



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Propiedades catalíticas
y termoestabilidad de
la lipasa recombinante de
Bacillus pumilus GMA1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

Q.F.B. RODRIGO MORA LUGO

TUTOR: DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES



MÉXICO, D. F.

Junio 2008



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.

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL
LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS
UBICADO EN EL 2º PISO DEL EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN DE LA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ESTE TRABAJO CONTÓ CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS CONACYT
(53710), PAPIIT (IN212607-3) Y UNA BECA DE MAESTRÍA CONACYT (195402).

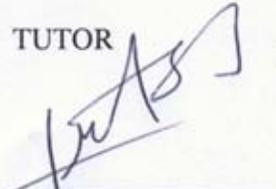
El **Comité Tutorial** que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Dr. Mario Calcagno Montans	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Ismael Bustos Jaimes	Facultad de Medicina, UNAM

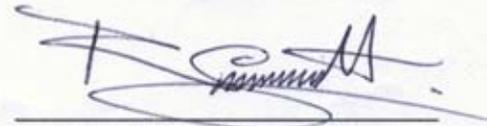
Jurado de Examen

Presidente	Dr. Agustín López-Munguía Canales	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Brenda Valderrama Blanco	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM

TUTOR


Dr. Ismael Bustos Jaimes

SUSTENTANTE


Q.F.B. Rodrigo Mora Lugo

Dedicado a

*bertha, cipriano, nancy, daniel, miguel angel, gabriel, arath, denisse
adriana, josé carlo, allison, josé, alejandra,... y los que vengan...*

...fueron, son y seguirán siendo mi principal fortaleza.

Agradecimientos

A Ismael Bustos Jaimes por todo el apoyo, enseñanza y paciencia que me ha brindado en este proyecto.

Al Dr. Mario Calcagno y la Dra. Amelia Farrés por ser parte de mi comité tutorial, sus valiosas contribuciones al desarrollo de este trabajo fueron muy importantes.

A mi jurado de examen por sus valiosas críticas sobre el escrito de mi tesis.

A Laura I. Álvarez Añorve por su gran apoyo en la preparación de reactivos y uso de equipos en el laboratorio.

A todos los miembros del Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas entre los años 2004-2008, fueron fundamentales en el desarrollo de este proyecto.

A mi familia que siempre ha sido el principal apoyo en todos mis proyectos.



ÍNDICE

Resumen	1
Abreviaturas usadas	2
Capítulo 1. Lipasas	
• Introducción	3
• Clasificación de lipasas bacterianas	4
• Estructura	7
• Mecanismo catalítico	9
• Lipasas del género <i>Bacillus</i>	10
Capítulo 2. Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1	
• Microorganismo	12
• Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1	13
○ Similitud con otras lipasas del género <i>Bacillus</i>	13
○ Propiedades bioquímicas	15
Capítulo 3. Termoestabilidad de las proteínas	
• Antecedentes	17
• Medición de la estabilidad de las proteínas	18
○ Estabilidad termodinámica	18
○ Estabilidad cinética	19
• Relación de estabilidad, flexibilidad y catálisis de las enzimas	20
• Termoestabilidad de las lipasas de la familia I.4	22
○ Termoestabilidad de la lipasa de <i>B. subtilis</i>	22
○ Termoestabilidad y propiedades catalíticas de la lipasa de <i>B. pumilus</i> GMA1	27
Capítulo 4. Hipótesis y Objetivos	29
Capítulo 5. Materiales y Métodos	
MATERIALES	
• Reactivos químicos	30
• Material de Biología Molecular	31
• Equipos	31
• Cepas bacterianas	32
• Plásmidos utilizados	32
• Plásmidos construidos	32
MÉTODOS	
• Reactivación de la cepa de <i>B. pumilus</i> GMA1	33
• Extracción de ADN cromosómico de <i>B. pumilus</i> GMA1	33
• Clonación del gen <i>bplA</i> en <i>E. coli</i>	
○ Amplificación del gen <i>bplA</i> por PCR	34
▪ Diseño de los cebadores	34

▪ PCR	36
○ Clonación del <i>bplA</i> en el vector pGEM-T	
▪ Vector	36
▪ Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	38
○ Purificación del plásmido p <i>Gbpl</i>	39
○ Digestión del plásmido p <i>Gbpl</i> con <i>EcoRI</i>	40
○ Digestión del plásmido p <i>Gbpl</i> con <i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> y <i>NdeI/XhoI</i>	41
○ Clonación del <i>bplA</i> en el vector pET22b+	41
▪ Ligación	42
▪ Transformación	43
● Secuenciación de ADN	44
● Ensayo para verificar la actividad lipolítica en medio sólido	44
● Determinación de condiciones de expresión de la proteína recombinante	44
● Purificación de la proteína recombinante	
○ Extracto intracelular	45
○ Cromatografía de afinidad	45
● Construcción de las mutantes sitio-específicas	
○ Diseño de los cebadores	46
○ PCR	46
○ Purificación	47
● Caracterización de la proteína silvestre y sus mutantes	48
○ Termoestabilidad	48
○ Parámetros cinéticos	49
Capítulo 6. Resultados y Discusión	
● Reactivación de la cepa de <i>B. pumilus</i> GMA1 y extracción de su ADN cromosómico	50
● Amplificación del gen <i>bplA</i> por PCR	51
● Clonación del gen <i>bplA</i> en el vector pGEM-T	51
○ Digestión del plásmido p <i>Gbpl</i> con <i>EcoRI</i>	52
○ Digestión del plásmido p <i>Gbpl</i> con <i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> y <i>NdeI/XhoI</i>	52
● Clonación del gen <i>bplA</i> en el vector pET22b+	54
○ Digestión del plásmido pET <i>bpl</i> con <i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> y <i>NdeI/XhoI</i>	54
● Actividad lipolítica en medio sólido	55
● Condiciones de expresión de la proteína recombinante	56
● Purificación de la proteína recombinante (cromatografía de afinidad)	57
● Construcción de las mutantes sitio-específicas	58
● Caracterización de la proteína recombinante y sus mutantes	61
○ Termoestabilidad	61
○ Parámetros cinéticos	66
Capítulo 7. Conclusiones y Perspectivas	73
Bibliografía	76

Resumen

Las lipasas son enzimas que pueden catalizar tanto la hidrólisis como la síntesis de acilgliceroles con gran regio- y enantioselectividad. Debido a ambas actividades, la elucidación de las bases moleculares de las propiedades catalíticas de estas enzimas es de gran interés tanto del punto de vista académico como industrial. Las lipasas microbianas han sido objeto de gran estudio debido a su facilidad de producción y gran potencial biotecnológico. *Bacillus pumilus* cepa GMA1 produce una lipasa que presenta máxima actividad a 50°C, de acuerdo a estudios sobre extractos semipuros. Esta temperatura es mayor a la reportada para sus homólogos provenientes de otras especies del género *Bacillus* e incluso de la misma especie.

En este trabajo se clonó, sobre-expresó y purificó la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1 (BplA-r) utilizando *E. coli* como hospedero. La estabilidad térmica y propiedades cinéticas de BplA-r fueron determinadas a distintas temperaturas. El estudio incluyó la evaluación de residuos que potencialmente podrían modificar la estabilidad térmica de la enzima a través de mutagénesis sitio-específica. Para este fin se construyeron las mutantes G28S, L114P, A132D y K166Y y se evaluaron sus parámetros cinéticos y estabilidad a distintas temperaturas. Encontramos que las mutaciones alteraron principalmente los valores de K_m en función de la temperatura, mientras las k_{cat} presentaron un comportamiento atípico con el aumento de la temperatura. Por otro lado, la estabilidad térmica presenta un comportamiento complejo que hizo difícil su correlación con los datos cinéticos. Para la interpretación de estos resultados se introdujo un índice que relaciona las propiedades cinéticas y la estabilidad de cada enzima a una temperatura dada ($k_{cat}/K_m/k_{ie}$, que es la relación entre la constante de especificidad y la constante de inactivación térmica). De acuerdo a este índice, las mutantes G28S, A123D y K166Y muestran de forma general un mejor desempeño respecto a BplA-r, mientras que la mutante L114P resultó estar afectada negativamente tanto en su catálisis como en su estabilidad. Los resultados obtenidos sugieren que la enzima ganó estabilidad a costa de perder flexibilidad.

Abreviaturas usadas

<i>bplA</i>	Gen que codifica para la lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1
BpIA	Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1
BpIA-r	Lipasa recombinante de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1
CDS	Calorimetría Diferencial de Barrido
DC	Dicroísmo Circular
ΔG_{PD}	Cambio de energía libre entre el estado plegado (P) y desplegado (D) de una proteína
Des	Agente desnaturalizante
k_d	Constante de velocidad del desplegamiento de una proteína
k_{ds}	Constante de hidrólisis del sustrato
k_i	Constante de velocidad de la transición al estado irreversible de una proteína
k_{ie}	Constante de inactivación enzimática (equivalente a la k_d de acuerdo al modelo de desnaturalización irreversible de una proteína, ver paginas 20 y 28)
k_p	Constante de velocidad del plegamiento de una proteína
LipA	Lipasa A de <i>Bacillus subtilis</i>
LB	Medio Luria-Bertani
LBamp	Medio Luria-Bertani con ampicilina (50 μ g/ml)
PCR	Del Inglés, reacción en cadena de la polimerasa
pG <i>bpl</i>	Vector pGEM-T + gen <i>bplA</i>
pET <i>bpl</i>	Vector pET22b+ + gen <i>bplA</i>
pNF	<i>p</i> -nitrofenol
pNFA	<i>p</i> -nitrofenil acetato
SCM	Sitio de clonación múltiple

Capítulo 1. Lipasas

Introducción

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3) catalizan la reacción de hidrólisis de los enlaces éster presentes en los triacilglicéridos, produciendo ácidos grasos libres y glicerol. En ausencia de agua también pueden realizar reacciones de alcoholisis o transesterificación, a partir de alcoholes y ésteres, así como de síntesis de ésteres partiendo de alcoholes y ácidos grasos libres (Kumar y Gross, 2000). Algo similar ocurre con las esterasas, enzimas cuyos sustratos son ésteres solubles en medios acuosos. La diferencia entre lipasas y esterasas siempre ha sido debatida ya que procede más de una definición que de una actividad catalítica. Hasta hace poco el criterio para definir a una enzima como una “lipasa verdadera” se basaba principalmente en dos propiedades: (a) que presentara el fenómeno llamado “activación interfacial”, esto es un dramático incremento de su actividad en presencia de una interfase lípido-agua (Sarda y Desnuelle, 1958), y (b) que presentara una “tapa” que cubra su sitio catalítico (Brzozowski y col., 1991; Derewenda y col., 1992; van Tilbeurgh, y col., 1993).

Tanto la activación interfacial como la presencia de una tapa cubriendo al sitio activo suelen ser fenómenos asociados, aunque en la realidad se conocen varias lipasas que no cumplen con alguna o ambas propiedades. La tapa del sitio activo de las lipasas está formada ya sea por un giro (Grochulski y col., 1994), una o dos hélices α (Brzozowski y col. 1991; Derewenda y col., 1992; Kim y col., 1997; Schrag, y col., 1997). El motivo estructural que forma la tapa se mantiene en una configuración "abierta" en presencia de sustancias hidrófobas, exponiendo así el sitio catalítico y una gran superficie hidrófoba de la proteína, la que se presume interactúa con la interfase lípido-agua. Actualmente se sabe

que la presencia de una tapa en la estructura de las lipasas no necesariamente está relacionada con la activación interfacial (Verger, 1997). Lipasas como la de *P. aeruginosa*, *B. glumae* y *C. antarctica* no muestran activación interfacial a pesar de contar con una tapa anfipática que cubre sus sitios catalíticos (Jaeger y Reetz, 1998). Por otro lado, algunas lipasas ni siquiera presentan esta “tapa” como la lipasa pancreática de cerdo (Hjort y col., 1993), la cutinasa de *F. solani* o la lipasa de 19 kDa de *B. subtilis* (van Pouderoyen y col., 2001). Hoy en día las lipasas se definen como carboxilesterasas que catalizan la reacción de hidrólisis (o síntesis) de acilglicérols de cadena larga, comúnmente de diez o más átomos de carbono de longitud en la cadena de acilo (Ferrato y col., 1997). Sin embargo algunos ésteres de glicerol con menos de diez átomos de carbono de longitud, que son sustratos comunes de las esterases, son también hidrolizados por la mayoría de las lipasas.

Clasificación de lipasas bacterianas

Debido a las actividades hidrolíticas fundamentales de las lipasas, la distribución de estas enzimas en la naturaleza es extensa, encontrándolas tanto en animales, plantas y microorganismos. Dentro de esta amplia gama, las lipasas de origen microbiano, principalmente aquellas de levaduras y bacterias, son las más utilizadas en química orgánica y aplicaciones biotecnológicas, lo que las ha llevado a ser objeto de intenso estudio por su gran potencial industrial (Kynclova y col. 1995; Toida y col. 1998; Namboodiri y Chattopadhaya, 2000; Woolley y Petersen, 1994; Alberghina y Lotti, 1998; Jaeger y Reetz, 1998; Kazlauskas y Bornscheuer, 1998). Las lipasas bacterianas han sido clasificadas por Arpigny y Jaeger (1999) con base en la comparación de sus secuencias de aminoácidos y algunas propiedades biológicas fundamentales (Tabla 1.1). Esta clasificación, aunque es relativamente antigua, sigue vigente debido a que la definición inicial de las familias se ha conservado. La clasificación original comprende alrededor de 50 enzimas agrupadas en 6 familias:

- 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 lipasas más pequeñas (19 a 21 kD) conocidas hasta ahora. Tienen rangos de pH óptimos alcalinos y preferencia hacia los triacilglicéridos de cadena corta como sustratos (<10 átomos de carbono en la cadena del acilo).
 - 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. El aspartato catalítico de estas enzimas se encuentra en una posición no equivalente respecto a las lipasas de las demás familias.
- Familia IV: A esta familia pertenecen las lipasas que muestran similitud con las lipasas sensibles a hormonas de mamíferos (LSH). Las proteínas de este grupo muestran gran actividad a bajas temperaturas (menos de 15°C).
- Familia V: Estas lipasas, al igual que las LSH, se encuentran en bacterias mesófilas (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae* o *Acetobacter pasteurianus*), psicrófilas (*Moraxella* sp., *Psy. immobilis*) y termófilas (*Sulfolobus acidocaldarius*). Las proteínas de este grupo muestran una similitud de secuencia significativa (20-25%) con varias enzimas bacterianas no-lipolíticas como deshalogenasas, haloperoxidasas y epóxido hidrolasas; incluso comparten similitud estructural (Verschueren, y col., 1993; Misawa, y col., 1998).
- Familia VI: Incluye esterases que han sido parcialmente identificadas de las secuencias del genoma. Estas esterases son pequeñas proteínas localizadas en el citoplasma bacteriano con similitud a las lipofosfolipasas de mamíferos (Arpigny y Jaeger, 1999).

Tabla 1.1. Familias de enzimas lipolíticas de origen bacteriano (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		
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38		
	2	<i>Burkholderia glumae</i> ^a	X70354	35		Fosfolipasa
		<i>Chromobacterium viscosum</i> ^a	Q05489	35		
		<i>Burkholderia cepacia</i> ^a	M58494	33		
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33		
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIKW1	D11455	14		
		<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15		
	4	<i>Bacillus subtilis</i> ^a	M74010	16		
		<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13		
	5	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15		
		<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14		
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14		
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13		
	6	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14		
<i>Streptomyces cinnamoneus</i>		U80063	14			
II	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	100	o.m.-esterasa* Aciltransferasa o.m.-esterasa		
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	31			
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	17			
	<i>Photobacterium luminescens</i>	P40601	17			
	<i>Streptomyces scabies</i> ^a	M57297	15			
III	<i>Streptomyces exfoliatus</i> ^a	M86351	100	Lipasa extracelular		
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82			
	<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33			
IV	<i>Moraxella</i> sp.	X53868	100	Lipasa 2 Carboxiesterasa		
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	28			
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	25			
	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	24			
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	24			
	<i>Escherichia coli</i>	AE000153	20			
V	<i>Moraxella</i> sp.	X53869	100	Lipasa 3 PHA-despolimerasa** Esterasa putativa Esterasa 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</i> sp.	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

** Polihidroxicano despolimerasa

Estructura

El patrón común de plegamiento de todas las lipasas es una estructura α/β hidrolasa (Ollis y col., 1992), que consiste en una hoja β central que típicamente cuenta con 8 hebras paralelas, excepto la segunda que es antiparalela. Las secciones $\beta 3$ a $\beta 8$ están conectadas por hélices α , las cuales están unidas a cada lado de la hoja β central. De acuerdo a estudios realizados por cristalografía de rayos X, se sabe que el sitio catalítico se localiza en el carboxilo terminal de la hoja β central, el cual comprende tres residuos catalíticos: un residuo nucleófilo (Ser, Cys o Asp), un residuo ácido (Asp o Glu), y un residuo de histidina, siempre en este orden en la secuencia de aminoácidos (Figura 1.1). En las 6 familias de las lipasas bacterianas con estructura conocida se ha encontrado el mismo patrón de plegamiento, con algunas diferencias características de cada familia en la longitud y arquitectura de la cadena polipeptídica (Jaeger y Reetz, 1998).

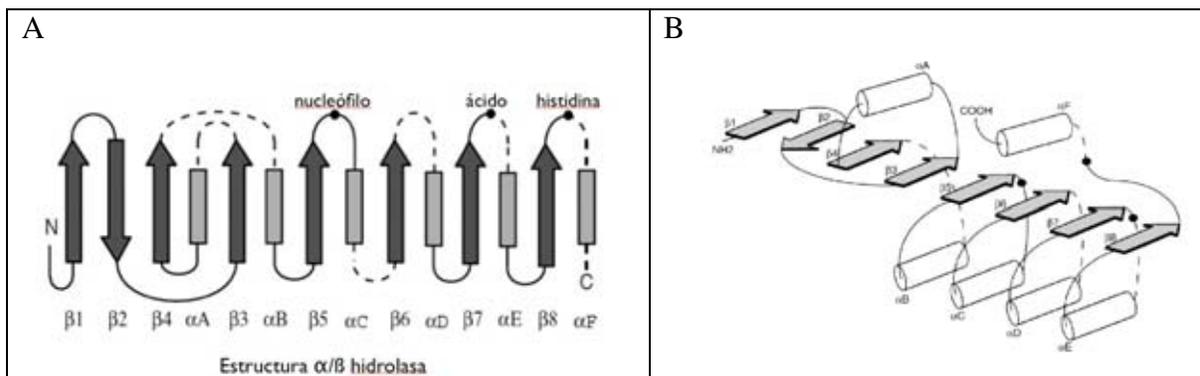


Figura 1.1. A) Topología de la estructura α/β hidrolasa de las lipasas y B) plegamiento canónico. Se muestran con puntos negros la posición de los residuos catalíticos (Fuente: Jaeger y col., 1999).

En las lipasas bacterianas se ha encontrado que el nucleófilo es invariablemente el residuo de serina, el cual está localizado en un pentapéptido altamente conservado (Gly-X-Ser-X-Gly). Este motivo forma parte de una hebra β seguida de un giro rígido que contiene al residuo de serina y, en seguida, una hélice α . A este arreglo se le conoce como β - ϵ Ser- α (Derewenda y Sharp, 1993). Este motivo estructural posiciona al residuo nucleófilo en la superficie del sitio activo y permite acceder fácilmente por un lado al residuo de histidina y

por el otro al sustrato. El segundo residuo catalítico (Asp) está localizado en el asa que conecta la hebra $\beta 7$ con la hélice αE , mientras que la histidina, el tercer residuo catalítico, se encuentra en un asa que sigue a la hebra $\beta 8$ de la hoja central (Figura 1.1).

Otra característica estructural encontrada en varias lipasas es el dominio correspondiente a la “tapa” del sitio activo. Ésta generalmente consistente en una hélice corta de carácter anfipático. En el caso de la lipasa de *Mucor miehei*, este dominio se encuentra en su configuración abierta al estar en contacto con una interfase lípido-agua, exponiendo la triada catalítica además de una gran superficie hidrófoba de aproximadamente 750\AA^2 (Brockman y col., 1973) en la que participan principalmente 12 aminoácidos: Ile85, Trp88, Ile89, Leu92, Phe94, Val205, Leu208, Phe213, Val254, Leu255, Leu258 y Leu267 (Brzozowski y col., 1991 y Derewenda y col., 1992). Estos aminoácidos están altamente conservados de acuerdo con las alineaciones de secuencia con otras lipasas conocidas, lo que confirma su importancia funcional en la interacción con la interfase lipídica. En la figura 1.2, se muestra la lipasa pancreática de caballo y se resalta el dominio correspondiente a su tapa. A pesar de que la tapa de las lipasas pancreáticas es de distinta naturaleza al de las lipasas microbianas, estos dominios tienen la función común de cubrir sus sitios activos. La mayoría de lipasas bacterianas también presentan un dominio similar que cubre sus sitios activos (Jaeger y col., 1999). Como ejemplos de lipasas bacterianas con tapa se tienen a algunas especies de *Staphylococcus* (Rosenstein y Gotz, 2000) y *Pseudomonas* (Noble y col., 1994; Kim y col., 1997; Schrag y col.1997), entre otros.

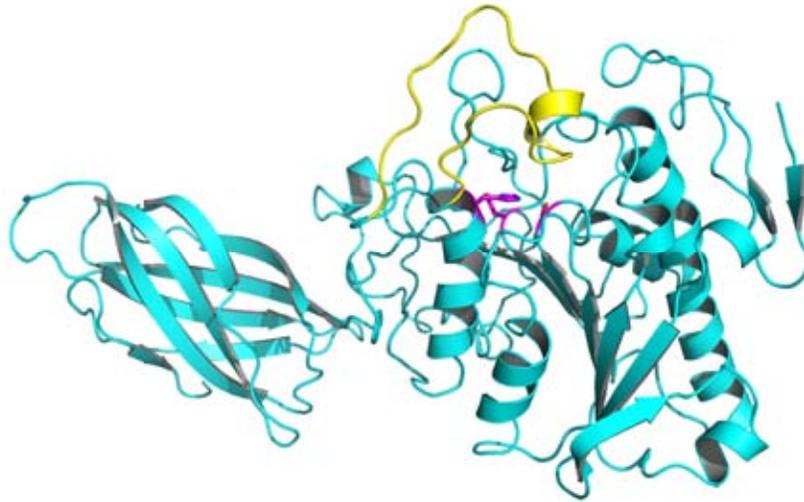


Figura 1.2. Estructural cristalográfica de la lipasa pancreática de caballo. Esta enzima presenta el típico plegamiento α/β hidrolasa en su dominio catalítico N-terminal. La triada catalítica está compuesta por los residuos Ser152, Asp176 e His263, los cuales se resaltan en color magenta. La región de la tapa está coloreada en amarillo. El dominio C-terminal tiene una topología de emparedado de hebras β y tienen la función de unir a una colipasa (Fuente: Bourne y col., 1994).

Mecanismo catalítico

Las lipasas son capaces de catalizar reacciones de hidrólisis en sistemas acuosos así como de esterificación, alcoholólisis, aminólisis y tiólisis en medios orgánicos. El mecanismo químico de la hidrólisis de lípidos con estas enzimas se ha sido descrito (Jaeger y Reetz, 1998; Jaeger y col., 1999). En las reacciones de hidrólisis, las lipasas 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 nucleofílico del átomo de oxígeno procedente del grupo hidroxilo del residuo de serina al carbono carbonilo del enlace éster del lípido (Figura 1.2). Esto produce la formación de un intermediario tetraédrico, que se caracteriza por tener una carga negativa en el oxígeno y que es estabilizado por interacciones con un macrodipolo producido por la hélice αC y por 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 $\beta 3$. 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 alcohol. El mecanismo continúa con un paso de desacilación, en el cual una molécula de agua hidroliza al intermediario covalente. La histidina catalítica activa a esta molécula de agua quitándole un protón. El ión OH^- resultante ataca al carbono 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 un nuevo ciclo catalítico.

