

03072
22
2eje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

**INGENIERIA DE PROTEINAS PARA REACCIONES DE ALCOHOLISIS:
MUTAGENESIS COMBINATORIA DE ALFA-AMILASA**

Tesis que para obtener el grado de Maestría en Biotecnología

presenta la alumna

Marina Ramírez Alvarado

Instituto de Biotecnología.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.



Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado

Insurgentes Sur y Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, México, D.F., Código Postal: 04510

NAM-CCH

PROYECTO ACADEMICO DE ESPECIALIZACION, MAESTRIA Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

IBT

OF. ALMC/108/94

Mtro. Pablo Ruiz Nápoles
Director de la UACPyP del CCH.
P r e s e n t e .

Por este conducto me permito informar a usted que en la reunión de Comisión Académica, que se llevó a cabo el 30 de agosto de 1994, se acordó poner a su consideración el siguiente Jurado para el examen de Maestría de la Q.F.B. RAMIREZ ALVARADO MARINA, con número de cuenta 8753872-2, y número de expediente 30922018, con la tesis titulada "Ingeniería de proteínas para reacciones de alcoholólisis: mutagénesis combinatoria de alfa-amilasa" dirigida por el Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero.

PRESIDENTE: Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero
VOCAL: Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos
SECRETARIO: Dr. Rafael Vázquez Duhalt
SUPLENTE: Dr. Agustín López Munguía Canales
SUPLENTE: Dr. Joel Osuna Quintero

Sin otro particular aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor., 12 de septiembre de 1994.

Agustín López Munguía Canales
Dr. Agustín López-Munguía Canales
Coordinador del Proyecto

Mtro. Pablo Ruiz Nápoles
VoBo

c.c.p. Dr. Francisco Bolívar Zapata Director del IBT
c.c.p. Biólogo Francisco Incera Ugalde Secretario de Asuntos
Escolares de la UACPyP del CCH.

ALMC/GSD/mvr.

Resumen

I. RESUMEN

Se planteó la tesis de maestría: "Ingeniería de Proteínas para reacciones de alcoholólisis: mutagénesis combinatoria de α -amilasa" dentro del proyecto de Biocatálisis en donde se buscaba producir un biosurfactante del tipo carbohidrato-cadena alifática a partir de alcohol de cadena larga y almidón. El modelo escogido para este proyecto fue la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*. debido a que el mecanismo de la reacción que cataliza esta enzima utiliza como nucleófilo un grupo -OH proveniente del agua o proveniente de un carbohidrato.

Se clonó el gen de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 en pBGS18, un vector de clonación para *E. coli*. Se expresó la proteína y se secuenció el gen.

Se diseñó un método de ensayo para la caracterización de mutantes activas tratando de diferenciar entre la reacción de hidrólisis propia de la enzima y la de alcoholólisis esperada. Este método se basa en diferencias entre ambas reacciones y consta de varios pasos.

Se realizó modelado molecular de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* en base a la estructura tridimensional reportada de la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (TAKA amilasa). Se llevó a cabo un anclaje del sustrato y se minimizó el complejo obtenido. Se obtuvo un modelo con el que se pudo conocer de manera mas cierta la disposición del sitio activo de la enzima y se diseñaron las mutaciones a realizar.

Se evaluó el método de mutagénesis combinatoria reportado por Merino *et al.*, 1992 como una herramienta para obtener mutantes de la α -amilasa. Después de la construcción de 5 bancos en 3 zonas de mutación, la contaminación de la silvestre obtenida nos llevó a concluir que este método no es el más adecuado para el gen de la α -amilasa, por su tamaño.

Se diseñó una mutante doble en la región 139140, la cual fue modelada y evaluada en cuanto a la factibilidad de seguir interaccionando con el sustrato, a través de la energía electrostática. La mutante W139R T140S se construyó y se caracterizó, manteniéndose activa; comprobándose que el modelo obtenido arrojó resultados que podían ser comprobados experimentalmente.

II. ANTECEDENTES

- 1.- PROYECTO PEMEX: Obtención de un biosurfactante.
- 2.- ¿Por qué producir un biosurfactante?
- 3.- Biocatálisis: Alcohólisis (Ingeniería de proteínas para Química Fina).
- 4.- Mutagénesis combinatoria.

1.- PROYECTO PEMEX: Obtención de un biosurfactante.

El proyecto de investigación "Ingeniería de Proteínas para reacciones de alcohólisis: Mutagénesis combinatoria de α -amilasa" forma parte del Proyecto de Biocatálisis que llevaron a cabo diversos grupos del IBT en colaboración con PEMEX. El proyecto tiene como objetivo la obtención de un biosurfactante utilizando como sustratos carbohidratos y alcoholes de cadena larga.

2.- ¿Por qué producir un biosurfactante?

Se define como un biosurfactante cualquier molécula que tiene actividad tensoactiva y que es sintetizada por una célula de cualquier organismo vivo. Los biosurfactantes actúan en interfases aire-agua, aceite-agua y líquido-sólido; son capaces de formar micelas, micelas invertidas, bastones micelares, bicapas y vesículas a través de reducir la tensión superficial que actúa en las fronteras de las fases. Su importancia en el mercado radica en su diversidad de usos: emulsificación, separación de fases, dispersión, mojado, espumado, solubilización, inhibición de la corrosión, reducción de la viscosidad así como actividad antimicrobiana en algunos casos. Estos productos presentan aplicaciones en la agricultura, la industria de los materiales y la construcción, alimentos y bebidas, limpieza, peletera, papelera, metalera, textil, cosmetológica, farmacéutica y petrolera.

Su demanda industrial está creciendo: En 1990 el mercado de surfactantes ascendía a \$ 3.9x10⁹ USD, la predicción para el año 2000 es de un incremento del 35% de la demanda (Fiechter, 1992). La mayor aplicación se encuentra en la Industria Petrolera, en la recuperación microbiana potenciada de petróleo de los pozos de almacenamiento (MEOR, Microbial Enhancement Oil Recovery en inglés), donde se utilizan los microorganismos *in situ*.

Las ventajas de los biosurfactantes sobre los surfactantes sintéticos son muy claras: su diversidad estructural lleva a una diversidad en las propiedades fisicoquímicas, su producción a partir de recursos renovables, su capacidad de ser modificados por ingeniería genética o por técnicas biológicas o bioquímicas y por supuesto, su biodegradabilidad.

Antecedentes

En la biodegradación microbiana de sustratos hidrofóbicos, se ha observado que se puede aumentar la velocidad de biodegradación si se agrega al sistema suficiente biosurfactante para reducir la tensión superficial de 2-16 mN/m (Finnerty, 1994). La producción de un biosurfactante no siempre es requisito de todos los organismos, generalmente se producen a partir de que su fuente de carbono inmediata es una sustancia hidrofóbica que presenta problemas de transferencia de masa en un medio acuoso.

3.- Biotatálisis: Alcohólisis (Ingeniería de Proteínas para Química Fina).

La biotatálisis presenta un amplio espectro de aplicaciones, dentro de estas, el encontrar vías más adecuadas para sintetizar moléculas sin que se requieran sustratos caros o metodologías complejas de síntesis. En este sentido, la Ingeniería de Proteínas ha comenzado a ser una disciplina que ha podido beneficiar las aplicaciones de la biotatálisis; una de ellas es la de mejorar las enzimas en cuanto a su estabilidad en solución acuosa y no-acuosa, modificar las constantes cinéticas de una reacción y modificar la especificidad.

La Ingeniería de Proteínas es un conjunto de métodos teóricos y experimentales utilizados para modificar y rediseñar polipéptidos. Se deriva principalmente de los avances iniciados en los setentas con el surgimiento de la tecnología del DNA recombinante. En esta disciplina se tratan de obtener funciones novedosas o mejoradas con la modificación de proteínas aisladas de algún organismo o a partir de péptidos generados *in vitro*. Asimismo, se trata de comprender la interacción que existe entre las propiedades bioquímicas de una proteína y su estructura.

El desarrollo de esta disciplina depende del avance de distintas áreas relacionadas: la tecnología del DNA recombinante es, a la fecha, su principal base metodológica. Continuamente se reportan nuevas técnicas para el aislamiento, expresión y modificación de genes que codifican polipéptidos. Los métodos computacionales (bases de datos para estudios de análisis de secuencia, gráfica molecular, etc.) han sido de gran ayuda para identificar patrones de secuencia ligados a funciones o estructuras conservadas, para modelar cambios en proteínas de estructura conocida, identificar las perturbaciones producidas por estos cambios, etc. A largo plazo, su principal objetivo es la creación de algoritmos para predecir las estructuras tridimensionales que pueden adoptar polipéptidos dados. La resolución de cálculos de este tipo involucra también la utilización de las computadoras más veloces disponibles; de otro modo, muchos de ellos no se efectuarían en tiempos razonables. Los métodos estructurales (cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (NMR)) son actualmente la única alternativa para la determinación de estructuras. Sin embargo, el costo y tiempo que requieren limita la generación de información estructural.

Los beneficios a corto y mediano plazo de esta tecnología en pleno desarrollo son múltiples. De ésta puede surgir una nueva generación de fármacos, vacunas y otras proteínas de interés clínico e industrial.

De esa manera, con las técnicas de Ingeniería de proteínas y de DNA recombinante disponibles están surgiendo tecnologías basadas en enzimas modificadas como una nueva ruta práctica para la síntesis a gran escala de intermediarios quirales y moléculas bioactivas.

Existen algunos ejemplos de síntesis de monosacáridos nuevos y aza-azúcares usando aldolasas recombinantes así como oligosacáridos complejos utilizando glucosiltransferasas recombinantes (Wong, 1992). En este reporte se utilizaron glucosiltransferasas que requieren para su actividad de complejos nucleótido-azúcar. La reacción que se lleva a cabo es estereo y regio selectiva.

4.- Mutagénesis combinatoria.

En la ingeniería de proteínas se requieren modificaciones en zonas o aminoácidos específicos de una proteína. Con este propósito, se han utilizado distintos enfoques:

Mutagénesis localizada.

La exposición de un segmento aislado de DNA ante reactivos como hidroxilamina o ácido nitroso es el método más sencillo de mutagénesis localizada al azar. La clonación de este DNA en un sistema apropiado (célula huésped-vector de expresión) permite seleccionar los cambios producidos en regiones de interés (Sambrook *et al.*, 1989).

El uso de DNA de cadena sencilla (como los bacteriófagos M13 recombinantes) mejora el rendimiento mutagénico de algunos agentes químicos (hidrazina, ácidos fórmico y nitroso, etc.). Estos agentes son capaces de modificar las bases nitrogenadas conservando intacto el esqueleto de azúcares y fosfatos. Al producir la cadena complementaria con ayuda de una polimerasa, las posiciones dañadas son apareadas con nucleótidos al azar (a diferencia del DNA de doble cadena, en el que la zona mutagenizada puede repararse *in vivo* tomando como molde la cadena complementaria).

Otros reactivos (químicos y algunos análogos de nucleótidos) pueden aumentar el número de mutantes y la especificidad mutagénica al utilizarse en la síntesis *in vitro* de DNA. Estos agentes interactúan con bases en especial. El bisulfito de sodio cataliza la desaminación de la citosina a uracilo en DNA de cadena sencilla. Esto resulta en transiciones de pares C-G hacia pares T-A (Shortle & Nathans, 1978). El uso de N⁴ hidroxil-dCTP produce transiciones del par A-T hacia el par G-C (11). El

Antecedentes

dBrUTP se incorpora por la transcriptasa reversa y produce transiciones del par T-A hacia el par G-C (Mott *et al.*, 1984). Adicionalmente, varios autores han reportado la omisión de nucleótidos como método para producir transiciones, transversiones y mutaciones puntuales en gran cantidad.

Dado el carácter azaroso de estas técnicas, el principal problema es la baja producción de cambios no conservativos de aminoácidos, de acuerdo con el reporte de Sirotkin en 1986, es necesario mutar simultáneamente dos o hasta tres nucleótidos dentro de un mismo codón; al aumentar la tasa mutagénica (con mayores concentraciones del agente) se aumenta también la probabilidad de producir cambios deletéreos en la secuencia, con lo que se reduce el conjunto de cambios múltiples observables. La mutagénesis química puede ser útil para conocer el contenido informativo de secuencias cortas (como algún fragmento de una proteína) cuyas secuencias codificantes se mutagenizan intensivamente.

Mutagénesis sitio-dirigida

A medida que ha evolucionado la tecnología del DNA recombinante, los métodos generales de mutagénesis se ha reemplazado por formas más directas de producir estos cambios. La aportación más significativa es a través del uso de oligonucleótidos sintéticos. Desde 1978, año en el se presentan los primeros reportes de mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (Hutchinson *et al.*, 1978), se han generado numerosas técnicas con este fin. Se describen a continuación algunas de las de mayor uso en la actualidad.

