumilus* GMA1 y algunos reactivos para el desarrollo satisfactorio de este trabajo.

A la M. en C. Patricia Wong de la Mora, por facilitarnos las micrografías de *B. pumilus* GMA1.

A Sergio y Gilberto, por apoyarme y hacer más grata y divertida mi estancia en la comuna.

A la banda de la Zona del Terror, en especial a Edgar (Smog), Miguel (Ra), Omar (Lukas) e Ignacio (Nacho) por ser mis amigos.

A Deisy, Ernesto, Goyo, Miguel Gil, José Luis, Violeta, Minerva, Chuchín y Juan Antonio Elechiguerra, por las buenas fiestas, los días de desvelos y la convivencia diaria.

A los Muñoz González, por ser mi segunda familia.

DEDICATORIAS

A Estela Rodríguez Sosa, por enseñarme que no hay ningún obstáculo suficientemente grande para no salir adelante, por darme su amor y comprensión siempre que lo he necesitado, por preocuparse siempre por darme lo mejor y por impulsarme a ser mejor cada día.

A Alfonso Solis Cano, por caminar de la mano conmigo.

A Omega Muñoz, por el profundo cariño que le tengo desde hace mas de una década y por todos los momentos compartidos.

A Aideé Mildred, por enseñarme que en la vida siempre hay sorpresas y pese a ser buenas o malas, siempre hay que salir adelante.

A Rocío Herrera, por ser mi amiga incondicional y por dejarme compartir parte de su vida.

A Berenice, por el buen humor y el optimismo siempre presente en su vida.

A Pilar, por que siempre me hace recordar el niño que traemos dentro.

A mis tíos Enrique, Hilarión, Rita, Eva, Josefina, Carlos, Jorge, Raúl, Claudia y Pilar, por estar siempre conmigo directa o indirectamente.

A mis primos Carlos, Norma, Erika y Carlos Alberto porque siempre los voy a llevar en mi corazón.

*"Pero tengo que atenerme al camino que he elegido.
Si no hago nada, si no estudio,
si no busco, estoy perdido. Y entonces,
Pobre de mi.*

Vincent Van Gogh

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Capítulo I. Introducción	1
LIPASAS	1
• Clasificación general	2
• Clasificación filogenética	3
• Lipasas microbianas	4
ESTRUCTURA	7
• Plegamiento α/β hidrolasa	7
• Estructura de la lipasa de <i>Bacillus subtilis</i>	9
ACTIVACIÓN INTERFACIAL	12
MECANISMO CATALÍTICO	13
ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	15
APLICACIONES DE LAS LIPASAS	16
• Aplicaciones de lipasas como hidrolasas	16
- Detergentes	16
- Industria Alimentaria	17
- Industria del papel	18
• Aplicaciones de lipasas como sintetetasas	19
LIPASA DE <i>Bacillus pumilus</i> GMA1	22
TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE	27
• Clonación y expresión de proteínas heterólogas	27
PCR	28
• Principio de la PCR	28
• Ciclos de temperatura	29
• Aplicaciones de la PCR	30

	Página
Capítulo II. Objetivos	33
Capítulo III. Materiales y métodos	34
<ul style="list-style-type: none"> • Esquema general de trabajo • Reactivos • Microorganismos y vectores • Reactivación de la cepa de <i>B. pumilus</i> GMA1 • Diseño de cebadores • Extracción de ADN de <i>B. pumilus</i> GMA1 • Electroforesis de ácidos nucleicos • Amplificación del gen <i>lipA</i> por PCR • Ligación del producto de PCR correspondiente al gen <i>lipA</i> con el vector pGEM-T • Purificación del plásmido pGlipA • Digestión con <i>EcoRI</i> del plásmido pGlipA • Digestión con <i>EcoRI/HindIII</i> del plásmido pTrc99A • Purificación del gen <i>lipA</i> y el plásmido pTrc99A digeridos con <i>EcoRI/HindIII</i> • Ligación del plásmido pTrc99A y el gen <i>lipA</i> con ligasa de T4 • Selección del plásmido pTlipA • Pruebas de expresión 	34 35 36 36 36 37 38 38 39 39 40 41 41 42 42 43
Capítulo IV. Resultados y discusión	45
<ul style="list-style-type: none"> • Extracción y purificación del ADN genómico • Amplificación del gen <i>lipA</i> • Ligación del producto de PCR correspondiente al gen <i>lipA</i> con el vector pGEM-T • Purificación del gen <i>lipA</i> • Ligación del plásmido pTrc99A y el gen <i>lipA</i> con ligasa de T4 • Pruebas de expresión 	45 45 46 50 51 54
Capítulo V. Conclusiones y perspectivas	59
Referencias	62

RESUMEN

Las lipasas son enzimas de gran importancia económica ya que se emplean en la formulación de detergentes, en la resolución de mezclas racémicas, en la síntesis de ésteres con interés farmacéutico y en reacciones de transesterificación. *Bacillus pumilus* GMA1 produce una lipasa termófila y alcalófila de aproximadamente 20 kDa de peso molecular y presenta preferencia por ácidos grasos de cadena corta (Bustos-Jaimes, 1995; Wong, 2002). En este trabajo nos propusimos clonar y expresar la enzima lipolítica de *B. pumilus* GMA1 en *E. coli*, eliminando el péptido líder que se elimina mediante el procesamiento postraduccional en *Bacillus*. Para tal fin, en primera instancia se extrajo DNA cromosómico *B. pumilus* GMA1 y se diseñaron los cebadores específicos para amplificar por PCR partiendo de la secuencia de la lipasa de *B. pumilus* B26 reportada por Kim y col. (2002), para las regiones que flanquean al gen *lipA*. Los cebadores diseñados incluyen una secuencia de unión a ribosoma y un codón que codifica metionina en la posición -1 en la región N-terminal de la proteína madura. Con dichos cebadores y el ADN genómico de *B. pumilus* GMA1 se amplificó el gen *lipA* y se introdujo al vector de clonación pGEM-T Easy Vector. El gen *lipA* se subclonó en el vector pTrc99A bajo una región promotora regulable (*P_{trc}*) vecina al sitio de clonación. Posteriormente se realizaron ensayos de expresión del gen *lipA* en *E. coli* bajo distintas condiciones de temperatura y diferentes concentraciones de inductor (IPTG), en medio sólido y líquido. Se encontró clara evidencia de actividad lipolítica en medio sólido por la presencia de halos de lisis sobre tributirina emulsificada en el medio de crecimiento. Por último, se evaluó la expresión del gen *lipA* en medio líquido mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). El perfil electroforético de las proteínas intracelulares de *E. coli* muestra una banda que en apariencia corresponde a la proteína LipA.

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

LIPASAS

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan no sólo la reacción de hidrólisis del enlace éster de los triacilglicéridos, sino también la reacción contraria (**FIGURA 1**). Dichas reacciones ocurren normalmente con una alta regio- y/o enantioselectividad (Jaeger y Reetz, 1998), lo cual hace de éstas enzimas un importante grupo de biocatalizadores en química orgánica sintética.

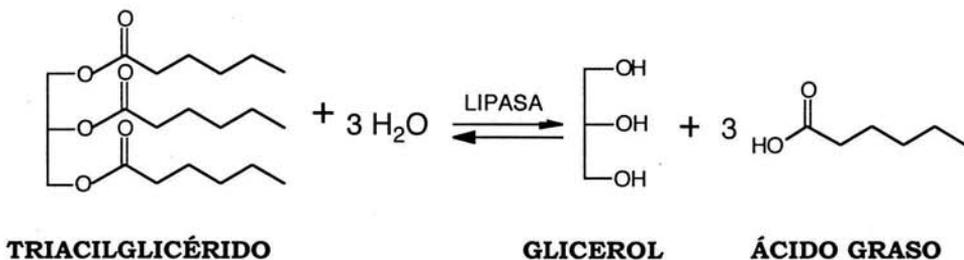


FIGURA 1. Reacción catalítica de las lipasas. Un triglicérido puede ser hidrolizado para formar glicerol y ácidos grasos o la reacción reversa (síntesis). (Fuente: Jaeger y Reetz, 1998).

Dichas enzimas han sido caracterizadas de acuerdo a parámetros como: el perfil de actividad contra pH, estabilidad y actividad con respecto a la temperatura, especificidad posicional en la hidrólisis de triacilgliceroles y especificidad por la naturaleza de los

ácidos grasos. La especificidad posicional es una característica importante para la aplicación industrial y analítica de estas enzimas.

Las lipasas actúan en la interfase lípido-agua en donde el sustrato normalmente se encuentra formando un equilibrio entre los estados monomérico, micelar y emulsificado. En esto difieren de otras enzimas como las esterasas, que hidrolizan el mismo enlace pero el sustrato debe ser soluble en fase acuosa (Derewenda y Sharp, 1993; Jaeger y Reetz, 1998).

Entre las razones del enorme potencial biotecnológico que muestran algunas lipasas de origen microbiano, se encuentran:

- 1) Pueden ser estables en disolventes orgánicos
- 2) No requieren cofactores
- 3) Exhiben alta enantioselectividad
- 4) Poseen alta especificidad por el sustrato

Con lo que demuestran ser sumamente versátiles incluso fuera de los sistemas biológicos tradicionales (Bustos-Jaimes y col., 2001).

Clasificación general

La mayoría de las lipasas se clasifican en dos grupos:

- A) El grupo sn-1,3 regioespecíficas, que reaccionan con las posiciones externas del glicerol, por ejemplo las lipasas de *Aspergillus niger* y *Rhizopus delemar*, y las no regioespecíficas o al azar, que actúan en las tres posiciones del glicerol, por ejemplo, la lipasa de *Geotrichum candidum* y *Cyclopium penicillium*.

B) El grupo sn-2, lipasas que reaccionan con la posición central del glicerol, al cual pertenecen un grupo reducido de lipasas, entre ellas se encuentra la lipasa de *Candida antarctica* A, mostrando poca actividad con respecto a esa posición. Por otro lado algunas lipasas muestran mayor selectividad por los triglicéridos comparada con los glicéridos parciales (mono y diglicéridos) así como preferencia por ciertos ácidos grasos (Lanser y col., 2001).

Clasificación filogenética

Diversos estudios sugieren que las lipasas, colinesterasas y estereras pertenecen a una misma familia de proteínas filogenéticamente relacionadas (Krejci y col., 1991; Hemila y col., 1994), que agrupa proteínas representantes de eucariotes, procariotes y proteínas que no presentan actividad enzimática.

Esta clasificación se divide en tres categorías: C, L y HSL.

- Grupo C (Carboxilesterasas), incluye a las colinesterasas de vertebrados e invertebrados, lipasas de hongos, estereras y proteínas no catálíticas.
- Grupo L (Lipasas), agrupa a las lipasas de vertebrados y bacterias, lipoproteínlipasas y aciltransferasas.
- Grupo HSL (Lipasas sensibles a hormonas), comprende a la acetilhidrolasa de *Streptomyces viridochromogenes*, la lipasa 2 de *Moraxella* TA 144, una esterasa de *Acinetobacter calcoaceticus* y una enzima recientemente secuenciada procedente de hígado humano, la arilacetamida desacetilasa.

Las lipasas se caracterizan por presentar el fenómeno de activación interfacial, en contraste con las esterasas o carboxilesterasas que no obedecen esta regla. Las cutinasas, por ejemplo, también son capaces de hidrolizar los sustratos típicos de las lipasas y no muestran activación interfacial, por lo cual son consideradas como un "puente" entre lipasas y esterasas. Las nuevas enzimas de bacterias termófilas pueden aportar un mejor conocimiento para entender la evolución de la familia de las esterasas/lipasas por un lado y, por el otro, pueden generar importantes ensayos en el campo de la estabilidad de proteínas de este tipo (Manco y col, 1998).

Lipasas microbianas

Hasta el año 1998, se han identificado 47 lipasas bacterianas representativas, agrupadas en seis familias basadas en la homología de su secuencia de aminoácidos y el peso molecular de la proteína (Arpigny y Jaeger, 1999) (**TABLA 1**).

- Familia I: Comprende a 22 miembros que están agrupados en 6 subfamilias:
 - Subfamilia I.1 y I.2 lipasas secretadas por la vía tipo II (Para su secreción requieren de un transportador externo)
 - Subfamilia I.3, la ruta de secreción es del tipo I (Se autotransportan) (Jaeger y Eggert, 2002).
 - Subfamilia I.4 son las proteínas más pequeñas (19 a 21 kD) de todas las lipasas hasta ahora conocidas. Tienen rangos de pH óptimo alcalinos y preferencia hacia los triglicéridos de cadena corta como sustratos. Además, la secuencia característica Gly-X-Ser-X-Gly del pentapéptido que contiene al residuo catalítico

de Serina se modifica a una secuencia de Ala-X-Ser-X-Gly y las secuencias alrededor del Asp e His catalíticos son absolutamente diferentes en comparación a las otras familias (Jaeger y col. 2001).

- Subfamilia I.5 son lipasas con características de fosfolipasas.
- Subfamilia I.6 comprende a lipasas de los géneros *Propionibacterium* y *Streptomyces*
- Familia II: Esta familia agrupa a las “nuevas lipasas” con funciones desconocidas.
- Familia III: Comprende las lipasas extracelulares de *Streptomyces* spp. y las cepas psicrófilas de *Moraxella* sp.
- Familia IV: A esta familia pertenecen a las lipasas adaptadas al frío que muestran similitud con lipasas de mamíferos sensibles a hormonas.
- Familia V: Estas lipasas muestran similitudes estructurales con deshalogenasas, haloperoxidasas y epoxi-hidrolasas, que presumiblemente exhiben el plegamiento α/β -hidrolasa característico de su estructura terciaria.
- Familia VI: Incluye esterasas que han sido parcialmente identificadas de las secuencias del genoma. Estas esterasas son pequeñas proteínas localizadas en el citoplasma bacteriano con similitud a las lipofosfolipasas de mamíferos (Arpigny y Jaeger, 1999).