Lipasas del género *Bacillus*

Existen dos grupos de lipasas del género *Bacillus*. Las lipasas de alto peso molecular de la subfamilia I.5 y las lipasas de peso molecular menor agrupadas en la subfamilia I.4. En las lipasas de este último grupo, 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. Además, las secuencias alrededor de los residuos catalíticos Asp e His son absolutamente diferentes en comparación a las otras familias (Jaeger y col., 1999).

Las lipasas de la subfamilia I.4 son las lipasas más pequeñas conocidas con un peso molecular de 19-20 kDa. Hasta el año 1999 sólo tres enzimas estaban clasificadas en esta subfamilia, dos lipasas de *Bacillus subtilis* (LipA y LipB) y una lipasa de *Bacillus pumilus* que comparte un 74% de identidad de secuencia con respecto a LipA. Actualmente, se han agregado a esta subfamilia lipasas provenientes de *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* DBRL-191, *B. sp.* B26 y *B. circulans*. Todas estas enzimas presentan una alta identidad de secuencia mientras que, en contraste, presentan muy poca similitud de secuencia (15% aprox.) con las lipasas provenientes del género *Bacillus* que forman parte de la subfamilia I.5, y otras lipasas mucho más grandes.

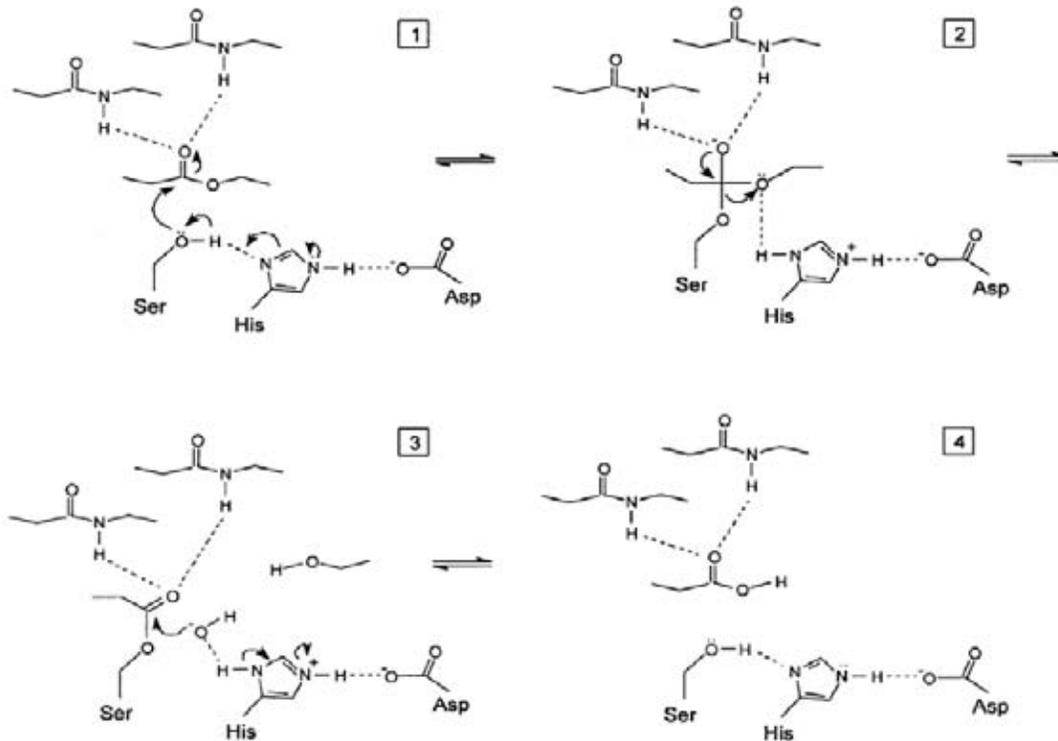


Figura 1.3. Mecanismo catalítico de la hidrólisis de ésteres en el sitio activo de las lipasas. 1) Activación del residuo nucleófilo de Ser y ataque nucleofílico al carbono carbonílico del enlace éster. 2) Formación del intermediario tetraédrico y reorganización electrónica previa a la liberación del motivo alcohólico del éster y la formación del intermediario acil-enzima. 3) Ataque por una molécula de agua activada al intermediario covalente acil-enzima y liberación del alcohol. 4) Hidrólisis del intermediario covalente y regeneración de la enzima (Fuente: Jaeger y col., 1999).

Dentro de las lipasas del género *Bacillus* pertenecientes a la subfamilia I.4, LipA es la más estudiada. De ella se han hecho estudios muy completos de la estructura del gen, secreción, caracterización bioquímica de la proteína y aplicaciones biotecnológicas (Dartois y col., 1992; Lesuisse y col., 1993; Dartois y col., 1994; Detry y col., 2006). Además, es la única enzima de la subfamilia I.4 de la que se ha reportado su cristalización y elucidado su estructura tridimensional (van Pouderoyen y col., 2001). Por otro lado, el resto de las lipasas de la subfamilia I.4 no han sido estudiadas tan exhaustivamente. A pesar de que muchas de estas enzimas han sido clonadas en cepas de *E. coli*, purificadas y se les han hecho estudios de potencial catalítico, no han sido cristalizadas ni se han publicado estudios detallados de sus propiedades cinéticas.

Capítulo 2. Lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1

Microorganismo

Bacillus pumilus GMA1 (Figura 2.1) fue aislado en Los Azufres, Michoacán, México. Esta cepa produce una lipasa con preferencia por ácidos grasos de cadena corta como sustratos (Bustos, 1995). La actividad de esta enzima ha sido caracterizada frente a distintas condiciones fisicoquímicas, encontrándose valores de temperatura y pH óptimos interesantes para usos industriales (Wong, 2001).

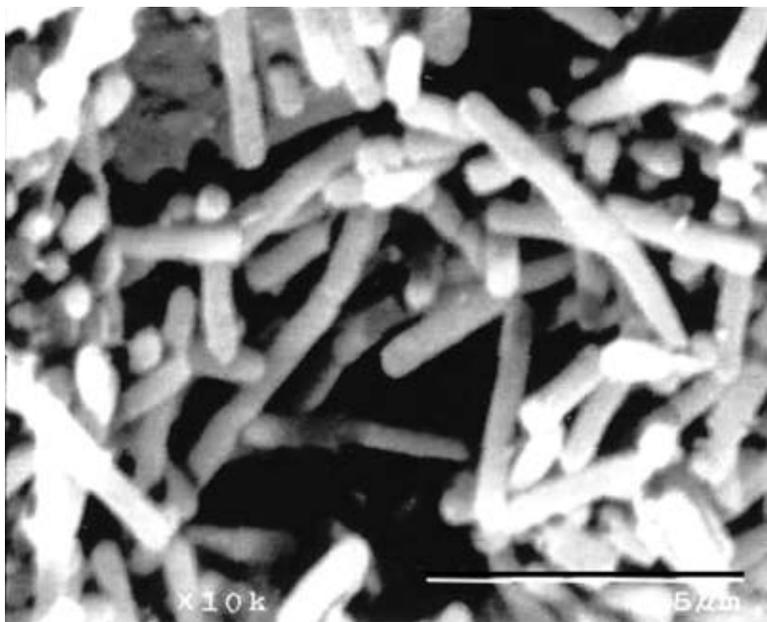


Figura 2.1. *Bacillus pumilus* GMA1 a 10,000x. La línea de escala representa 5 µm (Cortesía: Q.A. Patricia Wong).

Lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1

La lipasa de *B. pumilus* GMA1 (BplA) es homóloga a LipA (Bustos, 1998). Ambas lipasas se sintetizan como pro-enzimas, presentando un péptido señal de 31 aminoácidos que se pierde durante la secreción al medio extracelular (Dartois y col., 1992). En su forma madura estas lipasas poseen 181 residuos de aminoácidos y tienen un peso aproximado de 19.5 kDa. A partir de los datos cristalográficos reportados para LipA (van Pouderoyen y col., 2001) se ha modelado por homología la estructura de BplA tomando en cuenta el alto porcentaje de similitud que hay entre ambas proteínas (80%) (Figura 2.2). La estructura se muestra como una molécula globular con un plegamiento clásico α/β hidrolasa con 6 hebras- β paralelas flanqueadas por 5 hélices α . 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. El dominio correspondiente a la tapa del sitio activo no se encuentra presente, por lo que estos residuos se encuentran expuestos al disolvente.

Similitud con otras lipasas del género *Bacillus*

Existe homología en la secuencia de aminoácidos de BplA con el de otras lipasas del género *Bacillus* pertenecientes a la subfamilia I.4 (Figura 2.3). El pentapéptido consenso de las lipasas no se conserva en la primera posición, la cual cambia por Ala (A-X-S-X-G) y el resto de los aminoácidos se encuentra altamente conservado (A-H-S-M-G), así como los residuos que comprenden el sitio activo. También los aminoácidos de la cavidad oxianiónica, Ile12 y Met78, están conservados 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.



Figura 2.2. Modelo estructural de BpIA. Se resaltan los residuos catalíticos Ser77, Asp133 e His156. Este modelo por homología se realizó con el programa ESyPred3D Web Server 1.0 (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) a partir de los datos cristalográficos de LipA y la secuencia de aminoácidos de BpIA.

		20		40		60																																																				
BpIA	AEHNPVVMVHG	I	G	G	A	S	Y	N	F	S	I	K	S	Y	L	V	G	Q	G	W	D	R	N	Q	L	Y	A	I	D	F	I	D	K	T	G	N	N	R	N	G	P	R	L	S	R	F	V	K	D	61								
BpWOP	AEHNPVVMVHG	I	G	G	A	S	Y	N	F	S	I	K	S	Y	L	A	T	Q	G	W	D	R	N	Q	L	Y	A	I	D	F	I	D	K	T	G	N	N	R	N	G	P	R	L	S	R	F	V	K	D	61								
BIMBB01	AEHNPVVMVHG	I	G	G	A	S	Y	N	F	A	S	I	K	S	Y	L	V	G	Q	G	W	D	R	N	Q	L	F	A	I	D	F	I	D	K	T	G	N	N	R	N	G	P	R	L	S	R	F	V	K	D	61							
BspB26	AEHNPVVMVHG	I	G	G	A	S	Y	N	F	A	S	I	K	R	L	V	S	Q	G	W	D	Q	N	Q	L	F	A	I	D	F	I	D	K	T	G	N	N	L	N	N	G	P	R	L	S	R	F	V	K	D	61							
LipA	AEHNPVVMVHG	I	G	G	A	S	F	N	F	A	G	I	K	S	Y	L	V	S	Q	G	W	S	R	D	K	L	Y	A	V	D	F	W	D	K	T	G	T	N	Y	N	N	G	P	V	L	S	R	F	V	Q	K	61						
BcWOP	AEHNPVVMVHG	I	G	G	A	S	N	F	A	G	I	K	S	Y	L	V	S	Q	G	W	S	R	G	K	L	Y	A	V	D	F	W	D	K	T	G	T	N	Y	N	N	G	P	V	L	S	R	F	V	Q	K	61							
		80		100		120																																																				
BpIA	VLDKTGAKKVDI	V	A	H	S	M	G	G	A	N	T	L	Y	I	K	N	L	D	G	G	D	K	I	E	N	V	V	T	I	G	G	A	N	L	V	S	S	R	A	L	P	G	T	D	P	N	Q	122										
BpWOP	VLDKTGAKKVDI	V	A	H	S	M	G	G	A	N	T	L	Y	I	K	N	L	D	G	G	D	K	I	E	N	V	V	T	I	G	G	A	N	L	V	S	S	R	A	L	P	G	T	D	P	N	Q	122										
BIMBB01	VLDKTGAKKVDI	V	A	H	S	M	G	G	A	N	T	L	Y	I	K	N	L	D	G	G	D	K	I	E	N	V	I	P	I	G	G	A	N	L	V	S	S	R	A	L	P	G	T	D	P	N	Q	122										
BspB26	VLAKTGAKKVDI	V	A	H	S	M	G	G	A	N	T	L	Y	I	K	N	L	D	G	G	D	K	I	E	N	V	V	T	L	G	G	A	N	L	V	S	L	R	A	L	P	G	T	D	P	N	Q	122										
LipA	VLDETGA	K	K	V	D	I	V	A	H	S	M	G	G	A	N	T	L	Y	I	K	N	L	D	G	G	N	K	V	A	N	V	V	T	L	G	G	A	N	R	L	T	T	G	K	A	L	P	G	T	D	P	N	Q	122				
BcWOP	VLDETGA	K	K	V	D	I	V	A	H	S	M	G	G	A	N	T	L	Y	I	K	N	L	D	G	G	N	K	I	E	N	V	V	T	L	G	G	A	N	R	L	T	T	S	K	A	L	P	G	T	D	P	N	Q	122				
		140		160		180																																																				
BpIA	I	L	Y	T	S	V	Y	S	A	D	L	I	V	V	N	S	L	S	R	L	I	G	A	R	N	V	L	I	H	G	V	G	H	I	G	L	L	T	S	S	Q	V	K	G	Y	I	K	E	G	L	N	G	G	G	Q	N	T	181
BpWOP	I	L	Y	T	S	V	Y	S	A	D	L	I	V	V	N	S	L	S	R	L	I	G	A	R	N	I	L	I	H	G	V	G	H	I	G	L	L	T	S	S	Q	V	K	G	Y	I	K	E	G	L	N	G	G	G	Q	N	T	181
BIMBB01	I	L	Y	T	S	V	Y	S	A	D	L	I	V	V	N	S	L	S	R	L	I	G	A	R	N	V	L	I	H	G	V	G	H	I	G	L	L	T	S	S	Q	V	K	G	Y	I	K	E	G	L	N	G	G	G	Q	N	T	181
BspB26	I	L	Y	T	S	V	Y	S	A	D	L	I	V	V	N	S	L	S	R	L	I	G	A	R	N	V	L	I	H	G	V	G	H	I	G	L	L	T	S	S	Q	V	K	G	Y	V	K	E	G	L	N	G	G	G	Q	N	T	181
LipA	I	L	Y	T	S	I	Y	S	A	D	M	I	V	M	N	Y	L	S	R	L	D	G	A	R	N	V	Q	I	H	G	V	G	H	I	G	L	L	Y	S	S	Q	V	N	S	L	I	K	E	G	L	N	G	G	G	Q	N	T	181
BcWOP	I	L	Y	T	S	I	Y	S	A	D	M	I	V	M	N	Y	L	S	K	L	D	G	A	K	N	V	Q	I	H	G	V	G	H	I	G	L	L	M	N	S	Q	V	N	S	L	I	K	E	G	L	N	G	G	L	N	T	181	

Figura 2.3. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de algunas lipasas de la subfamilia I.4. Se resaltan con triángulos rojos los residuos catalíticos y con triángulos azules los residuos e la cavidad oxianiónica. El recuadro rojo señala el pentapéptido consenso presente en todas las lipasas de la subfamilia I.4. En violeta se muestran los residuos no conservados entre estas proteínas. BpIA: Lipasa de *B. pumilus* GMA1; BpWOP: Lipasa de *B. pumilus* DSM5776; BIMBB01: Lipasa de *B. licheniformis*; BspB26: Lipasa de *B. pumilus* B26; LipA: lipasa A de *B. subtilis* 168; BcWOP: Lipasa de *B. circulans*.

Propiedades bioquímicas

La actividad de la BplA ha sido caracterizada en extractos parcialmente purificados. Esta caracterización se realizó estudiando la hidrólisis de tributirina en emulsión a distintos valores de pH y temperatura. En estos estudios se encontraron valores de temperatura (T_{opt}) y pH (pH_{opt}) óptimos de 50°C y 10, respectivamente (Wong, 2001). También se sabe que esta proteína presenta preferencia por ácidos grasos de cadena corta como sustratos (Bustos, 1998).

En la actualidad más de 20 enzimas lipolíticas de la familia I.4 han sido identificadas y caracterizadas a partir de especies de *Bacillus*. Estas incluyen lipasas y esterases de microorganismos mesófilos o termófilos. En la Tabla 2.1 se muestran las propiedades bioquímicas de algunas de estas enzimas en donde se pueden ver algunas diferencias significativas entre éstas. Dentro del grupo destacan las lipasas de *B. licheniformis* y *B. pumilus* GMA1 como las enzimas más termoactivas, las cuales presentan valores de T_{opt} entre 50-60°C. En un análisis de la secuencia de estas dos enzimas se destaca un aminoácido en común que no presentan el resto de las lipasas que presentan T_{opt} más bajas, la glicina 28 (G28). Este cambio puntual en la secuencia de estas lipasas podría estar relacionado con las T_{opt} significativamente altas de estas enzimas. Por esta razón, como se verá más adelante, en el presente trabajo se evaluó la contribución de este residuo en la termoestabilidad de BplA.

Las lipasas del género *Bacillus* de la subfamilia I.4 guardan una gran identidad de secuencia a nivel de aminoácidos, como se observa en la Figura 2.3. Sin embargo, a pesar de la gran similitud que hay entre estas proteínas, se han encontrado diferencias significativas en cuanto a algunas de sus propiedades. Por ejemplo, BplA que guarda una gran similitud con las lipasas de *B. pumilus* DSM5776 (98%), *B. pumilus* B26 (93%) y LipA (80%), muestra una mayor T_{opt} con respecto al de estas enzimas (20, 15 y 13°C mayor, respectivamente) (Tabla 2.1). A pesar de que estos parámetros denominados como “óptimos” no corresponden a constantes fisicoquímicas, ya que dependen fuertemente del ensayo, los datos reportados para estas enzimas hacen suponer que las diferencias de T_{opt} entre ellas puede deberse principalmente a los aminoácidos no conservados en sus

secuencias. Un cambio significativo entre este grupo de lipasas tiene lugar en el residuo 28, mientras que BplA tiene una glicina, las otras tienen una serina (treonina para el caso de la lipasa de *B. pumilus* DSM5776). De acuerdo a lo anterior, pareciera ser que el residuo G28 tuviera alguna contribución en la estabilidad o actividad de las lipasas más termófilas de la familia I.4. Tomando en cuenta lo anterior, sería razonable pensar que la mutación G28S en BplA tendría una repercusión negativa en la estabilidad o la catálisis de la enzima con la temperatura, lo que evidenciaría la importancia de este residuo en ese aspecto.

Tabla 2.1. Características bioquímicas de algunas lipasas producidas por microorganismos del género *Bacillus*.

Microorganismo de procedencia	pH de máxima actividad	Temp. de máxima actividad (°C)	Peso molecular (kDa)	Referencia
<i>B. pumilus</i> DSM5776	9.5	30	19.3	Möller y col., 1991
<i>B. pumilus</i> B26	8.5	35	19.2	Kim y col., 2002
<i>B. subtilis</i> 168, LipA	10.0	37	19.3	Lesuisse y col., 1993
<i>B. pumilus</i> GMA1*	10.5	50	19.5	Bustos-Jaimes, 1998
<i>B. licheniformis</i>	10.0 - 11.5	50 - 60	19.2	Nthangeni y col., 2001
<i>Bacillus</i> sp.	6.4	60	22.0	Dharmsthiti y Luchai, 1999

*las propiedades bioquímicas se han obtenido a partir de extractos parcialmente purificados de *B. pumilus* GMA1, por lo que no necesariamente representan los valores reales de la lipasa pura.

Capítulo 3. Proteínas termoestables

Antecedentes

El estudio de la estabilidad de las proteínas frente a la temperatura ha tenido un gran auge en el área de bioquímica, particularmente en el campo de ingeniería de proteínas (Sternner y Liebl, 2001; Vieille y Zeikus, 2001). Las investigaciones hechas en este aspecto han tenido gran interés desde el punto de vista de la elucidación de las bases estructurales de la termoestabilidad de las proteínas y la relación estructura-función de estas moléculas. El desarrollo de proteínas termoestables con potencial biotecnológico ha sido también una de las principales razones para el estudio de la termoestabilidad, dado que muchos procesos industriales se realizan a temperaturas elevadas (Viikari y col., 1994; Zeikus y col., 1998; Niehaus y col., 1999).

Para entender las bases estructurales de la termoestabilidad se ha recurrido a una gran variedad de estrategias de estudio. Entre éstas se encuentra principalmente la comparación entre secuencias de aminoácidos de proteínas termófilas y mesófilas (Haney y col., 1999; Cambillau y Claverie, 2000; Chakravarty y Varadarajan, 2000), así como la comparación sistemáticas de sus estructuras (Karshikoff y Ladenstein, 1998; Facchiano y col., 1998; Maes y col., 1999; Kumar y col., 2000; Szilagyi y Závodszy, 2000). También las mutaciones específicas de aminoácidos han servido para obtener información importante acerca de la contribución de ciertos residuos sobre la estabilidad de las proteínas frente a la temperatura (Henning y col., 1997; Merz y col., 1999; Thoma y col., 2000). Todos estos estudios han aportado información para poder entender la termoestabilidad de estas enzimas y al mismo tiempo abren la posibilidad de desarrollar proteínas con esta característica, ya sea por métodos racionales (Malakauskas y Mayo, 1998; Van den Buró y

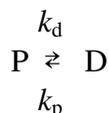
col., 1998; Hough y Danson, 1999), evolución dirigida (Cramer y col., 1998; Giver y col., 1998; Arnold y Volkov, 1999) o una combinación de ambos métodos (Akanuma y col., 1999).

Medición de la estabilidad de las proteínas

Las proteínas de los organismos termófilos e hipertermófilos generalmente son descritas en la literatura como muy (termo)estables. Sin embargo, el término “estabilidad” ha sido usado con distintos significados, por lo que a continuación se muestra una definición de este concepto en términos fisicoquímicos (Sterner y Liebl, 2001).

Estabilidad termodinámica

La estabilidad termodinámica de una proteína es la diferencia de energía libre entre el estado plegado (P) y desplegado (D) de la molécula, el cual es representado como ΔG_{PD} . Para un patrón de plegamiento y desplegado de dos estados se tiene el siguiente modelo:



En donde P es el estado plegado o nativo y D es el estado desplegado reversible de la proteína. Las constantes de velocidad para el plegamiento y desplegado son k_p y k_d , respectivamente. Un modelo de dos estados implica que (a) el desplegado de la forma P a D es reversible y (b) sólo los estados P y D son predominantes, siendo las concentraciones de intermediarios insignificantes o nulas. A partir de la constante de equilibrio de este proceso, $K = k_d/k_p = [D]/[P]$, se puede calcular ΔG_{PD} :

$$\Delta G_{PD} = -RT \ln K$$

A la temperatura estándar de 25°C, los valores de ΔG_{PD} generalmente son determinados por análisis de desnaturalización proteica inducida por agentes desnaturalizantes como la urea y el cloruro de guanidinio (Pace y Scholtz, 1997). El grado de desnaturalización de una

proteína inducido por la concentración de agente desnaturizante [Des] es medido por fluorescencia y/o espectros de dicroísmo circular (DC) (Schmid, 1997). De las señales espectroscópicas normalizadas se obtiene K , a partir de la cual se calcula ΔG_{PD} en función de [Des], utilizando la ecuación:

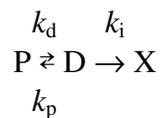
$$\Delta G_{PD} = \Delta G_{PD} (H_2O) - m [Des]$$

Asumiendo una relación lineal entre ΔG_{PD} y [Des], tanto ΔG_{PD} , en ausencia de agente desnaturizante ($\Delta G_{PD} (H_2O)$), como el valor de la pendiente m , que mide la dependencia de ΔG_{PD} con [Des], pueden determinarse con relativa facilidad (Pace y Scholtz, 1997).

Los valores de $\Delta G_{PD} (H_2O)$ de las proteínas termófilas a 25°C, no necesariamente son más altos que los de las proteínas mesófilas. La temperatura a la cual la concentración de los estados P y D son equivalentes ($K = 1$ y $\Delta G_{PD} = 0$) es conocida como T_m (del inglés, temperatura de fusión), la cual se utiliza comúnmente como una medida de la estabilidad térmica de una proteína dada.