Como se menciona arriba, los bacteriófagos M13 de *E. coli* tienen la capacidad de producir DNA de cadena sencilla, propiedad que se ha explotado al clonar genes de interés con el fin de facilitar su modificación. En este caso, los oligonucleótidos mutantes (un cierto número de bases modificadas flanqueadas por secuencias cortas silvestres) se reasocian a la región que se desea cambiar. Posteriormente, se incuba este complejo en una reacción enzimática de polimerización y la doble cadena resultante se introduce a una célula huésped. Los mutantes se identifican al hibridar el DNA total (presente en las colonias transformantes) con el oligonucleótido utilizado para introducir la mutación. Gracias al uso de "kits" comerciales de laboratorio (en los que se incluyen los reactivos necesarios para una metodología determinada, como el de Amersham, UK de 1988); esta técnica es reproducible y se ha difundido ampliamente. Con ella se han reportado todo tipo de mutaciones (inserciones, deleciones, substitutiones), sin embargo, en la práctica presenta dificultades para ciertas aplicaciones. El problema que se observa más comúnmente es la contaminación de las colonias transformantes con la secuencia silvestre. Esto se ha atribuido a diversas causas, entre las cuales resalta que el DNA molde se

Antecedentes

transforme como tal (cadena sencilla sin cambios que se convierte a la doble cadena *in vivo*) o a la actividad correctora en la bacteria que degrada al extremo 5' del oligonucleótido mutante, llevándose la porción modificada. Se han diseñado varias alternativas para evitar lo anterior y así incrementar el número de mutantes. El DNA de cadena sencilla puede removerse físicamente por medio de centrifugación en gradientes de densidad (Zoller & Smith, 1982), electroforesis en geles de agarosa (Simons *et al.*, 1982), o por medios enzimáticos con la nucleasa S1 (Hutchinson *et al.*, 1978).

El efecto de la reparación *in vivo* puede disminuirse polimerizando con otro oligonucleótido hasta la región mutagenizada. Al ligar el DNA resultante se pierde el extremo 5' libre y se evita su reparación como lo reporta Norris *et al.* en 1983.

Mutagénesis en cassette. Como una adaptación a la metodología descrita por Matteucci y Heyneker en 1983 y Wells *et al.* 1985 han implementado un tipo de mutagénesis a saturación que no involucra el uso de polimerasas. Esta técnica requiere que la zona a mutagenizar este flanqueada por dos sitios de restricción cercanos entre sí. Con esto, se diseñan dos oligonucleótidos mutantes complementarios que al reasociarse formen un producto similar al obtenido con la digestión del vector en esos sitios únicos. De este modo el DNA sintético puede reemplazar a la región silvestre. Como es evidente, la limitante de este enfoque es la necesidad de tener sitios de restricción apropiados.

Mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Este tipo de mutagénesis es una modificación al protocolo original de PCR (Erlich *et al.*, 1988). Se utiliza para la amplificación de un fragmento de DNA que se localiza entre dos regiones de secuencia conocida. Dos oligonucleótidos se utilizan como primeros (primers) en una serie de reacciones catalizadas por una DNA polimerasa:

- a) El DNA usado como molde se desnaturaliza incubándolo a alta temperatura con un exceso molar de los oligonucleótidos complementarios a cada sus extremos.
- b) Al disminuir la temperatura de esta mezcla, se permite la reasociación de los oligonucleótidos con su secuencia blanco en el molde.
- c) Se produce la doble cadena al extender la hebra del oligonucleótido con ayuda de una DNA polimerasa.

Al repetir varias veces este ciclo de desnaturalización, reasociación y polimerización, se logra la amplificación exponencial de una muestra de DNA. Esta técnica se beneficia con el uso de DNA polimerasas termoestables (Taq polimerasas) que resisten cambios drásticos de temperatura de un ciclo a otro. Sustituyen a las polimerasas convencionales (DNA pol I de *E. coli* y Klenow) que requieren ser agregadas al iniciar cada ronda de polimerización.

En la técnica de mutagénesis por PCR, los oligonucleótidos utilizados para

Antecedentes

amplificar al DNA son los mismos que incorporan los cambios deseados. Tiene varias ventajas sobre los métodos descritos de mutagénesis sitio-dirigida. Al obtener el DNA mutante en cantidades casi ilimitadas, se facilita la ejecución de varias técnicas previas a su clonación (como la caracterización por medio de secuencia o por patrones de restricción cuando se han insertado nuevos sitios). También resulta más fácil la clonación misma, porque al tener estos DNAs en altas concentraciones se evita la pérdida de muestra en los pasos preparativos. Esto también está ligado a la eficiencia de la transformación bacteriana. En la práctica, no siempre es factible mantener niveles altos de eficiencia de transformación. Como este valor está en función del número de células competentes y de la cantidad de DNA empleado, un número moderado de éstas puede ser compensado al utilizar un volumen grande de DNA, siempre y cuando éste no llegue a concentraciones saturantes. Así, el grado de optimización requerido depende de la variedad de proteínas mutantes que se espera obtener.

En la literatura se observa una infinidad de reportes sobre modificaciones por mutagénesis con PCR aplicadas a la ingeniería de proteínas (generación de sitios de restricción, sustitución de aminoácidos por cambios puntuales de nucleótidos, sustitución de uno o más codones adyacentes, etc.). Para la creación de bancos de mutantes heterogéneos, se requieren técnicas alternativas de PCR en donde los productos amplificados no contengan secuencias silvestres como contaminantes. Nelson y Long en 1989 describieron una técnica efectiva para la generación de mutantes. Los autores describen la incorporación de un cambio de citosina a guanina en el gen de la proteína S humana. De las colonias analizadas, se reporta una eficiencia del 100% en la obtención del cambio deseado, sin observar colonias silvestres del gen original. Con el uso de cuatro oligonucleótidos, permite insertar mutaciones en cualquier región de la secuencia. Otra de sus ventajas (a diferencia de otros tipos de PCR), es que al insertar la primera mutación, requiere de sólo un oligonucleótido adicional para cada nuevo cambio. De los cuatro oligonucleótidos requeridos, uno de ellos porta la mutación deseada. Los tres restantes sirven para amplificar selectivamente el producto mutante. La existencia de fenómenos de aditividad de diferentes reemplazos en una proteína, así como la posibilidad de interacciones complejas entre residuos de aminoácidos vecinos en la estructura tridimensional de una proteína, no necesariamente así en secuencia, sirve como una justificación muy válida para el enfoque combinatorio de mutagénesis (Wells, 1990).

Merino *et al.*, 1992 reportan una alternativa para la modificación a saturación de una región en un gen a través de mutagénesis combinatoria, utilizando oligonucleótidos no complementarios al gen en la primera reacción de PCR y oligonucleótidos degenerados en las bases que codifican para el o los aminoácido(s) escogidos para ser mutados. Este esquema permite realizar cambios de residuos cercanos en secuencia

Antecedentes

o lejanos, utilizando uno o varios oligonucleótidos que son los portadores de los cambios necesarios. Osuna en 1992 recalca que el éxito de la mutagénesis combinatoria depende del desarrollo de técnicas de búsqueda o selección rápidas y eficientes y de la eficiencia de la mutagénesis.

Mutagénesis combinatoria: "shuffling"-PCR sexual.

Stemmer en 1994 describe el shuffling de DNA como un método para la recombinación homóloga *in vitro* de un conjunto de genes mutantes seleccionados. Las mezclas de secuencia de DNA se fragmentan de manera azarosa con DNAsa I y se vuelven a ensamblar para crear una biblioteca de recombinantes.

Este proceso asemeja la recombinación sexual a través de los entrecruzamientos. Los sistemas bacterianos han generado genes de resistencias nuevas a través de la combinación de episomas de transferencia, recombinación y mutaciones puntuales. La selección natural aparentemente nos permite el rediseño eficiente de genes, operones, vías y quizás de genomas bacterianos completos para aplicaciones específicas.

La esencia de la recombinación sexual es un comportamiento aparentemente complejo, que de hecho ocurre con DNA desnudo. Si se piensa que la sexualidad aparece como un comportamiento que es inherente de los *building blocks*, Stemmer sugiere que la recombinación y la sexualidad pueden ser tan antiguas como el DNA mismo.

Desde 1974, se habla del concepto de *contenido de información* que se define como la resistencia de variación de una secuencia de aminoácidos basada en la diversidad taxonómica. Se sabe que la mayoría de los residuos pueden variar, aunque típicamente no todos al mismo tiempo, dependiendo de los cambios compensatorios en un contexto dado. Las proteínas que son sensibles a la mutagénesis al azar tienen un alto contenido de información (CI). Los sitios activos de las enzimas tienden a tener una densidad alta de información, mientras que los *linkers* tienen una baja densidad.

Esta metodología de mutagénesis nos permite conocer de manera rápida las zonas de la molécula que permiten variaciones en la secuencia de aminoácidos sin perder su estructura o su función. Por otro lado, también se contempla la posibilidad de eliminar las mutaciones silenciosas. Es un método muy eficaz para llevar a cabo evolución molecular *in vitro*, debido a que es muy similar a la recombinación sexual y ensaya un número muy grande de recombinaciones.

Este método puede ser una herramienta útil para barajar muchos genes relacionados naturalmente, como anticuerpos, genes homólogos de diferentes especies o genes altamente fragmentados como los de DNA de fósiles.

Introducción

III. INTRODUCCION

- 1.- Selección de la enzima modelo.
- 2.- Enzima modelo: α -amilasa.
Viabilidad de la reacción con base en los mecanismos encontrados en la naturaleza (CGTasas).
- 3.- Ingeniería de Proteínas de enzimas amilolíticas.
- 4.- Interacción Carbohidrato-Proteína.

1.- Selección de la enzima modelo

La selección de la enzima se hizo basándose en ciertas características generales que son necesarias para poder realizar un trabajo de Ingeniería de Proteínas, estas son:

- 1.- Estructura tridimensional reportada (al menos de alguna proteína homóloga).
- 2.- Mecanismo de reacción caracterizado a nivel molecular.
- 3.- Actividad en solventes orgánicos
- 4.- Capacidad para realizar alcoholólisis
- 5.- Expresión en *E. coli* o en *B. subtilis*
- 6.- Disponibilidad inmediata.
- 7.- Sustratos disponibles.

Pensando en estas características, se escogieron para la evaluación las siguientes hidrolasas, de las cuales se eliminaron aquellas que carecían de alguna de las características requeridas:

ENZIMA	PROCEDENCIA
Proteasas	<i>Bacillus subtilis</i>
Lipasas	animales o microbianas
Fosfolipasas	animales o microbianas
Carbohidrasas:	
*lisozima	microbiana
*alfa-amilasa	género <i>Bacillus</i>
*celobiohidrolasa	microbiana

Introducción

La enzima que cubrió con los requerimientos del trabajo es la α -amilasa, ya que se contaba con una estructura tridimensional homóloga (al inicio del proyecto, ahora se tienen tres), la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, se conoce de manera general el mecanismo de reacción, se tiene un reporte de Matsuubara en 1961 donde se reporta actividad alcohólica de la TAKA amilasa, se tienen varios reportes donde se ha clonado y expresado en cepas de *E.coli*, se pudo disponer de la enzima de manera casi inmediata y los sustratos utilizados fueron disponibles y baratos.

2.- Enzima modelo: α -amilasa

Las α -amilasas -clasificadas como 1,4- α -D-glucan-glucanohidrolasa (EC 3.2.1.1.)- ampliamente distribuidas en la naturaleza (bacterias, hongos, mamíferos y cereales) catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -1,4 contenidos en polímeros de glucosa como el almidón, maltodextrinas y el glucógeno de manera endo. Estas enzimas son llamadas en general amilolíticas en el caso de hidrolizar almidón y α -glucanasas en el caso de hidrolizar α -glucanos. Se han estudiado varios aspectos de las α -amilasas: Su estructura, su función, su mecanismo de secreción a través de la membrana y sus aplicaciones industriales. A nivel comercial, se utiliza principalmente para disminuir la viscosidad del almidón en solución, en la producción de alcohol, en cervecera, destefido de textiles, en la industria repostera, producción de adhesivos, farmacéuticos y detergentes y en el tratamiento del forraje para alimentación animal.

La clasificación general de las α -amilasas, de acuerdo a los productos generados son:

SACARIFICANTES, aquellas α -amilasas que llevan a cabo un 50-60% de la hidrólisis.

LICUEFACTANTES, las que hidrolizan el almidón en un 30-40%.

La especificidad de una α -amilasa depende de su fuente y se distinguen entre si por una distribución característica de oligosacáridos como productos, después de la hidrólisis exhaustiva de almidón. Estas diferencias en el patrón de distribución se han explicado en términos de las diferencias de números y afinidades del sustrato

Introducción

por los subsitios del centro activo de la enzima, siendo un subsitio la región del sitio catalítico capaz de interactuar con un residuo de glucosa del sustrato.

MacGregor en 1988 agrupa a las α -amilasas de distinto origen según su patrón de acción sobre amilosa:

PRODUCTORAS DE G6 (maltohexaosa)

Cebada

Bacillus amyloliquefaciens

PRODUCTORAS DE G5 Y G4
(maltopentaosa y maltotetraosa)

Aspergillus oryzae

Saccharomycopsis fibuligera

PRODUCTORAS DE G3 Y G2
(maltotriosa y maltosa)

Mamíferos

Bacillus subtilis

Streptomyces hygroscopicus

MECANISMO

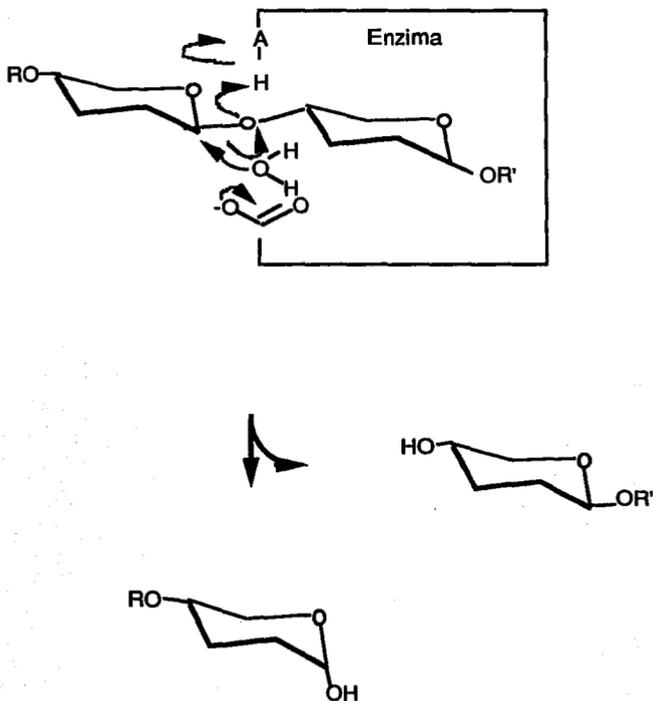
Las α -amilasas son enzimas amilolíticas específicas al enlace glucosídico α -1,4, que retienen la configuración en sus productos, es decir, producen α -glucósidos. El primer mecanismo propuesto por Koshland en 1954 consistía en un desplazamiento nucleofílico. Un mecanismo de dos pasos fue propuesto, donde el estado de transición involucrado en el proceso estaba covalentemente unido a la proteína. Este mecanismo pudo ser explicado de manera más completa por la inclusión del anión carboxilato como el grupo catalítico nucleofílico. Tao *et al.*, 1989 reporta un estudio de NMR apoyando el mecanismo de doble desplazamiento con la formación de un intermediario covalente enzima-glucosido β -carboxil ester de acetal.