TABLA 1. Familias de enzimas lipolíticas (Fuente: Arpigny y Jaeger, 1999).

Familia	Subfamilia	Especie productora	Número de acceso	Identidad ^b (%)	Propiedades
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a	D50587	100	Lipasas verdaderas
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95	
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57	
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43	
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40	
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39	
	2	<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38	
		<i>Burkholderia glumae</i> ^a	X70354	35	
		<i>Chromobacterium viscosum</i> ^a	Q05489	35	
		<i>Burkholderia cepacia</i> ^a	M58494	33	
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIKW1	AF050153	33	
		<i>Serratia marcescens</i>	D11455	14	
	4	<i>Bacillus subtilis</i>	D13253	15	
		<i>Bacillus pumilus</i>	M74010	16	
	5	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	A34992	13	
		<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	U78785	15	
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X95309	14	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	X02844	15	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	M12715	14	
6	<i>Propionibacterium acnes</i>	AF090142	13		
	<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	X99255	14		
I		<i>Pseudomonas aeruginos</i>	U80063	14	Fosfolipasa
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	AF005091	100	
		<i>Salmonella typhimurium</i>	P10480	31	
		<i>Photorhabdus luminescens</i>	AF047014	17	
		<i>Streptomyces scabies</i> ^a	P40601	17	
III		<i>Moraxella sp.</i>	M57297	15	o.m.-esterasa* Aciltransferasa o.m.-esterasa
		<i>Streptomyces exfoliatus</i> ^a	M86351	100	
		<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82	
IV		<i>Moraxella sp.</i>	X53053	33	Lipasa 1
		<i>Moraxella sp.</i>	X53868	100	Lipasa 2
IV		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	28	Carboxilesterasa
		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	25	
		<i>Pseudomonas sp. B11-1</i>	AF034088	24	
		<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	24	
		<i>Escherichia coli</i>	AE000153	20	
		<i>Escherichia coli</i>	AE000153	20	
V		<i>Moraxella sp.</i>	X53869	100	Esterasa
		<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	88	
		<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	34	
		<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	34	
		<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	25	
		<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	15	
VI		<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^a	S79600	100	Esterasas
		<i>Synechocystis sp.</i>	D90904	24	
		<i>Spirulina platensis</i>	S70419	22	
		<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	16	
		<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	15	

^aEnzimas lipolíticas con estructura tridimensional conocida.

^bSimilitud en las secuencias de aminoácidos determinadas con el programa Megalign (DNASar), con el primer miembro de la familia arbitrariamente fijado al 100%.

* Esterasa unida a membranas externas

** Polihidroxialcano despolimerasa

ESTRUCTURA

Plegamiento α/β hidrolasa

La lipasa pancreática humana y la lipasa fúngica del *Rhizomucor miehei* fueron las primeras enzimas de este tipo cuya estructura fue resuelta por rayos X; posteriormente le siguieron las estructuras de otras lipasas del origen fúngico como, *Geotrichum candidum*, *Fusarium solani*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Humicola lanuginosa* y *Rhizopus delemar*. En contraste, las estructuras de lipasas bacterianas se resolvieron lentamente, la primera fue *Burkholderia glumae*, varios años más tarde, le siguió la lipasa de *Chromobacterium viscosum* (lipasa que parecía ser idéntica a la de *Burkholderia glumae* y de *Burkholderia cepacia*). Recientemente, las estructuras de las lipasas de *Streptomyces exfoliatus*, *Streptomyces scabies* y *Pseudomonas fluorescens* han sido publicadas (Jaeger y col., 1999).

Las lipasas en general están ubicadas en un rango de peso molecular que va de 19 a 60 kD, todas muestran una estructura conocida como plegamiento α/β hidrolasa que consiste en una hoja- β central con 8 hojas paralelas ($\beta 1$ a $\beta 8$), a excepción de la segunda que es antiparalela. Las secciones $\beta 3$ a $\beta 8$ están conectadas por 6 α -hélices (A-F) las cuales están unidas a cada lado de la hoja- β central (Jaeger y Reetz, 1998) (**FIGURA 2**).

Gracias a estudios de cristalografía de rayos X, se sabe que el sitio catalítico se localiza en el carboxilo terminal de la hoja central. Este sitio contiene una tríada catalítica conservada en todos los casos: un residuo de histidina (His), un residuo ácido como aspartato (Asp) o glutamato (Glu) y un residuo de serina (Ser) que ataca nucleofílicamente al enlace éster de

los ácidos grasos durante la catálisis. El residuo nucleofílico de serina está localizado en el carboxilo terminal de la hoja β_5 , en un pentapéptido consenso altamente conservado GlyXSerXGly en donde X es cualquier aminoácido. En algunas lipasas provenientes del género *Bacillus*, el pentapéptido consenso cambia el primer residuo de Gly por Ala, AlaXSerXGly.

El residuo de Ser es activado por el acoplamiento entre los residuos Asp e His para hacerlo suficientemente nucleofílico. Este mecanismo de reacción es el mismo que se ha observado en el caso de las serin-proteasas, ya que el enlace peptídico resulta ser electrónicamente muy similar al enlace éster. En las lipasas, el residuo de Ser activo es el que se encuentra en la secuencia consenso mencionada con anterioridad, aunque el resto de los aminoácidos de la tríada catalítica provienen de distintas regiones de la proteína. El residuo de Ser encontrado dentro del pentapéptido consenso se encuentra, en el caso de las lipasas, en una conformación ϵ ($\Phi = 62^\circ$, $\Psi = -121^\circ$). Esta región consiste en una hoja β seguida por un giro rígido que contiene al residuo de Ser y en seguida una α -hélice, motivo estructural conocido como β - ϵ Ser- α (Derewenda y Derewenda, 1991). El análisis secuencial de aminoácidos alrededor de los residuos de Ser activos puede constituir la característica estructural que agrupa a las familias de serin-hidrolasas.

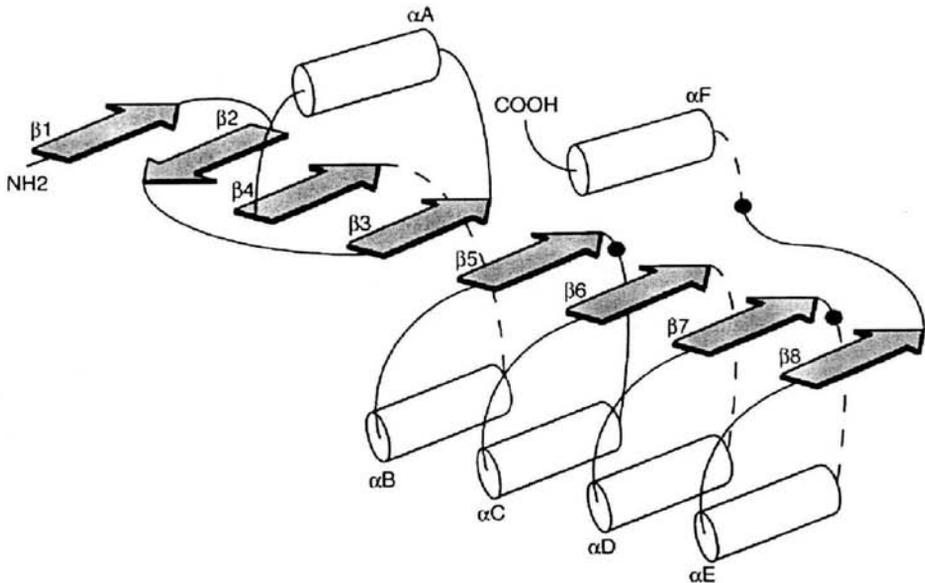


FIGURA 2. Estructura α/β hidrolasa. Las α -hélices están indicadas como cilindros, y las hojas β como flechas. La posición de los residuos activos se indican como círculos negros, donde el nucleófilo es el residuo después de la $\beta 5$, el residuo de Asp/Glu está después de $\beta 7$, y el residuo de histidina se localiza en la vuelta entre $\beta 8$ y αF (Fuente: Jeager y col., 1999).

Estructura de la lipasa de *Bacillus subtilis*

La lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 es homóloga a la lipasa de *Bacillus subtilis* (Bustos-Jaimes, 1998). Ambas lipasas poseen 181 residuos de aminoácidos en sus formas maduras y tienen un peso aproximado de 21kDa. Por estas razones, ambas proteínas deben compartir el mismo plegamiento y las diferencias catalíticas que muestran deben estar relacionadas con los residuos de aminoácidos que no son idénticos.

Por medio de estudios cristalográficos de rayos X se elucidó la estructura de la lipasa LipA de *Bacillus subtilis*. La estructura muestra una molécula globular con un plegamiento

clásico α/β hidrolasa con 6 hojas- β paralelas flanqueadas por 5 α -hélices (**FIGURA 3**). La triada catalítica corresponde a los residuos de Ser77, Asp133 e His156 y los grupos amida de los residuos Ile12 y Met78 forman la cavidad oxianiónica y están en posiciones muy similares a las encontradas en otras lipasas de estructura conocida. Sin embargo, no se encuentra presente el dominio correspondiente a la tapa del sitio activo, por lo que éste se encuentra expuesto al disolvente.

A través de la comparación con otras lipasas que han sido cristalizadas con una molécula de un análogo estructural del sustrato unido al sitio activo, se sabe que las cadenas acilo de sustratos C8 se encuentran unidas a la superficie de la proteína y son estabilizadas por interacciones hidrofóbicas con los residuos de la proteína (**FIGURA 4**). Dado que el grupo metilo de las cadenas de C8 alcanzan el extremo de la superficie hidrofóbica, podemos entender por qué el trioctilglicerol es el sustrato preferido de la lipasa de *Bacillus subtilis* (van Pouderooyen y col., 2001; Eggert y col., 2001).



FIGURA 3. Representación de la estructura de la lipasa de *B. subtilis*. Los residuos S, H y D pertenecen a la triada catalítica Ser77, His156 y Asp133 respectivamente. Las letras N y C indican el amino y carbonilo terminal respectivamente (Fuente: van Pouderoyen y col., 2001).

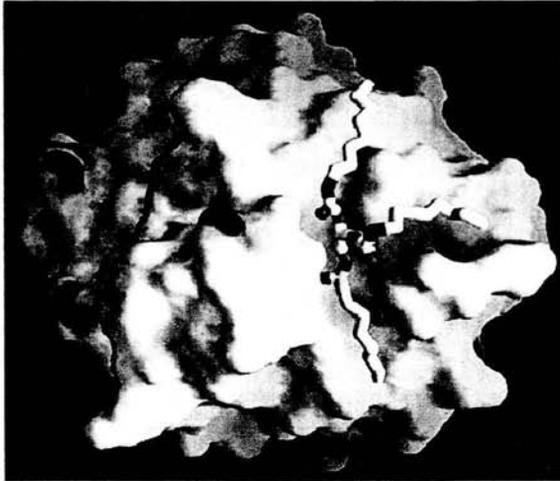


FIGURA 4. Representación de la superficie electrostática de la lipasa de *B. subtilis* con las regiones cargadas positiva- y negativamente mostradas en colores azul y rojo, respectivamente

(Fuente: van Pouderooyen y col., 2001).

ACTIVACIÓN INTERFACIAL

La activación interfacial es un fenómeno que surge desde los primeros estudios de la cinética de las reacciones lipolíticas catalizadas por enzimas, éste consiste en un dramático incremento de la actividad lipolítica cuando se encuentran en una interfase lípido-agua.

La determinación de las estructuras en tercera dimensión de las lipasas nos proporcionan una elegante explicación de la activación interfacial: El sitio catalítico de la lipasas fue encontrado cubierto por una cadena superficial que consiste en una hélice corta de naturaleza anfipática, o bien dos hélices o una región de horquilla que cubre el sitio activo, llamada "tapa o cubierta". Fuera de la interfase lípido-agua esta tapa se encuentra por encima del sitio activo dando como resultado la forma "cerrada" del sitio activo de la

enzima. En el caso de la lipasa pancreática cuando la enzima se encuentra dentro de la interfase lípido-agua, esta tapa se aleja del sitio catalítico a través de la superficie de la molécula moviendo su centro de gravedad 8 \AA y girando sobre su propio eje casi 180° para formar la forma "abierta", provocando que los residuos catalíticos queden accesibles al sustrato y se exponga una gran superficie hidrofóbica aproximadamente de 750 \AA^2 (Brockman y col., 1993), la que se presume interactúa con la interfase lipídica.

Sin embargo, actualmente se sabe que la presencia de una "tapa o cubierta" en la estructura de las lipasas no necesariamente esta correlacionada con la activación interfacial: lipasas de *P. aeruginosa*, *B. glumae*, *C. antarctica* B y una lipasa pancreática no muestran activación interfacial y en su estructura cuentan con una tapa anfipática que cubre sus sitios catalíticos. Esta observación llevó a concluir que la presencia de una "tapa o cubierta" y la activación interfacial son criterios inadecuados para clasificar a una enzima como lipasa (Jaeger y Reetz, 1998).