Estabilidad cinética

La desnaturalización térmica de muchas proteínas mesófilas y termófilas es irreversible, principalmente por la agregación de la molécula desplegada (D), por lo tanto, no puede ser estudiada en equilibrio termodinámico. Un modelo simple que describe la desnaturalización irreversible de una proteína es el siguiente,



En donde X es el estado de agregación cuya formación es irreversible, y k_i es la constante de velocidad de la transición de D a X. En el caso de desnaturalización irreversible, la constante de velocidad de todo el proceso de $P \rightarrow X$ es la $k_{obs} = (k_d k_i)/(k_p + k_i)$, y la vida media ($t_{1/2}$) está dada por $\ln 2/k_{obs}$. Este valor (k_{obs}) a una temperatura dada es usado comúnmente como una medida práctica para evaluar la estabilidad de una proteína. De

acuerdo con el modelo representado por la ecuación anterior, el valor de la k_{obs} está limitado por la k_d , porque sólo D (y no P) da lugar a una transición irreversible. Esto, como lo apuntó Plaza del Pino y col. (2000), puede ser de gran relevancia para las proteínas termófilas. Debido a las altas temperaturas fisiológicas en las que se desarrollan los organismos termófilos, los procesos irreversibles como la agregación proteica o modificaciones covalentes de aminoácidos termolábiles serán rápidos y por lo tanto $k_i \gg k_p$ y $k_{obs} \sim k_d$. Por esta razón, un valor bajo de k_d es importante para proteger cinéticamente a las proteínas termófilas, especialmente *in vivo*. En algunos casos en donde se han determinado valores de k_d se ha visto que las proteínas termófilas presentan valores mucho más bajos que sus respectivas contrapartes mesófilas.

Relación de estabilidad, flexibilidad y catálisis de las enzimas

Las enzimas termófilas se caracterizan por mantener su actividad y estructura a temperaturas altas respecto a la de sus contrapartes homologas, las enzimas mesófilas. Las enzimas termófilas generalmente muestran su mayor actividad biológica a temperaturas entre los 50 y 100°C. En este punto, es necesaria la estabilidad de estas proteínas a altas temperaturas para que lleven a cabo su función (Jaenicke, 1991; Fields, 2001). Los experimentos clásicos en que se mide la actividad enzimática a distintas temperaturas muestran que el número de recambio de la enzima, la velocidad a la que la enzima convierte a su sustrato en producto (k_{cat}), así como todas las constantes de velocidad aumentan conforme se eleva la temperatura del sistema como lo predice la ecuación de Arrhenius (Jaenicke, 2000).

Cuando se compara la actividad de una enzima que proviene de un organismo mesófilo con la de un termófilo, se obtienen datos interesantes e ilustrativos sobre la relación que existe entre su estabilidad, flexibilidad y catálisis. Como es de esperar, las curvas de actividad enzimática *versus* temperatura de las dos enzimas tienen el mismo perfil, excepto que la curva con la enzima del termófilo se desplaza hacia temperaturas más altas (Wray y col., 1999). Es decir, a las temperaturas a las que la enzima mesófila expresa actividades relativamente altas, la enzima termófila muestra actividades relativamente bajas (Merz y col., 2000). En la medida en que se incrementa la temperatura del sistema se llega al punto

en que la enzima del mesófilo pierde sus propiedades catalíticas, mientras que la del termófilo continúa aumentando hasta que finalmente se llega a una temperatura en que su actividad catalítica desaparece. La temperatura a la que se observa la máxima actividad se conoce como temperatura óptima, aunque este parámetro depende fuertemente del método de medición de actividad, por lo que no debe considerarse una constante termodinámica (Gómez-Puyou, 2003). Si se considera el dinamismo de las proteínas y su flexibilidad, se puede aceptar que la parte ascendente de la curva refleja un aumento en la flexibilidad de la enzima debido a un incremento en la energía cinética de la molécula, que es inducido por el aumento gradual de la temperatura. Por otra parte, la caída de la curva a temperaturas mayores refleja la desnaturalización térmica de la enzima (Shoichet y col., 1995).

Los trabajos en que se han comparado las k_{cat} de enzimas que provienen de organismos termófilos y mesófilos a diferentes temperaturas, muestran una característica interesante: a pesar de que las curvas de las enzimas termófilas están a la derecha de las de los mesófilos, las k_{cat} de las dos enzimas a las temperaturas óptimas son muy similares. En otras palabras, las dos enzimas tienen la misma capacidad catalítica, excepto que se requieren diferentes temperaturas para que las enzimas muestren velocidades catalíticas semejantes. Se ha referido a este comportamiento como un fenómeno de estados equivalentes (Jaenicke y Bohm, 1998). En otras palabras, las dos enzimas tienen la misma capacidad para llevar a cabo los arreglos conformacionales que acompañan a la catálisis, excepto que para que éstos ocurran, las enzimas termófilas requieren temperaturas mayores. Esto sugiere que la enzima termófila es relativamente más rígida o menos flexible que su contraparte mesófila.

La termoestabilidad de las enzimas es actualmente un campo muy activo debido al potencial biotecnológico que representan éstas. Por esta razón todos los estudios que lleven al mejoramiento en esta propiedad, además de aportar importante información para entender las bases moleculares de la termoestabilidad, tienen un gran interés industrial.

Termoestabilidad de las lipasas de la familia I.4

Las lipasas han sido utilizadas en gran cantidad en la industria de los detergentes así como en las industrias cosmética y alimentaria. La síntesis enantioselectiva de compuestos a partir de estas enzimas también ha tenido gran auge. Dentro de las lipasas del género *Bacillus* se han hecho estudios para mejorar la termoestabilidad de LipA ya sea de manera racional (Abraham y col., 2005) o aleatoria (Acharya y col., 2004). En estos últimos se han encontrado resultados interesantes.

Termoestabilidad de la lipasa de *B. subtilis*

En un estudio de evolución dirigida hecho por Acharya y col. (2004) se encontró que las mutaciones L114P, A132D y N166Y aumentaban de manera significativa la termoestabilidad de LipA. Las mutantes fueron construidas combinando las técnicas de PCR propenso a error y mutagénesis sitio-dirigida. En el primer ciclo de PCR propenso a error se obtuvieron aproximadamente 2000 colonias, a las cuales se les determinó actividad lipolítica residual después de incubarlas a 55°C hasta la pérdida de más del 80% de actividad. En el primer ciclo de selección la colonia más termoestable tuvo la mutación N166Y. Las mutaciones L114P y A132D se obtuvieron de manera concurrente en el segundo ciclo de PCR propenso a error. Se evaluaron las propiedades cinéticas y vidas medias de esta serie de mutantes termoestables individualmente y de manera conjunta mediante una doble (N166Y, A132D) y triple mutante (N166Y, A132D, L114P). Los resultados de la caracterización mostraron que estas mutaciones mejoran la termoestabilidad de LipA, sin alterar significativamente las constantes cinéticas (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Parámetros cinéticos y vida media de LipA y algunas mutantes que mejoran su termoestabilidad (Fuente: Acharya y col., 2004).

Enzima	K_m (mM)	k_{cat} ($\times 10^{-2} \text{min}^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($\times 10^{-2} \text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$t_{1/2}$ (min) 55°C, pH 7.0
Enzima silvestre (WT)	0.97	5.2	5.4	2.5
N166Y	1.03	5.0	4.8	25.4
A132D	0.63	6.1	9.7	7.0
L114P	0.69	5.5	8.0	18.9
DM (N166Y, A132D)	1.22	6.8	5.6	228.0
TM (N166Y, A132D, L114P)	1.96	8.1	4.1	677.0

Las estructuras de las proteínas DM y TM fueron determinadas por cristalografía de rayos X para evaluar los cambios estructurales que las mutaciones L114P, A132D y N166Y le confirieron a LipA (Figura 3.2). De manera general, se encontraron cambios sutiles como interacciones iónicas y nuevos puentes de hidrógeno que mejoran la estabilidad de la molécula. Los cambios principales que producen las mutaciones en la estructura general de la proteína se pueden resumir de la siguiente forma:

- N166Y: esta mutación se encuentra en la parte media de la hélice αF , que conecta con la hebra $\beta 8$ por medio de una hélice 3_{10} presente al inicio de la hélice αF . La mutación juega múltiples roles en la estabilización de la región en la que se encuentra. La tirosina 166 (Y166) se apila con otra tirosina vecina (Y25) de una hélice adyacente (αA), lo que resulta en una clásica interacción de apilamiento-pi paralela entre anillos aromáticos (Hunter y col., 1991; Aravinda y col., 2003) que provoca un acercamiento de las cadenas laterales y por lo tanto una interacción entre las hélices que contienen cada una de las tirosinas (Figura 3.2.A). Esta compactación provoca, al mismo tiempo, que una molécula de agua interactúe por puentes de hidrógeno con la cadena lateral de la Y166 y con un átomo de oxígeno del grupo carbonilo del residuo Y161 (Figura 3.2.B).
- A132D: esta mutación está en un asa que conecta la hebra $\beta 7$ y la hélice αE . Un puente de hidrógeno se establece entre el oxígeno de un grupo hidróxilo del D132 y el nitrógeno de la cadena principal del residuo G153, presente en un giro que conecta la hebra $\beta 8$ y la porción 3_{10} de la hélice αF (Figura 3.2.C). De esta manera,

las superficies de los giros se mantienen unidas por esta interacción. Los autores sugieren que esta interacción podría mejorar la termoestabilidad de la molécula.

- L114P: esta mutación se encuentra en una región de 14 aminoácidos que carece de estructura secundaria, entre las hebras $\beta 6$ y $\beta 7$ (Figura 3.2.D). Se sabe que las prolina ayudan a estabilizar las estructuras plegadas de las proteínas debido a las constricciones estructurales a que someten al esqueleto de carbono. Por lo tanto, un residuo de prolina (P114) en el giro más largo de la molécula puede contribuir en la estabilidad de la proteína.
- Doble mutante, DM (N166Y, A132D) y Triple mutante, TM (N166Y, A132D, L114P): el conjunto de estas mutaciones en ambas proteínas no cambia de manera significativa la estructura general respecto a LipA, las cuales se muestran muy similares a las de la enzima silvestre (WT) de acuerdo a espectros de fluorescencia de Trp, dicroísmo circular (UV lejano) y desviación del $C\alpha$ (rms) sobre las tres moléculas. Tanto DM como TM conservan las interacciones que cada mutación produce por sí sola, las cuales muestran un efecto sinérgico evidente para ambas proteínas. En TM sin embargo, hay un aumento significativo en su vida media (~300 veces) debido a los cambios sutiles que produce la mutación L114P. En esta proteína se produce un anclaje del extremo C-terminal por medio de un puente salino entre los residuos N181 y K122 (Figura 3.2D), lo que confiere estabilidad a la molécula. Por otro lado, DM que carece de esta mutación tiene una configuración del residuo N181 muy similar al de WT en la cuál no se produce la interacción con el residuo K122.

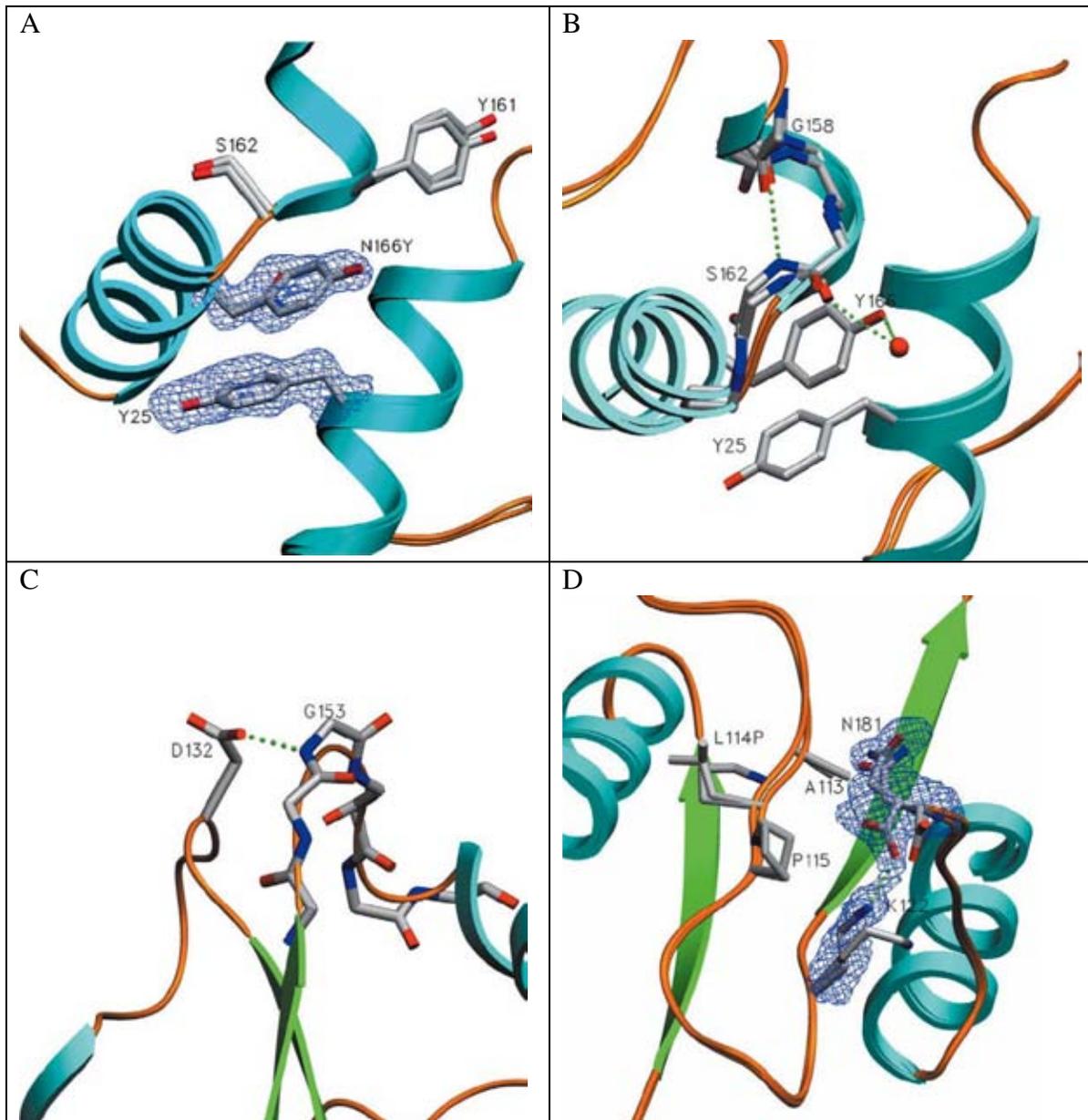


Figura 3.2: Cambios estructurales en la región mutada de la lipasa A (LipA) de *B. subtilis*. Regiones alrededor de las mutaciones N166Y (A y B), A132D (C) y L114P (D). Tomado de Acharya y col., 2004.

Por otro lado, la estabilización de LipA por métodos racionales ha arrojado resultados también interesantes. Este tipo de metodologías se basan principalmente en el análisis de la estructura de las proteínas y posterior modificación de las mismas por herramientas de ingeniería de proteínas (Malakauskas y Mayo, 1998; Van den Buró y col., 1998). El estudio

de Abraham y col. (2005) para mejorar la termoestabilidad de LipA es un trabajo que sigue este postulado. Parten del antecedente de que las proteínas más estables son generalmente más compactas y rígidas que las menos estables. El estudio considera que el cambio de los residuos menos empacados en el núcleo de la proteína, los cuales no tienen contacto con agua, por residuos más empacados mejorará la estabilidad de la proteína. Después de un análisis de todos los residuos de la molécula encontraron que las mutaciones A38V, G80A y G172V mejorarían significativamente la termoestabilidad de LipA respecto a la de la enzima silvestre (Tabla 3.2). Sin embargo, estas mutantes disminuyen significativamente la funcionalidad de la enzima mostrando actividades específicas menores al 30% respecto a la de la enzima silvestre. Esto manifiesta que la introducción de residuos que hacen más rígida la estructura de la proteína al mismo tiempo la convierten en una molécula menos flexible, lo que generalmente se traduce en una mejora de la termoestabilidad y una disminución de la actividad catalítica de la enzima. A pesar de que los resultados de este estudio no son comparables a los de Acharya y col. (2004) debido a que las mutantes se someten a distintas condiciones de pH, si muestran de forma general una tendencia del papel que podrían tener estas mutaciones en proteínas similares.

Tabla 3.2: Vida media de LipA y algunas mutantes que mejoran su termoestabilidad (Fuente: Abraham y col., 2005).

Enzima	Actividad específica (U mg ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (min) 50°C, pH 5.5
Enzima silvestre (WT)	3360.0	1.6
A38V	1178.0	107.5
G80A	985.8	113.8
G172V	863.4	102.5

Termoestabilidad y propiedades catalíticas de la lipasa de *B. pumilus* GMA1

Antecedentes directos

El presente trabajo tiene como objetivo principal estudiar las propiedades catalíticas de BplA y evaluar el efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima mediante determinación de constantes cinéticas. Además se pretende también evaluar residuos con posible repercusión en la termoestabilidad de la enzima de acuerdo a los antecedentes previamente descritos. Considerando que BplA es homóloga a LipA con una identidad de secuencia de aminoácidos del 80%, se podría suponer que las mutantes que le confieren termoestabilidad a una enzima tendrían una repercusión similar en la otra.

Por estas razones, es razonable pensar que las mutantes L114P, A132D y N166Y que mejoran la termoestabilidad de LipA pueden funcionar de una manera semejante en BplA, ya que los residuos que participan en las nuevas interacciones conferidas por las mutantes están conservados entre ambas enzimas. Cabe señalar que aunque el residuo 166 no está conservado entre ambas enzimas (N166 para LipA y K166 para BplA), esto no sería de importancia relevante, ya que es ese aminoácido el que se mutaría por una tirosina (Tyr), que es finalmente la que confiere las interacciones adicionales.

Las mutantes A38V, G80A y G172V que se han reportado también como estabilizantes para LipA (Abraham y col., 2005) no se consideraron para estabilizar a BplA debido a que ese trabajo se publicó tiempo después de haber comenzado nuestro proyecto y también debido al efecto negativo que prometían tener sobre la actividad catalítica de la enzima.

En lo que respecta al residuo G28 de BplA, en contraste con el posible efecto estabilizante que las mutantes L114P, A132D y N166Y pudieran tener en BplA, la construcción de la mutante G28S se haría bajo la premisa de obtener una enzima menos estable que la enzima silvestre, esto de acuerdo al análisis discutido anteriormente de las secuencias de aminoácidos y propiedades bioquímicas de las lipasas de la familia I.4. Al final, el estudio de cada una de estas mutantes proporcionaría información acerca de la contribución de cada uno de estos residuos en la estabilidad de la proteína con la temperatura.

Para estudiar el efecto de las mutaciones antes mencionadas en las propiedades catalíticas y la termoestabilidad de BplA es necesario clonar el gen que codifica para esta enzima (*bplA*) en una cepa de fácil manipulación y de la cual se conozcan bien sus mecanismos de regulación y expresión génica. *E. coli* es un microorganismo que cumple bien estos requisitos. Una vez clonado el gen *bplA*, el paso siguiente será la purificación de la proteína recombinante (BplA-r). La construcción de las mutantes se harán partiendo del gen *bplA* clonado en *E. coli*, por mutagénesis sitio-dirigida mediante el diseño de cebadores específicos para cada mutación. A partir de las enzimas puras se podrá medir la estabilidad de cada molécula mediante determinación de actividad residual después de distintos periodos de incubación a distintas temperaturas. Debido a los antecedentes de este tipo de enzimas a agregarse después de un calentamiento (Acharya y col., 2004), la evaluación de las estabilidades de estas enzimas tendría que ser por análisis cinético, determinando las constantes de desplegamiento de la proteína (k_d) a las distintas temperaturas a evaluar, las cuales en el presente trabajo llamaremos como constantes de inactivación enzimática (k_{ie}). Posteriormente se determinarían parámetros cinéticos como k_{cat} y K_m para cada forma de la enzima, también en función de la temperatura, tomando en cuenta el grado de inactivación (k_{ie}) de cada enzima a la temperatura de estudio. Los métodos y estudios anteriores proporcionan información acerca de las propiedades catalíticas de BplA-r, además de representar una manera racional de evaluar la estabilidad cinética de la enzima con la temperatura.

Capítulo 4. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

♣ Si el aminoácido G28 es un residuo relevante para las lipasas termófilas de la familia I.4, y él cual no está conservado en las lipasas mesófilas de la misma familia (Tabla 2.1), se esperaría que en BpLA-r la mutación G28S tuviera un efecto negativo en la estabilidad de la molécula demostrando así la importancia de este residuo en las lipasas termófilas.

♣ Las mutaciones G28S, L114P, A132D y K166Y mejorarán la termoestabilidad de BpLA-r de acuerdo a los antecedentes estabilizadores de estas mutaciones en la enzima homóloga LipA.

Objetivo General:

- Estudiar el efecto de las mutaciones G28S, L114P, A132D y K166Y en la cinética y termoestabilidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1.

Objetivos Particulares:

- Clonar y sobre-expresar la lipasa de *B. pumilus* GMA1 en *E. coli*.
- Construir las mutantes G28S, L114P, A132D y K166Y.
- Purificar la proteína recombinante y las mutantes propuestas.
- Determinar constantes de inactivación térmica (k_{ie}) de las enzimas a distintas temperaturas.
- Determinar parámetros cinéticos, k_{cat} y K_m , de las enzimas a distintas temperaturas.

Capítulo 5. Material y Métodos

MATERIALES

Reactivos químicos.

Reactivo	Marca
Acetato de potasio	Sigma
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo (pNFA)	Sigma
Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)	Sigma
Alcohol isoamílico	Sigma
Agar LB (Luria Bertrani)	Difco
Agarosa	GibcoBRL
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	Sigma
Bromuro de etidio	GibcoBRL
Caldo Luria Bertrani (LB)	Sigma
Cloroformo	Sigma
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma
Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's)	New England Biolabs
DNA ligasa	New England Biolabs
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	Sigma
Enzimas de restricción (<i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i> , <i>HindIII</i> , <i>XhoI</i> y <i>DpnI</i>)	New England Biolabs
Etanol	Sigma
Fenil-sefarosa CL-4B	Sigma

Fenol saturado de amortiguador	Sigma
Fosfato de potasio	Sigma
Glucosa	Sigma
Hidróxido de sodio (NaOH)	Sigma
Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG)	Sigma
Pronasa E	Sigma
2-propanol	Sigma
Tris	Sigma

Material de Biología Molecular

Sistema	Marca
Sistema de clonación pGEM [®] -T <i>Easy Vector System I</i>	Promega
QuikChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
QIAprep [®] Spin, Miniprep Kit 250	QIAGEN
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick [®] PCR Purification Kit	QIAGEN

Equipos

Equipo	Marca
Termociclador <i>PTC-200</i>	MJ Research
Electroporador (<i>Gene pulser II</i>)	Bio-Rad
pHmetro 713 <i>Metrohm</i>	Brinkmann
Espectrofotómetro <i>Ultrospec[®] 2000</i>	Amersham-Pharmacia
Espectrofotómetro <i>CARY 400</i>	Varian
Sonicador <i>CV26</i>	Cole Parmer
Centrífuga <i>Avanti J-25I</i>	Beckman
Microcentrífuga <i>5417R</i>	Eppendorf
HPLC (Controlador <i>600S</i> , bomba <i>626</i> , detector dual de absorbancia <i>2487</i> , desgasificador en línea <i>AF</i> y colector de fracciones <i>III</i>)	Waters

Cepas bacterianas

Cepa	Genotipo o descripción	Fuente o referencia
<i>Bacillus pumilus</i> GMA1	Cepa silvestre	Bustos-Jaimes (1998)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacI^q ZΔM15, T 10 (Tet^r)</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	Studier y Moffatt (1986) Novagen
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F- f80dlacZDM15D(lacZYAargF) U169 endA1 recA1 hsdR17(rk-mk+) deoR thi-1 supE44 l-gyrA96 relA1</i>	Hanahan (1983; 1985)

Plásmidos utilizados

Plásmido	Características relevantes	Fuente
pGEM-T	-	Promega
pET22b+	ColE1 P _{T7/lac} Amp ^r . Vector para expresión de genes dirigida por la ARN polimerasa del fago T7. Se obtiene una proteína de fusión con 6 histidinas en C-terminal.	Novagen

Plásmidos construidos.