Alternativamente, Mayer y Lerner en 1959 proponen un mecanismo con una hidrólisis tipo ácido, con un intermediario carboxonio que se estabiliza con la enzima y la hidratación estereoespecífica del intermediario para la formación de productos. Más tarde, un mecanismo ácido general-base general fue propuesto por Phillips y sus colaboradores en 1967 (citado en Qian *et al.*, 1994), para la hidrólisis enzimática de enlaces O- glucosídicos llevada a cabo por lisozima. La estructura altamente refinada por rayos X de un complejo con inhibidor de la lisozima de clara de huevo de gallina apoya la evidencia de la transferencia de un proton del ácido glutámico al oxígeno del enlace glucosídico, con un estado de transición de ion

Introducción

carboxonio. Este mecanismo es considerado el más probable para glucosil hidrolasas, en donde están incluidas las α -amilasas (Qian *et al.*, 1994). En la figura 11 se muestran los mecanismos de inversión y retención de la configuración basados en las hipótesis antes mencionadas.

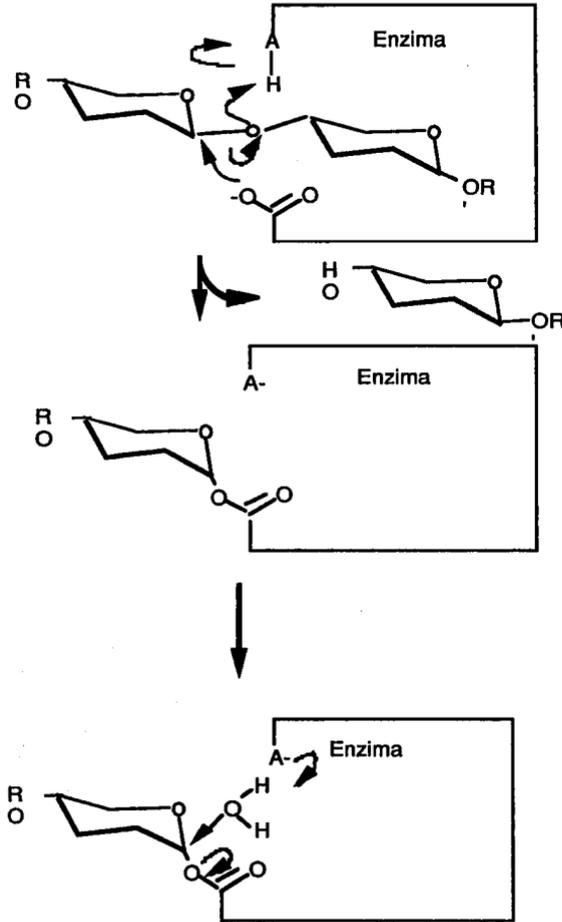
Mecanismos de hidrólisis I.



Enzimas que invierten la configuración

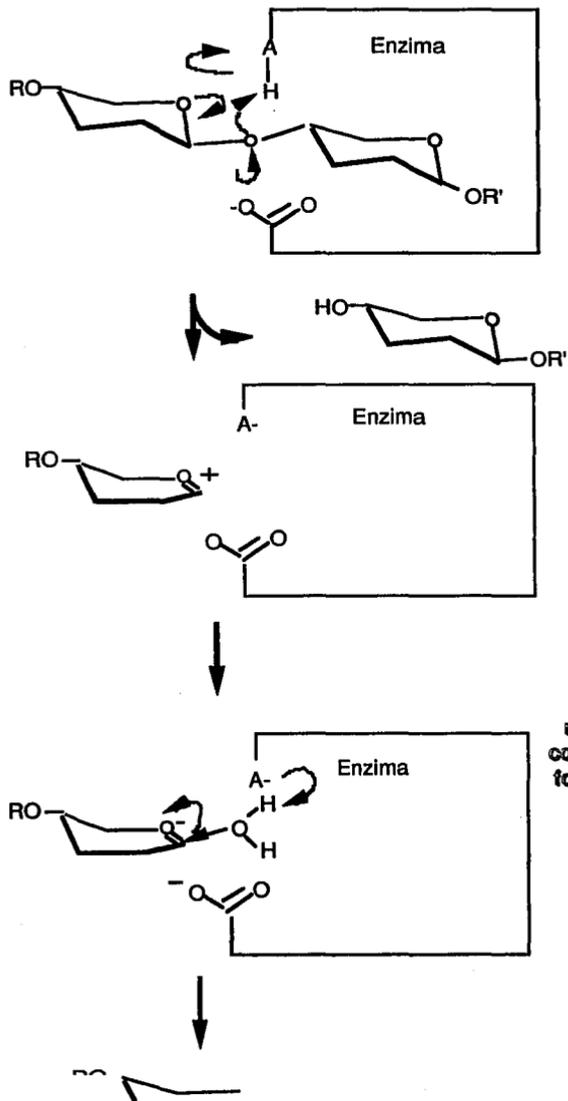
Mecanismos de hidrólisis II.

S_N2



enzimas que retienen la configuración a través de un intermediario covalente carbohidrato-enzima

Mecanismos de hidrólisis III.



Introducción

PROPIEDADES DE LAS α -AMILASAS

El espectro de pH óptimo de las α -amilasas varía desde 2.0-10.5, esto es indicativo de la adaptación evolutiva a sus circunstancias ambientales. La α -amilasa es una metaloenzima que contiene al menos un ion Ca^{2+} por molécula, que la estabiliza y activa. La cantidad de Calcio unido varía desde un ion hasta 10. En la estructura de Taka amilasa se observan 10 iones Ca^{2+} pero sólo uno está fuertemente unido. Una de las regiones conservadas propuestas de las α -amilasas es la responsable de la unión del Calcio. Se ha encontrado que la unión con Calcio y su función es temperatura-dependiente (Vihinen & Mäntsälä, 1989).

Las α -amilasas Bacilares son en general enzimas extracelulares, que se secretan al medio de cultivo en sistemas de expresión. Los péptidos señales de esta enzima del género *Bacillus* son mayores (29 a 41 aminoácidos) que los de otras enzimas de animales superiores (12-15 aminoácidos). No se sabe si su presencia intracelular en algunas cepas es debida a la hidrólisis de los granulos de almidón que algunas bacterias acumulan dentro de su citoplasma, ya que el almidón no puede penetrar las células.

La temperatura óptima para la actividad de la enzima y la temperatura óptima de crecimiento en general están relacionadas. La temperatura óptima más baja reportada es de 25°C-30°C para la amilasa de *F. oxysporum*, la más alta es al menos de 100°C para la enzima de *B. licheniformis*. Dentro del interés de este proyecto se encuentra el de usar una enzima termoestable debido a la posible relación que existe entre termoestabilidad y estabilidad en solventes no-acuosos (Arnold, 1990). Se ha encontrado que algunas de las amilasas son estabilizadas por albúmina serica bovina (BSA), incluida la producida por *Bacillus stearothermophilus*. La estabilización en presencia de BSA se debe probablemente al incremento en la concentración de la proteína, que es ventajoso porque se ha mostrado que las proteasas pueden estar presentes en preparaciones altamente purificadas (Hanzawa et al., 1986, citado por Vihinen y Mäntsälä, 1989).

Los pesos moleculares de las α -amilasas varían desde 10,000 hasta 139,000 Da. En su mayoría son enzimas monoméricas, aunque se han encontrado dímeros con las enzimas provenientes de *B. amyloliquefaciens* y *B. stearothermophilus* (Yutani, 1973).

Los inhibidores más comunes de la α -amilasa son los iones de metales pesados, reactivos con grupos sulfidrilos, EDTA y EGTA.

ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL

Se tienen los reportes de la estructura cristalográfica de α -amilasas provenientes de: *Aspergillus oryzae* a 3Å de resolución (Matsuura *et al.*, 1984), cebada a 3Å (Svensson *et al.*, 1987) *Aspergillus oryzae* a 2.1Å de resolución y *Aspergillus niger* (Boel *et al.*, 1990), *Bacillus subtilis* a 2.2Å de resolución (Chang *et al.*, 1993) y dos estructuras de la α -amilasa de páncreas de puerco, a 2.1Å de resolución, con una molécula de Cl^- , un ión Ca^{2+} , 145 moléculas de H_2O y un disacárido (Larson *et al.*, 1994) y a 2.2Å de resolución con una molécula de Cl^- , un ion Ca^{2+} , 393 moléculas de H_2O y un inhibidor de la α -amilasa, la acarbosa, con 5 anillos de azúcar unidos (Qian *et al.*, 1994).

Las coordenadas de la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (TAKA amilasa) están depositadas en el *Protein Data Bank* como 2taa, las coordenadas de la proveniente de *Aspergillus niger* están en el *Protein Data Bank* como 2aaa.

Todas las estructuras de α -amilasas reportadas (Matsuura *et al.*, 1984, Svensson *et al.*, 1987, Boel *et al.*, 1990 Qian *et al.*, 1994, Larson *et al.*, 1994) muestran que el dominio catalítico es un barril (α/β)₈ que consiste en ocho hebras β paralelas rodeadas de 8 α -hélices paralelas con una conectividad $\beta\alpha/\beta\alpha$ característica. Existe un pequeño dominio adicional localizada en el 3er. β - α loop, además de una hélice insertada después de la 6 hebra β . Los residuos responsables de la unión del sustrato y la catálisis se encuentran en el extremo C-terminal de las hebras β , o bien en los β - α loops (Matsuura *et al.*, 1984, Buisson *et al.*, Klein *et al.*, 1992).

HOMOLOGIAS ENTRE α -AMILASAS Y OTRAS CARBOHIDRASAS

Las α -amilasas presentan en su dominio A el plegamiento de barril (α/β)₈, conocido como TIM-barrel ya que fue en la enzima triosa-fosfato isomerasa (TIM) la primera en la que se encontró este plegamiento. Se sabe que aproximadamente el 10% de las estructuras tridimensionales depositadas de enzimas son TIM-barrels. Farber y Petsko en 1990 concluyeron, después de hacer un análisis estructural de las familias de enzimas con este plegamiento, que es probable que exista una evolución divergente dentro de cada familia de actividades enzimáticas, teniendo por ejemplo

Introducción

las CGTasas y las α -amilasas dentro de una misma familia. Sin embargo, no consideran que su análisis sea una prueba de que no existe evolución convergente. Por lo tanto, se hablará de homología entre carbohidrasas considerando que estas enzimas poseen un ancestro común.

Las α -amilasas alinean en regiones homólogas constituyendo un 4-7% de la identidad total de las secuencias (solo 20 aminoácidos son idénticos en todas las secuencias de α -amilasas). Friedberg (1983) es el que primeramente demuestra tres regiones de homología de las secuencias de aminoácidos de la α -amilasa. Nakajima *et al.*, en 1986 reportan que 6 α -amilasas animales -provenientes de rata, salivar de ratón, pancreática de ratón, cerdo, salivar de humano y pancreática de humano- se encontraron altamente similares (entre 80-90% de identidad de secuencia) mientras que las provenientes de *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus amyloliquefaciens* solo presentan un 60% de identidad entre ellas. En este trabajo es en el primero en el que se encuentran 4 regiones homólogas.

La mayoría de las cadenas laterales que han sido propuestas que interactúan con el carbohidrato están cerca o en los extremos C-terminal de las hebras β del barril α/β . Svensson en 1988 reporta que existe una clara homología entre α -amilasas, maltasas y ciclodextrin glucosiltransferasas (CGTasas). Henrissat en 1991 realiza un alineamiento de secuencias de glucosil hidrolasas buscando agruparlas en familias dependiendo de su clasificación enzimática por número (EC), encuentra 18 familias mono-específicas (con un mismo número EC) mientras que 17 familias fueron poliespecíficas (con al menos 2 números EC). La existencia de familias poliespecíficas indica que la adquisición de nuevas especificidades de glucosilhidrolasas es un evento evolucionario común. La divergencia de glucosilhidrolasas para adquirir nuevas especificidades no es un evento que se pueda predecir que se lleve a cabo con facilidad dada la estereoquímica relacionada entre algunos de los sustratos. Esta divergencia puede explicar su origen en la emergencia de nuevos carbohidratos durante la evolución. Señala que este esquema lleva a dos posibles explicaciones de presión evolutiva contradictorias:

- 1.- Optimización de la eficiencia catalítica del sustrato original
- 2.- Divergencia en la adquisición de nueva especificidad.