MECANISMO CATALÍTICO

Las lipasas son capaces de catalizar reacciones tanto en sistemas acuosos (hidrólisis) como en medios orgánicos (transesterificación y síntesis). En las reacciones de hidrólisis actúan sobre el enlace éster del carboxilo presente en los acilgliceroles para liberar ácidos grasos y glicerol. La hidrólisis del sustrato comienza con el ataque del átomo de oxígeno procedente del grupo hidroxilo del residuo nucleofílico de serina, sobre el carbonilo del enlace éster del lípido. Esto produce la formación de un intermediario tetraédrico, que se caracteriza por tener una carga negativa en el oxígeno, que es estabilizado por

interacciones con un macrodipolo producido por la α -hélice C y puentes de hidrogeno con dos grupos NH, a lo que se le conoce como "cavidad oxianiónica". Uno de los grupos NH proviene de un residuo que se encuentra detrás de la serina nucleofílica y el otro del residuo final de la hoja β 3. El ataque nucleofílico de la serina es incrementado por una histidina catalítica, a la que se transfiere el protón del grupo hidroxilo de la serina. Esta transferencia es facilitada por la presencia de un ácido, que orienta el anillo imidazol de la histidina y neutraliza parcialmente la carga generada en él. A continuación, este protón es donado al oxígeno del enlace éster para formar un alcohol. En este entorno, el componente ácido del sustrato es esterificado por la serina nucleofílica (intermediario unido covalentemente), mientras se libera el componente alcohólico. El mecanismo continúa con un paso de desacilación, en el cual una molécula de agua hidroliza el intermediario covalente. El sitio activo de la histidina, activa a esta molécula de agua quitándole un protón. El ión OH^- resultante ataca al carbonilo del grupo acilo unido covalentemente a la serina. Posteriormente la histidina dona un protón al oxígeno del residuo activo de serina, el cual libera a su vez el componente acilo, formando un ácido carboxílico. Después de la difusión de este ácido carboxílico, la enzima está disponible para otro ciclo catalítico (Jaeger y Reetz, 1998; Jaeger y col., 1999) **(FIGURA 5)**.

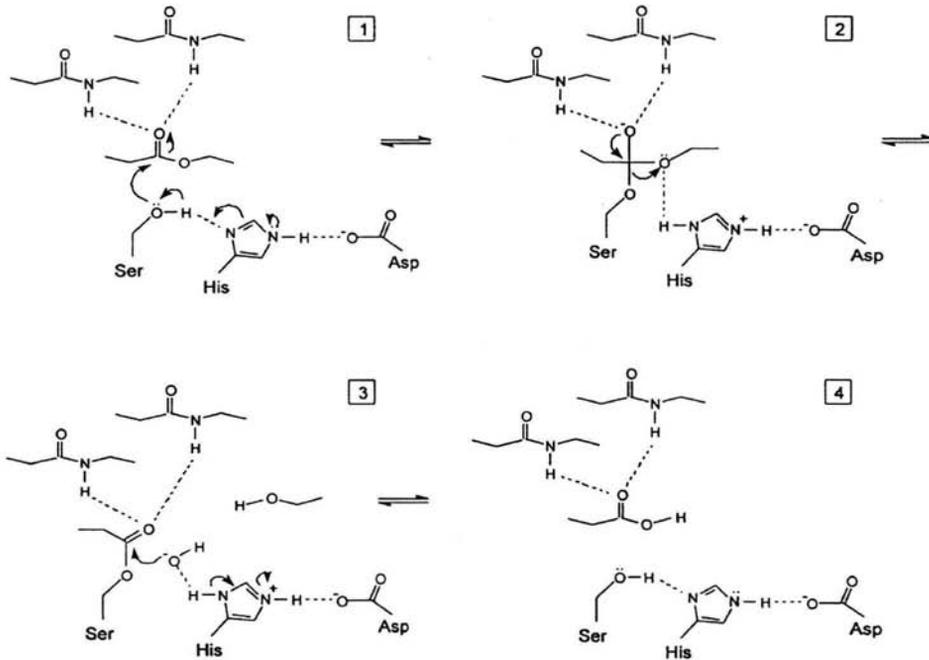


FIGURA 5. Mecanismo químico de la hidrólisis de ésteres en el sitio activo de las lipasas. 1)

Activación del residuo nucleofílico de Ser. 2) Formación del intermediario tetraédrico. 3)

Intermediario covalente acil-enzima. 4) Hidrólisis del intermediario covalente y regeneración de la enzima (Fuente: Jaeger, 1999).

ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Las reacciones lipolíticas ocurren en la interfase lípido-agua, lo que implica que su cinética no puede ser descrita por la ecuación de Michaelis-Menten, ya que ésta sólo es válida si la reacción catalítica tiene lugar en una fase homogénea. Los sustratos lipídicos usualmente se encuentran en un equilibrio entre los estados monomérico, micelar y

emulsificado, de lo que resulta la necesidad de un modelo adecuado para estudiar la cinética de reacción de las lipasas (Jaeger y Reetz, 1998).

La evaluación de actividad lipolítica siempre ha sido controvertida, ya que existen distintos sustratos que se pueden emplear para dicho ensayo, distintas condiciones de reacción como pH y temperatura, así como el sustrato. Se ha observado que la actividad de una lipasa medida por un solo método no es representativa de la actividad real de la enzima, ya que los sustratos que se usan para el ensayo de actividad pueden interactuar de manera distinta con la enzima y dependen del proceso que se esté midiendo, no siendo igual para la hidrólisis de lípidos que para la síntesis de ésteres (Vorderwülbecke y col. 1992).

Recientemente se ha aplicado una tecnología llamada "oil-drop" en la cual la cinética es monitoreada por un análisis automático del perfil de una gota de aceite que se mantiene en agua; la disminución en la tensión interfacial entre el aceite y el agua es causada por la acción hidrolítica de la lipasa en función del tiempo (Jaeger y Reetz, 1998).

APLICACIONES DE LAS LIPASAS

Aplicaciones de la lipasas como hidrolasas

Detergentes

La aplicación comercial más importante de las lipasas es en detergentes, los cuales son utilizados principalmente en los hogares y lavanderías industriales. Un estimado de 1000 toneladas de lipasas son agregadas a aproximadamente 13 billones de toneladas de detergente producido cada año. En 1994, *Novo Nordisk* introdujo la primera lipasa

comercial, Lipolase™ proveniente del hongo *T. lanuginosus* y que fue expresada en *Aspergillus oryzae*. En 1995, dos lipasas bacterianas fueron introducidas al mercado, Lumafast™ y Lipomax™ provenientes de *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas alcaligenes* respectivamente, ambas producidas por *Genecor Internacional*. Entre los desafíos que tienen hoy en día los productores de lipasas para la optimización de detergentes se encuentran:

- 1) La alta variación en la concentración de triglicéridos en las manchas de mugre, requiriendo lipasas con baja especificidad por el sustrato pero con alta actividad,
- 2) Las adversas (agresivas) condiciones de lavado (pH 10-11 y temperaturas de 30-60°C), requiriendo enzimas muy estables , y,
- 3) Los efectos de la desnaturalización química y/o degradación proteolítica causada por aditivos contenidos en el detergente como el LAS (Sulfonato de alquil benceno) y proteasas (Jaeger y Reetz, 1998).

Industria Alimentaria

Las lipasas endógenas son importantes para la ciencia de los alimentos porque los ácidos grasos producidos por su acción hidrolítica sobre los triacilglicéoles pueden determinar la aparición de sabores y olores deseables o desagradables. Un claro ejemplo es la maduración de quesos en la que ocurre una hidrólisis parcial de lípidos, la cual se sabe no es específica en posición pero sí preferente en el tamaño de la cadena del ácido graso, siendo mejor para cadenas cortas (Kwak y col.1989).

La posición, longitud y grado de insaturación influyen fuertemente, no sólo en las propiedades físicas, sino también en el valor nutritivo y aspecto sensorial de los triglicéridos. Por ejemplo, la manteca de cacao contiene principalmente ácido palmítico y esteárico, su punto de fusión es de aproximadamente 37°C lo que lleva a su rápida fusión dentro de la cavidad bucal provocando una sensación de frescura. Con este antecedente, en 1976 *Unilever* patentó una reacción, que describieron como “una mezcla de hidrólisis y síntesis de triglicéridos” que da como resultado un sustituto de maneca de cacao. Esta tecnología es actualmente comercializada por *Quest-Loders Crocklaan*, basada en la lipasa inmovilizada de *R. mihei*, que lleva a cabo una reacción de transesterificación que reemplaza al ácido palmítico por ácido esteárico para obtener el triglicérido deseado (Jaeger y Reetz, 1998).

Industria del papel

Otro campo de aplicación de importancia, es el uso de lipasas para remover el “pitch” de la pulpa producida en la industria del papel. “Pitch” es un término que describe conjuntamente los componentes hidrofóbicos (triglicéridos y ceras) de la madera que causan severos problemas en la pulpa y la fabricación del papel. *Nippon Paper Industries* en Japón desarrolló un método de control de “pitch” que utiliza una lipasa de *C. rugosa* que hidroliza más del 90% de triglicéridos presentes (Jaeger y Reetz, 1998).

Aplicaciones de las lipasas como sintetetasas

Las lipasas han sido utilizadas por químicos orgánicos durante mucho tiempo para catalizar una gran cantidad de transformaciones regio- y estereoselectivas, la mayoría de estas lipasas usadas como catalizadores en química orgánica son de origen microbiano.

Uno de los aspectos mas importantes del rápido avance en esta área es la posibilidad de catalizar reacciones enantioselectivas a escala industrial (Gandhi, 1997).

Hay básicamente 2 tipos de transformaciones orgánicas enantioselectivas catalizadas por lipasas:

1. La reacción proquiral de sustratos
2. Resolución cinética de mezclas racémicas

Originalmente, los alcoholes quirales y los ésteres de ácidos carboxílicos sirvieron como las dos clases principales sustratos. Sin embargo, a través de los años, el rango de compuestos se ha extendido rápidamente incluyendo dioles, α - y β -hidroxiácidos, cianohidrinás, clorohidrinás, diésteres, lactosas, aminas, diaminas, amino alcoholes y derivados de α - y β -aminoácidos.

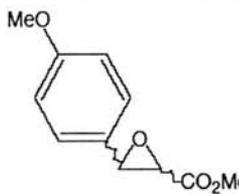
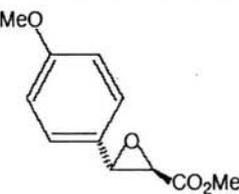
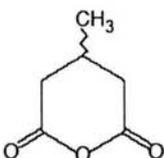
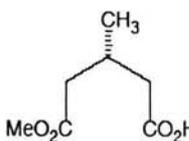
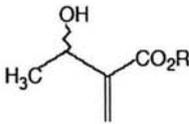
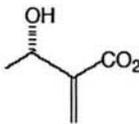
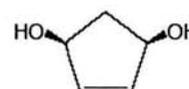
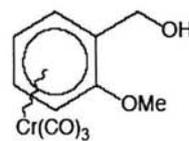
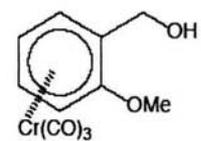
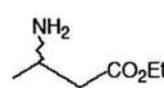
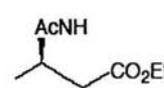
La catálisis típica incluye lipasas provenientes de bacterias como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *B. cepacea*, *C. viscosum*, *B. subtilis*, *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp. y *S. marcescens*, así como de origen fúngico como por ejemplo, *C. antarctica* B y *C. rugosa* (Jaeger y col., 1999).

Sin embargo, a pesar del gran número de publicaciones en esta área, el número de procesos industriales enantioselectivos basados en catálisis por lipasas es limitado. Entre los ejemplos que han demostrado tener buen éxito, se encuentra la síntesis quiral de

aminas catalizada por la lipasa de *Burkholderia plantarii* y la de *S. marcescens*, que participan en la producción de (2R-3S)-3-(4-metoxifenil) metilglicinato, el cual es usado en la síntesis de Diltiazem™ (Jaeger y Reetz, 1998).

Las lipasas y esterasas pueden utilizarse para la síntesis estereoquímica de ésteres. Estos ésteres estereoespecíficos son muy útiles en la industria farmacéutica y química (Katz y col. 1993), por ejemplo el Naproxen, el Ketoprofen y muchos intermediarios tanto de síntesis de medicamentos como de insecticidas y herbicidas (Hou, 1993) (TABLA 2).

TABLA 2. Ejemplos de reacciones enantioselectivas catalizadas por lipasas. (Fuente: Jaeger y Reetz, 1998).

Sustrato	Fuente	Producto	% Rendimiento	% ee*
	<i>Serratia marcescens</i>		45%	>98%
	<i>Pseudomonas</i> sp.		92%	87%
	<i>Pseudomonas</i> sp.		41%	>95%
	<i>Candida antarctica</i>		48%	>99%
	<i>Pseudomonas</i> sp.		47%	97%
	<i>Candida antarctica</i>		38%	95%

* % ee: % de exceso enantiomérico.

LIPASA DE *Bacillus pumilus* GMA1

El microorganismo de estudio, *Bacillus pumilus* GMA1 (FIGURA 6), fue aislado de las aguas termales de Los Azufres, Michoacán. Este microorganismo presenta características interesantes respecto a su termorresistencia, y la cepa como tal se considera atractiva por las actividades hidrolíticas que presenta (xilanolítica y proteolítica) además de las características de su lipasa (Bustos-Jaimes, 1995). Las características bioquímicas de este microorganismo se presentan en la TABLA 3.

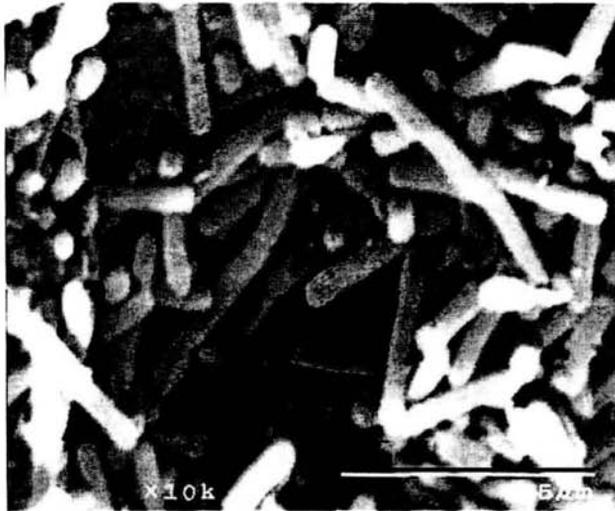


FIGURA 6. *Bacillus pumilus* GMA1 a 10 000x. La línea de escala representa 5 μ m (Cortesía: Patricia Wong).