Plásmido	Cepa hospedera de <i>E. coli</i>	Características relevantes
pG bpl	DH5α, XL1-Blue y BL21	Derivado de pGEM-T con un fragmento de 0.55 kb conteniendo el gen <i>bplA</i> clonado en <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> .
pET bpl	XL1-Blue y BL21	Derivado de pET22b+ con un fragmento de 0.55 kb conteniendo el gen <i>bplA</i> clonado en <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> .
pET bpl _G28S	XL1-Blue y BL21	Derivado de pET bpl con la mutante G28S en el gen <i>bplA</i> .
pET bpl _L114P	XL1-Blue y BL21	Derivado de pET bpl con la mutante L114P en el gen <i>bplA</i> .
pET bpl _A132D	XL1-Blue y BL21	Derivado de pET bpl con la mutante A132D en el gen <i>bplA</i> .
pET bpl _K166Y	XL1-Blue y BL21	Derivado de pET bpl con la mutante K166Y en el gen <i>bplA</i> .

MÉTODOS

Reactivación de la cepa de *B. pumilus* GMA1

La cepa de *Bacillus pumilus* GMA1, conservada en glicerol (50% v/v) a -20°C, se sembró en una placa con agar LB a 37°C por 24 h.

Extracción de ADN cromosómico de *B. pumilus* GMA1

La extracción y purificación de ADN genómico de *Bacillus pumilus* GMA1 se realizó siguiendo el método descrito por Ausubel y col. (1992) con algunas modificaciones. Este método se basa en el uso del detergente CTAB (bromuro de cetil trimetilamonio), que en condiciones de elevada salinidad reacciona con los ácidos nucleicos formando complejos estables y solubles. Posteriormente, el CTAB se elimina con facilidad aprovechando su solubilidad en disolventes orgánicos.

Protocolo

1. Cultivar la cepa en 50 mL de medio LB por 18 h a 37°C con agitación constante de 250 rpm.
 2. Obtener la biomasa por centrifugación a 5,000 rpm por 10 minutos.
 3. Resuspender las células con 2 ml de amortiguador TE (tris 10 mM y EDTA 0.2 mM pH 8).
 4. Agregar 1 mg de lisozima e incubar a 37°C durante una hora.
 5. Adicionar 100 µl de SDS 10%, mezclar suavemente e incubar a 37°C durante una hora.
 6. Adicionar 200 µl de NaCl 5 M y mezclar suavemente.
 7. Adicionar 200 µl de solución de CTAB/NaCl (10%/0.7 M), mezclar suavemente e incubar 15 min a 65°C.
 8. Adicionar un volumen de fenol-cloroformo (1:1), mezclar suavemente hasta que desaparezca la fase orgánica (inferior) y centrifugar a 14,000 rpm por 10 min.
 9. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo limpio y agregar 0.6 volúmenes de 2-propanol, mezclar suavemente por inversión y centrifugar a 14,000 rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante.
 10. Adicionar 1 ml de etanol al 70%, mezclar suavemente por inversión y centrifugar a 14,000 rpm por 1 min. Descartar el sobrenadante.
 11. Repetir el paso anterior dos o tres veces hasta que desaparezca el olor a fenol de la muestra.
 12. Secar el ADN a 50°C con vacío y guardarlo a 4°C hasta ser usado.
 13. Al usar el ADN purificado, resuspenderlo en 1 ml de amortiguador TE o agua destilada estéril.
-

Clonación del gen *bplA* en *E. coli*

Amplificación del gen *bplA* por PCR

La amplificación del gen *bplA* que codifica para la lipasa de *B. pumilus* GMA1 es un paso necesario para su clonación en un vector. Para ello se diseñaron cebadores específicos así como un protocolo de amplificación.

Diseño de los cebadores

El diseño de todos los cebadores utilizados en el presente trabajo se llevó a cabo con el programa *Primers for the Mac V 1.0* (Apple Pi. Ashland MA, USA) partiendo de la secuencia de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1. Algunos puntos importantes que se consideraron en el diseño de los cebadores son:

- Tamaño de los oligonucleótidos.
- Tm's parecidas entre los pares de cebadores.
- Extremos 3' preferentemente con las bases GG, CC, CG o GC, para favorecer la unión del ADN en el extremo en que la ADN polimerasa inicia la síntesis.
- Utilización de codones preferenciales para la cepa, en este caso *E. coli*.

Se sintetizaron los cebadores FBPNDE y RBPXHO para la amplificación del gen *bplA* a partir de la secuencia de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1. Estos cebadores incorporan los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* en los extremos N- y C-terminales del gen *bplA*, respectivamente (Tabla 5.1). El cebador para el extremo N-terminal (FBPNDE) incluye además un codón de metionina en la posición -1 (Met-1) con respecto al residuo Ala1 de la proteína madura, lo que permite el inicio de la síntesis de la proteína. La amplificación del gen *bplA* no incluye la región que codifica para el péptido señal que se encuentra en el ADN cromosómico de *B. pumilus* GMA1 (Figura 5.1).

Tabla 5.1. Cebadores utilizados en todo el estudio

Cebador	Secuencia 5' a 3'	Bases	T _m (°C)	Utilización
FBPNDE	ggaattc catatg gctgagcataatcc	27	58	Amplificación del gen <i>bplA</i> . Genera sitio <i>NdeI</i> en el extremo 5'. Incorpora un codón de Met en la posición -1.
RBPXHO	atagtaggc ctcgag attcgtattttgtcc	30	60	Amplificación del gen <i>bplA</i> . Genera sitio <i>XhoI</i> en el extremo 3'.
F28S	at ttggtt tct caaggctgg	20	50	Genera la mutante Gly28Ser en el gen <i>bplA</i> .
R28S	ccttg aga aaccaaataacttttaatag	28	53	Genera la mutante Gly28Ser en el gen <i>bplA</i> .
F114P	gagca ccg ccaggcacagatcc	22	62	Genera la mutante Leu114Pro en el gen <i>bplA</i> .
R114P	tgtg cctggcgg tgctctgc	20	60	Genera la mutante Leu114Pro en el gen <i>bplA</i> .
F132D	cagctc agac gatctcatcg	20	54	Genera la mutante Ala132Asp en el gen <i>bplA</i> .
R132D	gagatc gtc tgagctgtagacag	23	57	Genera la mutante Ala132Asp en el gen <i>bplA</i> .
F166Y	agtgt tac ggctacattaaagaagg	24	54	Genera la mutante Lys166Tyr en el gen <i>bplA</i> .
R166Y	agcc gta cacttggcttgag	20	54	Genera la mutante Lys166Tyr en el gen <i>bplA</i> .

En **negritas** se muestran sitios de restricción o codones de los residuos mutados.

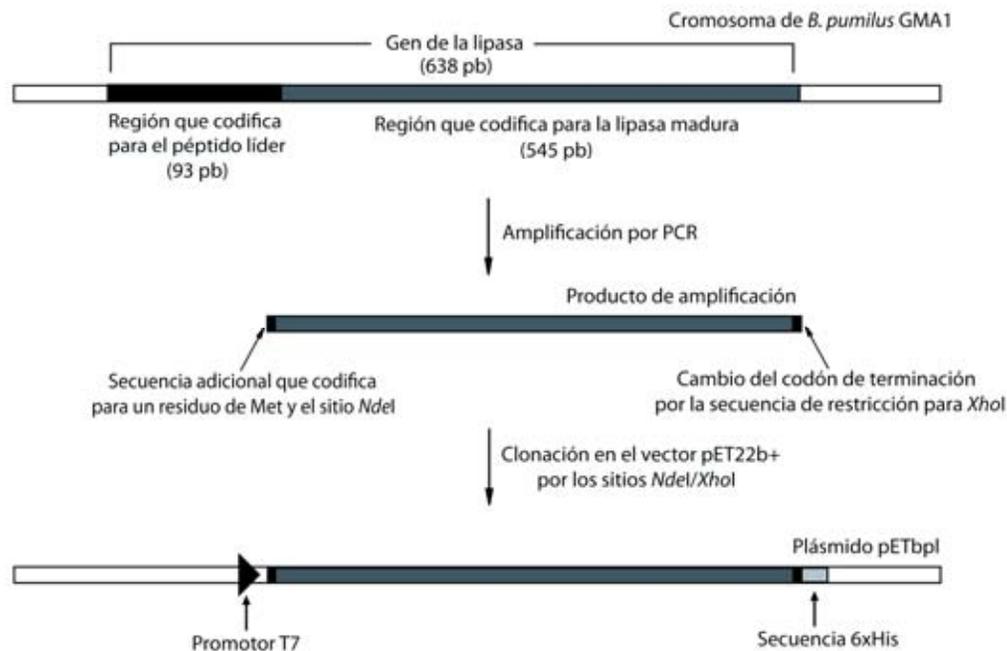


Figura 5.1. Estrategia de clonación del gen *bplA*. Al insertar el gen *bplA* en el vector pET22b+ se adicionó mediante cebadores específicos una Met en la posición -1 y los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' del gen, respectivamente.

PCR

Con el diseño previo de los cebadores y utilizando el ADN cromosómico de *B. pumilus* GMA1 como molde, se llevó a cabo la amplificación del gen *bplA* con el siguiente protocolo de PCR.

Protocolo

Reactivos	Volumen (μL)
Amortiguador para <i>Taq</i> 10x	5
ADN molde 40 ng/mL	2.5
Cebador FBPNDE 50 μM	1
Cebador RBPXHO 50 μM	1
dNTPs 1 mM	1
Mg ²⁺ 50 mM	2
Agua destilada	37.4
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/μL)	0.1

Condiciones de reacción	1 ciclo	95°C / 3 min
	30 ciclos	95°C / 1 min
		48°C / 1 min
		72°C / 1 min
1 ciclo	72°C / 1 min	

Clonación del *bplA* en el vector pGEM-T

Vector

Se utilizó el plásmido pGEM-T para clonar el producto de amplificación correspondiente al gen *bplA* (Figura 5.2). Algunas características importantes que tiene este vector de 3,015 pb son un promotor inducible del fago T7, un operador *lac*, una secuencia de unión al ribosoma o Shine Dalgarno y un gen de β-lactamasa que le confiere resistencia a la ampicilina.

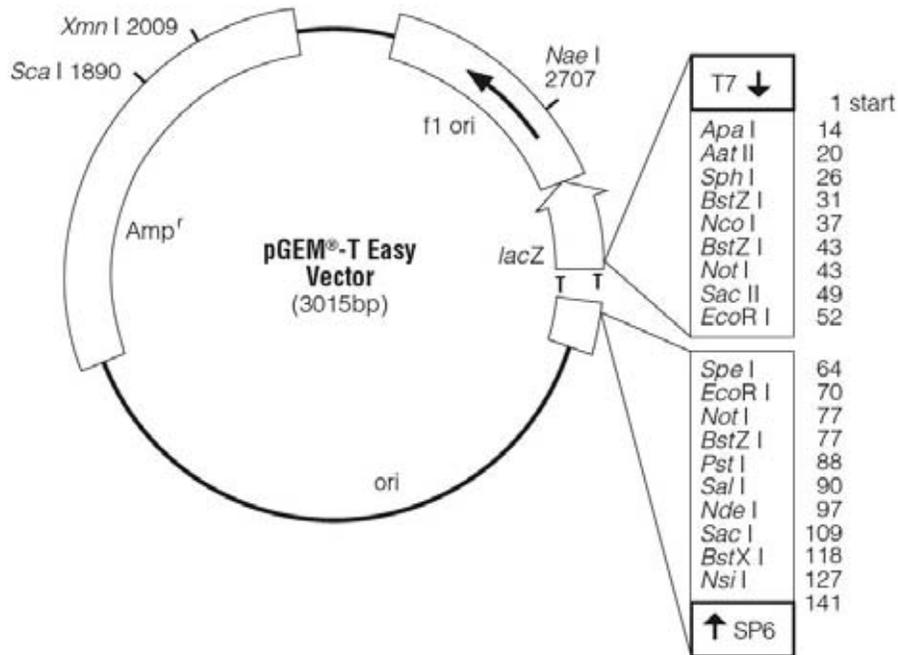


Figura 5.2. Vector de clonación pGEM-T.

La ligación del gen *bplA* con el plásmido pGEM-T se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (pGEM[®]-T Easy Vector System I) con el siguiente protocolo modificado:

Protocolo

Reactivos	Volumen (μL)
Amortiguador de ligación 2x	5
pGEM-T	1
Producto de PCR	3
ADN Ligasa T4	1

Condiciones de ligación: 4°C durante 12 horas

Transformación de células competentes de *E. coli*

El producto de ligación entre el gen *bplA* y el vector pGEM-T se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*. Debido a la dificultad que presentan las células de *E. coli* a ser transformadas con plásmidos no súper-enrollados se utilizaron dos métodos de transformación para aumentar las posibilidades de éxito, por choque térmico con células DH5 α y por electroporación con células XL1-Blue. Estos procedimientos de transformación fueron descritos por Hanahan y col. (1983) y Dower y col. (1988), respectivamente. Se utilizaron los siguientes protocolos modificados:

Protocolo para preparar células quimiocompetentes

1. A partir de un vial congelado de la cepa de *E. coli* deseada se siembran placas de medio LB y se incuban durante 12 h a 37°C hasta obtener colonias aisladas,
2. Con una de estas colonias se inocula un tubo con 5 ml de medio LB con el correspondiente antibiótico y se incuba durante toda la noche a 37°C y agitación suave.
3. Inocular con la muestra anterior un matraz con 500 ml de medio LB, e incubar a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0.4-0.6.
4. Centrifugar la muestra a 5000 rpm por 10 minutos. Mantener la biomasa a 4°C. Para mantener condiciones de asepsia se esterilizan previamente los tubos de centrifuga y todas las disoluciones, además para no romper la cadena de frío se mantienen en hielo antes de su uso.
5. Resuspender cuidadosamente la biomasa en 100 ml de una disolución de CaCl₂ 0.1 M previamente enfriada en hielo.
6. Repetir el paso anterior de lavado con CaCl₂, una vez más.
7. Finalmente, resuspender la biomasa en 2 ml de una disolución de CaCl₂ 0.1 M y 40% de glicerol; hacer alícuotas de 70 μ l en tubos eppendorf estériles. Conservar las muestras a -80°C.

Protocolo de transformación por choque térmico

1. Se extrae un vial de células competentes congeladas a -80°C y se coloca en hielo para una descongelación lenta.
2. Una vez descongeladas las células se les añade el ADN a transformar y se mantienen 30 minutos en hielo.
3. A continuación se procede al “choque térmico” colocando el tubo en un baño de agua a 42°C, seguido de 5 minutos en hielo.
4. Se añade 1 ml de medio SOC* y la mezcla se incuba a 37°C con agitación durante una hora.
5. Se siembran alícuotas de 50 μ l en placas de agar LBamp, posteriormente se incuban durante 12-16 h a 37°C.

*Medio SOC: Para la preparación de este medio primero se esteriliza en autoclave una disolución de extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, NaCl 0.05%, posteriormente, se adicionan las disoluciones previamente esterilizadas (por filtración) de MgSO₄ 1%, MgCl₂ 1% y glucosa 1%.

Protocolo para preparar células electrocompetentes

1. A partir de un vial congelado de la cepa de *E. coli* deseada se siembran placas de medio LB y se incuban durante 12 h a 37°C hasta obtener colonias aisladas,
 2. Con una de estas colonias se inocula un tubo con 5 ml de medio LB con el correspondiente antibiótico y se incuba durante toda la noche a 37°C y agitación suave.
 3. Inocular con la muestra anterior un matraz con 500 ml de medio LB, e incubar a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0.4-0.6.
 4. Centrifugar la muestra a 5000 rpm por 10 minutos. Mantener la biomasa a 4°C. Para mantener condiciones de asepsia se esterilizan previamente los tubos de centrifuga y todas las disoluciones, además para no romper la cadena de frío se mantienen en hielo antes de su uso.
 5. Resuspender cuidadosamente la biomasa en 500 ml de una disolución de glicerol al 10% previamente enfriada en hielo.
 6. Repetir el paso anterior de lavado con glicerol al 10%, una vez más.
 7. Finalmente, resuspender la biomasa en 1 ml de la disolución de glicerol al 10% y en 1 ml de la disolución GYT (glicerol 10%, extracto de levadura 0.125% y triptona 0.25%); hacer alícuotas de 70 µl en tubos eppendorf estériles. Conservar las muestras a -80°C.
-

Protocolo de transformación por electroporación

1. Se extrae un vial de células competentes congeladas a -80°C y se coloca en hielo para una descongelación lenta.
 2. Una vez descongeladas las células se les añade el ADN a transformar y se mantiene en hielo un minuto.
 3. La mezcla se traspara a una celda de electroporación pre-enfriada.
 4. A continuación se procede al “pulso eléctrico” colocando la celda de 0.1 cm en el equipo electroporador (*Gene pulser II*, BIO-RAD) con las siguientes condiciones: 25 µF, 200 W y 1.8 kV.
 5. Se añade 1 ml de medio SOC* y la mezcla se incuba a 37°C con agitación durante una hora.
 6. Se siembran alícuotas de 50 µl en placas de agar LBamp, posteriormente se incuban durante 12-16 h a 37°C.
-

Purificación del plásmido p*Gbpl*

La extracción y purificación del plásmido p*Gbpl* se realizó siguiendo el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y Russell (2001) con las siguientes modificaciones:

Protocolo

1. Cultivar el microorganismo en 5 ml de LBamp hasta una DO₆₀₀ de 1. Centrifugar por 5 minutos a 14,000rpm a 15°C.
2. Resuspender las células en 100 µl de disolución I (50 µM glucosa, 25µM Tris-HCl pH 8, 10 µM EDTA y 10 mg/ml de lisozima) e incubar a 37°C por 1 hora.
3. Adicionar 200 µl de una disolución recién preparada de 0.2 M NaOH y 4% de SDS. Mezclar suavemente por inversión e incubar en hielo durante 10 minutos.
4. Agregar 150 µL de una disolución de acetato de potasio 5 M pH 5 y poner en hielo durante 10 minutos.

5. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Traspasar 400 µl del sobrenadante a un tubo nuevo.
 6. Agregar 400 µL de fenol saturado de amortiguador y mezclar suavemente. Adicionar 400 µL de cloroformo y mezclar suavemente. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 7. Traspasar 700 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.
 8. Recolectar el precipitado (plásmido) por centrifugación a temperatura ambiente durante 15 minutos a 14,000 rpm.
 9. Lavar el precipitado con etanol al 70%, secar al vacío y resuspender en 50 µL de amortiguador TE adicionado con RNAsa.
-

Digestión del plásmido p*Gbpl* con *EcoRI*

La digestión de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo siempre en las condiciones recomendadas por los fabricantes (New England Biolabs). El plásmido purificado p*Gbpl* a partir de las células transformadas de *E. coli* DH5α y XL1-Blue se sometió a una digestión con el enzima *EcoRI* de acuerdo al siguiente protocolo:

Protocolo

Reactivos	Volumen (µL)
Amortiguador 2, 10x	0.5
Plásmido purificado por lisis alcalina	1
Enzima <i>EcoRI</i> (20.00 U/µL)	0.5
Agua destilada	3

Condiciones de digestión: 37°C durante 2 horas

Digestión del plásmido p*Gbpl* con *NdeI*, *XhoI* y *NdeI/XhoI*

El plásmido p*Gbpl* se sometió también a una digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, debido a que el gen *bplA* fue amplificado con cebadores que incorporan estos sitios de restricción en sus extremos. El vector pGEM-T posee por si mismo una región *NdeI* en su sitio de clonación múltiple (SCM), por lo que se realizaron tres reacciones de acuerdo al siguiente protocolo:

Protocolo

Reactivos	Reacción con:		
	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	<i>NdeI/ XhoI</i>
	Volumen (µL)		
Amortiguador 2, 10x	0.5	0.5	0.5
Plásmido purificado por lisis alcalina	1	1	1
Enzima <i>NdeI</i> (20.0 U/µl)	0.5	-	0.5
Enzima <i>XhoI</i> (20.0 U/µl)	-	0.5	0.5
Agua destilada	3	3	2.5

Condiciones de digestión: 37°C durante 2 horas.

Clonación del *bplA* en el vector pET22b+

El gen *bplA* se subclonó en el plásmido pET22b+, que es finalmente el vector de expresión seleccionado para expresar el gen *bplA* (Figura 5.3). Algunas características importantes que tiene este vector de 5,493 pb son un promotor del fago T7, un operador *lac*, una secuencia de unión al ribosoma o Shine Dalgarno y el codón de inicio seguido de un conector que permite, sin romper el marco de lectura, insertar la secuencia del gen que se pretende expresar fusionada a la secuencia que codifica para 6 residuos de histidinas en el C-terminal (Figura 5.4). Además, contiene un gen de β-lactamasa que le confiere resistencia a la ampicilina. Los cebadores FBPND E y RBPXHO descritos previamente fueron diseñados para la clonación del gen *bplA* en este vector por los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*.

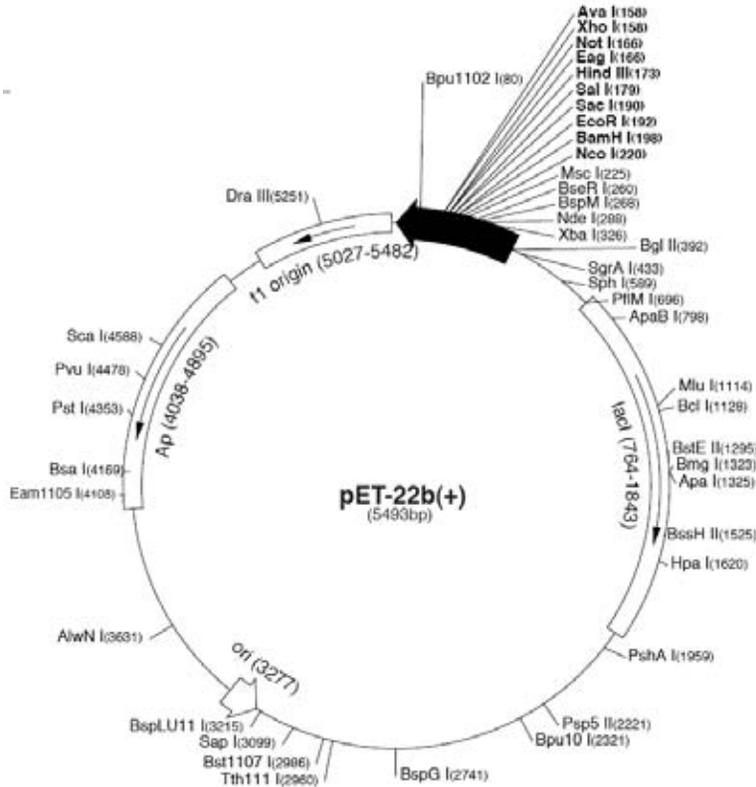


Figura 5.3. Vector de clonación pET22b+.