En 1991, Jespersen *et al.* reportaron a través de alineamiento de secuencias los distintos dominios presentes en las glucosil hidrolasas. Encontraron que tanto las α -amilasas como las CGTasas presentan el barril $(\beta/\alpha)_3$ en el extremo N-terminal, denominado por los autores dominio A, seguido por un dominio consistente en

Introducción

hebras β plegado con la conformación del motivo *Greek-key* (dominio C). Un dominio menor (dominio B) es aquel insertado entre la tercera hebra β y la tercera α -hélice del barril (β/α)₈. Las CGTasas tienen un dominio adicional llamado dominio D con hebras β presentando un plegamiento del tipo inmunoglobulina (*immunoglobulin-type*); finalmente un dominio E con un motivo de hebras β diferente a los otros presentes en estas enzimas.

Los dominios A y B son los responsables de la actividad catalítica, no se conoce la función del dominio C aunque Holm *et al.*, 1990 reporta mutantes en este dominio que pierde la actividad.

El dominio D no se le conoce función, mientras que el dominio E está involucrado en la unión a almidón crudo en glucoamilasas.

Comparando específicamente α -amilasas con ciclodextrin glucosiltransferasas, Nakamura *et al* en 1992 realizó primeramente un trabajo de alineamiento en el que encuentra que el dominio α/β de las α -amilasas puede ser alineado con el mismo dominio de las CGTasas obteniéndose una identidad en secuencia de menos del 30%. Los residuos catalíticos se mantienen conservados en ambas enzimas.

A través de mutagénesis crearon las mutantes CGTasa D229N, E257Q y D328N. Ninguna de estas mutantes presenta actividad de hidrólisis (α -amilasa) ni de transglucosilación (CGTasa) pero todas estas mutantes mantienen su capacidad de unirse a almidón. Se sabe que los dos Asp y el Glu encontrados en α -amilasas y CGTasas también se encuentran en pululanasa (actividad sobre poli α -1,6 maltotriosa), neopululanasa, α -amilasa-pululanasa (actividad sobre α -1,4 y α -1,6), isoamilasa (actividad α -1,6 sobre glucógeno), y α -glucosidasas (actividad sobre residuos de glucosa terminales en el extremo no-reductor unidas α -1,4).

Las variaciones de especificidad de sustrato y de productos debe estar adscrita a la relación entre un centro catalítico similar pero estructuras de los subsitios diferentes.

SECUENCIAS CONSERVADAS EN LAS α -AMILASAS

1era. región
(según Janecek, 1992)

AO	GFTAIWTP	64
B	GVIHWLPP	42
HP	GFGGVQVSP	43
EA	GITAVWIPP	41
ES	GYTAIQISP	39
SH	GYGYVEVSP	39

2a. región
(según MacGregor, 1988)

GMVIMDVVANHM	123
GVOAIADIVINHR	94
GVRTYVDVINHM	102
NVQVYGDDVVLNKH	104
GIKVIVDVINHT	103
GVKVIADAVVNHM	94

3era. región
(según Janecek, 1992)

AO	LPDLD	177
B	APDID	150
HP	LIDL	148
EA		
ES	LYDWN	147
SH		
BST	YADLD	204

4a. región
(según MacGregor, 1988)

DGLRIDIVKH	210
DAWRLEFARG	184
AGFRLEDAKSH	201
DGFRLEDAKSH	235
DGFRLEDAKSH	180
DGFRLEDAKSH	178

5a. región
(según MacGregor, 1988)

AO	EVID	233
B	EWD	209
HP	EVID	235
EA	EYQ	263
ES	EILQ	210
SH	EVIY	203

6a. región
(según MacGregor, 1988)

LLGTFVENHDN	298
KAATFVDNHDN	282
RALVFVDNHDN	291
KAVTFVENHDN	319
KLVTWVESHDT	260
QARTFVDNHDN	253

7a. región
(según Janecek, 1992)

AO	AIRNY	271
B	AIRKR	341
HP	WERNV	396
EA	ARKEY	390
ES	RFHN	340
SH	GFRNA	328

Introducción

SITIO DE UNIÓN A CALCIO Y LOOP L3

Como se comentó anteriormente, la α -amilasa requiere de Ca^{2+} para su actividad. En la estructura tridimensional de la Taka amilasa se observa que los residuos 121 (posición en la que se encuentra N o D en todas las secuencias), 163 (N o D) y 175 (D) están muy cerca del ion calcio y por lo tanto parecen ser importantes para la unión de este ión. Los residuos 210 y 211 también están cerca del ion calcio. El residuo 210 está parcialmente conservado (H o G) y no existe conservación en el 211. Es posible, sin embargo, que estos residuos interactúen con el calcio a partir de la cadena principal, v.g a partir del grupo C=O.

MacGregor en 1988 se refiere como loop L3 a la secuencia de aminoácidos comprendida entre la tercera hebra b y la tercera hélice. Este loop es el más largo (55-109 residuos) para las enzimas de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. stearothermophilus*.

Tres de los residuos que pueden estar uniendo al ion calcio (163, 175 y 121 de Taka amilasa) están situados en el L3. Es posible que el ion calcio juegue un papel importante en el mantenimiento de esta parte de la cadena polipeptídica en la conformación correcta para la actividad enzimática. El loop que conecta la cadena $\beta 3$ con la $\alpha 3$ en las α -amilasas forma un dominio estructural completo. Se conoce del análisis cristalográfico de la α -amilasa de páncreas de puerco (PPA) (Qian *et al.*, 1994), que el loop mencionado interacciona con el dominio $(\alpha-\beta)_8$ a través de un sitio de unión a calcio, el cual se observa también en la estructura cristalográfica de dos α -amilasas microbianas, *A. oryzae* (TAKA) y *A. niger* (Matsuura *et al.*, 1984, Boel *et al.*, 1990) y en la de páncreas de puerco (Larson *et al.*, 1994). Dado el papel regulatorio que se le ha dado al calcio en la catálisis de las α -amilasas de mamíferos, Qian *et al.*, 1994 observó que el calcio está alejado del sitio activo 12 Å y que su esfera de coordinación la constituyen aminoácidos del Loop L3. Además, se observa que este dominio es poco estructurado y móvil, por lo que propone que el papel del calcio es contribuir al plegado de este dominio.

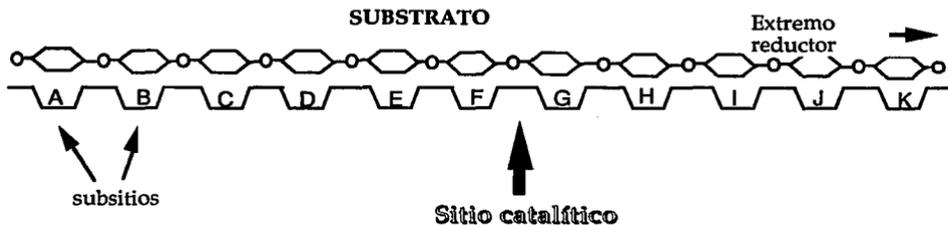
Janecek en 1992 identificó regiones conservadas en el L3 en α -amilasas de diverso origen, que son homólogas a las zonas de unión del calcio estructural en PPA y Taka amilasa. La CGTasa, cuya estructura cristalográfica también se ha resuelto, también posee el dominio estructural L3 y requiere de calcio para su actividad.

SUBSITIOS Y RESIDUOS CATALITICOS

Se define como subsitio a la región del sitio activo que interactúa con un anillo de piranosa del sustrato de la α -amilasa.

Introducción

Sitio activo de la enzima



FUENTE

A. oryzae

Cebada

Pancreática de Puerco

B. amyloliquefaciens

B. subtilis (sacarificante)

SUBSITOS

C-K (Kondo, 1980)

A-I (MacGregor & MacGregor, 1985)

D-H (Seigner *et al.*, 1987)

A-J (Torgerson *et al.*, 1979)

D-H (Hiromi *et al.*, 1983)

Lo que se espera de las α -amilasas de las que no se han estudiado los subsitios es que tengan los subsitios D-H y que sean similares en la estructura de esta porción de la molécula.

RESIDUOS CATALITICOS

Los residuos que se han considerado activos por múltiples estudios de mutagénesis sitio dirigida, de alineamiento de secuencias y conservación de las mismas están situados estructuralmente ya sea en las hebras β (cerca de los extremos C-terminal) o en los loops que unen el extremo C-terminal de las hebras β al extremo N-terminal de la α -hélice adyacente (L1- L8). Los residuos que se encuentran en los loops deben ser capaces de un gran movimiento conforme se une el sustrato. El posicionamiento de los residuos activos en dichos loops permite variaciones de una α -amilasa a la otra sin alterar la superestructura ($\beta\alpha$)₈ de las enzimas.

ASP 206

ASP 297

Hebras del barril β

loop 7

Introducción

en la catálisis, reconocimiento y unión del sustrato, estabilización del estado de transición y especificidad de productos. Todos estos resultados, proveen las bases para modificar las propiedades de las glucosidasas usando técnicas genéticas. Algunos de las mutantes de α -amilasa reportadas en la bibliografía que pueden ser importantes para este trabajo se enumeran a continuación.

Holm *et al.*, 1990: Reportan un banco de 98 mutantes de α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 a lo largo de toda la proteína. Las mutantes en los residuos catalíticos pierden su actividad. Dentro de este banco de mutantes, las que se tienen en el residuo 238 son importantes para este proyecto debido a que His 238 parece ser un residuo importante debido a que en la cristalografía de Matsuura *et al.*, 1984 se encontró una molécula de H₂O unida a este residuo, molécula de H₂O que probablemente participa dentro del mecanismo; además, este residuo participa en la unión con el sustrato y probablemente con el Ca²⁺.

H238N		continúa activa
H238Y		pierde su actividad
V236V	H238Y	pierde su actividad

El hecho de haber encontrado una mutante que continúa activa denota que este residuo no es esencial para la catálisis, por lo que ofrece un buen sustento para proponerlo como candidato a mutarse.

Matsui *et al.*, 1991: Reportan la mutante W84L de la α -amilasa de *Saccharomycopsis fibuligera*; la cual aumenta su capacidad transglucosilática.

Ishikawa *et al.*, 1992: Reportan mutantes en la α -amilasa pancreática de humano en las Histidinas cercanas al sitio activo. H101N disminuye su actividad a 1%, H201N disminuye a un 26% su actividad y concluyen que juega muchos papeles estructurales con respecto a la unión con Calcio; H299N disminuye a 3% su actividad. La H101 es la correspondiente H238 en la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* .

Fujiwara *et al.*, 1992: Reportan mutantes en CGTasa de *Bacillus stearothermophilus* que pierden su capacidad de hacer ciclos y aumentan su capacidad sacarificante. La mutante F255I elimina su actividad CGTasa y aumenta en 227% su actividad sacarificante. En esta posición de la proteína se encuentran residuos aromáticos en las CGTasas, mientras que para las α -amilasas se encuentran isoleucinas, leucinas o valinas. Se concluye que probablemente este residuo tiene que ver con la capacidad

Introducción

de transglucosilación de la enzima para generar ciclodextrinas. Dado que el mecanismo de transglucosilación es una reacción de alcoholólisis, esta mutación es muy importante para estudiar los residuos involucrados en reacciones de la hidrólisis y transglucosilación de la CGTasa.

Søgaard *et al.*, 1993: Reportan que las mutantes de α -amilasa de cebada en los residuos catalíticos D180N, E205Q y D291N producen enzimas inactivas. Con respecto a estos residuos confirma su papel como catalíticos, ya sugerido a partir de los alineamientos de secuencia. También genera mutantes en dos de las histidinas alrededor del sitio activo, H93N (TAA H122) y H290N (TAA H296). Concluye que las histidinas aumentan la afinidad por acarbosa y que participan en la estabilización del estado de transición. La mutante W279A es crítica para la estabilidad del plegamiento en las α -amilasas de cereales, según concluyen en este reporte.

Takase, 1993: Reporta mutantes de α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* en el residuo N329. Genera tres mutantes: N329K que disminuye su actividad a 0.3% y altera el perfil de pH/Temperatura de la enzima, N329D que también altera su perfil pH/Temperatura pero no afecta su actividad y N329V que no afecta su actividad en gran medida. Concluye que existen residuos involucrados en la dependencia del pH que no necesariamente están relacionados con la actividad. Este residuo es cercano al D331, que es catalítico.

Matsui *et al.*, 1994: Reporta que las mutantes de α -amilasa de *Saccharomycopsis fibuligera* en los residuos Y83F, Y83W, W84F y W84Y pierden su capacidad de transglucosilar, mientras que las mutantes Y83L, Y83N y W84L continúan transglucosilando.

Los autores concluyen que para estas posiciones dentro del sitio activo de la enzima la presencia de un residuo no cargado, hidrofóbico aumenta la capacidad transglucosilática de la enzima.

4.- Interacciones carbohidrato-proteína

Otro aspecto importante a considerar son las interacciones carbohidrato-proteína. Los carbohidratos juegan papeles clave en una gran variedad de procesos biológicos, siendo que estos procesos requieren de interacciones del carbohidrato con una proteína, es muy importante el entendimiento molecular de los factores asociados con este tipo de interacciones. Entendiendo las reglas básicas que determinan la afinidad, la especificidad y la catálisis en sí, no solamente entenderemos mejor los mecanismos de reacción ya conocidos sino que a partir de éstos podremos diseñar nuevas actividades, especificidades, afinidades. Quiócho en 1989 presenta un análisis completo de este tipo de interacciones basándose en las estructuras

Introducción

tridimensionales resueltas por rayos X del complejo de la proteína que une arabinosa (ABP) con su sustrato, la estructura a 1.9 Å de resolución de la proteína que une galactosa (GBP) con D-glucosa y finalmente la estructura de la proteína que une maltosa (MBP) a 2.3 Å. Todas estas son enzimas monoméricas sirven como componentes esenciales del sistema de transporte activo sensible a shock-osmótico de una variedad de carbohidratos.