TABLA 3. Patrón de fermentación de carbohidratos y otras pruebas bioquímicas de *Bacillus pumilus* GMA1 (Fuente: Bustos-Jaimes, 1995).

Carbohidrato/Resultado	Carbohidrato/Resultado	Carbohidrato/Resultado	Carbohidrato/Resultado
Glicerol (+)	Eritritol (-)	D-Arabinosa (-)	L-Arabinosa (+)
β -Metil-D-Xilósido	D-Xilosa (+)	L-Xilosa (+)	Adonitol (-)
α -Metil-D-Xilósido (-)	Galactosa (-)	Glucosa (+)	Fructosa (+)
Mannosa (+)	Sorbosa (-)	Rhamnosa (-)	Dulcitol (-)
Inositol (+)	Manitol (+)	Sorbitol (-)	α -Metil-D-Mannósido (-)
Esculina (+)	Salicina (+)	Celobiosa (+)	Maltosa (+)
α -Metil-D-Glucósido (-)	N-Acetil-glucosamina (-)	Amigdalina (+)	Arbutina (+)
Lactosa (+)	Melibiosa (-)	Sacarosa (+)	Trehalosa (+)
Inulina (-)	Melezitosa (-)	Rafinosa (-)	Almidón (-)
Glicógeno (-)	Xilitol (-)	Gentiobiosa (+)	D-Turanosa (-)
D-Lixosa (-)	D-Tagatosa (+)	D-Fucosa (-)	L-Fucosa (-)
D-Arabitol (-)	L-Arabitol (-)	Gluconato (-)	2-Ceto-gluconato (-)
5-Ceto-gluconato (-)	Tinción de Gram (+)	Catalasa (+)	β -Galactosidasa
Arginina dihidrolasa (-)	Lisina descarboxilasa (-)	Ornitina descarboxilasa (-)	Uso de citrato (-)
Producción de H ₂ S (-)	Ureasa (-)	Triptofano desaminasa (+)	Producción indol (-)
Producción acetoina (+)	Hidrólisis de gelatina (+)	Reducción de nitratos (-)	Hidrólisis caseína (+)
Lipasa (+)	Hidrólisis xilano (+)		

La lipasa de este microorganismo ha sido secuenciada y caracterizada, encontrando un pH óptimo de 10 a 10.5 y una temperatura de máxima actividad de 50°C, presenta preferencia por ácidos grasos de cadena corta y un peso molecular aproximado de 21 kDa (Bustos-Jaimes, 1998; Wong, 2002).

En la literatura se encuentran reportadas varias lipasas de *B. pumilus* entre las que se encuentran la lipasa de *B. pumilus* B26 (Kim y col., 2002) y *B. pumilus* DSM5776 (Möller y col., 1991); éstas han sido caracterizadas de manera bioquímica y molecular (TABLA 4). Las propiedades bioquímicas de la lipasas de *B. pumilus* DSM5776 difieren de aquellas que exhibe la lipasa de *B. pumilus* GMA1 y del mismo modo, las características bioquímicas de ambos microorganismos difieren en algunos puntos como lo son la producción de acetoína y utilización de citrato.

Dentro de las lipasas del genero *Bacillus* que han sido caracterizadas molecularmente se ha hecho evidente la existencia de una familia de lipasas de peso molecular pequeño ya que en el caso de *B. pumilus* DSM5776 (Möller y col., 1991) y *B. subtilis* 168 (Sugihara y col., 1991) se ha encontrado que existe homología, con una identidad de 68% a nivel de DNA, 73% a nivel de proteína y hasta 83% si se hacen consideraciones funcionales con respecto a la naturaleza de los aminoácidos que las componen.

TABLA 4. Características bioquímicas de algunas lipasas producidas por microorganismos del género *Bacillus*. (Fuente: Möller y col., 1991; Kim y col., 2002; Wong, 2001; Mulalo y col., 2001; Sugihara y col., 1991; Schmidt-Dannert y col. 1996).

Microorganismo de procedencia	pH de máxima actividad	Temperatura de máxima actividad (°C)	Peso molecular (kDa)
<i>B. pumilus</i> DSM5776	9.5	30	19.3
<i>B. pumilus</i> B26	8.5	35	19.2
<i>B. pumilus</i> GMA1	10.5	50	21.0
<i>B. licheniformis</i>	10.0 – 11.5	50 - 60	19.2
<i>B. subtilis</i> 168 LipA	10.0	37	19.3
<i>Bacillus</i> sp.	6.4	60	22.0

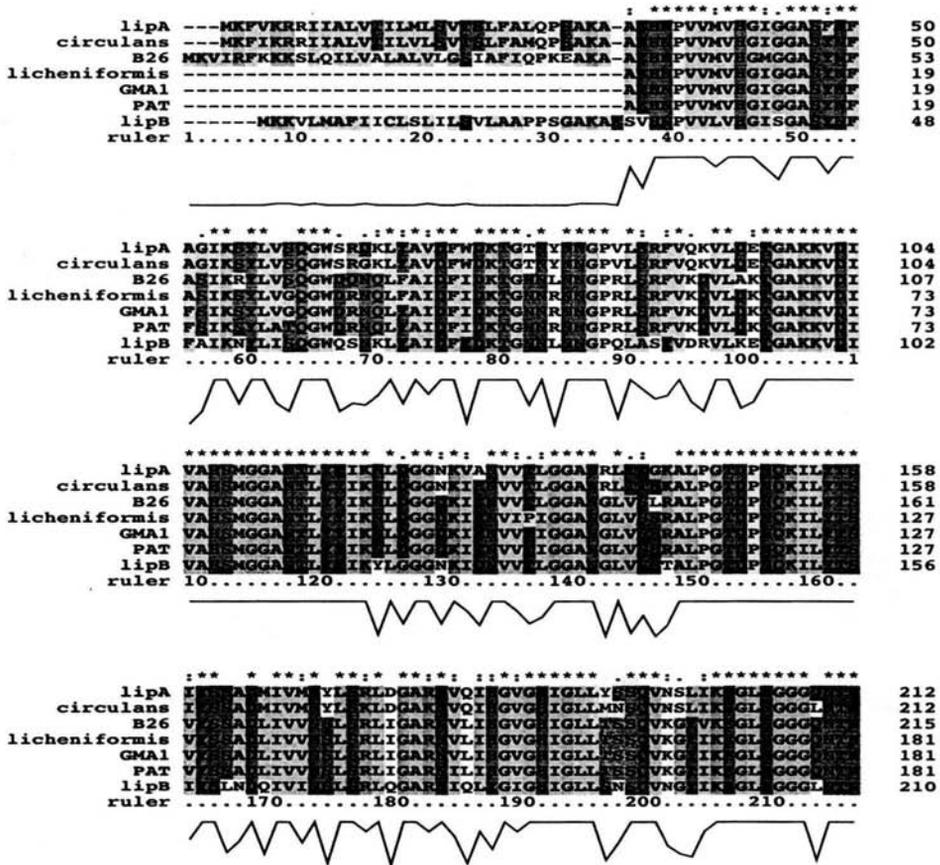
En la TABLA 4 se puede observar la notoria similitud en las propiedades fisicoquímicas de las lipasas de *B. licheniformis* (Mulalo y col. 2001) y *B. pumilus* GMA1 (Bustos-Jaimes,

1995; Wong, 2002). En la comparación entre las secuencias de estas lipasas (**FIGURA 7**) se puede observar claramente que el pentapéptido consenso (A-X-S-X-G) de las lipasas del género *Bacillus* se encuentra altamente conservado (A-H-S-M-G), así como los aminoácidos correspondientes a la cavidad oxianiónica, Ile12 y Met78, excepto en la lipasa de *B. pumilus* B26 que muestra un cambio de la Ile por Met en la posición 12. No obstante, es el átomo de hidrógeno del nitrógeno del enlace peptídico el que interactúa con el oxianión, por lo que este cambio podría no tener consecuencias catalíticas importantes.

La **TABLA 4** nos permite observar que las lipasas que actúan a mayor pH y a más alta temperatura son las de *B. licheniformis* (Mulalo y col. 2001) y *B. pumilus* GMA1 (Bustos-Jaimes, 1995; Wong, 2002). Estas dos lipasas se diferencian de las demás por la presencia de un residuo de Gly en la posición 28, donde las otras tienen un residuo de Ser o Thr.

Este es el único cambio que ambas lipasas comparten entre ellas y no con las otras. Anteriormente se habían postulado la Val27 y la Gly28 como posibles responsables del cambio de las propiedades catalíticas entre las lipasas de *B. pumilus* GMA1 y DSM5776 (Bustos-Jaimes, 1998). El residuo Gly28, en la lipasa de *B. subtilis*, se encuentra en el extremo distal de la hélice que soporta el asa donde se encuentra el residuo de Ile12 que, como ya se mencionó, forma parte de la cavidad oxianiónica. Debido a su tamaño, el mayor número de conformaciones posibles para este aminoácido y la incapacidad de formar puentes de hidrógeno de su cadena lateral, la presencia de este aminoácido podría generar los cambios estructurales responsables de las propiedades alcalófilas y termófilas de estas lipasas.

FIGURA 7. Comparación de secuencias de aminoácidos entre las lipasas del género *Bacillus*.



LipA : Lipa de *B. subtilis*
 LipB : LipB de *B. subtilis*
 Circulans: Lipasa de *B. circulans*
 Licheniformis: Lipasa de *B. licheniformis*

GMA1: Lipasa de *B. pumilus* GMA1
 PAT : Lipasa de *B. pumilus* DSM5776
 B26: Lipasa de *B. pumilus* B26

TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE

Clonación y expresión de proteínas heterólogas

Se denomina ADN recombinante a un ADN híbrido obtenido *in vitro* por combinación de dos ADNs pertenecientes a 2 especies diferentes, que se prepara con el objetivo de realizar lo que se denomina una clonación, proceso acompañado o no de la expresión de proteínas. Es pertinente destacar que no es posible "transplantar" directamente el ADN a estudiar sobre el cromosoma bacteriano. Por tal motivo el ADN se inserta en un vector el cual presenta en su estructura las señales necesarias para su replicación, pero no pueden replicarse por sí solos, por lo que necesitan ser introducidos en células huéspedes como por ejemplo bacterias.

Por otro lado la clonación tiene por objetivo aislar y obtener numerosas copias idénticas de un gen o un fragmento de éste. Un "clon" es, por definición, un gran número de células, o moléculas idénticas, que proceden de un único ancestro, sea una célula o una molécula.

El ADN recombinante (ADN/bacteriófago o ADN/plásmido) tiene la gran ventaja de poder replicarse en una bacteria como lo habría hecho el bacteriófago o el plásmido original. Por lo cual es un medio cómodo de producir una multiplicación del fragmento de ADN a estudiar.

Entre los muchos sistemas disponibles para la producción de proteínas heterólogas, *Escherichia coli* sigue siendo la bacteria gram-negativa más atractiva debido a su capacidad de crecer rápidamente y en alta densidad en sustratos baratos, su genética ha

sido ampliamente caracterizada y se dispone de un número cada vez más grande de vectores de expresión.

Los avances en la comprensión de la función, la regulación y las interacciones de los productos celulares del gen, junto con la disponibilidad de herramientas genéticas nuevas, están haciendo a *E. coli* un anfitrión más atractivo para la producción de proteínas heterólogas. El hecho es que solamente una pequeña cantidad de información se ha explotado para propósitos prácticos y sigue habiendo diversos aspectos fundamentales de su fisiología que alentarán el progreso en la optimización de este microorganismo para la expresión de la proteínas (François, 1999).

PCR

Principio de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica que permite amplificar ADN o ARN, de tal forma que es posible detectar copias únicas de genes, las cuales se pueden manipular posteriormente.

El procedimiento consiste en realizar ciclos repetitivos de: a) desnaturalización del ADN molde, b) hibridación de dos cebadores con las secuencias complementarias al ADN de interés, y c) la extensión mediante la actividad de una ADN polimerasa.

Ambos oligonucleótidos se hibridan con los extremos del fragmento del ADN molde que se desea amplificar, se sintetiza la cadena complementaria por medio de una ADN polimerasa y finalmente se desnaturaliza el duplex resultante con calor para repetir el ciclo aproximadamente 30 veces. Esto da por resultado teóricamente una amplificación

exponencial de aproximadamente 2^{30} copias del gen de interés (FIGURA 8). Como una característica importante, el ADN molde puede ser utilizado en forma pura o formar parte de una mezcla de biomoléculas.

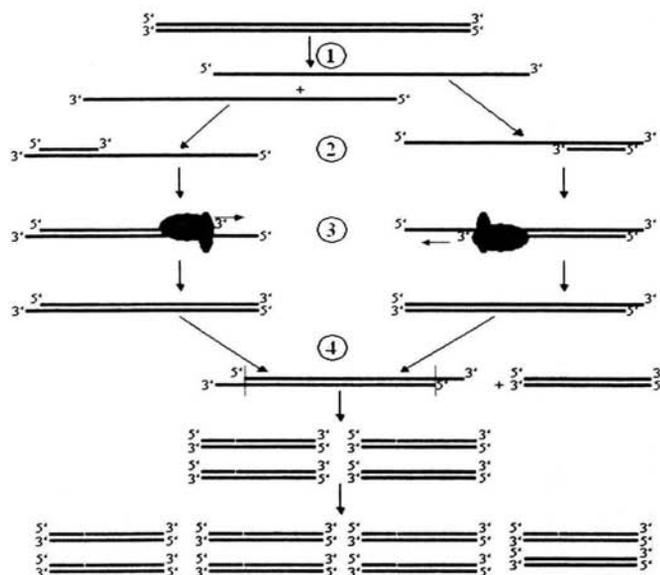


FIGURA 8. Principio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Ciclos de temperatura

Cuando la secuencia de interés que se requiere amplificar se localiza en un ADN genómico, las dos cadenas están unidas en forma duplex. Este ADN se desnaturaliza calentándolo a 94°C durante un minuto, lo que produce la separación de las dos hebras. Posteriormente, al enfriar y mantener la temperatura entre 40 y 60°C durante un minuto, los dos oligonucleótidos se hibridan con las secuencias complementarias del ADN molde, lo que permite que se inicie la síntesis de la cadena complementaria por la ADN polimerasa cuando se eleva la temperatura a 72°C y se

mantiene así durante el tiempo necesario dependiendo de la longitud del segmento que se desea amplificar. Al conjunto de estas etapas se le conoce como un **ciclo de amplificación**. Generalmente el primer ciclo de amplificación es precedido por una etapa de desnaturalización, a una temperatura de 94 a 95°C durante 3 a 5 minutos con el objeto de desnaturalizar por completo el ADN molde, al final de los ciclos de amplificación la temperatura se mantiene a 72°C durante 5 minutos para permitir que los fragmentos que no se amplificaron por completo sean completados (Arredondo-Peter, 1993).