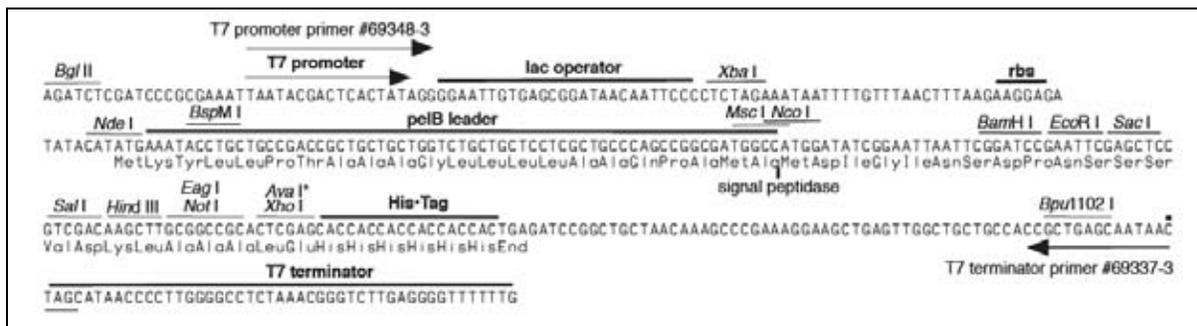


Figura 5.4. Región de clonación/expresión del vector pET22b+.

Ligación

El gen *bplA* fue extraído a partir del plásmido p*Gbpl* digerido con *NdeI* y *XhoI*. La purificación se llevó a cabo a partir de geles de agarosa al 1% con el sistema *QIAquick* (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Simultáneamente se digirió el vector pET22b+ con las mismas enzimas de restricción y el plásmido escindido fue

purificado bajo las mismas condiciones. La ligación del gen *bplA* con el plásmido pET22b+ se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo:

Protocolo

Reactivos	Volumen (μL)
Amortiguador de ligación 2x	10
Gen <i>bplA</i> flanqueado por los extremos <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	6
Vector pET22b+ digerido con <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	2
Agua destilada	1
ADN Ligasa T4	1

Condiciones de ligación: 4°C durante 12 horas

La visualización de genes, productos de ligación y demás ácidos nucleicos se hizo por electroforesis en gels de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1x (Tris-HCl 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial 1.14 μl/l, pH 7.8); teñido con bromuro de etidio.

Transformación

El producto de ligación entre el gen *bplA* y el vector pET22b+ se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue de acuerdo al protocolo descrito anteriormente. De las células transformantes se purificó el plásmido pET*bpl* por el método de lisis alcalina descrito anteriormente. Se comprobó la incorporación del gen *bplA* en pET22b+ mediante digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* utilizando el mismo protocolo que el que se utilizó para el plásmido p*Gbpl*. Finalmente, con el plásmido pET*bpl* se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3).

Secuenciación de ADN

La secuenciación de los distintos fragmentos de ADN analizados en el presente trabajo fue realizada por el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Se utilizaron los cebadores *pUC/M13 Forward* y *T7 Terminator* para secuenciar los plásmidos de pGEM y pET, respectivamente.

Ensayo para verificar la actividad lipolítica en medio sólido

A las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET*bpl* se les determinó cualitativamente su actividad lipolítica en medio sólido. Estas células se sembraron en placas de agar LB con tributirina (0.5 %), IPTG (0.1 mM) y ampicilina (50 µg/ml). La incubación fue a 37°C por 12 h. Como control negativo en otra placa se sembraron bajo las mismas condiciones células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET22b+ (sin el inserto *bplA*). La presencia de actividad lipolítica en las células se verificó por la formación de halos de lisis en las placas de agar con tributirina.

Ensayo para determinar las condiciones de expresión de la proteína recombinante

Se ensayaron distintas concentraciones del inductor (IPTG) y tiempos de incubación para establecer las condiciones de mayor expresión de la proteína recombinante. Se estableció un protocolo para evaluar estas variables.

Protocolo

-
1. Inocular la cepa en cultivos de 25 ml de medio LBamp e incubar a 37°C y agitación (220 rpm) hasta tener una DO₆₀₀ de 0.8.
 2. Adicionar a los cultivos la cantidad de inductor a evaluar: 0.0, 0.05, 0.1, 0.5, 0.75 y 1 mM de IPTG.
 3. Colectar alícuotas de 1 ml cada 30 minutos, hasta las 5 horas de incubación después de la inducción.
 4. Obtener la biomasa de c/u de las fracciones por centrifugación a 14,000 rpm por 5 min, resuspender las células en 20 µl de agua y 5 µl de amortiguador de cargado* (condiciones reductoras) y ponerlas en un baño de agua hirviendo por 10 min.
 5. Correr geles en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) de las distintas fracciones.
*Amortiguador de cargado: Tris-HCl 0.1 M, 2-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, EDTA 5 mM, glicerol 10%, pH 7.
-

Purificación de la proteína recombinante

Extracto intracelular

A partir de las condiciones de cultivo establecidas con el ensayo anterior, se desarrolló el siguiente protocolo para la obtención del extracto intracelular de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET*bpl*, a partir de lotes de cultivo de un litro.

Protocolo

-
1. Se prepara un preinóculo (10 ml) a partir de una colonia de la cepa BL21 que contiene el plásmido pET*bpl* en medio LBamp. Se incuba toda la noche a 37°C en agitación.
 2. Se inocula, con 5 ml de preinóculo, un matraz de 2 l conteniendo 1 l de medio LBamp. Se incuba a 37°C en agitación orbital a 220 rpm.
 3. Al inicio de la fase exponencial (DO₆₀₀ de 0.6 a 0.8) se añade IPTG y se incuba bajo las mismas condiciones de acuerdo con las condiciones estandarizadas del ensayo anterior (0.5 mM, 3 h).
 4. Obtener la biomasa por centrifugación a 5,000 rpm por 15 minutos.
 5. Lavar la biomasa de 2 a 3 veces con un volumen de 500 mL de KCl al 0.15 %.
 6. Resuspender las células en 20 ml del amortiguador de sonicado (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 7.5).
 7. La muestra se somete a 8 pulsos de sonicación de 15 segundos de duración a 40-50 W de potencia.
 8. Centrifugar a 15,000 rpm por 20 min. Conservar el sobrenadante (fracción soluble) a 4°C.
-

Cromatografía de afinidad

La utilización de etiquetas de histidina en las proteínas recombinantes permite la purificación de éstas mediante una resina de níquel, metal afín a los residuos de histidina de la proteína. Para la purificación de la proteína recombinante se utilizó el equipo cromatográfico HPLC de Waters. La muestra inyectada en el equipo fue el extracto intracelular. Se siguió el siguiente procedimiento de purificación sugerido por el fabricante de la resina de afinidad (Protino[®] Ni-IDA, Macherey Nagel), con algunas modificaciones.

Protocolo

-
1. Se empacó una columna cromatográfica (Waters) con 20 ml de la resina Protino Ni-IDA. La columna se instaló debidamente en el equipo HPLC (Waters) que consiste en: controlador (600S), bomba (626), detector dual de absorbancia (2487), desgasificador en línea (AF) y colector de fracciones (III). El programa utilizado para el manejo del equipo fue el *Empower* (Waters).
 2. Se utiliza una velocidad de flujo de 2 ml/min durante toda la corrida cromatográfica, para pasar las disoluciones por la columna.

3. Se pasan 200 ml de agua destilada, 200 ml de NiSO₄ 10 mM y 200 ml del amortiguador de equilibrado (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM, pH 7.5)
4. Se inyectan 10 ml de la muestra (fracción intracelular soluble).
5. Se pasan 200 ml del amortiguador de equilibrado.

Elución de la proteína

6. Se pasa el amortiguador de elución (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, pH 7.5) de forma gradual para hacer un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM durante 90 minutos. Se recogen fracciones de 2 ml.
7. Las fracciones se analizan con geles de acrilamida.
8. Las fracciones en las que se encuentra la proteína pura (peso molecular de 21 kDa, aprox.) y en concentración considerable se colectan y dializan frente 50 volúmenes de una disolución de fosfato de potasio 20 mM pH 7.5, para eliminar los restos de imidazol.
9. La proteína pura se concentra en glicerol 50% (V/V) para su conservación a -20°C.

Regeneración de la columna

10. Se pasan 400 ml del amortiguador de regeneración (EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, pH 4), 400 ml de agua destilada y 400 ml de agua destilada con 20% de etanol.
 11. La columna se conserva a 4°C.
-

Construcción de las mutantes sitio-especificas

Diseño de los cebadores

Se diseñaron cebadores para realizar mutaciones sitio-dirigidas en el gen *bplA* clonado en el vector pET22b+ (pET*bpl*). Los cebadores sintetizados fueron F28S y R28S, para la mutante G28S; F114P y R114P, para la mutante L114P; F132D y R132D, para la mutante A132D; F166Y y R166Y, para la mutante K166Y (Tabla 5.1).

PCR

A partir de la síntesis de los cebadores previamente diseñados y con el plásmido pET*bpl* como ADN molde, se realizaron las mutaciones sitio-especificas de acuerdo al manual del *kit QuikChange*[®] (Stratagene). Se siguió el siguiente protocolo modificado de PCR:

Protocolo

Reactivos	Volumen (µL)
Amortiguador para <i>Pfu</i> 10x	5
ADN molde (pET <i>bpl</i>) (10 ng/µl)	1
Cebador F (120 ng/µl)	1
Cebador R (120 ng/µl)	1
dNTPs (2.5 mM)	1
Agua destilada	40
ADN polimerasa <i>Pfu</i> (5 U/µl)	1

Condiciones de reacción	1 ciclo	95°C / 3 min
	30 ciclos	95°C / 1 min
		48°C / 1 min
	1 ciclo	68°C / 15 min
68°C / 1 min		

Al terminar el termociclado se adicionaron 2 µl de la enzima de restricción *DpnI* (20 U/µl) para eliminar el ADN molde (no mutado) y se incubaron a 37°C por 2 h. Con estas muestras se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue de acuerdo al método descrito anteriormente. Se purificaron los plásmidos (pET*bpl*_mutante) de las células transformantes por el método de lisis alcalina descrito anteriormente, los cuales fueron secuenciados para verificar el éxito de las mutaciones. Finalmente, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos pET*bpl*_mutantes. A las células transformadas se les determinó su actividad lipolítica en medio sólido de acuerdo al método anteriormente descrito para la proteína silvestre.

Purificación

La purificación de cada una de las mutantes se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente para la proteína recombinante. Se utilizaron las mismas condiciones. La visualización de proteínas en extractos y fracciones de purificación a lo largo del presente trabajo se hizo mediante geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970).

Caracterización de la proteína silvestre y sus mutantes

La caracterización de la enzima recombinante y sus mutantes consistió en estudiar sus propiedades catalíticas y estabilidad en función de la temperatura. Para ello se determinaron las constantes catalíticas, k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m , además de las constantes de inactivación térmica (k_{ie}) y los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de cada una de las enzimas.

Termoestabilidad

Se estudió la pérdida de actividad de la enzima recombinante y sus mutantes en función del tiempo de exposición a distintas temperaturas para obtener constantes de inactivación enzimática, (k_{ie}). A partir de los datos obtenidos se calcularon la vida media de las proteínas de acuerdo a la fórmula $t_{1/2} = (\ln 2)/k_{ie}$ (ver capítulo 3). El procedimiento seguido para este estudio fue el siguiente:

Protocolo

-
1. A una celda de espectrofotómetro con 1000 μ l de la mezcla de sustrato (pNFA 500 μ M, fosfato de potasio 20 mM, tritón X100 0.1%v/v), adicionar la enzima de estudio (concentración final de 1 μ M).
 2. Medir el cambio de absorbancia a 400 nm en el tiempo contra un blanco (mezcla de sustrato sin enzima) durante un minuto (abs_{400}/min) a 30°C. Se utilizó el espectrofotómetro *CARY 400* (Varian).
 3. Calcular la actividad relativa en μ M/min (actividad inicial) con el valor de la pendiente de una curva patrón de pNF (Abs_{400}/μ M).
 4. Incubar en baño de agua a la temperatura a evaluar la enzima de estudio.
 5. A tiempos determinados, tomar una alícuota de la enzima incubada y medir su actividad relativa como en los pasos 1, 2 y 3.
 6. Graficar los valores de actividad relativa contra el tiempo. Los datos obtenidos se ajustan con el programa *Prism 4.0 for Macintosh* a la ecuación exponencial inversa $A(t)=e^{-k \cdot t}$. En donde A, es la actividad residual de la enzima al tiempo (t), y k es la constante de inactivación térmica del enzima (k_{ie}) en min^{-1} a la temperatura de estudio.
-

Parámetros cinéticos

Se determinaron los parámetros cinéticos, k_{cat} y K_m , de las enzimas puras en función de la temperatura. Estos valores se calcularon a partir de los datos aparición de producto en un curso de tiempo de la reacción de hidrólisis enzimática del sustrato. La reacción se mide hasta que la concentración de sustrato es de menos del 10% del original, lo cual suele reducir sensiblemente la velocidad de generación de producto. El análisis de la curva de progreso de la reacción fue realizado con el programa *Encora 1.2* (Willeman y col., 2000 y Straathof, 2001), el cuál puede obtenerse de manera gratuita en el sitio de Internet de la Universidad de Tecnología de Delf (<http://www.tnw.tudelft.nl>). El programa se basa en la integración numérica de la ecuación diferencial de Michaelis-Menten-Henry, por el método de Runge-Kutta. Este programa puede, de ser necesario, considerar la constante de inactivación de la enzima e incluso la hidrólisis química del sustrato haciendo un balance de materia para cada paso de integración (Straathof, comunicación personal). El procedimiento seguido para el estudio fue el siguiente:

Protocolo

-
1. A una celda de espectrofotómetro con 1000 μl de la mezcla de sustrato (pNFA 500 μM , fosfato de potasio 50 mM, tritón X-100 1%v/v pH 7.5) preincubada a la temperatura de estudio, adicionar la enzima a evaluar (concentración final de 1 μM).
 2. Medir el cambio de absorbancia a 400 nm en el tiempo ($\text{Abs}_{400}/\text{min}$) contra un blanco (fosfato de potasio 50 mM, tritón X-100 1%v/v pH 7.5) a la temperatura de estudio hasta un consumo mayor al 90% del sustrato. Se utilizó el espectrofotómetro *CARY 400* (Varian).
 3. A partir de los datos anteriores, calcular la producción de producto (pNF) y el consumo de sustrato (pNFA) en el tiempo con el valor de la pendiente de una curva patrón de pNF ($\text{abs}_{400}/\mu\text{M}$).
 4. Alimentar con los datos anteriores al programa *Encora 1.2* para el cálculo de los valores de k_{cat} y K_m . Tomar en cuenta las constantes de inactivación térmica (k_{ic}) de la enzima y de hidrólisis del sustrato (k_{ds}) a la temperatura de estudio.
 5. Graficar los valores de k_{cat} y K_m contra la temperatura.
-

Capítulo 6. Resultados y Discusión

Reactivación de la cepa de *B. pumilus* GMA1 y extracción de su ADN cromosómico

La cepa de *Bacillus pumilus* GMA1, conservada en glicerol (50% v/v) a -20°C, se sembró en una placa con agar LB a 37°C por 24 h. Se obtuvieron varias colonias aisladas las cuales demostraron ser bacilos Gram+ de acuerdo a la tinción de Gram (Figura 6.1A). A partir de dos colonias distintas se purificó el ADN cromosómico de acuerdo a la metodología descrita. El ADN de la muestra “A” parece estar íntegro y con buena pureza de acuerdo a un gel de agarosa al 1% (Figura 6.1B), por lo que se utilizó para ensayos posteriores.

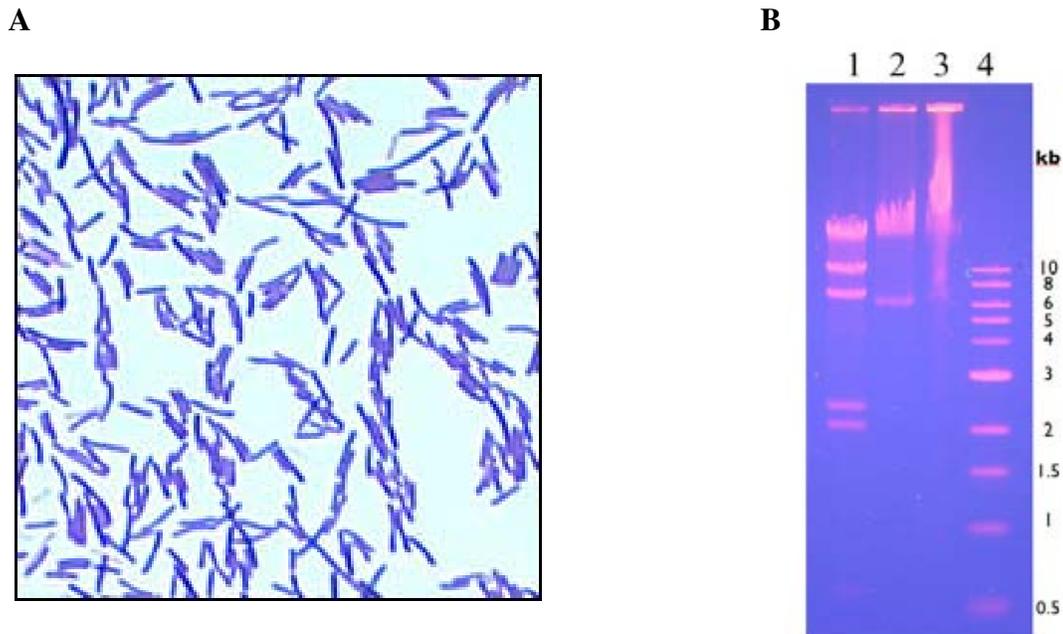


Figura 6.1.A) *Bacillus pumilus* GMA1, bacilos Gram +. **Objetivo 100x.** **B)** ADN genómico de *B. pumilus* GMA1. Carriles 1 y 4, marcador de peso molecular; carriles 2 y 3, muestras A y B, respectivamente.

Amplificación del gen *bplA* por PCR

A partir del ADN cromosómico de *B. pumilus* GMA1 se amplificó el gen correspondiente a su lipasa (*bplA*) con los cebadores FBPNDE y RBPXHO (Tabla 5.1) de acuerdo al protocolo de amplificación descrito en la metodología. Se obtuvo la amplificación de un producto de aproximadamente 560 pb, lo cual concuerda con el peso esperado para el gen *bplA* (Figura 6.2).

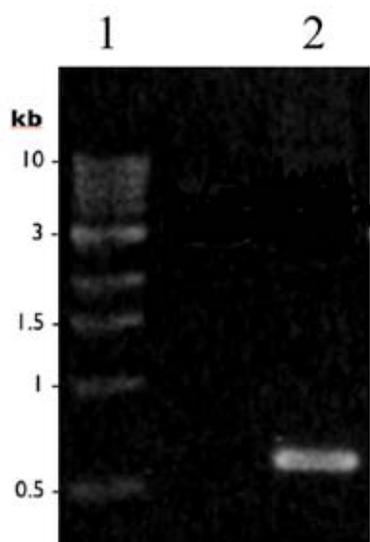


Figura 6.2. Amplificación del gen *bplA* (560 pb) por PCR. Carril 1, marcador de pesos moleculares; carril 2, producto amplificado.

Clonación del gen *bplA* en el vector pGEM-T

El producto de amplificación (*bplA*) de la PCR se incorporó en el sitio de clonación del vector pGEM-T de acuerdo a las instrucciones del fabricante (*kit pGEM[®]-T Easy Vector System*). El gen *bplA* queda flanqueado por los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*. El producto de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* XL1-Blue. A partir de estas células se purificó plásmido con el sistema *QIAprep[®] Spin, Miniprep Kit 250*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para los ensayos posteriores.

Digestión del plásmido pG**bp**l con *Eco*RI

Se verificó la incorporación del gen *bplA* en el vector mediante una digestión con la enzima de restricción *Eco*RI, teniendo en cuenta que el sitio de clonación del vector pGEM-T está flanqueado por sitios de restricción de *Eco*RI y que el gen *bplA* no contiene dicha secuencia (Bustos, 1998). El protocolo de la digestión está descrito en la metodología. El resultado fue satisfactorio ya que la electrofóresis reveló la presencia de un inserto de aproximadamente 560 pb, correspondiente al gen *bplA*. (Figura 6.3). A este plásmido se le denominó pG**bp**l.

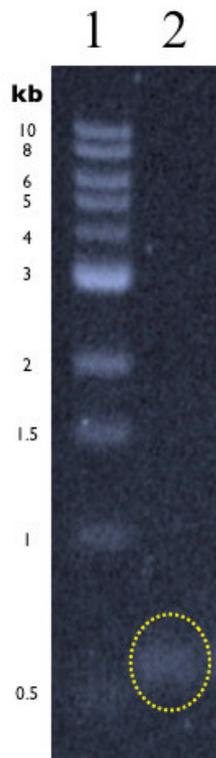


Figura 6.3. Digestión del plásmido pGbp**l. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, digestión de la muestra con *Eco*RI. Se señala en un círculo la banda correspondiente al inserto (gen *bplA*, 560 pb, aprox.).**

Digestión del plásmido pG**bp**l con *Nde*I/*Xho*I

El plásmido pG**bp**l fue digerido con las enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I. Se realizaron tres reacciones de acuerdo al protocolo descrito en la metodología, la primera reacción sólo

con la enzima *NdeI*, la segunda con *XhoI* y la tercera con ambas enzimas. El resultado de la digestión con la enzima *NdeI* generó un solo inserto de un peso molecular mayor al del gen *bplA*, de 560 pb, lo cual se esperaba ya que el vector pGEM-T por si solo tiene un sitio de restricción para *NdeI*, por lo que en la digestión con esta enzima el inserto conserva un fragmento del vector de clonación siempre que ellos sitios *NdeI* del vector y del inserto no se encuentren del mismo lado (Figura 6.4, carril 1). La digestión con la enzima *XhoI* no muestra el fragmento correspondiente al gen *bplA*, sino únicamente el plásmido en forma lineal, lo cual se esperaba ya que sólo hay un sitio de restricción para esta enzima (Figura 6.4, carril 2). Finalmente, la digestión con ambas enzimas *NdeI/XhoI* muestra la presencia del inserto de 560 pb, aprox., correspondiente al gen *bplA* (Figura 6.4, carril 3). El resultado satisfactorio de las tres reacciones fue una prueba importante para suponer la conservación de los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' del gen *bplA*, respectivamente. Para corroborar la identidad del inserto éste fue secuenciado.

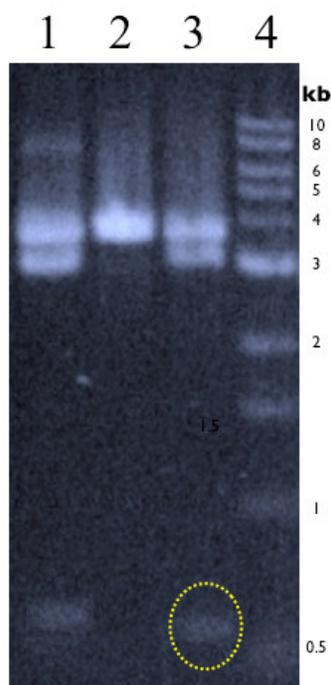


Figura 6.4. Digestión del plásmido pG*bpl***.** Carriles 1, 2 y 3, digestión de la muestra con *NdeI*, *XhoI* y *NdeI/XhoI*, respectivamente; carril 4, marcador de peso molecular. Se señala en un círculo la banda correspondiente al inserto (gen *bplA*, 560 pb, aprox.).

Clonación del gen *bplA* en el vector pET22b+

El gen *bplA* fue clonado en el vector pET22b+: Los plásmidos pET22b+ y p*Gbpl* fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* de acuerdo a los protocolos establecidos en la metodología. A partir del plásmido p*Gbpl*, se purificó el gen *bplA* con el sistema *QIAquick*[®] *Gel Extraction Kit*. La unión entre el gen *bplA* y el vector pET22b+ se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de ligación establecido en la metodología. El producto de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* XL1-Blue. A partir de estas células se purificó plásmido para ensayos posteriores.