Los factores esenciales para la interacción entre las proteínas y los sacáridos son:

- 1.- Puentes de hidrógeno.
- 2.- Fuerzas de van der Waals.
- 3.- Apilamiento o "Stacking" entre el carbohidrato y los residuos aromáticos de la proteína.
- 4.- Conformación del carbohidrato.

1.- PUENTES DE HIDROGENO

Los puentes de hidrógeno juegan tres papeles principales en las interacciones carbohidrato-proteína:

- * Proveen de estabilidad.
- * Confieren especificidad.
- * Controlan la dinámica de la interacción.

Esto se logra gracias a las características que presentan los puentes de hidrógeno en general; por un lado son lo suficientemente estables para contribuir significativamente con los requisitos de afinidad de la unión con el ligando (estabilidad) pero no son tan fuertes como para impedir una rápida disociación con el ligando (dinámica), factores especialmente importantes para las proteínas involucradas en transporte activo. Si se les compara con las fuerzas no-direccionales de van der Waals, los puentes de hidrógeno son altamente direccionales, característica importante para la especificidad, por último, refiriendonos a los sustratos, los grupos hidroxilos de los carbohidratos no solo participan de manera importante en estas uniones sino que también constituyen el grupo funcional más importante en los carbohidratos, ya que son esteroespecíficos y altamente expuestos.

Introducción

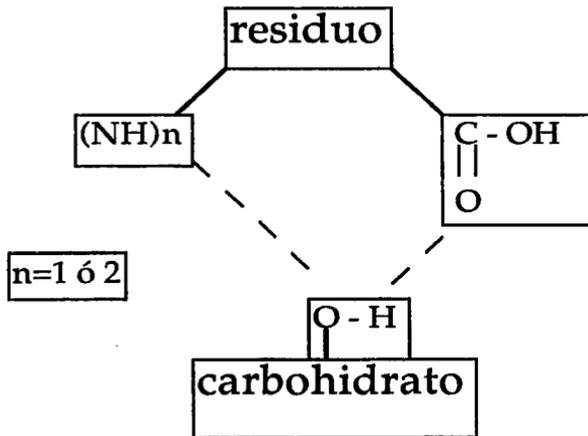
La importancia de los grupos hidroxilo también radica en que tienen la habilidad de involucrarse en tres puentes de hidrógeno: Como DONADOR de un puente de hidrógeno y como ACEPTOR de dos a través de los pares electrónicos sp^3 no apareados.

Se tienen tres tipos de puentes de hidrógeno:

- a) puentes de hidrógeno cooperativos
- b) puentes de hidrógeno bidentados
- c) redes de puentes de hidrógeno

a) PUENTES DE HIDROGENO COOPERATIVOS

Los puentes de hidrógeno cooperativos son los que resultan de la participación simultánea de un hidroxilo del carbohidrato como donador y como aceptor de puentes de hidrógeno. Todos los hidroxilos de la D-glucosa -sustrato- unida a proteína están comprometidos en uniones de hidrógeno cooperativas.



Introducción

Figura 3I. Representación esquemática de los puentes de hidrógeno cooperativos entre el carbohidrato y la proteína.

b) PUENTES DE HIDROGENO BIDENTADOS

Cuando cada uno de los dos hidroxilos adyacentes de un 4C_1 de piranósido interactúan con un átomo diferente del mismo residuo plano polar, forman un puente de hidrógeno bidentado. Estos puentes de hidrógeno tienen determinados requerimientos geométricos, se forman cuando el par de hidroxilos adyacentes son ecuatoriales o cuando uno es ecuatorial y el otro axial. La distancia entre el par de oxígenos del carbohidrato es de aproximadamente 2.8Å.

c) REDES DE PUENTES DE HIDROGENO

La formación de puentes de hidrógeno cooperativos y bidentados lleva a la creación de redes de puentes de hidrógeno entre el azúcar y los residuos esenciales. El grupo polar de una cadena lateral plana, el puente de hidrógeno de residuos polares adyacentes forman una red mas extensiva y elaborada de puentes de hidrógeno.

Introducción

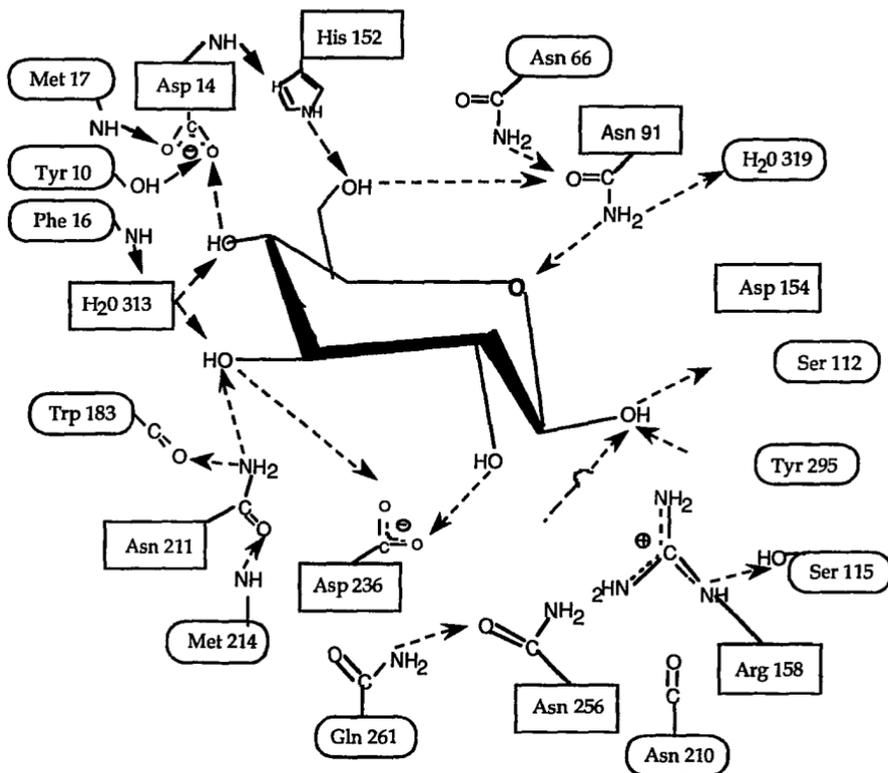


Figura 4I. Diagrama esquemático de los puentes de hidrógeno cooperativos, puentes de hidrógeno bidentados y redes de puentes de hidrógeno en el complejo de la proteína unidora de D-galactosa (GBP) con D-glucosa. Adaptado de Quioco, 1989.

2.- FUERZAS DE VAN DER WAALS

Las interacciones entre las moléculas no polares son muy débiles y dependen de la

Introducción

atracción entre los dipolos transitorios y los dipolos inducidos. En una muestra grande de moléculas no polares habrá algunas moléculas que presenten dipolos transientes o temporales, los cuales causan un "clumping" (agrupamiento) momentáneo de uniones de electrones al final de una molécula. Este dipolo transitorio puede inducir otro dipolo en la molécula vecina. Estas asociaciones tienen una vida media corta y su energía de interacción es baja.

Estas interacciones son parte de las fuerzas de van der Waals, las asociaciones no covalentes basadas en la atracción entre dipolos transitorios (Campbell, 1991).

Las fuerzas de dispersión también contribuyen significativamente en la interacción carbohidrato-proteína. Todos los átomos pesados de la L-arabinosa unida a ABP, así como la D-glucosa unida a GBP presentan fuerzas de van der Waals con los átomos de la proteína. Se requiere de una distancia de 4Å para que puedan interactuar. Se encuentran 54 contactos van der Waals en el complejo ABP-arabinosa y 60 en el complejo GBP-glucosa. Este número de contactos es inusual y son la consecuencia del gran número de puentes de hidrógeno que permiten que muchos de los otros átomos de los residuos polares alcancen la distancia van der Waals con el sustrato complementando la unión del carbohidrato con su sitio de unión.

3.- APILAMIENTO ó "STACKING" ENTRE EL CARBOHIDRATO Y LOS RESIDUOS AROMATICOS DE LA PROTEINA.

Inesperadamente y de manera sobresaliente, algunos de los contactos van der Waals en los dos complejos mencionados anteriormente (GBP -glucosa y ABP-arabinosa) se generan por el stacking de uno o los dos lados del anillo del monopiranosido con residuos aromáticos. El descubrimiento de estas interacciones de apilamiento ó stacking revelan otra faceta inusual de las interacciones carbohidrato-proteína. La localización de los residuos aromáticos es consistente con la presencia de centros hidrofóbicos, estos residuos aromáticos confieren especificidad al sitio activo ya que no permiten la unión de ciertos epímeros por impedimentos estéricos. Otro de los factores que confieren especificidad se puede atribuir a la ausencia de residuos que interactúen con la orientación correcta para formar puentes de hidrógeno.

4.- CONFORMACION DEL CARBOHIDRATO

Los monopiranosidos tienen una conformación 4C_1 de silla. Los sitios de unión son una de las regiones de la proteína que presentan menor movilidad, esto causado en gran parte por la formación del complejo. Dado el extenso número de interacciones y la gran cantidad de puentes de hidrógeno, de interacciones van der Waals, interacciones de stacking y la eficiencia alta de empaqueo entre los sitios de unión al sustrato con éste, el anillo del piranosido unido no se encuentra distorsionado.

IV. OBJETIVO GENERAL

Obtener mediante mutagénesis combinatoria un α -amilasa que lleve a cabo reacciones de alcoholólisis teniendo como sustratos almidón y alcoholes de cadena larga.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Aislamiento y clonación del gen de α -amilasa de *B. stearothermophilus* ATCC 12980.
- 2.-Diseño de un método de ensayo para discriminar reacciones de alcoholólisis y de hidrólisis.
- 3.- Modelado molecular de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* en base a la estructura tridimensional de la α -amilasa de *Aspergillus orizae* (TAKA amilasa).
- 4.-Evaluación del método de mutagénesis combinatoria propuesto por Merino *et al.*, (1992) como alternativa para obtener mutantes de α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*.
- 5.- Secuenciación y caracterización fenotípica de las mutantes.

VI. MATERIALES Y METODOS

- 1.- Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo, antibióticos y soluciones amortiguadoras.
- 2.- Extracción de plásmidos en *E.coli*.
- 3.- Aislamiento de genoma de bacterias.
- 4.- Electroforesis en gel.
- 5.- Transformación bacteriana.
- 6.- Digestión de DNA con enzimas de restricción.
- 7.- Mutagénesis dirigida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 8.- Clonación de fragmentos mutantes.
- 9.- Secuenciación.
- 10.- Cromatografía en papel de carbohidratos.
- 11.- Determinación de azúcares reductores.
- 12.- HPLC.
- 13.- Modelado Molecular

1.- Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo, antibiótico y soluciones amortiguadoras.

Cepas (*E. coli*).

- JM101 (supE thi Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB+ lacI ϕ lacZ Δ M15]). Se utiliza para la extracción de plásmidos y para la expresión de proteínas silvestres y mutantes. También es útil por el marcador genético (lacI ϕ lacZ Δ M15) que permite la α -complementación con el extremo amino terminal de la β -galactosidasa codificada en vectores de expresión del tipo pUC.

-DH5 α (supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1). Se utiliza para la producción de DNA para secuencia (en doble cadena). Cepa deficiente en el sistema de recombinación, lo cual facilita la transformación y permanencia de DNAs modificados *in vitro*.

-CMK presenta una alta eficiencia de transformación.

Plásmidos.

pBGS 18 y 19. La construcción de estos plásmidos fue reportada por Spratt *et al* en 1986. El objetivo de estos plásmidos es tener plásmidos Km, que fueran análogos con pUC y pEMBL. Varían de los pBS por la eliminación de un sitio AccI que estaba duplicado. Estos plásmidos contienen el polilinker de M13 y todos los sitios de clonación pueden ser utilizados. La designación 18 y 19 son referencia de de las correspondientes de los vectores M13mp.

Materiales y Métodos

Medios de cultivo

Medios líquidos

Medio LB (Luria-Bertani):

A 950 mL de agua desionizada agregar 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Agitar hasta que los solutos se disuelvan. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y llevar a un volumen final de 1 L con agua desionizada. Esterilizar con autoclave durante 20 min. a 15 libras/pulgada².

Medio SOB

A 950 ml de agua desionizada agregar: 20 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 0.5 g de NaCl. Agitar hasta que los solutos se disuelvan y posteriormente agregar 10 ml de KCl 250 mM. Ajustar a pH 7.0 con NaOH 5 N y Aforar a 1 L con agua desionizada. Esterilizar con autoclave. Previo a su uso, se le adicionan 5 mL de una solución estéril de MgCl₂ 2 M.

Medio SOC

Este medio es idéntico al SOB, solo que contiene glucosa a una concentración 20mM. Para esto, agregar 20ml de glucosa 1 M estéril a 1 L de medio SOB cuando éste haya llegado a 60°C o menos despues de autoclavar.

Medios sólidos.

De los medios descritos arriba, preparar el deseado y agregar 15 g de bacto-agar. Esterilizar con autoclave. Dejar que el medio se enfríe hasta 50°C aproximadamente antes de agregar sustancias termolábiles, como antibióticos.

Medio Agar Nutritivo- almidón

A 950 mL de agua desionizada agregar 31 g de agar nutritivo DIFCO y 2 g de almidón soluble. Se suspende perfectamente y se esteriliza con autoclave durante 20 min. a 15 libras/pulgada².