Aplicaciones de la PCR

Como bastan pequeñas cantidades de muestras de ADN relativamente poco refinadas, la PCR se ha convertido en un valioso instrumento de investigación en biología y en medicina clínica y forense. En investigación biológica, la PCR ha acelerado el estudio de la función de los genes, el mapeo genético y la evolución. En la investigación de la función de los genes se utiliza la PCR para obtener copias de genes individuales, cuyas actividades pueden estudiarse y definirse con mayor precisión.

Se recurre a la PCR para obtener copias múltiples de regiones determinadas del ADN humano. Estas regiones pueden examinarse a continuación para comprobar si están vinculadas con enfermedades genéticas, como la fibrosis quística.

También se ha beneficiado de la PCR el estudio de la evolución. Los científicos la han utilizado para estudiar el ADN de insectos atrapados hace miles de años en gotas de ámbar. Aun cuando gran parte de ese ADN ha perdido su estructura, se conserva todavía

intacta una cantidad suficiente para ser multiplicada mediante la PCR para comparar el resultado con el observado en insectos actuales.

En medicina, la PCR resulta particularmente útil en el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas. Las muestras de ADN obtenidas del feto mediante amniocentesis (extracción de una pequeña cantidad de líquido del útero materno) se analizan ahora en sólo unas horas. Antes era necesario cultivar células fetales en un medio nutritivo especial durante varias semanas para poder realizar análisis bioquímicos. La PCR también se ha utilizado en células tomadas de embriones de sólo unas horas de edad fertilizados *in vitro* (en un tubo de ensayo) para determinar si están exentos de enfermedades. A continuación, el embrión se implanta en el útero materno para iniciar un embarazo normal.

Otras aplicaciones médicas de la PCR son la identificación de virus, bacterias y células cancerosas en tejidos humanos. Puede utilizarse incluso con células individuales aplicando una variante llamada PCR *in situ* para identificar tipos celulares específicos.

En medicina forense la PCR ha revolucionado la identificación de delincuentes. Las pruebas de tipificación de ADN basadas en PCR pueden crear huellas “dactilares” que identifican sin ambigüedad a cualquier persona. Estas pruebas permiten también excluir o implicar a sospechosos basándose en pequeñas cantidades de sangre, piel, pelo o semen recogidas en el escenario del delito. La PCR se ha utilizado también para seguir la pista a residuos industriales y otros productos. Se añaden pequeñas cantidades de ADN de un tipo conocido a lotes de explosivos, derivados del petróleo, venenos, y otros residuos, que quedan así definitivamente etiquetados. Estas etiquetas de ADN pueden recuperarse a partir de fangos u otros contaminantes recogidos en vías de agua públicas, por ejemplo, y

multiplicarse mediante PCR para comparar el resultado con las listas que mantienen los fabricantes de las etiquetas. Una coincidencia es una prueba con mucho peso que puede inculpar al responsable de la contaminación.

En el presente trabajo nos proponemos clonar y expresar la lipasa termófila y alcalófila de *B. pumilus* GMA1 en *E. coli*. Esto nos permitirá obtener una mayor cantidad de enzima para estudiar sus propiedades catalíticas en sistemas de reacción de interés. Para tal motivo utilizamos como estrategia la amplificación del gen de esta lipasa por PCR para posteriormente clonarlo. Los cebadores utilizados para la PCR nos permitirán incluir secuencias tales que nos permitan generar una construcción en la cual se coloca un residuo de metionina en la posición -1 con respecto al amino terminal de la proteína madura (procesada postraduccionalmente). Esta metionina tendrá la función de ser el aminoácido número 1 de la proteína recombinante. Este gen modificado no contará con el péptido señal de secreción de *Bacillus* ni con otros péptidos para dirigirlo al espacio periplásmico en *E. coli*, por lo que se espera que la enzima recombinante no sea secretada al medio. Sin embargo, se espera que la adición de este aminoácido en el extremo N-terminal de la lipasa madura no impida su actividad catalítica.

Capítulo II. OBJETIVOS

General

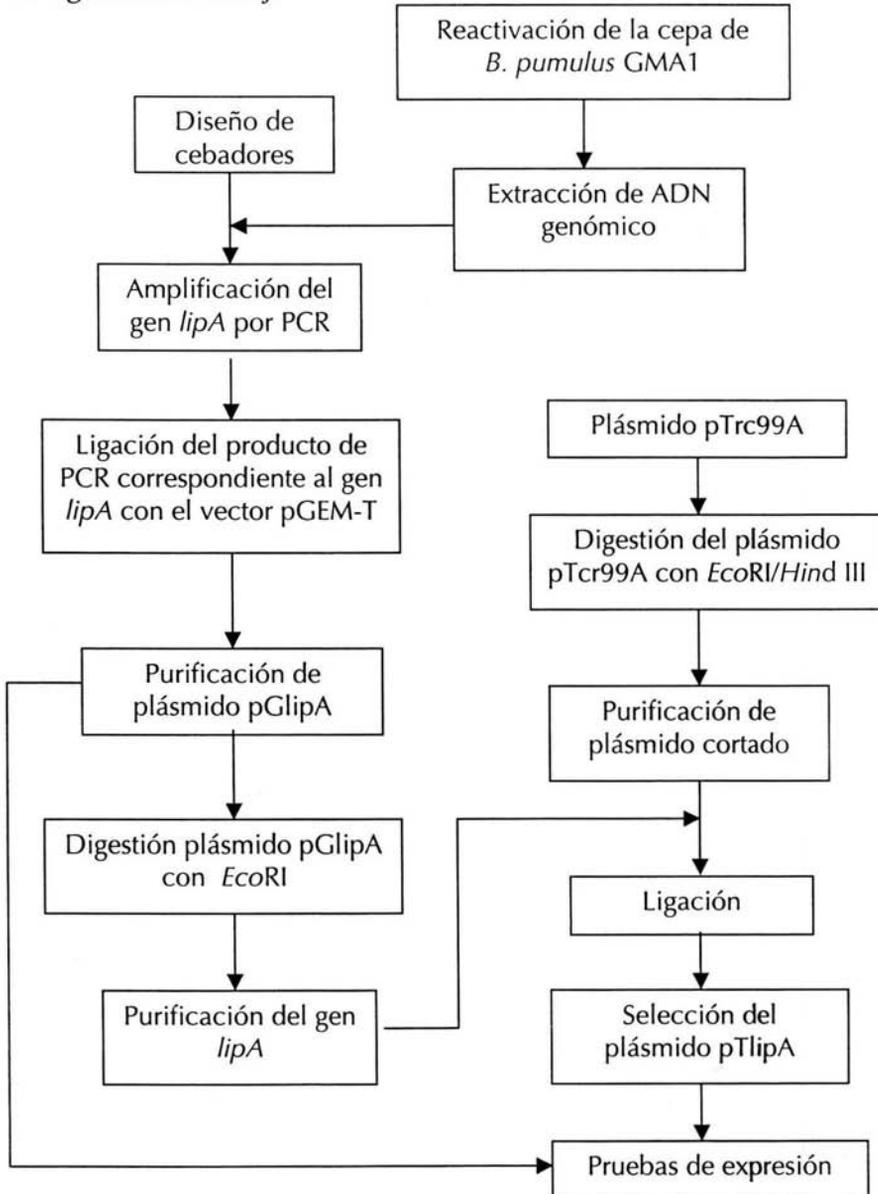
- Clonar y expresar la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 en *E. coli*.

Particulares

- Amplificar por PCR la región correspondiente al gen de la lipasa de *B. pumilus* GMA1, eliminando el péptido líder y agregando un residuo de Met en posición -1 con respecto a la proteína madura.
- Clonar el gen de esta lipasa bajo el control de un promotor regulable.
- Estudiar la expresión de esta lipasa en *E. coli*.

Capítulo III. MATERIAL Y MÉTODOS

Esquema general de trabajo



REACTIVOS

Acetato de potasio	(Sigma)
Alcohol isoamílico	(Sigma)
Agar LB (Luria Bertrani)	(Difco)
Amortiguador TE (Tris-EDTA)	(Sigma)
Amortiguador 2	(New England Biolabs)
Caldo LB (Luria Bertrani)	(Difco)
Cloroformo	(Sigma)
CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)	(Sigma)
EDTA (Ácido etilendiaminotetracético)	(Sigma)
Enzimas de restricción (<i>EcoRI/HindIII</i>)	(New England Biolabs)
Etanol	(Sigma)
Fenol saturado de amortiguador	(Sigma)
Glucosa	(Sigma)
NaCl	(Sigma)
NaOH	(Sigma)
Pronasa E	(Sigma)
2-propanol	(Sigma)
Sistema de clonación pGEM-T - Easy vector	(Promega)
SDS (Dodecilsulfato de sodio)	(Sigma)
Tris-HCl	(Sigma)
Ligasa	(New England Biolabs)
<i>GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i>	(Amersham)
Agarosa	(GibcoBRL)
Bromuro de etidio	(GibcoBRL)

MICROORGANISMOS Y VECTORES

Bacteria/plásmido	Propiedades/Fenotipo
<i>B. pumilus</i> GMA1	LipA+
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hdsS_B</i> , (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , l(DE3)
pGEM-T	<i>Amp^r</i> , <i>ori</i> , <i>lac Z</i> , <i>f1 ori</i>
pTrc99A	<i>trc</i> , <i>lac Iq</i> , <i>Amp^r</i> , <i>rrnB2</i> , <i>rrnB1</i>

Reactivación de la cepa de *B. pumilus* GMA1

La cepa se mantuvo congelada en medio BHI a -20°C, posteriormente se cultivó en medio LB líquido a 37°C durante 12h a 250 r.p.m.

Diseño de cebadores

El diseño de cebadores se llevó a cabo utilizando el programa *Primers for the Mac V 1.0* (Apple Pi. Ashland MA, USA) partiendo de la secuencia de la lipasa de *B. pumilus* B26 reportada por Kim y col. (2002). Los cebadores seleccionados se muestran a continuación.

FOMEB26 33 BASES

5'-GAATTCCTAAGGGGGAATGGCTGAGCATAATCC-3' T_m = 64°C

RLIPHB26 27 BASES

5'-TAAGCTTTTIAATTCGTATTCTGTCC-3' T_m = 52°C

En itálicas se muestra el sitio de restricción (*EcoRI* en el caso de FOMEB26 y *HindIII* en el caso de RLIPHB26), en negritas la secuencia Shine-Dalgarno (para el caso de FOMEB26) y por último la secuencia subrayada corresponde a los codones de inicio (FOMEB26) y término (RLIPHB26).

Extracción de DNA de *B. pumilus* GMA1 (Modificado de Ausubel y col., 1992)

- 1) Crecer 50 mL de *Bacillus pumilus* GMA1 toda la noche a 37°C con agitación constante de 250 r.p.m.
- 2) Centrifugar a 1000 r.p.m. en un rotor JA20.
- 3) Resuspender las células en 2mL de amortiguador TE (10 mM, 0.2 mM, pH 8.0).
- 4) Adicionar 1 mg de lisozima e incubar a 37°C durante una hora.
- 5) Agregar 0.5 mg de pronasa E y 150 µL de SDS 10%. Mezclar suavemente e incubar a 37°C durante una hora.
- 6) Agregar 200 µL de NaCl 5 M y mezclar suavemente. Agregar 200 µL de solución de CTAB/NaCl (10%/0.7 M). Mezclar e incubar 15 min a 65°C.
- 7) Agregar un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Mezclar suavemente hasta que desaparezca la fase orgánica (inferior) y centrifugar a 1000 r.p.m. en un rotor JA20 durante 10 min.
- 8) Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y agregar un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar suavemente hasta que desaparezca la fase orgánica (inferior) y centrifugar a 1000 r.p.m. en un rotor JA20 durante 10 min.

- 9) Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y agregar 0.6 volúmenes de 2-propanol. Mezclar hasta que se observe el DNA precipitado. Retirar el líquido con una pipeta y enjuagar el precipitado con 2 mL de etanol al 70%. Secar el DNA a 50°C con vacío y resuspenderlo en 1.0 mL de amortiguador TE pH 8.0 y guardar a -20°C hasta ser usado.

Electroforesis de ácidos nucleicos

La visualización del ADN cromosómico, los productos de PCR y los plásmidos se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se corrió a 10 V/cm por 45 min. Posteriormente el gel se tiñe con una solución de bromuro de etidio para posteriormente ser irradiado con luz ultravioleta.