Digestión del plásmido pET*bpl* con *NdeI*, *XhoI* y *NdeI/XhoI*

Se verificó la incorporación del gen *bplA* en el vector mediante una digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, teniendo en cuenta que el gen *bplA* está delimitado por estos sitios de restricción. El protocolo de la digestión está descrito en la metodología. El resultado fue satisfactorio ya que la electroforesis reveló la presencia de un inserto de 560 pb, aprox., correspondiente al gen *bplA*. (Figura 6.5). A este plásmido se le denominó pET*bpl*.

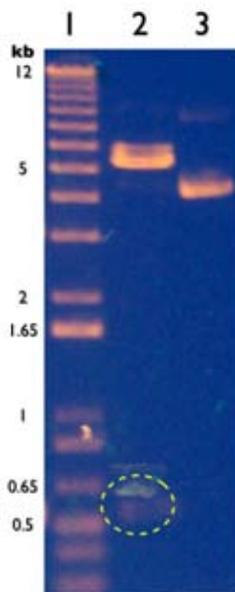


Figura 6.5. Digestión del plásmido pET*bpl*. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 y 3, plásmido digerido con *NdeI/XhoI* y sin digerir, respectivamente. Se señala en un círculo la banda correspondiente al inserto (gen *bplA*, 560 pb, aprox.).

Actividad lipolítica en medio sólido

El plásmido pET*bpl* se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* BL21 (DE3), que es finalmente la cepa encargada de la expresión del gen. Las células transformantes se sembraron en una placa de agar LB con tributirina (0.5 %) e IPTG (0.05 mM). Después de una incubación a 37°C por 20 h se observaron halos de lisis alrededor de las colonias que crecieron en la placa (Figura 6.6A). Como control negativo, se sembraron en una placa similar células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET22b+ y se incubaron bajo las mismas condiciones. Las colonias resultantes no presentaron halos de lisis sobre el agar (Figura no mostrada). Lo anterior describe una prueba contundente de actividad lipolítica conferida a las células de *E. coli* por el gen *bplA*.

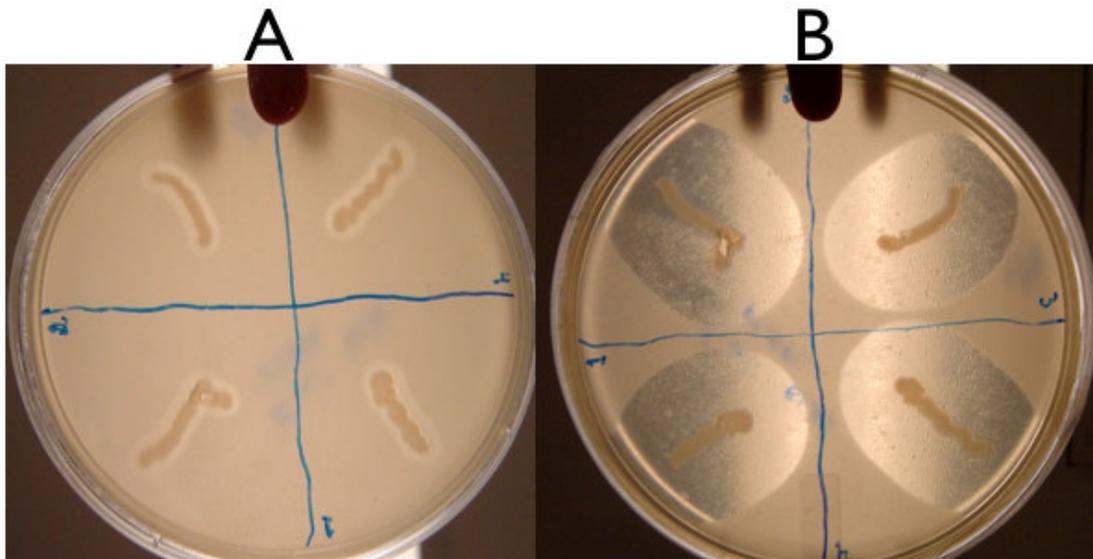


Figura 6.6. A) Halos de lisis sobre las placas de agar LB con tributirina producidos por células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET*bpl* después de 12 h de incubación a 37°C, B) misma placa después de 18 h de conservación a 4°C.

Se observó además, que los halos de lisis producidos por las células transformadas con pET*bpl* crecen con el tiempo aún si las placas son conservadas en refrigeración (4°C) hasta el consumo total de la tributirina (Figura 6.6B). Esto en primera instancia fue interpretado como un escape de la enzima lipolítica de las células, en este caso la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1 (BplA-r). Sin embargo, durante la producción de la enzima en medio LB líquido, se confirmó por ensayos de actividad lipolítica a las distintas fracciones

(medio de cultivo, fracción soluble e insoluble de las células) que la BplA-r se conserva casi en su totalidad (>98%) en la fracción soluble de las células, por lo que, al menos en cultivo líquido, no es hay un escape significativo de BplA-r hacia el medio. Tomando en cuenta los hechos anteriores, la purificación de la proteína recombinante se hizo a partir de la fracción celular y no del medio de cultivo.

Condiciones de expresión de la proteína recombinante

Para sobre-expresar la BplA-r en células de *E. coli* transformadas con el plásmido pET*bpl* se evaluaron distintas condiciones de cultivo en las que se varió la concentración del inductor (IPTG) y el tiempo de incubación después de la inducción. El procedimiento desarrollado se describe en la metodología. Los resultados obtenidos mostraron que una concentración final en el medio de 0.5 mM de IPTG y 3 h de incubación a 37°C después de la inducción produce la mayor expresión de proteína recombinante (Figura 6.7A). Sin IPTG en el medio de cultivo, la proteína recombinante simplemente no se expresa (Figura 6.7B).

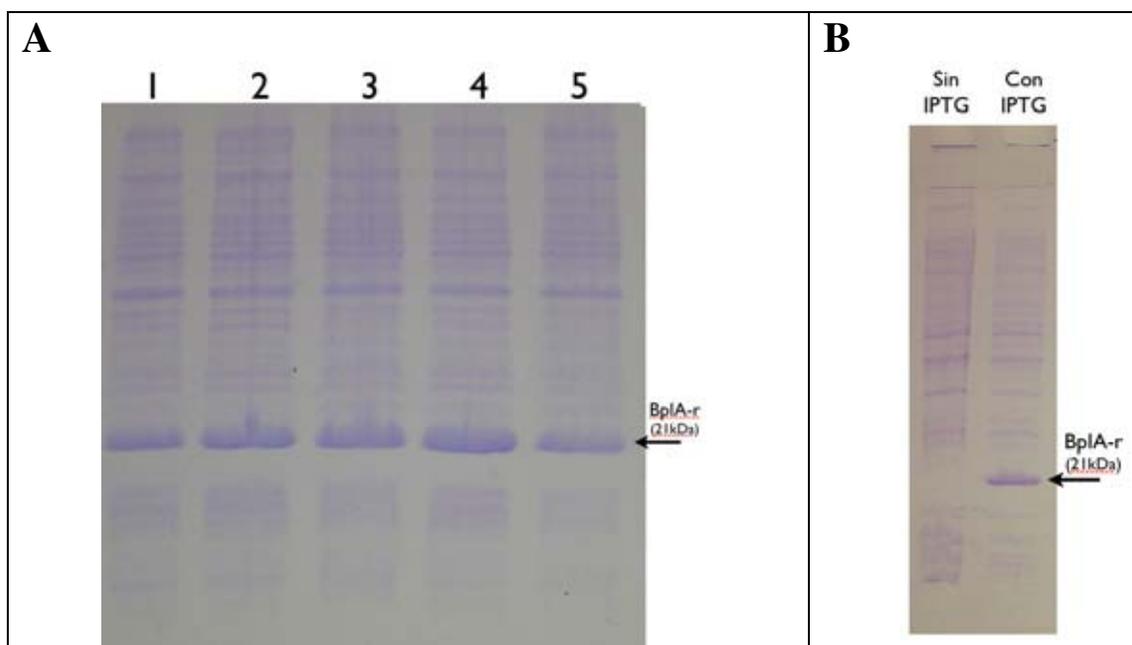


Figura 6.7. A) Gel PAGE-SDS con algunas de las muestras del ensayo para establecer las condiciones de mayor expresión de la BplA-r. Las condiciones que se evaluaron son la concentración de inductor y el tiempo de incubación a 37°C después de inducir: carril 1, 0.1 mM y 3 h; carril 2, 0.5 mM y 1.5 h; carril 3, 0.5 mM y 2 h; carril 4, 0.5 mM y 3 h; carril 5, 1 mM y 3 h. B) La proteína recombinante en ausencia de IPTG no se expresa.

Purificación de la proteína recombinante (cromatografía de afinidad)

La fracción soluble (15 ml) de un lote de cultivo de un litro de la bacteria recombinante, se inyectó en una columna de afinidad para etiquetas de histidinas en dos partes, para no sobrepasar la capacidad de la columna. La columna fue previamente equilibrada con una disolución amortiguadora. Después de inyectar la muestra se lavó la columna pasando tres volúmenes de columna de la disolución amortiguadora. La proteína unida en la matriz de afinidad se eluyó de la columna con un gradiente creciente de imidazol (de 20 a 500 mM)., En los cromatogramas se nota un aumento gradual en la absorbancia a 280 nm durante el gradiente de imidazol debido a la capacidad de éste de absorber luz UV. Los detalles del procedimiento de la purificación están en la metodología. El resultado obtenido fue que a una concentración menor de 250 mM de imidazol, la proteína unida a la matriz es completamente eluida de la columna (Figura 6.8).

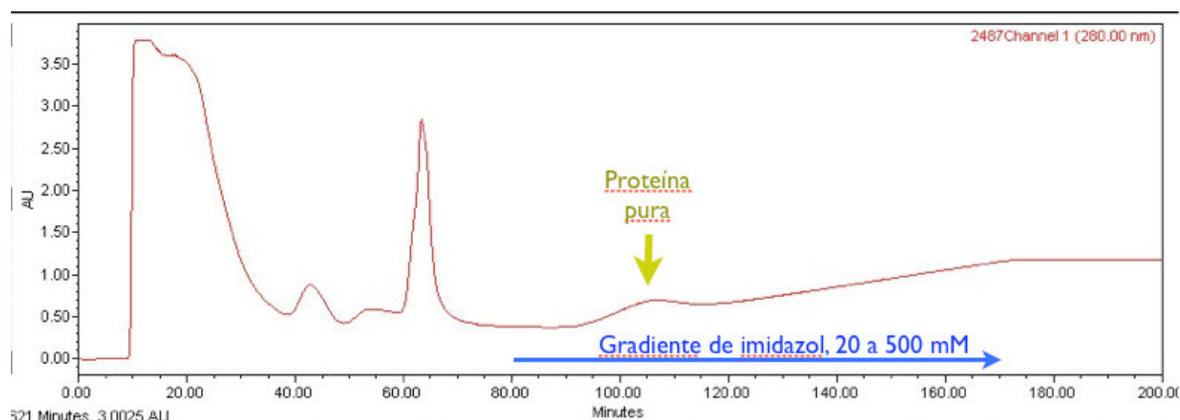


Figura 6.8. Cromatograma de la purificación de BpIA-r por columna de afinidad (Ni). HPLC (Waters); columna 1.1 x 16.4 con resina Protino Ni-IDA (Sigma); velocidad de flujo de 1 ml/min, a temperatura ambiente (~22°C); gradiente de elución, 20 a 500 mM de imidazol en 90 min. El gradiente se llevó a cabo mediante la combinación de las disoluciones A y B. A, amortiguador de equilibrado (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM, pH 7.5), y B, amortiguador de elución (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, pH 7.5).

La proteína fue analizada por PAGE-SDS para seguir la presencia de la misma en todas las etapas de la purificación. Los resultados mostraron que cierta cantidad de BpIA-r se pierde en la fracción insoluble de las células (precipitado del sonicado). También se pierde proteína recombinante en el frente de elución posiblemente debido a interacciones

inespecíficas de la proteína con etiqueta de histidinas con otros componentes celulares. Aún así se obtuvo un rendimiento de 45.6 % de BplA-r pura. En el caso de las mutantes los rendimientos fueron similares excepto para la mutante L114P que, como se mencionó anteriormente, presenta una expresión menor a la del resto de las formas de la enzima (Tabla 6.1).

Conservación de la proteína pura

Las fracciones de la elución con la proteína recombinante pura se colectaron y dializaron contra 250 volúmenes de un amortiguador de fosfato de potasio 20 mM pH 7.5 para quitar el exceso de imidazol. Posteriormente, la muestra se concentró hasta el 50% de su volumen en glicerol puro mediante una membrana de diálisis. La proteína se conservó a -20°C. El grado de pureza de la proteína después de todo el proceso de purificación es grande como se observó cualitativamente por PAGE-SDS.

Construcción de las mutantes sitio-específicas

La construcción de las mutantes G28S, L114P, A132D y K166Y de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 se llevó a cabo partiendo del gen *bplA* clonado en el vector pET22b+. Se diseñaron los cebadores adecuados para cada mutación (Tabla 5.1) y se utilizó el plásmido pET*bpl* como ADN molde para hacer la mutagénesis sitio-dirigida. Los protocolos de amplificación para cada mutante se muestran en la metodología. Con el producto de las reacciones de PCR se transformaron células competentes de *E. coli* XL1-Blue. A partir de estas células transformadas se purificaron los plásmidos con el sistema *QIAprep[®] Spin, Miniprep Kit 250*, los cuales fueron secuenciados para verificar el éxito de las mutaciones. A estos plásmidos se les denominó pET*bpl*_G28S, pET*bpl*_L114P, pET*bpl*_A132D y pET*bpl*_K166Y.

De igual forma que con el plásmido pET*bpl*, los plásmidos de las mutantes se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3). Se evaluó la actividad lipolítica en medio sólido y los perfiles electroforéticos de proteínas de cada una de estas cepas (Figura 6.9). En estos primeros resultados se observó que la mutante L114P presenta un halo de lisis más pequeño sobre el agar LB con tributirina (Figura 6.9A) y una menor expresión de proteína

de acuerdo a una electroforesis en gel de agarosa (Figura 6.9B). Aparentemente, el cambio en el residuo 114 repercute en la actividad y expresión de la enzima.

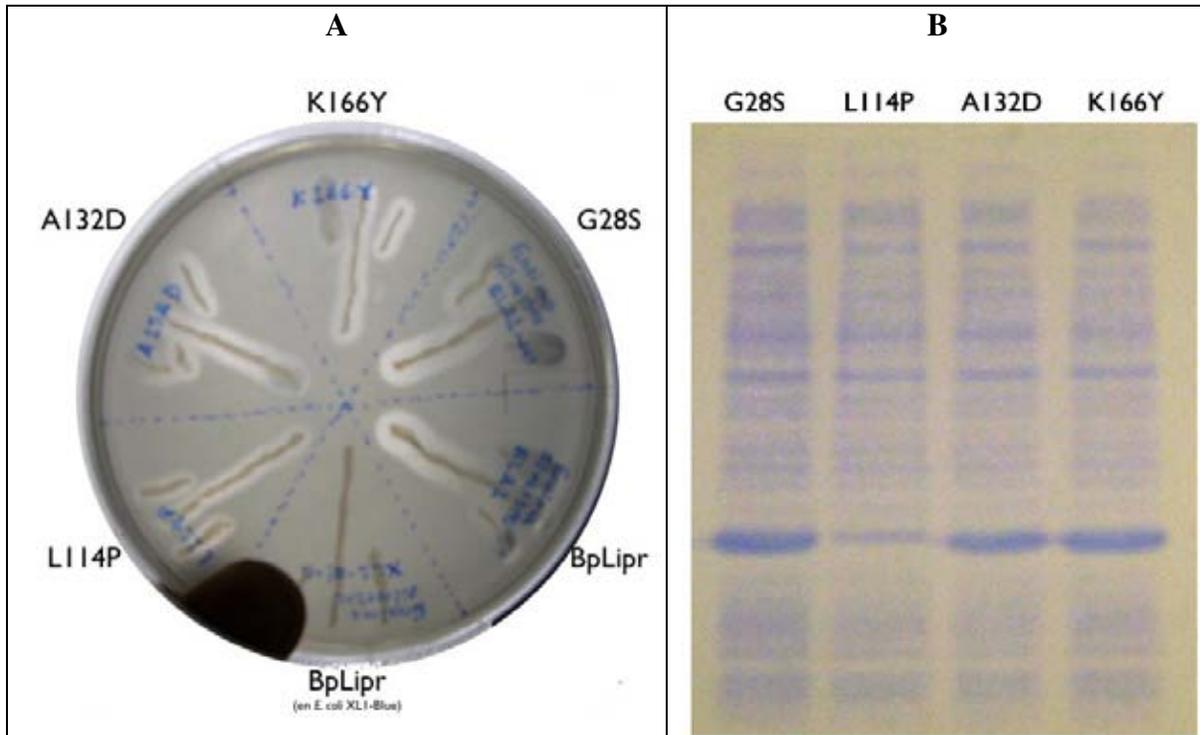


Figura 6.9. Propiedades de las mutantes de la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1: A) actividad lipolítica en medio sólido y B) perfil electroforético.

Purificación

La purificación de las mutantes se llevó a cabo utilizando el mismo método que para la BpLA-r. Al igual que con la BpLA-r, en el caso de las mutantes de BpLA-r se obtuvo una sola especie electroforética (Figura 6.10).

Se midió la concentración de proteína y actividad específica en cada una de las etapas de la purificación de la enzima silvestre y las mutantes para determinar los rendimientos durante todo el proceso. Estos valores se encuentran resumidos en la tabla 6.1.

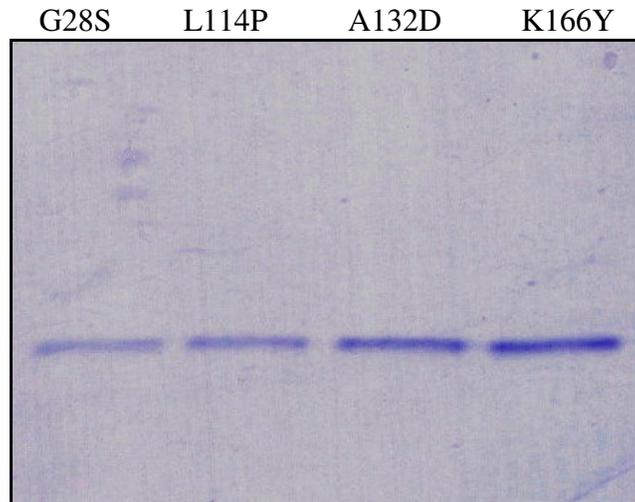


Figura 6.10. Forma pura de las mutantes G28S, L114P, A132D y K166Y.
Gel PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie. Fracciones purificadas por columnas de Ni (Protino) y dializadas contra un amortiguador de fosfatos para la eliminación del imidazol.

Tabla 6.1. Tabla de purificación de la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1 y sus mutantes.

		PROTEINA (totales)			ENZIMA			Rendimiento	Factor de purificación
		Vol.	Conc.	Proteína total	Actividad volumétrica	Actividad específica	Actividad total		
Etapas	Enzima	ml	mg/ml	mg	U/ml	U/mg	U	%	
Extracto crudo (Sonicado)	BpIA-r	16	36.74 ± 1.5	587.8	668 ± 30	18.2	10698	100	1
	G28S	16	34.45 ± 0.2	551.2	3897 ± 30	113.0	62286		
	L114P	16	31.54 ± 3.0	504.6	199 ± 30	6.3	3179		
	A132D	16	87.38 ± 0.3	1398.1	1433 ± 30	16.4	22929		
	K166Y	16	46.33 ± 0.3	741.3	1622 ± 30	35.0	25946		
Fracción soluble: sobrenadante del sonicado	BpIA-r	15	15.07 ± 0.3	226.1	444 ± 30	29.5	6670	62.4	1.6
	G28S	15	9.72 ± 0.2	145.8	2640 ± 50	271.6	39600	63.5	2.4
	L114P	15	8.28 ± 0.3	124.2	116 ± 20	14.0	1739	55.1	2.2
	A132D	15	2.13 ± 0.2	179.7	1053 ± 50	87.9	15796	68.9	5.3
	K166Y	15	9.45 ± 0.2	141.7	1206 ± 20	127.6	18081	69.7	3.6
Proteína pura dializada y concentrada en glicerol	BpIA-r	20	2.04 ± 0.2	40.8	244 ± 20	119.6	4880	45.6	6.6
	G28S	40	1.56 ± 0.2	62.4	580 ± 30	371.8	23200	37.2	3.3
	L114P	17	2.18 ± 0.3	37.1	43 ± 10	19.7	731	22.9	3.1
	A132D	45	1.38 ± 0.1	62.1	179 ± 10	129.7	8054	35.1	7.9
	K166Y	32	1.51 ± 0.1	48.3	331 ± 20	219.3	10592	40.8	6.2

* Se define una unidad enzimática (U), como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de pNF por minuto.

Una de las ideas de tener clonada una proteína particular, en este caso una lipasa, en una cepa de *E. coli* además de facilitar el proceso de purificación, tiene como objetivo el poder producir cantidades superiores a los que produciría la cepa original, en este caso *B. pumilus* GMA1. La purificación de BplA a partir de este microorganismo en la actualidad no se ha podido llevar a cabo con un buen rendimiento. En el trabajo de Wong (2001), se describe un procedimiento para la purificación de BplA a partir de un extracto celular de *B. pumilus* GMA1 por columnas de filtración e intercambio iónico. Además de describir un procedimiento complicado, la poca selectividad de las cromatografías utilizadas les resultó en la imposibilidad de obtener la enzima pura, simplemente obtuvieron una muestra semipura de BplA (1.18 U/mg) que resultó en un rendimiento muy pobre (0.114 mg por litro de cultivo). En contraste, en el procedimiento de purificación a partir de células de *E. coli* del presente trabajo se obtienen muestras puras de BplA (119.6 U/mg) además de tomar en cuenta la sencillez y rapidez que la cromatografía de afinidad representa. Lo anterior se traduce en la obtención de 40.8 mg de proteína pura a partir de un lote de cultivo de 1 litro (Tabla 6.1), lo que representó suficiente proteína para la realización de toda la caracterización hecha en este trabajo.

Caracterización de la proteína recombinante y sus mutantes

La caracterización de BplA-r y sus mutantes consistió en el estudio de las propiedades catalíticas a través de las constantes cinéticas, k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m , así como la termoestabilidad a través de las constantes de inactivación térmica (k_{ie}) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de cada una de las enzimas a diferentes temperaturas.

Termoestabilidad

Se determinaron las constantes de inactivación térmica (k_{ie}) de BplA-r y sus mutantes mediante la medición de la actividad hidrolítica hacia el pNFA de acuerdo al procedimiento descrito en la metodología. La actividad de las enzimas se siguió por 180 min o hasta una pérdida mayor al 80% de su actividad inicial. Las temperaturas que se evaluaron fueron 20, 25, 30, 35 y 40°C. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación exponencial inversa $A(t)=e^{-k \cdot t}$ (Figura 6.11). En donde A, es la actividad residual de la enzima al tiempo (t), y k

es la constante de inactivación térmica del enzima en min^{-1} a la temperatura de estudio (k_{ie}). La Figura 6.12, muestra las tendencias ascendentes en las k_{ie} de todas las proteínas con el aumento de la temperatura. Las vidas medias de las proteínas a distintas temperaturas (Tabla 6.2) se calcularon a partir de los valores de las constantes de inactivación térmica, con la fórmula $t_{1/2} = \ln 2 / k_{ie}$ (ver Capítulo 3).