Para la preparación de cajas:

Vaciar 20 mL de medio a cada caja de Petri de 90 mm. Dejar 20 min. a temperatura ambiente para que el agar solidifique. Almacenar a 4°C. Antes de usar, secarlas en una campana de flujo laminar (dejando las tapas entreabiertas) durante 20 min.

Materiales y Métodos

Antibiótico

Se preparan como soluciones stock 1000x y se almacenan a -20°C:

Kanamicina. Disolver 125 mg en 5 ml de agua bidestilada (25 mg/ml final) y filtrar.

La concentración de trabajo es de 25 µg/ml.

Soluciones amortiguadoras.

Amortiguador TE

Este amortiguador se utiliza para resuspender DNA. Consta de tris hidroximetilaminometano (trizma base) 10 mM pH 7.6 y etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA) 1 mM pH 8.0

Amortiguador TB

Este amortiguador se utiliza para resuspender células al hacerlas competentes para transformación. Esta compuesto por piperazina-N,N'-bis 2-etano ácido sulfónico (PIPES) 10 mM, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM y KCl 250 mM. Mezclar todos los componentes excepto el MnCl₂ y ajustar el pH hasta 6.7 con KOH 5 M. Disolver posteriormente el MgCl₂ y esterilizar por filtración con membranas de 0.45 µm. Guardar a 4°C.

Amortiguador TBE

Se usa como amortiguador de corrida en geles de acrilamida o agarosa. Para preparar el stock 10x se mezclan 108 g de tris base, 55 g de ácido bórico y 40 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0) en un litro de agua bidestilada.

2.- Extracción de plásmidos en *E. coli* (Según Rodríguez y Tait, 1983).

1.- Inocular una colonia bacteriana transformada en 1.5mL de medio LB con antibiótico en un tubo de vidrio de 15mL. Incubar toda la noche a 37°C con agitación de 200 rpm.

2.- Pasar el cultivo a un tubo de polipropileno de 1.5 mL y centrifugar 5min. a 12,000 x g.

3.- Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 1mL de amortiguador TES (tris HCl 50 mM, pH 7.6, sacarosa al 20% y EDTA 50 mM) con ayuda de un agitador magnético (vórtex).

4.- Centrifugar durante 5min. a 12,000 x g, desechar el sobrenadante y resuspender en 150 µl de amortiguador TES.

5.- Agregar 5 µL de RNasa (ribonucleasa pancreática A, 10 mg/mL en acetato de sodio

Materiales y Métodos

0.1 M, EDTA 0.3 mM, pH 4.8 y precalentado a 80°C durante 10min.) y 350 µl de mezcla lítica (solución 1:1 de SDS al 2% y NaOH 0.4 M). Agitar por inversión del tubo e incubar en hielo durante 20min.

6.- Agregar 250 µl de acetato de sodio 3 M pH 4.8. Invertir el tubo varias veces. Incubar en hielo durante 30min.

7.- Centrifugar 15 min. a 12,000 x g a 4°C. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio.

8.- Agregar un volumen de isopropanol. Invertir el tubo varias veces y centrifugar 15 min. a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.

9.- Limpiar con un papel higiénico las paredes del tubo con cuidado de no tocar la pastilla de DNA. Secar el tubo en Savant (desecador de vacío y calor).

10.- Resuspender en 300 µl de agua bidestilada y agregar un volumen de fenol. Agitar con vórtex y agregar otro de cloroformo. Agitar nuevamente.

11.- Centrifugar 4 min. a 12,000 x g. Pasar el sobrenadante a otro tubo y agregarle 300 µl de cloroformo. Agitar y centrifugar nuevamente.

12.- Tomar el sobrenadante y agregar 12 µL de NaCl 5 M. Agitar y posteriormente poner 300 µL de etanol absoluto. Dejar 15 min. en hielo seco o 1 hora a -20°C.

13.- Centrifugar 15min. a 12,000xg. Tirar el sobrenadante y agregar 500 µL de etanol al 70%. Centrifugar 5 min. a 12,000 x g y tirar el sobrenadante. Secar en Savant.

14.- Resuspender en 20 µL de agua bidestilada.

Se obtienen de 1 a 2µg de DNA por mL de cultivo.

3.- Aislamiento de genoma de bacterias.

1.- Crecer el cultivo a saturación

2.- Centrifugar 1.5 mL en microfuga a 14000 x g durante 2 minutos.

3.- Resuspender el pellet en 567 µL de buffer TE. Agregar lisozima hasta que alcance una concentración de 1mg/mL. Incubar a 37°C por 30 min.

4.- Añadir 30 µL de SDS al 10% y 3 µL de proteinasa K 20 mg/mL. Mezclar e incubar una hora a 37°C.

5.- Agregar 100 µL de NaCl 5M. Mezclar a fondo.

6.- Agregar 80 µL de CTAB/NaCl. Mezclar e incubar por 10 min. a 65°C.

7.- Extraer con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1. Centrifugar por 5 min.

8.- Transferir la fase acuosa a un tubo fresco. Extraer con un volumen de fenol. Agitar a fondo. Agregar un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico. Centrifugar 5 min.

9.- Transferir la fase acuosa a un tubo fresco. Precipitar el DNA con 0.6 volúmenes de isopropanol. Lavar el precipitado con 70% de etanol. Remover el sobrenadante y secar el pellet. Resuspender en H₂O o buffer TE.

4.- Electroforesis en gel.

La técnica para preparación de geles de agarosa es la descrita por Sambrook et al. 1989. Para el análisis y aislamiento de DNA de plásmido utilizar agarosa al 0.8% en amortiguador TBE 1x. Los fragmentos de DNA de menor tamaño (2000-100pb) se observan en concentraciones variables de agarosa (de 1 a 1.5%), según el caso. A cada muestra (desde 50 hasta 500ng de DNA si es un gel analítico) agregar 2µl de amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol al 30% en agua bidestilada) por cada 10µl de DNA. Los geles se corren a un voltaje de 1-5V/cm (el número de cm es igual al de la distancia entre electrodos) en amortiguador TBE 1x. Es importante que el amortiguador con el que se prepara el gel sea del mismo stock con el cual se hace la corrida. Después de ésta, sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio (1µg/ml de agua bidestilada) durante 1min. Enjuagar el gel en agua para remover el exceso de bromuro de etidio. Observar en transiluminador de luz ultravioleta.

Extracción de bandas de DNA a partir de agarosa.

En esta técnica es importante que el DNA por aislar no sea sumergido en bromuro de etidio ni expuesto a la luz ultravioleta:

1.- Utilizar una alícuota mínima del DNA a extraer como control de migración (la cual puede correr en uno de los extremos del gel). Así, en base a su posición observada en luz UV se cortan las bandas de DNA restante no teñido.

2.- Pasar la agarosa por una jeringa de 1 o 3mL (con aguja) y devolver el machacado a un tubo de polipropileno de 1.5mL.

3.- Agregar tres volúmenes de fenol, agitar fuertemente con vórtex y congelar en hielo seco durante 15 min.

4.- Centrifugar durante 15 min. a 12,000 x g y tomar el sobrenadante.

A éste, agregarle un volumen de fenol, agitar con vórtex y agregar otro de cloroformo. Agitar nuevamente y centrifugar a 12,000 x g durante 4 min.

5.- Tomar el sobrenadante y precipitar con 4 µl de NaCl 5 M por cada 100 µL de muestra y un volumen de etanol absoluto. Dejar en hielo seco durante 15 min.

6.- Centrifugar 15 min. a 12,000 x g. Desechar el sobrenadante y agregar 500µL de etanol al 70%, invertir el tubo y centrifugar 5min. a 12,000xg. Desechar el sobrenadante con cuidado para conservar la pastilla (dos veces).

7.- Secar el tubo con Savant. Resuspender la pastilla en amortiguador TE o agua bidestilada. Verificar la cantidad de DNA recuperado en un gel apropiado.

Caracterización y aislamiento de oligonucleótidos.

Se utilizan geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20% como se describe en Sambrook *et al*, 1989. El stock al 20% de acrilamida se prepara de la siguiente manera: a 50mL de agua bidestilada agregar 19 g de acrilamida, 1 g de bis-acrilamida, 48.04 g de urea (8 M final) y 10 ml de amortiguador TBE 10x. Agitar hasta disolver y aforar a 100mL de agua. Filtrar con membrana Millipore de 0.45 μm . Guardar en frasco color ámbar. Para la preparación de estos geles existen varios modelos de cámaras verticales con diferentes volúmenes. En nuestro caso, se requiere de 6ml de stock de acrilamida, 28 μl de persulfato de amonio y 5 μL de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) para un gel. A cada 10 μL de muestra, agregar 2 μl de amortiguador de carga (para prepararlo, mezclar: 10ml de formamida, 10mg de xilencianol, 10 mg de azul de bromofenol y 200 μL de EDTA 0.5 M (pH 8.0). Correr las muestras a 300 V. Sacar el gel del molde e iluminar con lámpara de luz ultravioleta de onda corta o teñir con bromuro de etidio como los geles de agarosa. Los geles preparativos se hacen en cámaras de mayor capacidad (27 mL de stock de acrilamida, 200 μL de persulfato de amonio y 25 μL de TEMED) y se corren a 200 V.

Elución de oligos a partir de bandas de poliacrilamida al 20%.

- 1.- Cortar con navaja la banda deseada y ponerla en un tubo de polipropileno de 1.5mL (nunca más de 0.2 g de gel por tubo).
- 2.- Agregar 1mL de agua bidestilada a cada tubo e incubar durante 12 h a 37°C.
- 3.- Guardar los sobrenadantes en tubos de polipropileno de 1.5ml. Eliminar el exceso de urea por el método propuesto por Sawadogo & Van Dyke en 1991.
- 4.- Agregar 0.5 mL de butanol a cada tubo de polipropileno. Agitar con vortex por 15 seg. y centrifugar durante 30 seg. a 14,000xg. Eliminar la fase superior.
- 5.- Seguir agregando mayor y mayor cantidad de butanol conforme la fase superior vaya aumentando de volumen. Seguir agitando y centrifugando después de cada adición.
- 6.- En el momento en el que no se observe fase acuosa y se observe el pellet, limpiar por última vez y dejar secando en Savant.
- 7.- Resuspender en agua bidestilada.

4.- Transformación bacteriana.

Uno de los métodos utilizados es una modificación de Inoue, H. et al, 1990 y el descrito por Hanahan, 1983.

a)Preparación de células competentes:

- 1.- Descongelar stock de células (en medio LB con dimetil sulfóxido (DMSO) al 7%) y estriar en medio LB-agar. Cultivar toda la noche a 37°C.
- 2.- Tomar de 10 a 12 colonias e inocular en 250 mL de medio SOB en matraz de 2 L. Cultivar a 18°C en agitación rápida (200 A 250 rpm) hasta 0.6 de absorbancia a 600 nm de longitud de onda.
- 3.- Poner en matraz en hielo durante 10min.
- 4.- Transferir el cultivo a tubos de 250 mL y centrifugar 10 min. a 4,000 x g a 4°C.
- 5.- Resuspender la pastilla celular en 80mL de TB e incubar 10 min. a 4°C. Centrifugar como arriba.
- 6.- Resuspender suavemente la pastilla en 20 mL de TB y posteriormente agregar DMSO hasta una concentración de 7%.
- 7)Despues de incubar durante 10 min. en un baño de hielo, alicuotar en tubos de cultivo celular y congelar inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido.

Otro método para preparar células competentes para transformación por electroporación. es aquel propuesto en el Manual Bio-Rad versión 1.0 de uso del electroporador.

- 1) Inocular 1 L de Luria con 1/1000 volúmenes de cultivo de 12 horas fresco.
- 2) Crecer las células a 37°C con agitación hasta alcanzar $A_{600nm} = 0.6$ (Para células CMK, con 12 horas de crecimiento se alcanza, para JM101 se requiere de resiembra y otras 4 horas de crecimiento).
- 3) Para cosechar, enfriar el matraz en hielo por 15-30 min. Centrifugar en un rotor frío a 4000 x g por 15 min.
- 4) Resuspender el pellet en un total de 1 L de H₂O fría estéril con baja fuerza iónica. Centrifugar igual que en 3.
- 5) Resuspender en 0.5 L de H₂O fría estéril con baja fuerza iónica. Centrifugar igual que en 3.
- 6) Resuspender en aprox. 20 mL de glicerol al 20% estéril. Centrifugar igual que en 3.
- 7) Resuspender en un volumen final de 2 ó 3 mL de glicerol al 10% estéril. Alicuotar la suspensión en tubos estériles con 50 µL cada uno. La concentración de células deber ser de 3×10^{10} células/mL.
- 8) Esta suspensión debe ser congelada en alicuotas en hielo seco y guardadas a -70°C. Las células se mantienen en buen estado al menos 6 meses.

b) Transformación.

Transformación por choque térmico.

- 1) Descongelar una alícuota de células competentes a temperatura ambiente y agregar 200 μL a un tubo de polipropileno de 0.5 mL. Poner en hielo.
- 2) Agregar de 1 a 5 μL de solución del DNA a las células competentes e incubar en hielo durante 30 min.
- 3) Dar choque térmico (sin agitar) durante 30 seg. a 42°C y regresar al hielo.
- 4) Agregar 800 μL de medio SOC y poner en incubadora con agitación (200 rpm) a 37°C durante 1 h.
- 5) Platear en medio selectivo y dejar crecer toda la noche.

Transformación por electroporación.