Amplificación del gen *lipA* por PCR

La amplificación del gen *lipA* se realizó utilizando los cebadores diseñados con anterioridad bajo las siguientes condiciones:

Reactivos		Condiciones de reacción	
Amortiguador 10X	5.0 µL	1 ciclo	95.0°C / 3.0 min
Mezcla dNTP's (10 mM)	1.0 µL		
Cebador de inicio (50 µM)	1.0 µL		
Cebador de término (50 µM)	1.0 µL	30 ciclos	95.0°C / 1.0 min
DNA molde (40 ng/ µL)	1.0 µL		48.0°C / 1.0 min
Mg ²⁺ (50 mM)	2.0 µL		72.0°C / 1.0 min
H ₂ O	38.5 µL	1 ciclo	72.0°C / 10.0 min
Taqpol (5.00 U/ µL)	1.0 µL		

Ligación del producto de PCR correspondiente al gen *lipA* con el vector pGEM-T

La ligación se realizó utilizando el Sistema pGEM-T - Easy vector (Promega Corp., Madison WI, USA) conforme al siguiente protocolo:

Reactivos	Cantidad	Condiciones de ligación
Amortiguador de ligación 2x	5.0 μ L	4°C durante 12 horas
pGEM-T	1.0 μ L	
Producto de PCR	3.0 μ L	
DNA Ligasa T4	1.0 μ L	

Purificación del plásmido pGlipA

- Crece el microorganismo en 5 mL de LB hasta una DO de 1. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm a 15°C.
- Resuspender las células en 100 μ L de disolución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 10mg/ml de lisozima). Se incuba a 37°C por 1 hora.
- Adicionar 200 μ L de disolución recién preparada de 0.2 M NaOH y 4% de SDS. Mezclar e incubar en hielo durante 10 minutos.
- Agregar 150 μ L de una disolución 5 M de acetato de potasio (pH 5) e incubar en hielo durante 10 minutos.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Retirar 400 μ L de dos tubos y juntarlos en un tubo nuevo.

- f) Agregar 400 μL de fenol saturado de amortiguador (Sigma), mezclar suavemente. Adicional 400 μL de cloroformo y mezclar suavemente. Centrifugar como en el paso 5.
- g) Transferir 750 μL de la fase acuosa a un tubo limpio y precipitar el ADN mediante la adición de un volumen igual de 2-propanol. Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
- h) Recolectar el plásmido por centrifugación a temperatura ambiente durante 15 minutos a máxima velocidad.
- i) Lavar el plásmido con etanol al 80% hasta que no se perciba olor a fenol y secar al vacío. El ADN se resuspende en 25 μL de amortiguador TE (Tris 10 mM, pH 8; EDTA 2 mM).

Digestión con *EcoRI* del plásmido pGlipA

La digestión se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

Reactivos	Cantidad	Condiciones de digestión
Plásmido pGlipA	70.0 μL	37°C durante 12 horas
Amortiguador 2 (New England Biolabs)	15.0 μL	
Enzima <i>EcoRI</i> (20.00 U/ μL)	3.0 μL	
H ₂ O	62.0 μL	

Digestión con *EcoRI/HindIII* del plásmido pTrc99A

La digestión se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

Reactivos	Cantidad	Condiciones de digestión
Plásmido pTrc99A	70.0 μL	37°C durante 12 horas
Amortiguador 2 (New England Biolabs)	15.0 μL	
Enzima <i>EcoRI</i> (20.00 U/ μl)	3.0 μL	
Enzima <i>HindIII</i> (20.00 U/ μl)	3.0 μL	
H ₂ O	59.0 μL	

Purificación del gen *lipA* y el plásmido pTrc99A digeridos con *EcoRI/HindIII*

Los fragmentos de ADN correspondientes al gen *lipA* y al plásmido pTrc99A cortados en ambos casos con *EcoRI* y *HindIII* se sometieron a electroforesis de agarosa al 1% para separar sus componentes. En el caso del gen *lipA*, el fragmento de interés se debe separar del resto del plásmido pGlipA (vector pGEM) y, para el caso del plásmido pTrc99A, el vector se debe separar del fragmento que corresponde al sitio de clonación múltiple del vector situado entre los sitios de corte *EcoRI* y *HindIII*. Tras la separación en el gel de agarosa, se cortan las bandas y purifican por adsorción en columnas de fibra de vidrio para ser lavadas y posteriormente eluidas en forma pura. Para este propósito se utilizó el sistema de purificación *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ligación del plásmido pTcr99A y el gen *lipA* con ligasa de T4

La ligación entre el vector pTcr99A y el fragmento de DNA correspondiente al gen *lipA* se realizó conforme al siguiente protocolo:

Reactivos	Cantidad	Condiciones de ligación
Amortiguador de ligación con 0.1 M ATP	1.0 μ L	4°C durante 12 horas
Ligasa T4	1.0 μ L	
Fragmento <i>lipA</i> purificado	3.0 μ L	
Plásmido pTcr99A E-H	1.0 μ L	
H ₂ O	4.0 μ L	

Selección del plásmido pTlipA

1. Se transformaron células competentes de *E.coli* BL21 con 2 μ L del producto de ligación del plásmido pTcr99A y el gen *lipA*. La transformación se realiza por electroporación utilizando una diferencia de potencial de 1800 V en una celda de 1mm de separación entre electrodos.
2. Se inocularon cajas con agar LB, que contienen 50 mg/mL de ampicilina, con 50 mL de células transformadas y se incubaron a 37°C durante 12h.
3. Se seleccionaron al azar 10 colonias a las cuales se les extrajo y purificó el plásmido que contenían.
4. El plásmido se digirió con *EcoRI/HindIII* para evaluar la presencia del inserto de interés.

5. Los plásmidos que presentaron un fragmento de restricción correspondiente al peso molecular del gen *lipA* fueron utilizados como templados en una reacción de PCR específica para el gen *lipA* (ver amplificación del gen *lipA*).

Pruebas de expresión

Inicialmente se probó la actividad de la proteína LipA en medio sólido. Se inocularon células recombinantes que contenían el plásmido pTlipA, en medio LB (agar) con 0.5% de tributirina emulsificada, 50 mg/mL de ampicilina y dos concentraciones del inductor isopropiltiogalactósido (IPTG), 0 y 1 mM. A continuación las placas se incubaron durante 12 horas a 37°C y una vez que se presentó desarrollo celular, se mantuvieron a diferentes temperaturas (4, 20 y 37°C), haciendo observaciones cada 12 h hasta la aparición de halos de lisis sobre la tributirina emulsificada. Como control negativo se utilizaron células con el plásmido pTrc99A, bajo las mismas condiciones.

Complementariamente se probó la expresión del gen *lipA* en medio líquido, para lo cual se tomaron cantidades iguales de un cultivo homogéneo y saturado de células recombinantes que contenían el plásmido pTlipA y se inocularon en 10 mL de medio LB líquido con una concentración de 50 µg/mL de ampicilina, estos medios se incubaron a 37°C durante 12 horas.

Una vez transcurrido este tiempo se indujo la expresión del gen *lipA* adicionando isopropiltiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. A partir de este momento se incubaron a diferentes temperaturas (4, 20 y 37°C) durante 120 h, tomando alícuotas de 1 mL a intervalos de 12 h. Al igual que los ensayos en medio sólido, se utilizó

como control negativo *E. coli* transformada con el plásmido pTrc99A. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se utilizaron geles preparados de manera discontinua, mediante un gel concentrador al 4% y un gel separador al 15% (Laemmli, 1970).

Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y purificación del ADN genómico

El microorganismo se reactivó en medio LB a 37°C durante 24h, transcurrido este tiempo se extrajo y purificó el ADN genómico tal como se describe en el apartado de materiales y métodos, el producto de la extracción se sometió a una electroforesis de la cual se obtuvo una banda única de alto peso molecular (no mostrado).

Amplificación del gen *lipA*

La amplificación del gen *lipA* se realizó mediante una PCR utilizando los cebadores previamente diseñados. El producto obtenido se sometió a una electroforesis de la cual se obtuvo una banda única de peso molecular de aproximadamente 564 pb (**FIGURA 9**). El producto de PCR esperado tiene un peso molecular de 574 pb, por lo que asumimos que el producto obtenido corresponde al gen *lipA*.

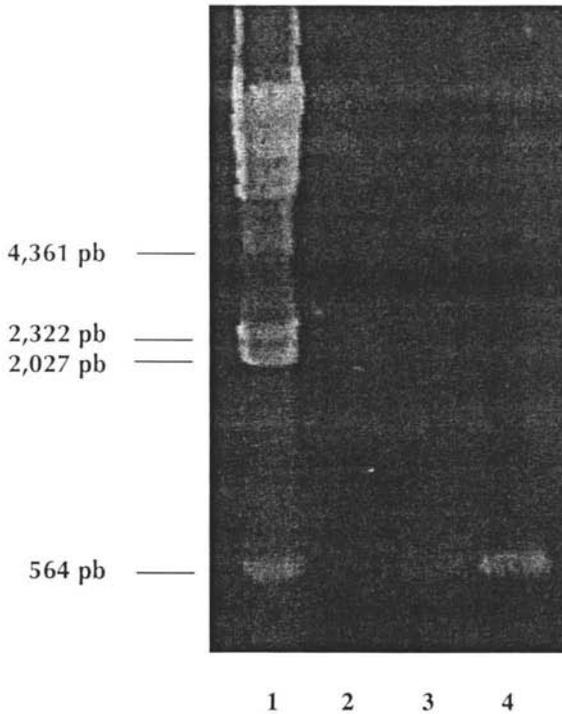


FIGURA 9. Amplificación por PCR del gen *lipA*. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 3 y 4, producto obtenido por PCR de la amplificación del gen *lipA*.

Ligación del producto de PCR correspondiente al gen *lipA* con el vector pGEM-T

El producto de PCR correspondiente al gen *lipA* se ligó al vector de clonación pGEM-T *Easy Vector* tal como se indica en el apartado de material y métodos. El producto obtenido de dicha ligación fue utilizado para transformar células electrocompetentes de *E. coli* BL21, a las células recombinantes obtenidas se les extrajo y purificó el plásmido pGlipA para verificar la presencia del inserto. El plásmido se sometió a una digestión con *EcoRI* considerando que la clonación se realizó en una región flanqueada por dos sitios de

restricción para esta enzima y que nuestro gen no contiene ese sitio de restricción. La digestión se analizó por electroforesis, encontrando una banda con un peso molecular de aproximadamente 564 pb, lo que indica la posible presencia del inserto correspondiente al gen *lipA*. Paralelamente se realizó una PCR con el objetivo de amplificar el inserto, para lo cual se utilizaron los cebadores específicos para regiones que flanquean al gen *lipA*. Los resultados obtenidos se muestran en la **FIGURA 10**.

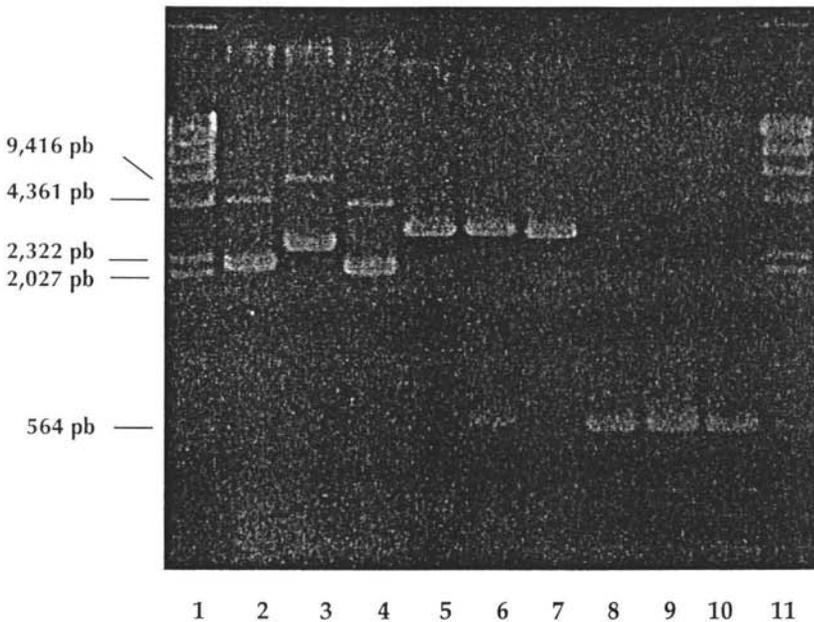


FIGURA 10. Pruebas para detectar la presencia del gen *lipA* contenido en los plásmidos putativos pGlipA. Carril 1 y 11, marcador de peso molecular; carril 2, 3 y 4, plásmidos pGlipA; carril 5, 6 y 7, productos obtenidos por digestión del pGlipA con *EcoRI*; carril 8,9 y 10, productos obtenidos de la amplificación del gen *lipA* por PCR a partir de pGlipA.

En los carriles 2, 3 y 4 de la **FIGURA 10** se observan dos patrones electroforéticos distintos que corresponderían al plásmido pGlipA (**FIGURA 11**). Estas diferencias podrían ser producto de las variaciones en el tamaño de los trectos de poliA y poliT que tienen el producto de PCR y el vector de clonación en sus extremos 3'-OH, respectivamente. Estas diferencias darían como resultado un enrollamiento diferente de la forma cerrada del plásmido y, por lo tanto, un patrón electroforético diferente.

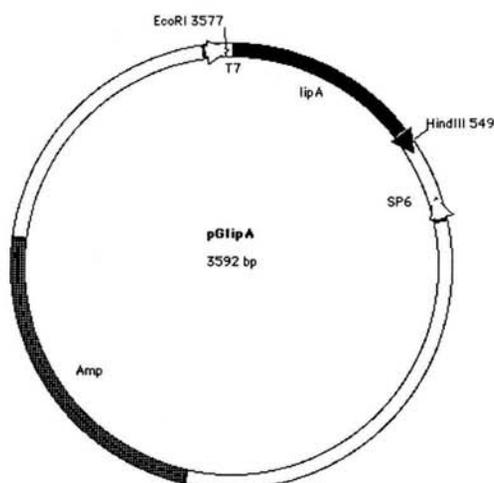


FIGURA 11. Mapa teórico del plásmido pGlipA.