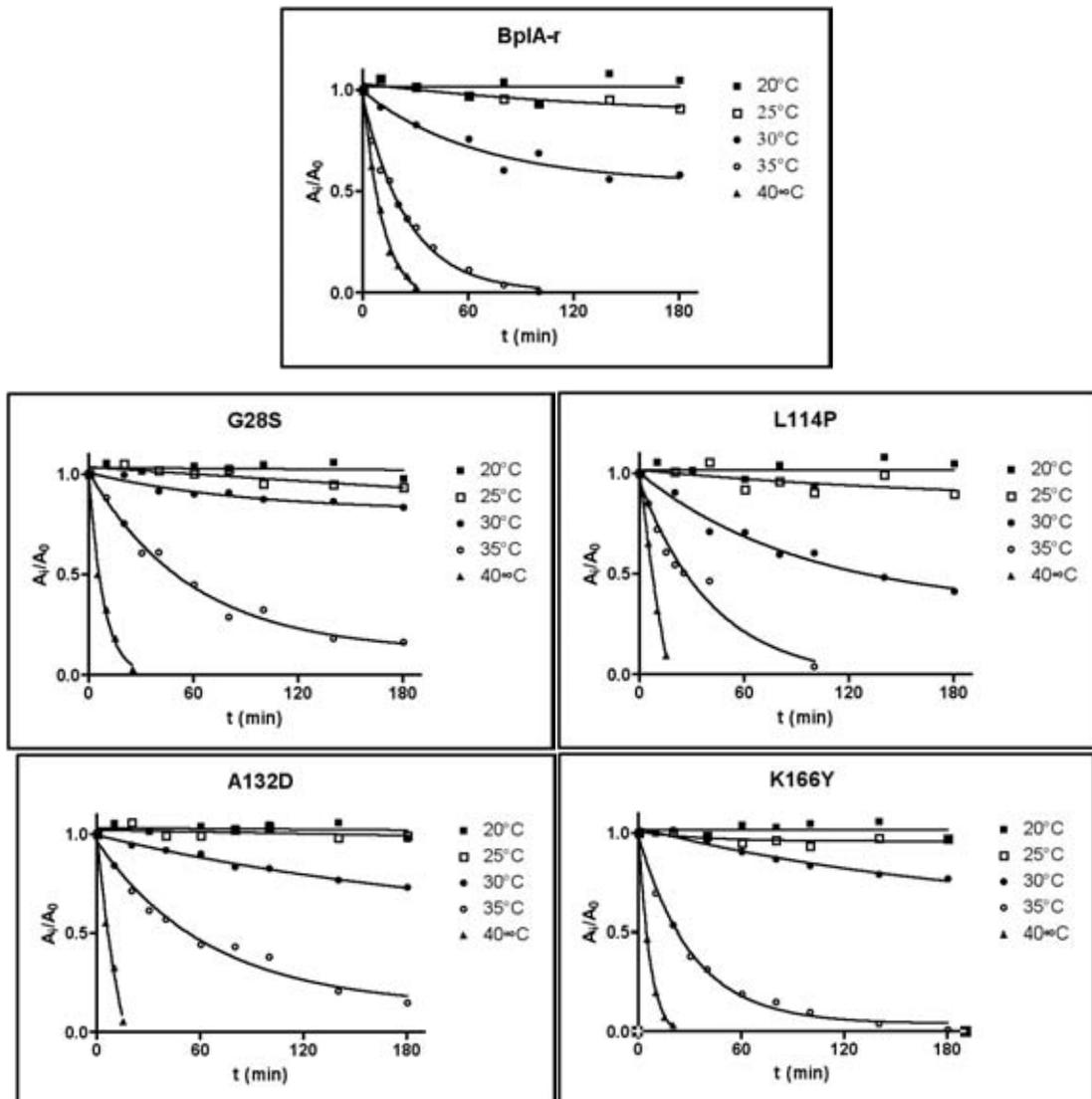


Figura 6.11. Termoestabilidad de BpIA-r y sus mutantes a distintas temperaturas.

No se pudieron estudiar temperaturas mayores a 40°C debido a que las enzimas se inactivan casi de forma inmediata. Cabe resaltar que aunque se ha reportado una temperatura óptima de hidrólisis de 50°C para BplA (Bustos 1995; Wong 2001) hay que considerar que esos estudios se realizaron a partir de extractos de *Bacillus pumilus* GMA1 y no de la proteína recombinante pura de este. Estos hechos ponen sin duda en discusión el carácter termófilo de esta enzima, la cual se asumía con una mayor capacidad hidrolítica a una temperatura alrededor de los 50°C. Sin embargo dichos ensayos se realizaron a tiempos cortos y fijos sin considerar la estabilidad de la enzima. Aunque no se encuentra entre los objetivos del presente trabajo, sería interesante considerar estudios de plegamiento y desplegamiento por DC y Fluorescencia para verificar la integridad de la proteína a esas temperaturas y obtener información que correlacione con estos resultados.

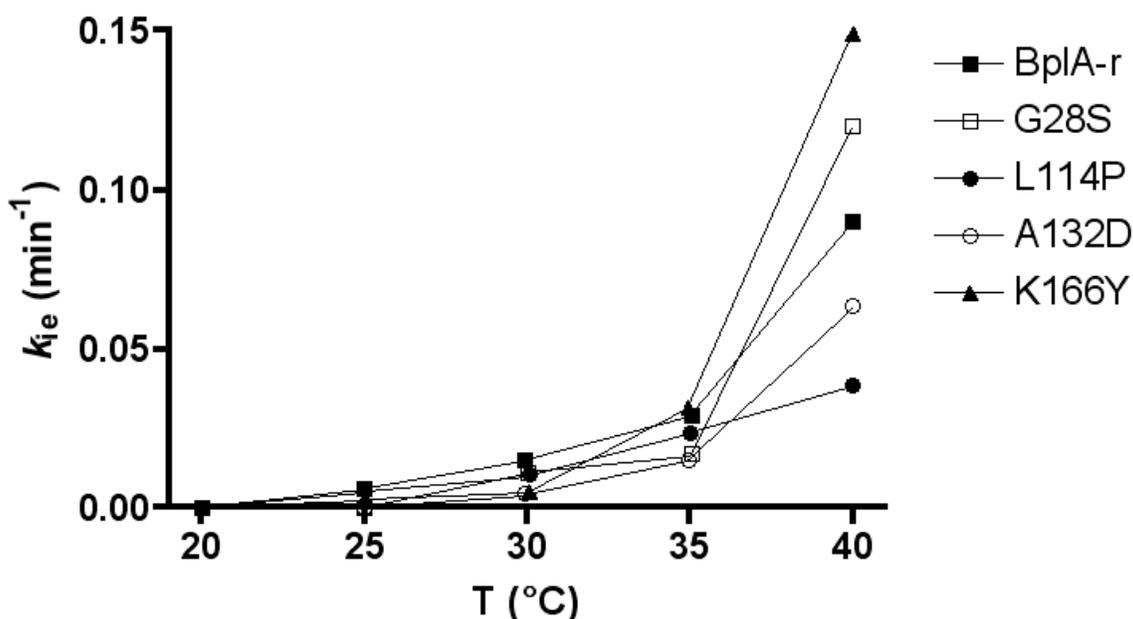


Figura 6.12. Gráfico de las constantes de inactivación térmica (k_{ie}) de BplA-r y sus mutantes a distintas temperaturas.

Tabla 6.2. Vida media ($t_{1/2}$) de BplA-r y sus mutantes a distintas temperaturas.

Enzima	$t_{1/2}$ (min)				
	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
BplA-r	9120.4	112.3	45.5	23.8	7.7
G28S	23104.9	2840.8	61.8	41.0	5.8
L114P	7701.6	131.9	66.8	29.4	17.9
A132D	23901.6	18240.7	160.0	45.8	10.9
K166Y	17328.7	251.0	136.8	21.9	4.6

Los valores se calcularon con la formula $t_{1/2}=\ln 2/k_{ie}$ a partir de las k_{ie} de la figura 6.12.

En general, todas las mutantes se muestran más estables que BplA-r en el rango de 20 a 40°C con algunas excepciones particulares. Por ejemplo, las mutantes G28S y K166Y son estabilizantes pero sólo en una parte del rango de temperaturas evaluadas, observándose que para G28S el efecto estabilizador se pierde a 40°C, mientras que para K166Y un efecto desestabilizador se observa desde los 35°C. Los resultados en general se muestran un poco inconsistentes, ya que mientras algunas mutaciones se muestran como buenos estabilizadores en ciertos rangos de temperatura a otras temperaturas ya no lo son tanto, sino es que incluso resultan hasta desestabilizantes (Figura 6.12 y Tabla 6.2). En la Figura 6.12, además se observa que a las temperaturas de 20 y 25°C no hay muy buenos ajustes a la ecuación exponencial inversa debido a la gran estabilidad de las enzimas a esas temperaturas, por lo que los valores de las k_{ie} y $t_{1/2}$ no necesariamente representan valores muy acertados bajo esas condiciones. Se realizaron gráficos de Arrhenius con los valores de las k_{ie} ($\ln k_{ie}$ contra $1/T$), y como se esperaba todas las enzimas muestran un comportamiento lineal solamente si se descartan las temperaturas de 20 y 25°C, las cuales como se había dicho pueden tener valores de k_{ie} muy inciertos.

Las mutaciones L114P, A132D y K166Y, en general resultaron ser estabilizadoras, sin embargo la contribución que tuvieron en la estabilidad de BplA-r, no fue de una magnitud semejante a la que se reporta en LipA (Acharya y col., 2004). Cabe señalar que ambas enzimas se han purificado a partir de un vector equivalente (pET21b para LipA) clonado en células de *E. coli* BL21 (DE3). A pesar de que BplA-r conserva los residuos responsables de las interacciones adicionales proporcionados por estas mutantes discutidas en el capítulo 3, esta enzima no es estabilizada en forma similar a su homóloga en LipA. Por ejemplo, en

LipA, las mutaciones L114P, A132D y N166Y aumentan su vida media en 7.5, 2.5 y 10 veces a 55°C, respectivamente (Tabla 2.1). Mientras que en BplA-r, ninguno de estos cambios aumenta mas de 3.5 veces su $t_{1/2}$, incluso cuando se evaluaron a temperaturas menores (Tabla 6.2). Sólo se observa una excepción para la mutante A132D a 25°C, en donde hay un aumento en $t_{1/2}$ de 162 veces. Sin embargo, como se había dicho anteriormente, los datos de todas las mutantes a esa temperatura no mostraron buenos ajustes a la ecuación utilizada debido a que el cambio en la actividad de la enzima fue marginal en el tiempo del estudio (Figura 6.11), por lo que el cálculo de las k_{ie} y por ende de las $t_{1/2}$ podrían no ser muy precisas. Los resultados de estabilidad obtenidos para BplA-r sugieren que las mutaciones proporcionan interacciones adicionales a las discutidas en el capítulo 3 que no pueden ser descritas exclusivamente por el modelo cristalográfico de las mutantes en LipA como lo reporta Acharya y col. (2004).

En relación a la mutante G28S, ésta resultó ser menos estable que la BplA-r a la temperatura de 40°C. Esto viene a confirmar algo de lo que se esperaba de esta mutante, la cual fue construida precisamente para disminuir esa propiedad. Aunque esta mutante se muestra estabilizada de 20 a 35°C, a la temperatura de 40°C ya no lo es así. En esta mutante también se observa un aumento en la $t_{1/2}$ de 25 veces a 25°C (Tabla 6.2), dato que como se había discutido anteriormente se tiene que tomar bajo reservas. La Tabla 2.1 muestra que BplA presenta su máxima actividad hidrolítica a 50°C. Sin embargo los autores de ese trabajo no estudiaron la estabilidad de la enzima por lo que no se puede discutir al respecto. La enzima recombinante, en contraste a lo reportado previamente, resultó ser poco estable a altas temperaturas. Cabe mencionar que los ensayos de actividad con la enzima silvestre fueron hechos con extractos enzimáticos no puros y que el método de medición fue diferente (caída de pH por la acción hidrolítica de la enzima) y utilizando un sustrato muy diferente (tributirina en emulsión). La diferencia entre los perfiles de actividad en función de la temperatura, como se mencionó anteriormente, no necesariamente están asociados a un aumento en la k_{cat} de la enzima, sino al conjunto de relaciones afectadas por la temperatura, como son k_{cat} , K_m y estabilidad de la enzima. Es probable además, como se ha observado con otras enzimas, que el sustrato estabilice a la enzima haciendo variar su perfil de actividad con la temperatura. Recordemos que en nuestro caso estamos usando

pNFA, que es relativamente pequeño y hasta hidrófilo comparado con la tributirina, por lo que las interacciones enzima-sustrato son necesariamente muy distintas para cada sustrato. Finalmente debemos mencionar que en este caso no estamos utilizando la enzima silvestre, sino una enzima recombinante que tiene algunos residuos de aminoácido adicionales en sus extremos N- y C-terminales. No creemos que estos residuos sean capaces de cambiar tan drásticamente la estabilidad de la enzima pero no podemos descartarlo.

Parámetros cinéticos

Se determinaron los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m de BplA-r y sus mutantes a distintas temperaturas (Figura 6.13). A partir de estos valores se calculó la eficiencia catalítica de cada una de las enzimas a las distintas temperaturas estudiadas (Figura 6.14). Las temperaturas que se evaluaron fueron 20, 25, 30, 35 y 40°C. Al igual que en los estudios de estabilidad, no se pudo estudiar temperaturas mayores a 40°C debido a que las enzimas se inactivan casi de inmediato, además de que la mezcla del sustrato se torna turbia.

La determinación de las constantes cinéticas no se llevo a cabo por métodos tradicionales en los que se mide velocidades iniciales de reacción a distintas concentraciones de sustrato, sino que se obtuvieron a partir de curvas de progreso de la reacción de hidrólisis hasta el consumo casi total del sustrato (pNFA). El consumo de pNFA y la producción de pNF a lo largo de la reacción fueron determinados a partir de la pendiente de una curva patrón de pNF. Estos datos fueron utilizados para alimentar el programa *Encora 1.2* (Straathof, 2001), él cual los ajusta para obtener las constantes k_{cat} y K_m como se discute en la metodología. En la Figura 6.15, se muestra un ejemplo de uno de los ajustes hechos con el programa para el caso de la mutante L114P a 20°C.

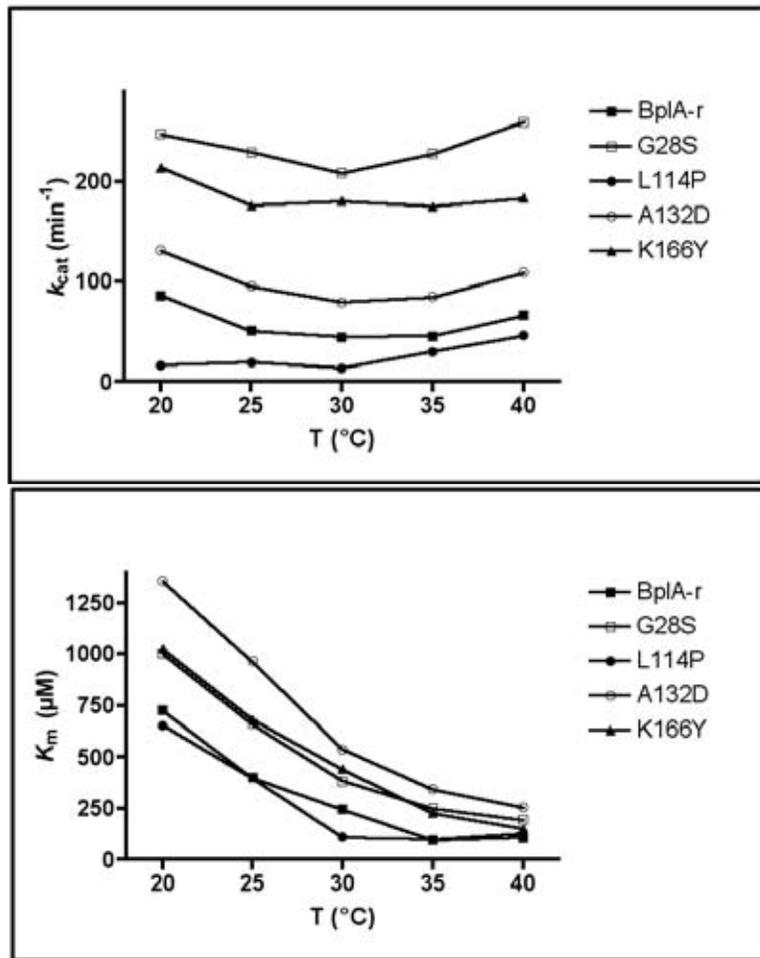


Figura 6.13. Gráfico de los valores de k_{cat} y K_m de BplA-r y sus mutantes a distintas temperaturas.

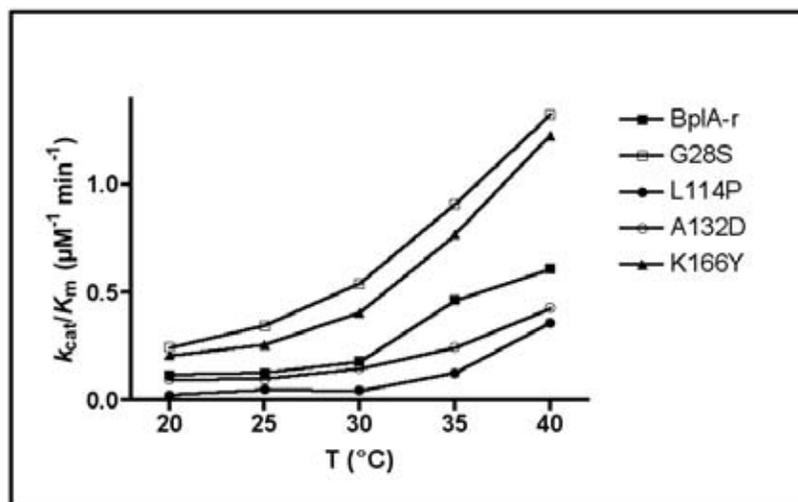


Figura 6.14. Eficiencia catalítica (especificidad) de BplA-r y sus mutantes a distintas temperaturas.

Para ajustar los datos en la reacción de hidrólisis de BpIA-r se consideró un mecanismo simple, en el cual se tiene un sustrato (pNFA) y un solo producto (pNF), aunque en realidad hay una molécula de agua que participa en la reacción de hidrólisis y los productos son un ácido y un alcohol, la estequiometría entre pNFA:pNF es 1:1. También se consideró irreversible el paso de pNFA→pNF, debido a que la reacción de hidrólisis en medio acuoso es esencialmente irreversible. En el ajuste se consideraron también la hidrólisis no-enzimática del sustrato y la inactivación térmica de la enzima. El posible error introducido por la hidrólisis no-catalizada del sustrato se puede eliminar mediante la inclusión de controles en cada condición de reacción para posteriormente restarlos de las curvas de generación de producto en el tiempo. Otro método es utilizar la capacidad del programa de hacer la corrección a partir de la constante cinética de pseudo-primer orden para la hidrólisis del sustrato (k_{ds}). Por esta razón se determinaron estas constantes para el pNFA a las temperaturas de los distintos ensayos (Tabla 6.3) como se describe en los métodos. Por su parte, el error introducido por considerar la concentración de enzima constante, particularmente a altas temperaturas, se eliminó del mismo modo que el del sustrato: se utilizaron las constantes de inactivación térmica (k_{ie}) calculadas previamente (Figura 6.12). Los valores de toda la caracterización (termoestabilidad y actividad catalítica) de BpIA-r y sus mutantes hechas en el presente trabajo se encuentran resumidos en la Tabla 6.4.

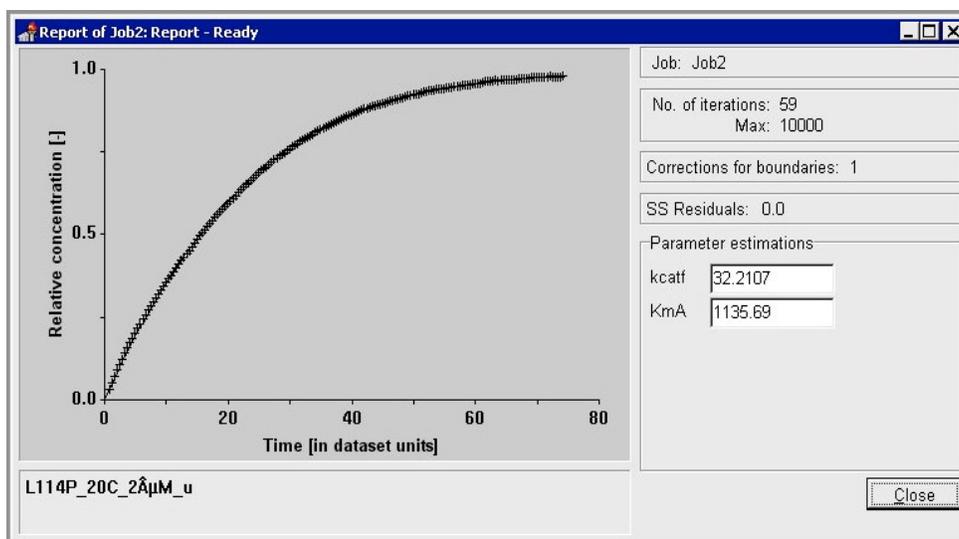


Figura 6.15. Ejemplo de un ajuste de la curva de progreso de reacción con el programa *Encora 1.2*. Curso en el tiempo de la reacción de hidrólisis de pNFA por la mutante L114P a 20°C.

Tabla 6.3. Constantes cinéticas de hidrólisis espontánea del *p*-nifrofenil acetato (pNFA) a distintas temperaturas.

T (°C)	k_{ds} (min ⁻¹)
20	0.0019
25	0.0040
30	0.0079
35	0.0150
40	0.0485

En los resultados obtenidos se observó que las mutantes G28S y K166Y son las que tienen mejor eficiencia catalítica que BplA-r, mientras que el caso contrario ocurre con las mutantes L114P y A132D, las cuales mostraron una eficiencia catalítica menor en el rango de temperaturas estudiado.

La eficiencia catalítica de G28S y K166Y se ve favorecida por sus altos valores de k_{cat} , aunque los valores de las K_m sean mayores a los de BplA-r. Mientras que la eficiencia catalítica de las mutantes L114P y A132D se ve disminuida debido principalmente a una combinación en las propiedades catalíticas. La mutante L114P, aunque tuvo una K_m similar al de la BplA-r, presentó una k_{cat} más baja que la de todas las otras formas de la enzima. Por esta razón la eficiencia catalítica de la mutante L114P fue la menor de todas las formas de la enzima. Por otro lado la mutante A132D presenta valores más altos de k_{cat} que BplA-r, sin embargo sus valores de K_m son los más altos de todas las formas de la enzima por lo que tuvo una menor eficiencia catalítica.

La mutante G28S, aunque presenta valores similares de K_m a los de la mutante K116Y, tiene los valores de k_{cat} más altos, lo que la hace ser la enzima con la mejor eficiencia catalítica de todo el grupo. Esta mutante fue diseñada para disminuir la estabilidad de la enzima recombinante, lo cual se logró a la temperatura de 40°C, adicionalmente se logró aumentar la eficiencia catalítica de esta enzima en el rango de 20-40°C. Esto confirma de manera parcial la importancia del residuo de serina en la actividad catalítica de LipA, que sin embargo a temperaturas mayores parece no contribuir a la estabilidad de la molécula. En el caso de la BplA-r, el residuo Gly28 tiene una contribución positiva en la estabilidad de la proteína, pero no así en la catálisis de la enzima dentro del rango 20-40°C.