Prender el electroporador y ajustar:

- la resistencia a 200 Ohms
- la capacitancia a 2.5 μFD
- el voltaje a 1.6 V

Preparar 1 tubo de vidrio de 5 mL estéril con 980 μL de medio SOC, 10 μL de Mg 2M y 10 μL de glucosa 2M.

Colocar en una celda para electroporación de 0.1 cm, 50 μL de suspensión de células competentes, 1-5 ng de plásmido o 20 ng de ligación (según sea el caso).

Colocar en el electroporador y aplicar el voltaje. Si el tiempo fue apropiado para transformar, se resuspenden las células transformadas en el medio preparado anteriormente y se deja crecer a 37°C durante una hora. Se platea en un medio selectivo y se deja crecer toda la noche.

5.- Digestión de DNA con enzimas de restricción.

BglII (New England Biolabs, NEB) Buffer: tris HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y DTT 1 mM a pH 7.9.

EcoRI (Boehringer) Buffer: tris HCl 90 mM (pH 7.5), NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y BSA 0.1mg/ml.

HindIII (NEB) Buffer: tris HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM a pH 7.9.

PstI (NEB) Buffer: tris HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM a pH 7.9.

XbaI (BRL) Buffer : Tris HCL 50 mM, MgCl₂ 10 mM y NaCl 50 mM a pH 8.0.

La temperatura de reacción para todas las enzimas es de 37°C. Las unidades de actividad definidas por los fabricantes no fueron reproducibles en nuestros experimentos, por lo cual se usaron cantidades variables de enzima. En una reacción estándar, se necesita de 10 µL de mezcla de reacción por cada µg de DNA a digerir. Los tiempos de digestión son de 2 a 12h según la enzima utilizada. Los productos de digestión se analizan en geles de agarosa de 0.8, 1.2 o 1.5% dependiendo de los tamaños de las bandas esperadas.

Doble digestión. En muchos casos es necesario digerir una muestra de DNA con dos endonucleasas distintas. Estas pueden usarse de manera simultánea en la misma mezcla siempre y cuando las condiciones de reacción sean similares para ambas. Generalmente, el único parámetro que puede diferir es el amortiguador empleado. En este caso, se utiliza en la mezcla el amortiguador que contenga menos sal (NaCl, KCl). Para completar la doble digestión, es necesario agregar un pequeño exceso de la enzima que no se encuentra en su condición óptima.

6.- Mutagénesis dirigida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Este método se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) propuesta por Mullis en los 80's. El protocolo básico para cada reacción es el siguiente:

10 ng de templado de DNA. En caso de que varíe la concentración, se especifica.
20 pmoles de cada oligonucleótido (primeros).

20 mM Tris-HCL pH=8.3

1.5 mM MgCl₂

25 mM KCl

0.05% Tween 20

50 mM de cada dNTP (T, A, G, C)

2 unidades de Taq DNA polimerasa

Material es y Métodos

La reacción se lleva a cabo de la siguiente manera:

En cada uno de los ciclos existe una etapa de desnaturalización de DNA, misma que se lleva a cabo a 92°C durante un minuto y medio para el caso de todas las reacciones de PCR llevadas a cabo en este proyecto. Después de que el DNA se desnaturaliza, se lleva a cabo el forjado (annealing) en donde la temperatura dependerá de los oligonucleótidos utilizados para cada una de las reacciones; el tiempo utilizado para el annealing es de un minuto y medio en todas nuestras reacciones. Finalmente se lleva a cabo la polimerización que se lleva a cabo a 72°C, temperatura óptima para la Taq polimerasa. La duración de la polimerización en cada ciclo es de 3 minutos. Al final de la reacción se dejan 15 minutos a 72°C en donde se lleva a cabo polimerización.

En el caso de la segunda PCR en donde se extiende todo el gen, algunas reacciones necesitaron de ciclos en donde solamente se extiende el gen. Esto se especificará en cada caso.

Los oligonucleótidos utilizados como primeros en la reacción PCR se sintetizaron en la Unidad de Síntesis de Macromoléculas, IBT/UNAM.

Los protocolos de PCR de cada reacción reportada en Resultados y Discusión son los siguientes:

Amplificación del gen de α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* a partir de genoma

OLIGONUCLEOTIDO 5': CGG GCG AGA TCT AGA AGG AGT TAA ATA
Xba I S-D

TTA TGC TAA CGT TTC ACC GC
Met L eu T hr P he H is A rg gen de la α -amilasa)

OLIGONUCLEOTIDO 3': CCC CGG AAG CTT GGA TGG GCG CCT TGT GT
Hind III

(la porción en itálicas corresponde al gen de la α -amilasa en ambos oligonucleótidos)
Las temperaturas y los tiempos de las reacciones de PCR se escribirán de la siguiente manera:

20 x (92°C, 1.5; 55°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x 72°C, 15.0

Lo que quiere decir:

92°C durante un minuto y medio (Desnaturalización)

55°C durante un minuto y medio (recocido o *annealing*)

72°C durante tres minutos (polimerización)

20 ciclos

72°C durante 15 minutos (polimerización)

1 ciclo

Materiales y Métodos

Para simplificar la consulta de las figuras correspondientes a las PCR en resultados y discusión, los oligonucleótidos serán llamados por sus abreviaturas:

oligonucleótido 5' = 5'

oligonucleótido 3' = 3'

oligonucleótido W139T140 = región 1

oligonucleótido V264W268 = región 2

oligonucleótido K237H238 = región 3

oligonucleótido Bgl II 139140 = Bgl II

oligonucleótido reverso tapón = rev.

oligonucleótido universal = univ.

oligonucleótido tapón = tap.

Construcción de la mutante NNG/C139NNG/C140

1a. PCR

oligonucleótido W139T140:

TC CAA GCA NNG/C NNG/C AAA TTT GAT TTT CCC GGG CGG

139 140

oligonucleótido reverso tapón:

GGA ATA GCC GAT CGA GAT CTA GGA AAC AGC TAT GAC CAT G

Porción no complementaria

Templado: pBGS19 α -amy

30 x (92°C, 1.5; 55°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x (72°C, 15.0)

2a. PCR

oligonucleótido tapón:

GGA ATA GCC GAT CGA GAT CT

porción no complementaria al gen

oligonucleótido universal:

GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT

5 x (92°C, 1.5; 62°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 25 x (92°C, 1.5; 60°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x (72°C, 15.0)

Materiales y Métodos

Construcción de la mutante NNG/C264 NNG/C268

1a. PCR

oligonucleótido reverso tapon

oligonucleótido V264W268:

CTA TTT ACC NNG/C GGG GAA TAT NNG/C AGC TAT GAC ATC

264

268

Templado: pBGS19 α -amy

30 x (92°C, 1.5; 58°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x (72°C, 15.0)

2a. PCR

oligonucleótido tapón

oligonucleótido universal

5 x (92°C, 1.5; 62°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 25 x (92°C, 1.5; 60°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x (72°C, 15.0)

Construcción de la mutante NNG/C237NNG/C238

1a. PCR

oligonucleótido reverso tapón

oligonucleótido K237H238

TGC CGT CNN G/CNN G/CAT TAA GTT C

237

238

5 x (92°C, 1.5; 30°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 25 x (92°C, 1.5; 55°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x (72°C, 15.0)

2a. PCR

oligonucleótido tapón

oligonucleótido universal

5 x (92°C, 1.5; 62°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 25 x (92°C, 1.5; 60°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x (72°C, 15.0)

Materiales y Métodos

Construcción de la mutante W139R T140S

oligonucleótido Bgl II 139140

GGC ACC TAT CAA ATC CAA GCA AGA TCT AAA TTT GAT TTT CCC GGG
139 140
Bgl II

CGG

1a. PCR

25 x (92°C, 1.5; 62°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x (72°C, 15.0)

2a. PCR

oligonucleótido tapón

oligonucleótido universal

25 x (92°C, 1.5; 60°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x (72°C, 15.0)

7.-Clonación de los fragmentos mutantes.

a)Preparación de los vectores de clonación.

Se digiere el plásmido pBGS18 con las enzimas HindIII ó PstI y XbaI. Se obtienen dos fragmentos de 6080 pb y 5066 pb respectivamente y se aíslan de gel. Se llevaron a cabo reacciones de ligación como un control de las digestiones.

9 µL de agua bidestilada

1 µL de plásmido digerido (50 ng)

3 µL de amortiguador de ligasa 5x (tris HCl 50 mM (pH 7.8), MgCl₂ 10 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM).

1.5 µL de ATP 10 mM

0.5 µL de ligasa (2 unidades).

Se utiliza el total de esta reacción para transformar una alícuota de *E. coli* JM101 o CMK competentes como se describe arriba. No deben observarse colonias resistentes al seleccionar en AN alm y Kanamicina 25 µg/ml.

Materiales y Métodos

Preparación de los fragmentos mutantes.

El segundo fragmento obtenido de la PCR (α -amilasa mutante) se digiere con las enzimas HindIII ó PstI y XbaI como se describe arriba. Se obtiene una banda de DNA de 1134 y de 1956 pb. Aislar de gel de agarosa al 1% y cuantificar el DNA recuperado.

Ligación y clonación del vector con el fragmento mutante.

Para facilitar que el fragmento mutante se ligue al vector de clonación, se prepara una mezcla de ligación en que la proporción molar de fragmento y vector sea aproximadamente de 5:1,

- 8 μ L de agua bidestilada
- 1.5 μ L de dATP 10mM
- 3 μ L de amortiguador de ligasa
- 1 μ L de DNA de vector de clonación (100ng)
- 1 μ L de fragmento de PCR digerido (100ng)
- 0.5 μ L de ligasa

Agitar e incubar durante 12h a 14°C. Transformar con 7.5 μ L de esta reacción y seleccionar en cajas de kanamicina a 25 μ g/ml

8.- Secuenciación (método de Sanger para DNA en doble cadena).

- 1) A un tubo de polipropileno de 1.5ml, poner 2 μ g de DNA del plásmido a secuenciar. Llevar a 8 μ l y ponerle 2 μ l de NaOH 2N fresco. Dejar 5min. a temperatura ambiente.
- 2) Agregar 3 μ l de acetato de amonio 3M pH 4.5 y 2 μ l de agua desionizada.
- 3) Poner 5 μ l del oligo utilizado como primero (aprox. 25 ng) y 75 μ l de etanol absoluto.
- 4) Dejar 15 min. en hielo seco y posteriormente centrifugar 15 min. a 12,000 x g en la microfuga.
- 5) Aspirar el sobrenadante y lavar con 500 μ l de etanol al 70%. Centrifugar 5min. a 12,000 x g (dos veces).
- 6) Secar la pastilla y resuspender en 8 μ l de agua bidestilada y 2 μ l de amortiguador de secuencia (concentrado 5x: tris HCl 200 mM pH 7.5 MgCl₂ 100 mM y NaCl 200 mM).

Materiales y Métodos

- 7) Calentar 2 min. a 65°C.
- 8) Agregar 0.4 µl de mezcla de marcaje (concentrado 5x: dGTP 7.5µM, dCTP 7.5µM, dTTP 7.5µM), 1.6 µl de agua bidestilada, 1 µl de DTT 0.1M y 0.5 µl de dATP ³⁵S (5µCi).
- 9) Tomar 0.25 µl de enzima secuencasa (nombre comercial de una DNA polimerasa modificada del bacteriófago T7) y diluir con 1.75 µl de agua desionizada y bidestilada.
- 10) Mezclar y dejar 10 min. a temperatura ambiente.
- 11) Marcar cuatro tubos de polipropileno de 0.5 ml con las letras G, A, T y C. Poner a cada uno 2.5 µl de la mezcla de terminación respectiva (ésta contiene a tres dNTP's distintos a concentración 80 µM y a uno de los dideoxinucleótidos a concentración 8 µM. Así, para el tubo marcado con A, se requieren 2.5 µl de una mezcla de dGTP, dTTP y dCTP 80 µM y ddATP 8 µM). Poner estos tubos a 37°C 2 min. antes de que concluyan los 10min. del paso anterior.
- 12) Poner 3.5 µl de la reacción del paso 10) a cada terminador.
- 13) Dejar 15min. a 37°C.
- 14) Poner 4 µl de mezcla de paro y calentar 2 min. a 75°C.
- 15) Cargar el gel con 3 o 4 µl de la reacción. Correr las muestras a 35-40 watts y 2000volts.
- 16) Desmontar el gel de la cámara de electroforesis y transferirlo a filtro de papel Whatman.
- 17) Secarlo durante 1h a 80°C en un desecador de geles.
- 18) Exponer ante un film X-OMAT (Kodak) durante 16h en un cassette oscuro de exposición o se expone en un cassette de Phosphor Imager para ser capturado en el Phospor Imager y poder analizarlo de una mejor manera.
- 19) Revelar la placa expuesta con los reactivos convencionales (revelador, fijador, agua).
- 20) Analizar la secuencia obtenida.

Si el DNA a secuenciar es un producto de PCR:

- 1) Poner 1 pM de PCR otro pM del oligo en un tubo de polipropileno de 1.5 mL.
- 2) Calentar la muestra 3min. a 95°C.
- 3) Dejar en hielo 5 min.
- 4) Seguir el protocolo anterior a partir del paso 6).

10.- Determinación de azúcares reductores.

Se realizaron ensayos de producción de azúcares reductores basados en el método reportado por Miller en 1959 -utilizando el ácido 3, 5 dinitro salicílico- con algunas modificaciones en el caso de las reacciones en presencia de propanol.

Materiales y Métodos

*2 volúmenes de sobrenadante de 12 hrs con 4 horas de inducción con IPTG ($1 \cdot 10^{-6}$ moles/mL).

*2 volúmenes de solución de almidón al 0.5% en buffer de acetatos 0.2 M pH=5.3 con CaCl_2 0.02 M.