En los carriles 5, 6 y 7, de la **FIGURA 10** encontramos que sólo uno de ellos (carril 6) presenta la digestión del plásmido con la enzima de restricción *EcoRI*. Esto es evidente por la presencia de una banda de peso molecular aproximado de 564 pb. Finalmente en los carriles 8, 9 y 10 de la **FIGURA 10** se presentan los productos de amplificación del gen *lipA* por PCR con los cebadores FOMEB26 y RLIPHB26. La

presencia de un producto de PCR del tamaño correspondiente al del gen *lipA* nos indica que, en los tres casos, el plásmido contenía este gen.

Debido a que la enzima de restricción *EcoRI* no produjo el fragmento esperado, aunque por PCR se determinó que sí se encontraba, nos hizo pensar que los plásmidos no se encontraban lo suficientemente puros. Los plásmidos de los carriles 2 y 3 de la **FIGURA 10**, se repurificaron y se sometieron a digestiones con *EcoRI*, *HindIII* y *EcoRI/HindIII*. Los resultados obtenidos se muestran en la **FIGURA 12**. En los carriles 2 y 3 que corresponden a la digestión con *EcoRI* se observan claramente en ambos casos la aparición de una banda de un peso molecular aproximado de 564 pb que corresponde al gen *lipA*. En los carriles 4 y 5 en los que realizó la digestión del plásmido con *HindIII* se ve claramente la aparición de una sola banda, en ambos casos, de peso molecular mas alto que en los carriles anteriores que corresponde al fragmento del plásmido linearizado ya que solo hay un sitio de restricción para esta enzima. Por último, los carriles 6 y 7 corresponden al digestión del plásmido con *EcoRI/HindIII*. Estos carriles muestran el mismo patrón electroforético que los carriles 2 y 3, lo que nos indica la presencia del inserto correspondiente al gen *lipA* y además se demuestra que no se trata de plásmidos diferentes sino del mismo, pG*lipA*.

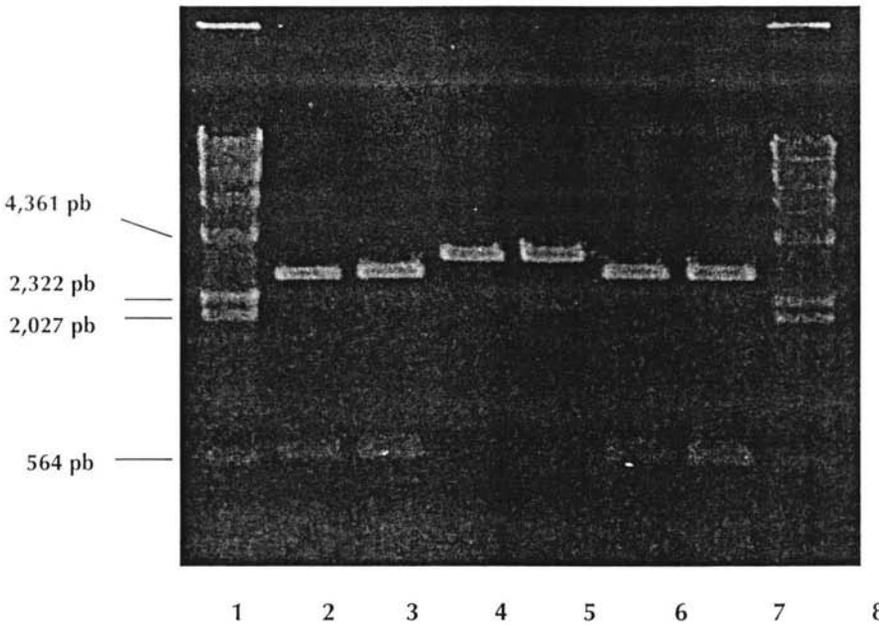


FIGURA 12. Segunda prueba de identificación del inserto *lipA* en pGlipA. Carril 1 y 8, Marcador de peso molecular. Carril 2 y 3, Producto obtenido por digestión del pGlipA con *EcoRI*. Carril 4 y 5, Producto obtenido por digestión del pGlipA con *HindIII*. Carril 6 y 7, Producto obtenido por digestión del pGlipA con *EcoRI/HindIII*.

Purificación del gen *lipA*

Teniendo la certeza de la presencia del inserto correspondiente al gen *lipA* en el plásmido pGlipA se procedió a su purificación siguiendo el protocolo descrito en material y métodos. En este caso, el plásmido pGlipA se digirió con *EcoRI/HindIII* antes de purificar el gen. Ya purificado el gen *lipA* se procedió a realizar un análisis electroforético en el cual se encontró una única banda de aproximadamente 564pb correspondiente al gen *lipA*.

Ligación del plásmido pTrc99A y el gen *lipA* con ligasa de T4

Para insertar el gen *lipA* en el vector pTrc99A, este vector fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción con las que se digirió este gen. Esto permite que el producto ligado se encuentre direccionado con respecto al promotor *trc* del vector pTrc99A. Tanto el gen *lipA* como el vector previamente digeridos y purificados se ligaron como se describe en material y métodos. A este plásmido resultante le llamamos pTlipA, y su mapa se muestra en la **FIGURA 13**.

El producto de la reacción de ligación fue utilizado para transformar células electrocompetentes de *E. coli* BL21. La selección de las células recombinantes se realizó en base a su resistencia a la ampicilina y la formación de halos de lisis en medio sólido LB con tributirina en emulsión. A las células seleccionadas se les extrajo y purificó el plásmido pTlipA para verificar la presencia del inserto. Al igual que en el caso de pGlipA se realizó una digestión con enzimas de restricción, para tal fin se utilizaron las enzimas *EcoRI/HindIII* considerando que la clonación se realizó en una región flanqueada por sitios de restricción para estas enzimas. El producto de la digestión se analizó por electroforesis. Los resultados se muestran en la **FIGURA 14** en donde puede verse que en los carriles 2, 3, 4, 5 y 6 encontramos 2 patrones de desplazamiento distintos para el mismo plásmido pTlipA, lo que puede corresponder a la un dímero de plásmidos pTlipA-pTlipA y como consecuencia del enrollamiento de estos, el desplazamiento en el análisis electroforético es diferente.

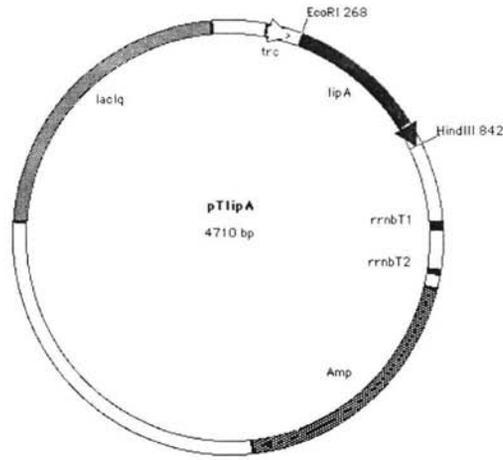


FIGURA 13. Mapa del plásmido pTlipA

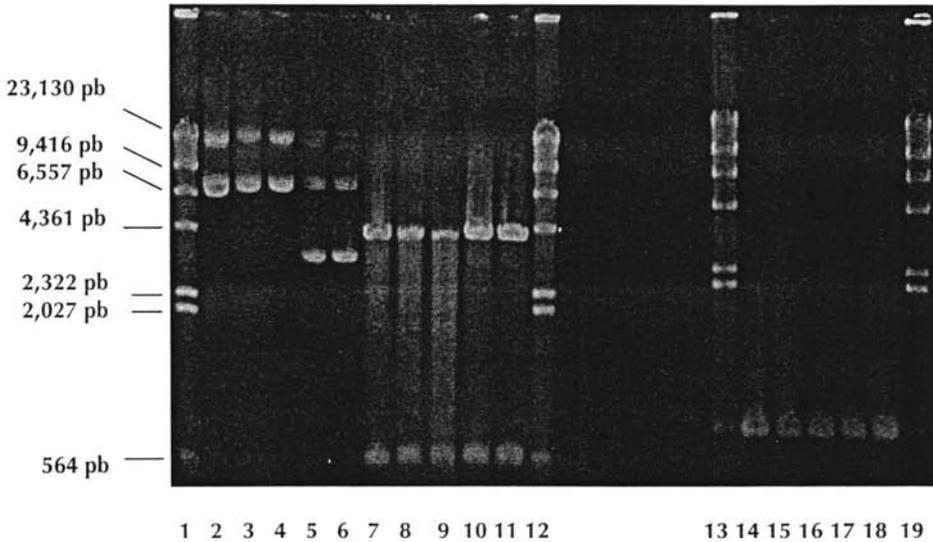


FIGURA 14. Identificación del inserto *lipA* en los plásmido putativo pTlipA. Carril 1,12, 13 y 19, marcador de peso molecular; carril 2,3,4,5 y 6, plásmidos pTlipA; carril 7,8,9,10 y 11, producto obtenido por digestión de los plásmidos putativos pTlipA *EcoRI/HindIII*; carril 14,15,16,17 y 18, amplificación del inserto *lipA* por PCR.

En los carriles 7, 8, 9, 10 y 11 de la **FIGURA 14** se presentan los productos de digestión del pTlipA con *EcoRI/HindIII*, en el cual para todas las muestras se presenta el mismo patrón de desplazamiento: 2 bandas únicas. La primera banda corresponde al plásmido sin el inserto *lipA* en un peso molecular de aproximadamente 4,361 pb y la segunda hasta un peso molecular aproximado de 564 pb que, muy probablemente, corresponde al inserto *lipA*. En los carriles 14, 15, 16, 17 y 18 se muestra el producto obtenido de la amplificación del inserto *lipA* que se obtuvo por PCR usando como molde el pTlipA y utilizando los cebadores específicos para regiones que flanquean al gen *lipA*. La aparición de una única banda de peso molecular aproximado de 564 pb al igual que en la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI/HindIII*, nos da la evidencia suficiente de la presencia del inserto *lipA* en el plásmido estudiado.

Con el propósito de comprobar que la construcción del pTlipA fuera correcta y en base a los resultados obtenidos en la **FIGURA 14** se procedió a tomar los dos plásmidos pTlipA que presentaron patrones electroforéticos distintos (pTlipA2 y pTlipA4) y se sometieron tanto a digestión con *EcoRI/HindIII* como a amplificación del el gen *lipA* por PCR. Los resultados obtenidos se muestran en la **FIGURA 15** y corroboran que existen dos patrones electroforéticos distintos para los plásmidos seleccionados. Sin embargo, ambos plásmidos generan los mismos patrones tanto de digestión como de amplificación por PCR. Esto podría deberse a que durante la reacción de ligación se forman dímeros pTlipA-pTlipA, que en consecuencia tendrían un peso molecular y patrón de enrollamiento distinto. Y uno de éstos patrones electroforéticos correspondería a uno de esos dímeros.

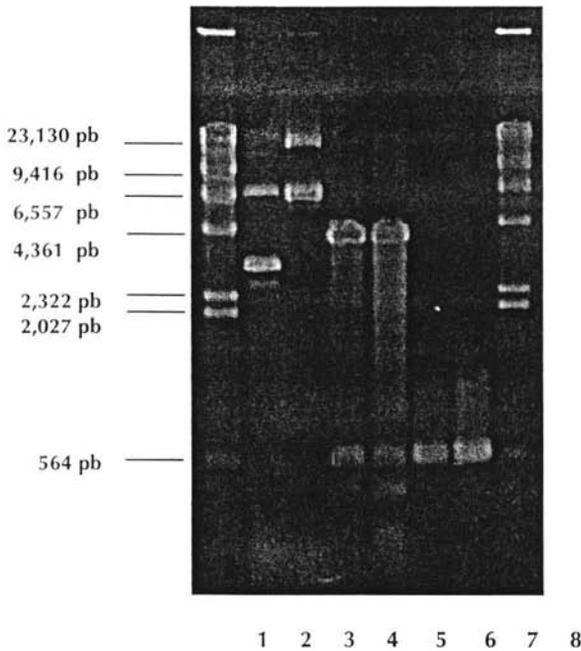


FIGURA 15. Análisis de restricción y por PCR de los diferentes plásmidos putativos pTlipA. Carril 1 y 8, marcador de peso molecular; carril 2, pTlipA4; carril 3, pTlipA2; carril 4 y 5, digestiones de los plásmidos pTlipA4 y pTlipA2 respectivamente con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*; carril 6 y 7, productos de PCR de los plásmidos pTlipA4 y pTlipA2 respectivamente amplificados con los cebadores FOMEB26 y RLIPHB26.

Pruebas de expresión

En los ensayos en medio sólido en los que se utilizó isopropiltiogalactósido (IPTG) y bajo todas las temperaturas utilizadas (4, 20 y 37°C) se observó claramente el desarrollo de bacterias recombinantes en un lapso de 12 h de incubación. Para el caso de las placas que se cambiaron a 4°C, la aparición de halos de lisis sobre la tributirina emulsificada en el agar se presentó a las 24 h de incubación. Para las temperaturas de 20 y 37°C y tras hacer observaciones cada 12 h, la aparición de halos de lisis se presentó entre las 36 y 48 h de

incubación respectivamente. Caso muy similar se presentó en ausencia del inductor, el desarrollo de bacterias recombinantes se hizo evidente a las 12 h de incubación y posteriormente entre las 48 y 72 h se lograron distinguir halos de lisis sobre la tributirina emulsificada con diferencias mínimas entre las diferentes temperaturas. Como podemos observar el inductor no muestra efecto sobre la expresión del gen *lipA*, mientras que el control negativo presentó crecimiento y una mínima formación de halos de lisis sobre tributirina emulsificada a las 72 h de incubación, como se nota claramente en la **FIGURA 16**. Este halo debe ser una consecuencia de la conocida actividad esterasa de *E. coli* (Sroga y Dordik, 2002; Sorrentino y col., 2003), y es notoriamente menor que el halo formado alrededor de la bacteria transformada con el plásmido pTlipA (**FIGURA 16**).