De manera global podemos ver que las mutaciones tuvieron efecto significativo sobre las K_m . En todas las mutantes y en BplA-r los valores de K_m disminuyen con el aumento de la temperatura en el rango de 20-40°C, lo que puede interpretarse como una mejor asociación entre la enzima y su sustrato bajo esas condiciones. Las k_{cat} por otro lado presentan un comportamiento más atípico con el aumento de la temperatura. Si bien es conocido que las constantes de velocidad de las actividades enzimáticas generalmente se ven favorecidas con el aumento de la temperatura de acuerdo al principio de Arrhenius (Jaenicke, 2000), para el caso de BplA-r y sus mutantes no se observa este comportamiento, al menos en el rango de temperaturas estudiado. Aunque en algunos puntos pueda cumplirse esta afirmación, en general la tendencia de los valores de k_{cat} a aumentar con la temperatura no es clara para las enzimas estudiadas. Sin embargo no se descarta que a temperaturas mayores de 40°C, las constantes cinéticas de estas enzimas puedan aumentar de manera notable, lo que podría evaluarse con sustratos más estables y solubles. Actualmente no se ha reportado un comportamiento similar para otras lipasas al que presentan las enzimas de este estudio, incluso no hay muchos trabajos en donde se evalué el cambio de las constantes cinéticas con la temperatura para este tipo de enzimas. Lo común es encontrar actividades enzimáticas en función de la temperatura. Estas actividades suelen ser proporcionales a la velocidad aunque no se sabe a ciencia cierta ni el grado de avance de la reacción ni qué tan lejos se encuentra la enzima de su V_{max} . No obstante, en cualquier condición deben cumplir con la ecuación de Michaelis-Menten-Henry:

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

En consecuencia, si dichos ensayos se hacen a concentración de enzima constante y concentración de sustrato constante, las actividades así medidas deben ser proporcionales a k_{cat}/K_m y por esa razón nuestra gráfica de especificidad en función de la temperatura se asemeja mucho a las típicas gráficas de actividad en función de la temperatura (Figura 6.14).

Tabla 6.4. Resumen de los parámetros cinéticos y de termoestabilidad de la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1 y sus mutantes a distintas temperaturas.

Enzima	Propiedades catalíticas				Estabilidad	
	T (°C)	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m $\times 10^2$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	k_{ie} $\times 10^{-5}$ (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
BplA-r	20	726.48	86.28	11.88	0.76	9120.4
	25	400.67	51.10	12.75	61.74	112.3
	30	245.28	44.50	18.14	152.50	45.5
	35	97.56	45.51	46.65	291.40	23.8
	40	108.46	66.28	61.11	898.10	7.7
G28S	20	1001.18	247.16	24.69	0.30	23104.9
	25	662.27	229.14	34.60	2.44	2840.8
	30	383.41	208.42	54.36	112.20	61.8
	35	250.30	228.13	91.14	169.10	41.0
	40	195.24	259.20	132.76	1198.00	5.8
L114P	20	654.79	16.68	2.55	0.90	7701.6
	25	401.27	19.71	4.91	52.56	131.9
	30	109.81	13.90	4.65	103.80	66.8
	35	99.75	30.43	12.66	235.90	29.4
	40	128.47	46.25	36.00	387.00	17.9
A132D	20	1357.30	131.04	9.65	0.29	23901.6
	25	963.93	95.24	9.88	0.38	18240.7
	30	537.03	79.38	14.78	43.31	160.0
	35	344.67	84.63	24.55	151.50	45.8
	40	254.78	108.97	42.77	634.40	10.9
K166Y	20	1024.36	213.88	20.88	0.40	17328.7
	25	681.79	176.22	25.85	27.62	251.0
	30	443.04	180.38	40.71	50.68	136.8
	35	228.07	175.23	76.83	316.50	21.9
	40	149.34	183.44	122.84	1491.00	4.6

Nuestro estudio cinético sugiere una mejora de la constante de especificidad o eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) con el aumento de la temperatura en el intervalo de temperatura de 20 a 40°C (Figura 6.14) para todas las enzimas estudiadas. Sin embargo este aumento de la especificidad catalítica puede ser engañoso debido a que el aumento de esta constante no garantiza que la enzima sea un mejor catalizador en términos de estabilidad. Por esta razón decidimos introducir un parámetro que incluyera la constante de especificidad y que además tomara en consideración la estabilidad de la enzima. Para ello simplemente hicimos

la relación de la constante de especificidad y la constante de inactivación térmica a temperatura fija ($k_{cat} K_m^{-1} k_{ie}^{-1}$). Consideramos a esta relación como un índice de especificidad y estabilidad de la enzima en condiciones dadas. Al graficar este índice como función de la temperatura para cada una de las formas de la enzima encontramos un efecto mucho más apegado a la realidad de las propiedades fisicoquímicas globales de las enzimas en cuestión (Figura 6.16). Este índice resultó ser bastante sensible ya que fue necesario hacer los gráficos en escala semi-logarítmica para una buena apreciación de las variaciones con la temperatura. Las mutantes G28S, K166Y y A123D, de acuerdo al índice de especificidad y estabilidad definido previamente, son mejores a 20°C que la enzima silvestre. Por el contrario, la mutante L114P resultó ser la más afectada debido a su pobre eficiencia catalítica y baja estabilidad. Si seguimos los datos para el resto de las enzimas podemos decir que las mutantes G28S, K166Y y A123D resultaron mejores que la BplA-r en todo el rango de temperaturas exploradas, mientras que la mutante L114P resultó ser perjudicial para el desempeño global de la enzima. La ventaja de este índice es que considera tanto los parámetros catalíticos de la enzima como su estabilidad. Por ejemplo, a 40°C el desempeño de todas las enzimas estudiadas es similar ya que aunque algunas son más activas su estabilidad es pobre y *viceversa*.

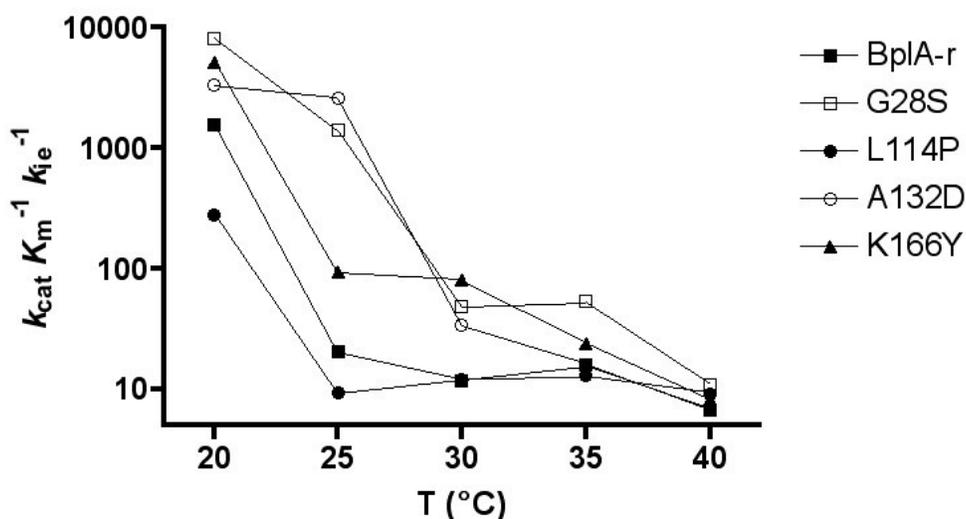


Figura 6.16. Relación de la constante de especificidad (k_{cat}/K_m) y la constante de inactivación térmica (k_{ie}) de BplA-r y sus mutantes a distintas temperaturas.

Capítulo 7. Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones

Se clonó, sobre-expresó y purificó la BplA-r. La modificación de la secuencia original del gen de esta enzima (*bplA*) por técnicas de biología molecular facilitó la expresión de la proteína y su purificación por cromatografía de afinidad.

Se establecieron condiciones de máxima expresión de BplA-r evaluando concentración de inductor y tiempo de incubación después de inducir células de *E. coli* BL21 (DE3) (0.5 mM y 3 h, respectivamente).

Se generaron las mutantes G28S, L114P, A132D y K166Y por mutagénesis sitio-dirigida. Estas mutantes fueron sobre-expresadas y purificadas en forma similar que BplA-r, obteniendo rendimientos similares.

Se caracterizó la estabilidad y constantes cinéticas de BplA-r y sus mutantes en función de la temperatura (20-40°C). La obtención de las constantes cinéticas k_{cat} y K_m fue más rápida y sencilla a partir de cursos en el tiempo de la reacción de hidrólisis de las enzimas, que de la medición de velocidades iniciales.

El residuo de glicina 28 (G28) no juega un papel determinante en la estabilidad y afecta de manera negativa la k_{cat} de la enzima BplA-r. En cambio el residuo S28 en esta misma enzima si tiene un efecto relevante en el cambio de las constantes cinéticas al mejorar la eficiencia catalítica de la enzima con el aumento de temperatura de 20-40°C. Esto resalta la importancia que tiene este residuo en las lipasas bacterianas de la familia I.4 que muestran T_{opt} en ese rango de temperaturas. La mutante G28S en BplA-r resultó entonces ser de gran interés biotecnológico ya que, aunque no es termoestable, aumentó tres veces su k_{cat} y aumentó a más del doble la vida media a 20°C con respecto a la enzima parental.

Las mutaciones L114P y A132D resultaron ser estabilizadoras para BplA-r en el rango de temperaturas estudiado (20-40°C). La mutación K166Y sólo resultó estabilizadora en el intervalo de 20 a 30°C. Sin embargo las contribuciones de estas mutaciones en la termoestabilidad de BplA-r no son de igual magnitud a las reportadas en su enzima homóloga LipA. Esto presume la existencia de interacciones dinámicas que no son tomadas en cuenta en las estructuras cristalográficas reportadas por Acharya y col. (2004).

La mutación K166Y mejoró la eficiencia catalítica de BplA-r en el rango de temperaturas estudiado (20-40°C), mientras que las mutaciones L114P y A132D resultaron perjudiciales en ese aspecto.

Para evaluar conjuntamente las propiedades cinéticas y de estabilidad de cada enzima, se generó un índice de especificidad y estabilidad enzimática que considera la k_{cat} , K_m y la k_{ie} , que puede ser utilizado para estimar el desempeño global de un biocatalizador. De acuerdo a este índice, las mutantes G28S, K166Y y A123D resultaron tener un mejor desempeño que la BplA-r, mientras que la mutante L114P resultó ser nociva en todos los aspectos como lo muestran sus valores de especificidad y estabilidad.

Perspectivas

Estudiar el plegamiento de BplA-r y las mutantes por dicroísmo circular para validar los mecanismos de desplegamiento propuestos.

Purificar y estudiar las propiedades cinéticas y estabilidad de la enzima silvestre (BplA) para tener un buen punto de comparación entre el efecto de la adición de aminoácidos a la enzima recombinante (BplA-r) con sus propiedades fisicoquímicas.

Estudiar la enantioselectividad de la BplA-r y sus mutantes para evaluar el efecto de tales mutaciones sobre esta propiedad.

Estudiar la dinámica molecular de las enzimas para relacionar los efectos cinéticos observados con los efectos de las mutaciones en la dinámica molecular.

Bibliografía

1. **Abraham**, T. Seung, P. P. And Young, J. Y. (2005). Stabilization of *Bacillus subtilis* Lipase A by increasing the residual packing. *Biocatalysis and Biotransformation*. **23**:217-224.
2. **Acharya**, P., Rajakumara, E., Sankaranarayanan, R. and Rao, N. M. (2004). Structural Basis of Selection and Thermostability of Laboratory Evolved *Bacillus subtilis* Lipase. *J. Mol. Biol.* **341**:1271-1281.
3. **Akanuma**, S., Yamagishi, A., Tanaka, N., and Oshima, T. (1999). Further improvement of the thermal stability of a partially stabilized *Bacillus subtilis* 3-isopropylmalate dehydrogenase variant by random and sitedirected mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **260**:499-504.
4. **Alberghina** L, Lotti M. 1998. Lipases and lipids: structure, specificity and applications in biocatalysis. *Chem. Phys. Lipids.* **93**:1-216 (Suppl.).
5. **Aravinda**, S., Shamala, N., Das, C., Sriranjini, A., Karle, I.-L. & Balaram, P. (2003). Aromatic–aromatic interactions in crystal structures of helical peptide scaffolds containing projecting phenylalanine residues. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 5308-5315.
6. **Arnold**, F. H. and Volkov, A. A. (1999). Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**:54-59.
7. **Arpigny**, J.L. y Jaeger, K. E. (1999). “Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties”. *Biochem. J.* **343**:177-183.
8. **Ausubel**, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1992). Short protocols in molecular biology. *New York*. 1992. 3rd ed.
9. **Berg**, O.G., Cajal, Y., Butterfoss, G.L., Grey, R.L., Alsina, M.A., Yu, B.Z. and Jain, M.K. (1998). Interfacial Activation of Triglyceride Lipase from *Thermomyces (Humicola) lanuginosa*: Kinetic Parameters and a Basis for Control of the Lid. *Biochemist.* **37**(19).
10. **Bourne**, Y., Martinez, C., Kerfelec, B., Lombardo, C. C. and Cambillau, C. (1994). Horse Pancreatic Lipase. The Crystal Structure Refined at 2.3 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **238**:709-732.
11. **Brockman**, H. L., Law, L. H. Y. Kezdy, F. J. (1973). Catalysis by adsorbed enzymes. The hydrolysis of tripropionin by pancreatic lipase adsorbed to siliconized glass beads. *J. Biol. Chem.* **248**(14):4965-4970.
12. **Brzozowski**, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. C., Lawson, D. M. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature.* **351**:491-94.
13. **Bustos**, I. (1995). Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasas proveniente de un ambiente extremo. Tesis de Licenciatura, UNAM.
14. **Bustos**, I. (1998). Análisis del gen que codifica para la lipasa de *B. pumilus* GMA1. Tesis de Maestría, UNAM.
15. **Cambillau**, C. and Claverie, J.-M. (2000). Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *J. Biol. Chem.* **275**:32383-32386.
16. **Chakravarty**, S. and Varadarajan, R. (2000). Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Lett.* **470**:65-69.
17. **Cramer**, A., Raillard, S. A., Bermudez, E., and Stemmer, W. P. (1998). DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution.

- Nature*. **391**:288-291.
18. **Dartois**, V., Baulard, A., Schanck, K. & Colson, C. (1992). Cloning, nucleotide sequence and expresión in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim. Biophys. Acta*. **1131**:253-260.
 19. **Dartois**, V., Coppee, J. Y., Colson, C. & Baulard, A. (1994). Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1670-1673.
 20. **Derewenda**, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Derewenda, Z. S. (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*. **31**:1532-41.
 21. **Derewenda**, Z.S. y Sharp, A.M. (1993). News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem. Sci.* **18**:20-25.
 22. **Detry**, J., Rosenbaum, T., Lutz, S., Hahn, D., Jaeger, K. E., Muller, M. and Eggert, T. (2006). Biocatalytic production of enantiopure cyclohexane-trans-1,2-diol using extracellular lipases from *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **72**:1107-1116.
 23. **Dharmsthiti**, S. and Luchai, Sudaporn (1996). Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus sp.* THL027. *FEMS Microbiology Letters*. **179**(2):241-246.
 24. **Dower**, W. J., Millar, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*. **16**(13):6127-6145.
 25. **Facchiano**, A. M., Colonna, G., and Ragone, R. (1998). Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study. *Prot. Eng.* **11**:753-760.
 26. **Ferrato**, F, Carriere F, Sarda L, Verger R. 1997. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *See Ref.* **122**:327-47.
 27. **Fields**, P. A. (2001). Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol.* Part A. **129**:417-431.
 28. **Giver**, L., Gershenson, A., Freskgard, P. O., and Arnold, F. H. (1998). Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:12809-12813.
 29. **Gómez-Puyou**, A. (2003). La complejidad de las proteínas: relación entre estabilidad, flexibilidad y catálisis. *Mensaje Bioquímico, FM, UNAM.* **27**:85-95.
 30. **Grochulski**, P, Li, Y., Schrag, J. D., and Cygler, M. (1994). Two conformational status of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* **3**:82-91.
 31. **Hanahan**, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**(4):557-580.
 32. **Haney**, P. J., Badger, J. H., Buldak, G. L., Reich, C. I., Woese, C. R., and Olsen, G. J. (1999). Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:3578-3583.
 33. **Hennig**, M., Sterner, R., Kirschner, K., and Jansonius, J. N. (1997). Crystal structure at 2.0 Å resolution of phosphoribosylanthranilate isomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: possible determinants of protein stability. *Biochemistry*. **36**:6009-6016.
 34. **Hjort**, A., Carriere, F., Cudrey, C., Woldike, H., Boel, E., et al. (1993). A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho) lipase. *Biochemistry*. **32**:4702-7.
 35. **Hough**, D. W. and Danson, M. J. (1999). Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**:39-46.

36. **Hunter**, C. A., Singh, J. & Thornton, J. (1991). π - π Interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. *J. Mol. Biol.* **218**: 837-846.
37. **Isobe**, K. (1988). Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agri. Biol. Chem.*, **52**:41-47.
38. **Jaeger**, K. E., Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**:396-403.
39. **Jaeger**, K. E., Dijkstra, B. W., and Reetz, M. T. (1999). Bacterial Biocatalysts: Biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:315-51.
40. **Jaeger**, K-E. and Eggert, T. (2002). "Lipases for biotechnology". *Curr. Opin. Biotech.* **13**:390-397.
41. **Jaenicke**, R. (1991). Protein stability and molecular adaptations to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* **202**:715-728.
42. **Jaenicke**, R. y Bohm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Op. in Struct. Biol.* **8**:738-748.
43. **Jaenicke**, R. (2000). Do ultrastable proteins from hyperthermophiles have high or low conformational rigidity? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:2962-2964.
44. **Karshikoff**, A. and Ladenstein, R. (1998). Proteins from thermophilic and mesophilic organisms essentially do not differ in packing. *Protein Eng.* **11**:867-872.
45. **Kazlauskas**, R. J. and Bornscheuer, U. T. (1998). Biotransformations with lipases. In *Biotechnology, Biotransformations I*, ed. DR Kelly. Weinheim: Wiley-VCH/New York: VCH Publ. **8**: 37-191.
46. **Kim** K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. and Suh, S. W. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure.* **5**:173-85.
47. **Kim**, H.K., Choi, H.J., Kim, M.H., Sohn, C.B. and Oh, T.K. (2002). Expression and characterization of Ca^{2+} -independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochim. Biophys. Acta.* **1583**:205-212.
48. **Kumar**, A. and Gross, R.A. (2000). *Candida antarctica* Lipase B-Catalyzed Transesterification: New Synthetic Routes to Copolyesters. *J. Am. Chem. Soc.* **122**:11767-11770.
49. **Kumar**, S., Tsai, C. J., and Nussinov, R. (2000a). Factors enhancing protein thermostability. *Prot. Eng.* **13**:179-191.
50. **Kynclova**, E., Elsner, E., Köpf, A., Hawa, G., Schalkhammer, T. and Pittner, F. (1995). Novel method for coupling of poly(ethyleneglycol) to carboxylic acid moieties of proteins. *J. Mol. Recog.* **9**:644-65.
51. **Laemmli**, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
52. **Lindahl**, E., Hess, B. and van der Spoel, D. (2001). GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.* **7**:306-317.
53. **Lesuisse**, E., Schanck, K. & Colson, C. (1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **216**:155-160.
54. **Maes**, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1999). The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a

- comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins*. **37**:441-453.
55. **Malakauskas**, S. M. and Mayo, S. L. (1998). Design, structure and stability of a hyperthermophilic protein variant. *Nat. Struct. Biol.* **5**:470-475.
56. **Merz**, A., Knöchel, T., Jansonius, J. N., and Kirschner, K. (1999). The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges. *J. Mol. Biol.* **288**:753-763.
57. **Merz**, A., Yee, M. C., Szadkowski, H., Pappenberger, G., Cramer, A., Stemmer, W. P., Yanofsky, C., and Kirschner, K. (2000). Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry* **39**:880-889.
58. **Misawa**, E., Chion, C. K., Archer, I. V., Woodland, M. P., Zhou, N. Y., Carter, S. F., Widdowson, D. A. and Leak, D. J. (1998). *Eur. J. Biochem.* **253**:173-183.
59. **Moller**, B. y col. (1991). Alkaline *Bacillus* lipases, coding DNA sequences therefore and bacilli which produce these lipases. Patente internacional WO 91/16422.
60. **Namboodiri**, V. M. H. and Chattopadhyaya, R. (2000). Purification and Biochemical Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids*. **35**:495-502.
61. **Niehaus**, F., Bertoldo, C., Kähler, M., and Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:711-729.
62. **Noble**, M. E. M., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. and Frenken, L. G. J. (1994). Analysis of the structure of *Pseudomonas glumae* lipase. *Protein Engineering, Design and Selection*. **7**:559-562.
63. **Nthangeni**, M. N., Patterton, H., van Tonder, A. Vergeer, W. and Litthauer, D (2001). Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on Bacillus lipases. *Enzyme Microb Technol.* **28**(7-8):705-712.
64. **Ollis**, D. L., Shea, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., et al. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**:197-211.
65. **Pace**, C. N. and Scholtz, J. M. 1997. Measuring the conformational stability of a protein. In: *Protein structure-a practical approach*, pp. 299–321. (Creighton, T. E., Ed.). Oxford University Press, Oxford, New York.
66. **Plaza del Pino**, I. M., Ibarra-Molero, B., and Sanchez-Ruiz, J. M. 2000. Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability *in vivo* and its relation with misfolding diseases. *Proteins*. **40**:58–70.
67. **Rasool**, S. (2005). Molecular cloning of enantioselective ester hydrolase from *Bacillus pumilus* DBRL-191. *FEMS*. **249**:113-120.
68. **Rosenstein**, R. and Gotz, F. (2000). Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*. **82**:1005-1014.
69. **Sambrook**, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *CSHL Press*.
70. **Sarda** L, Desnuelle P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta*. **30**:513–21.
71. **Schmid**, F. X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In: *Protein Structure—A Practical Approach*, pp. 261–297. (Creighton, T. E., Ed.). Oxford University Press, Oxford.
72. **Schrag**, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., et al. (1997). The open

- conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure*. **5**:187–202.
73. **Shoichet**, B. K., Baase, W. A., Kuroki, R., and Matthews, B. W. (1995). A relationship between protein stability and protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**:452-456.
 74. **Sterner**, R. and Liebl, W. (2001). Thermophilic Adaption of Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **36**(1):39-106.
 75. **Straathof**, A. J. J. (2001). Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve analysis. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*. **11**:991-998.
 76. **Studier**, F. W. and Moffatt, B. A. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* **189**:113-130
 77. **Szilagyi**, A. and Závodszky, P. (2000). Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure Fold. Des.* **8**:493-504.
 78. **Thoma**, R., Hennig, M., Sterner, R., and Kirschner, K. (2000). Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure Fold. Des.* **8**:265-276.
 79. **Van den Burg**, B., Vriend, G., Veltman, O. R., Venema, G., and Eijsink, V. G. (1998). Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**:2056-2060.
 80. **van Pouderoyen**, G., Eggert, T., Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* **309**:215-226.
 81. **van Tilbeurgh**, H, Egloff M-P, Martinez C, Rugani N, Verger R, et al. (1993). Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. **362**:814-20.
 82. **Verger**, R. 1997. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **15**:32-38.
 83. **Verschueren**, K. H., Seljee, F., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H. and Dijkstra, B. W. (1993). *Nature (London)*. **363**:693-698.
 84. **Vieille**, C. and Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **65**:1-43.
 85. **Viikari**, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., and Linko, M. (1994). Xylanases in biobleaching. From an idea to industry. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**:335-350.
 86. **Willeman**, W. F., Hanefeld, U., Straathof, A. J. J. and Heijnen, J. J. (2000). Estimation of kinetic parameters by progress curve analysis for the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase. *Enzyme Microb. Technol.* **27**:423-433.
 87. **Wong**, De la Mora, P. (2001). Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: producción fermentativa y algunas propiedades. Tesis de Licenciatura, UNAM.
 88. **Woolley**, P., Petersen S.B., eds. 1994. *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*. London: Cambridge Univ. Press. 363 pp.
 89. **Wray**, J. W., Baase, W. A., Lindstrom, J. D., Weaver, L. H., Poteete, A. R., and Matthews, B. W. (1999). Structural analysis of a non-contiguous second-site revertant in T4 lysozyme shows that increasing the rigidity of a protein can enhance its stability. *J. Mol. Biol.* **292**:1111-1120.
 90. **Závodszky**, P., Kardos, J., Svingor, and Petsko, G. A. (1998). Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:7406-7411.
 91. **Zeikus**, J. G., Vieille, C., and Savchenko, A. (1998). Thermozyms: biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles*. **2**:179-183.