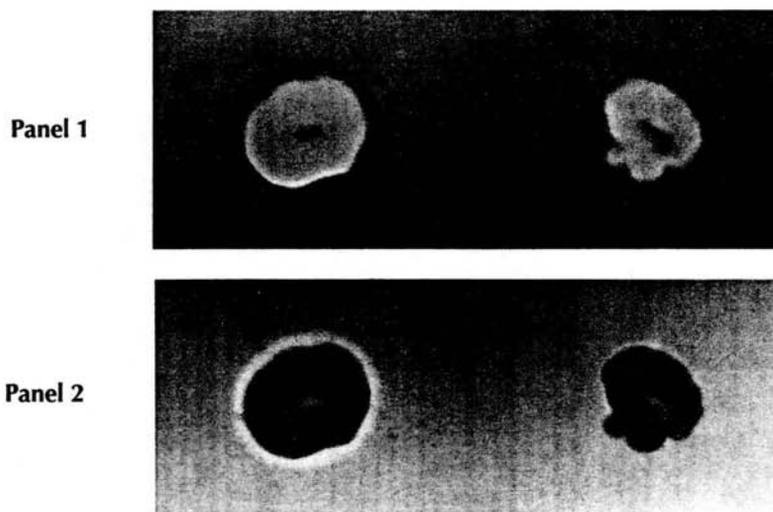


FIGURA 16. Colonias recombinantes de *E. coli*. Panel 1, a la izquierda una colonia recombinante de *E. coli* que contienen el plásmido pTlipA y que muestran actividad lipolítica, manifestándose el halo de lisis sobre la tributirina emulsificada en medio de cultivo sólido y a la derecha una colonia recombinante de *E. coli* que contiene el plásmido pTrc99A (control negativo).

Panel 2, se presentan los colores invertidos para una mejor apreciación del halo de lisis.

La construcción del plásmido pTlipA debería producir una lipasa sin péptido líder (señal de secreción) que, en consecuencia, no debería ser secretada al medio de cultivo. Por esta razón, se esperaba que el inducir la expresión del gen *lipA*, apareciera una banda de aproximadamente 20 kDa en el patrón electroforético de las proteínas intracelulares de *E. coli*. El ensayo de expresión de LipA en medio líquido no produjo cambios en el perfil electroforético de proteínas intracelulares totales a 4, 20 y 37°C. Sin embargo, a partir de las 120 h de incubación a 37°C, el perfil electroforético de *E. coli* transformada con los plásmidos pGlipA y pTlipA presentaron un patrón ligeramente distinto. En la **FIGURA 17** se muestran los perfiles de proteínas de *E. coli* a 120 h y 37 °C. A la altura del marcador de peso molecular correspondiente a 18.4 kDa aparece una banda de aproximadamente este peso molecular, que no aparece a otros tiempos y temperaturas y que tampoco aparece en el control negativo de este experimento (*E. coli* transformada con el plásmido pTrc99A y cultivada en las mismas condiciones). Consideramos que esta banda podría corresponder a la proteína LipA. Sin embargo, no contamos por el momento con más evidencias que los patrones electroforéticos aquí presentados.

Es claro que la expresión del gen *lipA* es relativamente pobre en las condiciones de trabajo. El cebador FOMEB26 incluye una secuencia Shine-Dalgarno antes del codón que codifica para el residuo de metionina inicial. Sin embargo, el vector posee una secuencia de este tipo antes del sitio de clonación *EcoRI*, de modo que el RNAm correspondiente al gen *lipA*, contiene dos secuencias Shine-Dalgarno contiguas. Es posible que la presencia de dos secuencias Shine-Dalgarno en la construcción repercuta en la eficiencia de la

traducción de la expresión, ya que aunque ésta secuencia esté presente, si la distancia entre ésta y el sitio de inicio de la traducción no es la adecuada, el complejo ribosoma-RNAm se desestabilizará antes de encontrar el codón de inicio. Con respecto al IPTG, éste no tuvo efecto significativo sobre la expresión del gen *lipA*, ya que aunque se produzca alta cantidad de RNAm si el ensamble del ribosoma a éste no es el adecuado como se mencionó anteriormente, la producción de la proteína se vería disminuida.

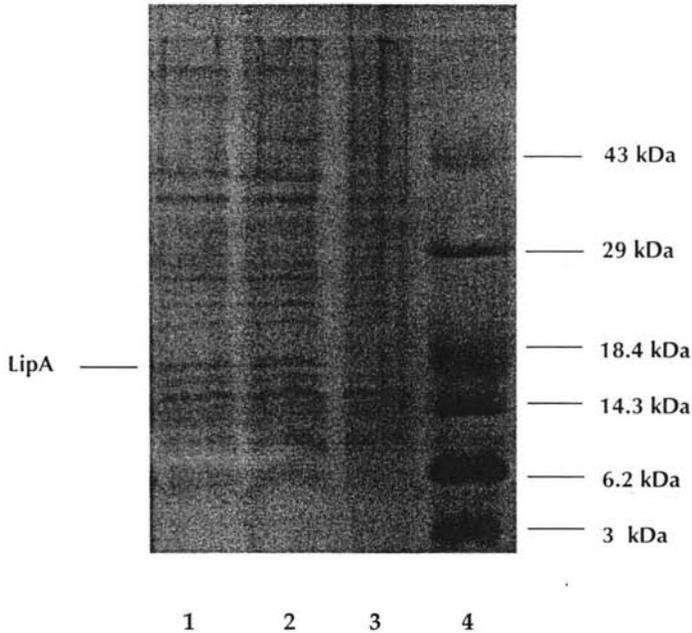


FIGURA 17. Perfil electroforético de proteínas intracelulares de *E. coli* BL21 transformada con pGlipA y pTlipA. Carril 1, células transformadas con pGlipA; carril 2, células transformadas con pTlipA; carril 3, control negativo células transformadas pTrc99A; carril 4, marcador de peso molecular.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que es necesario trabajar alrededor de la región de inicio de la proteína LipA para obtener una mayor expresión de esta proteína. Sin embargo, la poca cantidad de proteína obtenida mostró tener actividad lipolítica en cultivo sólido. Esto nos permite afirmar que la proteína LipA, aún teniendo un residuo de metionina adicional en el extremo N-terminal, conserva su actividad lipolítica. Esta proteína, que puede ser considerada como un producto de la ingeniería genética, deberá ser caracterizada para evaluar si sus propiedades alcalófilas y termófilas no fueron alteradas por la adición de este residuo de Met en la región N-terminal.

Capítulo V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

- ❖ El gen de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 se amplificó por PCR con la utilizando los cebadores específicos FOMEB26 y RLIPHB26 diseñados a partir de la secuencia de la lipasa de *B. pumilus* B26.

- ❖ Se clonó el gen *lipA* de *B. pumilus* GMA1 en un vector tipo TA .

- ❖ Se subclonó el gen *lipA* de *B. pumilus* GMA1 en un sistema de expresión que contiene una región promotora regulable (*P_{trc}*).

- ❖ Se observó actividad lipolítica de células recombinantes de *E. coli* BL21 que contenían el plásmido pTlipA en medio sólido, la cual se evaluó por la aparición de un de halo de lisis.

- ❖ Se detectó una proteína de aproximadamente de 18.4 kDa dentro del perfil de proteínas intracelulares de células recombinantes de *E. coli* BL21, consideramos que esta banda correspondería a la proteína LipA.

- ❖ En medio sólido se encontró una pobre actividad del gen *LipA*, que puede deberse a la presencia de dos secuencias Shine-Dalgarno contiguas y separadas del codón de inicio de la proteína que provocaría una disminución en la capacidad de síntesis de los ribosomas y como consecuencia se presenta una baja expresión del gen.

- ❖ La proteína LipA, modificada por ingeniería genética para expresarse en *E. coli*, conserva su actividad lipolítica.

PERSPECTIVAS

- ❖ Rediseñar los cebadores específicos que flanquean al gen *lipA* de *B. pumilus* GMA1 eliminar la secuencia Shine-Dalgarno duplicada para obtener una mejor expresión.

- ❖ Encontrar las condiciones mas favorables de cultivo para obtener un mejor rendimiento de expresión.

- ❖ Establecer un sistema de purificación de esta enzima basada en las técnicas ya descritas para enzimas similares.

- ❖ Determiner las propiedades catalíticas de esta enzima modificada.

- ❖ De acuerdo al alineamiento mostrado en la **FIGURA 7**, pareciera que el residuo Gly28 es el responsable de las propiedades alcalófilas y termófilas de esta enzima. Un estudio de mutagénesis dirigida de este aminoácido nos permitiría corroborar esta hipótesis.

REFERENCIAS

- Arredondo-Peter, R. (1993). "La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: un impacto reciente en la Biología Molecular". *Bol. Educ. Bioq.* **12**:3-14.
- Arpigny, J.L. y Jaeger, K-E. (1999). "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties". *Biochem. J.* **343**:177-183.
- Ausbel, F. y col. (1992). "Short protocols in molecular biology. A compendium of methods from Current protocols in molecular biology." Second edition. John Wiley & Sons, New York.
- Brockman, H.L., Law, J.H. y Kezdy, F.J. (1993). "Catalysis by adsorbed enzymes. The hydrolysis of tripropionin by pancreatic lipase absorbed to siliconized glass beads". *J.Biol.Chem.* **248**:4965-4970.
- Bustos-Jaimes, I. (1995). "Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasas proveniente de un ambiente extremo". Tesis, Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
- Bustos-Jaimes, I. (1998). "Análisis del gen que codifica para la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1". Tesis, Maestría en Biotecnología, UACPyP-CCH y Facultad de Química, UNAM.
- Bustos-Jaimes, I., Montero-Morán, G., Lara-González, S. y Álvarez-Añorve, L. (2001). "Enzimas más allá de su ámbito fisiológico: Lipasas". *Bol. Educ. Bioq.* **20**:234-240.
- Derewenda, Z.S. y Derewenda, U. (1991). "Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases". *Biochem. Cell. Biol.* **69**:842-851.
- Derewenda, Z.S. y Sharp, A.M. (1993). "News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases". *Trends Biochem. Sci.* **18**:20-25.
- Eggert, T., van Pouderoyenb, G.,Dijkstra, B.W. y Jaeger, K-E.(2001). "Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure". *FEBS Lett.* **502**:89-92.

- François, B. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*". *Curr. Opin. Biotech.* **10**:411-421.
- Gandhi, N.N. (1997). "Applications of lipase". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**:621-634.
- Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P. y Davidson, S. (1996). "Microbial lipases: Production and applications". *Sci. Prog.* **79**:119-157.
- Hemila, H., Koivula, T.T. y Palva, I. (1994). "Hormone-sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: identification of a superfamily of esterases and lipases". *Biochim Biophys Acta.* **1210**:249-253.
- Hou, C.T. (1993). "Screening of microbial esterases for asymmetric hydrolysis of 2-ethylhexyl butyrate". *J. Ind. Microbiol.* **11**:73-81.
- Jaeger, K-E. y Eggert, T. (2002). "Lipases for biotechnology". *Curr. Opin. Biotech.* **13**:390-397.
- Jaeger, K-E. y Reetz, M. (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology". *TIBTECH* **16**:396-402.
- Jaeger, K-E., Dijkstra, B.W. y Reetz, M.T. (1999). "Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases". *Arch. Microbiol.* **53**:315-351.
- Kim, H.K., Choi, H.J., Kim, M.H., Sohn, C.B. y Oh, T.K. (2002). "Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26". *Biochim. Biophys. Acta* **1583**:205-212.
- Krejci, E., Duval, N., Chatonnet, A., Vincens, P. y Massoulié, J. (1991). Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:6647-6651.
- Kwak, H.S., Jeon, I.L. y Perng, S.K. (1989). "Statically patterns of lipase activities on the release of short-chain fatty acids in Cheddar cheese slurries". *J. Food Sci.* **54**:1559-1564.
- Laemmli, UK. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* **227**:680-5.
- Lanser, A. C., Manthey, L. K. y Hou, C. T. (2001). "Regioselectivity of new Bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein". *Curr. Microbiol.* **44**:336-340.

- Manco, G., Adinolfi, E., Pisani F.M., Ottolina, G., Correa G. y Rossi, M. (1998). "Overexpression and properties of a new thermophilic and thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormonesensitive lipase subfamily". *Biochem. J.* **332**:203-212.
- Möller, B. y col. (1991). "Alcaline *Bacillus* lipases, coding DNA sequences therefore and bacilli which produce these lipase." Patente internacional WO 91/16422.
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M.L., Atomi, H. y Schmid, R.D. (1996). "Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus* I molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties." *Biochim. Biophys. Acta* **1301**:105-14.
- Sorrentino, N., De Simone, G., Menchise, V., Mandrich, L., Rossi, M., Manco, G. y Pedone, C. (2003). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of Aes acetyl-esterase from *Escherichia coli*." *Biol. Crystallogr.* **59**: 1846-8.
- Sroga, G.E. y Dordick, J.S. (2002). "A strategy for in vivo screening of subtilisin E reaction specificity in *E. coli* periplasm." *Biotechnol. Bioeng.* **78**: 761-9.
- Sugura, A., Tani, T. y Tominaga, Y. (1991). "Purification and characterization of a novel lipase from *Bacillus* " *J. Biochem.* **109**,211-216.
- van Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K-E. y Dijkstra, B.W. (2001). "The cristal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal α/β hidrolase fold enzyme". *J. Mol. Biol.* **309**:215-226.
- Vorderwülbecke, T., Lieslich, K. y Erdmann, H. (1992). "Comparison of lipases by different assays". *Enzyme Microbiol. Technol.* **14**: 631-639.
- Wong De la Mora, P. (2001). "Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: Producción fermentativa y algunas propiedades". Tesis, Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.