*1 volumen de buffer de acetatos 0.2 M pH=5.3 con CaCl_2 0.02 M ó propanol.

La mezcla de reacción se llevaba a cabo a 55°C se mantenía una agitación continua y se tomaban muestras a distintos tiempos. Se detenía la reacción con una solución de ácido dinitro salicílico en medio alcalino.

Se calentaban los tubos tapados con canicas durante 5 minutos en un baño maría a ebullición y se dejaban enfriar en agua-hielo durante otros 5 minutos. Se agregaba 5 mL de agua destilada y se leían a 540 nm en un espectrofotómetro.

11.- HPLC

Se utilizó un HPLC Millipore Waters con una columna de intercambio iónico y una fase móvil Acetonitrilo 75:25. Las muestras se centrifugaron y se filtraron previamente a ser analizadas. El flujo utilizado en el HPLC fue de 1 mL/min. y se analizaron las muestras por índice de refracción.

12.- Modelado Molecular

HOMOLOGY

*Se utilizan las coordenadas de una proteína depositada en Protein Data Bank (PDB). Se añaden las secuencias de las proteínas que se quieren alinear.

*Se alinean las secuencias estableciendo gaps y loops, en base a la secuencia de la proteína con estructura tridimensional.

* Se establecen por el alineamiento las regiones altamente conservadas para que se asignen coordenadas.

* Se establecen las regiones donde existen loops para que haga una búsqueda el programa a las estructuras de loops depositadas en PDB. Se asignan coordenadas de acuerdo a los loops encontrados que puedan tener cierta similitud con los loops de la proteína problema.

Posterior al modelado, es necesario llevar a cabo minimizaciones de energía de la molécula.

Minimizaciones y anclaje (DOCKING)

Las minimizaciones se llevaron a cabo en el programa DISCOVER (Biosym, Tech. Inc.) Se presenta un resumen a continuación. El anclaje del sustrato se llevó a cabo con el programa DOCKING del mismo programa.

Minimizaciones del anclaje del G8
con la α -amilasa de *Bacillus
stearothermophilus*

Primera minimización:

cutoff= 10.00

cutdis= 12.00

swtdis= 1.5

overlap= 0.01

dielectric= 1

5000 iteraciones utilizando el algoritmo *steepest descents* hasta llegar a 0.001 kcal/A

Segunda minimización:

A PARTIR DE LA PRIMERA MINIMIZACION

dielectric= 2.0

Toda la proteína y el carbohidrato fijo excepto:

residuos 150-156

residuos 230-233

residuos 295-298

Las iteraciones necesarias hasta llegar a 10 kcal/A usando el algoritmo *steepest descents*.

Después de llegar a esta energía, las iteraciones necesarias hasta llegar a 0.05 kcal/A usando el algoritmo *conjugate gradient*.

Tercera minimización y dinámica:

A PARTIR DE LA SEGUNDA MINIMIZACION

cutoff= 15.0

cutdis= 14.0

dielectric= $1xr$, donde r = distancia en Å

añadir átomos pesados a la minimización fijando todo lo demás.

Las iteraciones necesarias hasta llegar a 8.0 kcal / Å usando el algoritmo *steep descents*

DINAMICA

con el algoritmo *steep descents* llegar a 8.0 kcal/A,

Materiales y Métodos

En cada una de las minimizaciones se comentan los datos que variaron con respecto a la primera. En todos los casos, se minimizó únicamente la capa de H₂O, el sustrato y los 10Å de proteína más próximos al carbohidrato.

Delphi

Para medir las interacciones electrostáticas entre la proteína y el carbohidrato, se utilizó el programa DELPHI de Insight II, Silicon Graphics. El protocolo utilizado es el siguiente:

```
get pdb amysilv
get pdb mutbglii
get G8.crg

hydrogens wt on 1

potentials fix wt
charges fix wt
delphi
list mol wt

exit on
```

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

1.- CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pBGS18 α -amy Bst.

2.- DISEÑO DE UN METODO DE ENSAYO Y DE BUSQUEDA PARA DISCRIMINAR REACCIONES DE ALCOHOLISIS Y DE HIDROLISIS.

- a) Método de búsqueda: Depolimerización del almidón.
- b) Método de búsqueda: Depolimerización de almidón en presencia de alcoholes alifáticos.
- c) Método de ensayo: Azúcares reductores.
- d) Método de ensayo: cromatografía en capa fina de los productos de reacción en presencia y ausencia de alcohol.
- e) Método de ensayo: HPLC

3.- MODELADO MOLECULAR Y DISEÑO DE MUTANTES.

- a) Anclaje proteína-sustrato y dinámica Molecular.
- b) diseño de mutantes.

4.- EVALUACION DEL METODO DE MUTAGENESIS COMBINATORIA PROPUESTO POR MERINO *et al.*, (1992) COMO ALTERNATIVA PARA OBTENER MUTANTES DE LA α -AMILASA DE *Bacillus stearothermophilus*.

- a) información obtenida de los bancos construidos
- b) Diseño y modelado de la mutante Bgl II 139140 (minimización y Delphi).
- c) caracterización de la mutante Bgl II 139140
- d) Evaluación global del método de mutagénesis combinatoria para el α -amilasa.

5.- GENE SHUFFLING COMO UNA ALTERNATIVA FACTIBLE DE MUTAGENESIS COMBINATORIA PARA LA α -AMILASA.

1.-CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pBGS18 α -amyBst.

Conociendo la secuencia del gen de α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 (Nakajima *et al.*, 1985), se diseñaron oligonucleótidos complementarios con los extremos 5' y 3' del gen que fueron utilizados en una reacción de PCR teniendo como templado el genoma de *Bacillus stearothermophilus* aislado.

El producto de PCR incluyó:

Una secuencia Shine-Dalgarno óptima para *E.coli*, inicio de traducción (ATG en lugar de GTG) incorporado en el oligonucleótido 5', con el marco de lectura abierta (ORF) completo para la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* y los terminadores de transcripción propios de la enzima en *Bacillus stearothermophilus*.

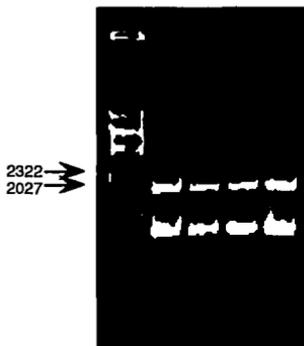


Figura 1RyD. Productos de PCR de amplificación de α -amilasa. Se utilizaron los oligonucleótidos 5' y 3' para la amplificación. Carril 1: marcador de PM, Carril 2 y 4: producto de PCR utilizando Genoma intacto de *Bacillus stearothermophilus*, Carril 3 y 5: producto de PCR utilizando Genoma digerido con Hind III.

Se obtuvieron dos productos de amplificación de la PCR. Se clonó el producto que presentaba el peso molecular más cercano al gene (1952 pb) en el plásmido pBGS18 - con resistencia a kanamicina- como un fragmento XbaI-HindIII. Se transformó la ligación en células de *E.coli* (CMK) y se observó actividad de α -amilasa en las células transformadas a través de formación de halos de almidón. Se encontró actividad de α -amilasa en el sobrenadante de las células transformadas con el plásmido pBGS18 α -amyBst. Este plásmido se secuenció para confirmar la presencia del gen y se encontró una secuencia idéntica a la reportada por Nakajima *et al.*, 1986.

2.- DISEÑO DE UN METODO DE ENSAYO Y DE BUSQUEDA PARA DISCRIMINAR REACCIONES DE ALCOHOLISIS Y DE HIDROLISIS.

Basándonos en la estrategia de trabajo, se consideró necesario diseñar un método de búsqueda de mutantes de interés que permitiera detectar la actividad de los genes mutantes para posteriormente secuenciar y conocer el cambio llevado a cabo en los residuos escogidos. Los bancos de mutantes se construyeron como dobles mutantes, lo que quiere decir que se pensaba rastrear en una población de 400 mutantes en donde solo un 4.6% provendría de cambios que dieran origen a los codones silvestres.

La propuesta de el método en general se basó en tres principios fundamentales:

1.- Durante la hidrólisis del almidón, catalizada por la α -amilasa, se produce una depolimerización del almidón y se generan extremos reductores, que pueden ser detectados de manera cuantitativa por el método del ácido dinitro salicílico.

2.- Para que la enzima lleve a cabo alcoholólisis, se necesita que utilice al alcohol como nucleófilo dentro de la segunda parte de la reacción.

3.- Durante la alcoholólisis, no se generan extremos reductores.

Basándose en esto, el método de búsqueda se pensó como un método rápido, de un paso -en caja petri- donde se pudiera detectar las mutantes de interés activas, que al analizarse a nivel de secuencia pudieran dar información que nos permitiera plantear nuevos experimentos de mutagénesis para mejorar la actividad. Los experimentos previos que se realizaron con la enzima silvestre (descritos en breve) nos hicieron pensar que era necesario llevar a cabo otro tipo de pruebas bioquímicas, de más de un paso, para poder caracterizar el cambio de actividad buscado, debido a que los métodos de ensayo directo no fueron reproducibles y no nos arrojaron mucha información.

Por lo tanto, consideraremos de ahora en adelante como el método de búsqueda la depolimerización de almidón en cajas con y sin alcoholes alifáticos; y la determinación de azúcares reductores, la cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alto desempeño como métodos de ensayo.

a) Método de búsqueda: Depolimerización del almidón.

Para el esquema de mutagénesis combinatoria diseñado se buscaba llevar a cabo la búsqueda en una población de transformantes compuesta por puras mutantes, sabiendo que cierto porcentaje de ellas perdería su actividad hidrolítica debido a los cambios realizados por la mutación. Con esto, se pensó que el número de mutantes a evaluar sería bajo.

La búsqueda de mutantes que sigan degradando almidón es solo una selección general para evitar trabajar con las mutaciones que eliminan la actividad hidrolítica. Se encuentra ampliamente citado en la literatura la detección de actividad de α -amilasa a través de la depolimerización del almidón incluido dentro del medio de cultivo en la caja petri. En nuestro caso, utilizamos como medio Agar Nutritivo-almidón (31 g/L agar nutritivo, 2 g/L almidón) reportado como un medio adecuado para observar halos de almidón a simple vista o a través del uso de lugol.

b) Método de búsqueda: Depolimerización de almidón en presencia de alcoholes alifáticos.

Pensando en la posibilidad de encontrar una actividad diferente entre las colonias que crecían en ausencia de alcoholes con las que crecen en presencia de alcoholes, inicialmente se hicieron pruebas de viabilidad de las colonias que contenían el plásmido pBGS18 α -amyBst en presencia de distintas concentraciones de distintos alcoholes alifáticos, encontrándose las siguientes concentraciones máximas viables:

- 7.5% etanol
- 3.0% propanol
- 3.0% butanol
- 3.0% hexanol
- 3.0% heptanol
- 3.0% octanol

Cabe destacar que para los alcoholes hexanol, heptanol y octanol, fue imposible probar una mayor concentración en caja petri debido a su inmiscibilidad en el medio de cultivo.

Una vez evaluada la viabilidad, se procedió a observar si la colonia seguía depolimerizando el almidón en presencia de estos alcoholes. Se encontró que no sólo depolimeriza el almidón sino que produce un halo mayor que la colonia que crece en ausencia de alcohol. El mismo efecto se observó con el p-nitro fenol (2.5 mg/mL) con el que también se trabajó como una alternativa -no exitosa- de este método de búsqueda. Este aumento en la depolimerización del alcohol viene acompañado en todos los casos de una disminución en el tamaño de la colonia.

Teniendo estos resultados se buscó una posible explicación del fenómeno observado. Existen varias respuestas para explicarlo. Una posibilidad es que la concentración de enzima extracelular aumenta por efecto del alcohol, probablemente porque las células de *E.coli* son más frágiles en presencia del alcohol. Adicionalmente, si la enzima estuviera llevando a cabo alcoholólisis en mayor medida que la hidrólisis, una posibilidad sería la presencia de un biosurfactante que rompiera a las células actuando como bacteriostático o antibiótico, fenómeno reportado para algunos biosurfactantes por Fiechter en 1992. Para poder comprobar esto, se requiere de un ensayo adicional.

Resultados y discusión

En un afán de poder comprobar la presencia de un biosurfactante, se utilizó un método para evaluar la tensión superficial del sistema utilizando cajas petri con agar nutritivo-almidón, en donde se colocaba un *jardín* de *Bacillus thuringiensis*, bacteria muy sensible a la presencia de un surfactante. Se hicieron algunos ensayos exitosos donde las colonias que tenían el plásmido con el gen de α -amilasa generaban inhibición del crecimiento del jardín, mientras que las colonias que tenían plásmido sin el gen no inhibían el crecimiento del jardín.

Desgraciadamente, estos resultados no fueron reproducibles para el gen silvestre, debido a que se debe de controlar las condiciones de crecimiento del Bacilo para hacer el jardín y en presencia del antibiótico y del alcohol, el momento en el que se coloca el jardín en las cajas y las condiciones de crecimiento de las colonias a evaluar.

Con esto, se puede concluir que aunque se intentó, no se logró diseñar un método de búsqueda en un solo paso de mutantes de interés ya que las estrategias a seguir no fueron en ninguno de los casos concluyentes, por lo que la selección de mutantes se hizo únicamente observando depolimerización del almidón en presencia y ausencia de alcoholes en caja, requiriéndose de los métodos de ensayo para poder distinguir la presencia de alcoholísis.

c) Método de ensayo: Azúcares reductores.

Se realizaron ensayos de producción de azúcares reductores basados en el método reportado por Miller en 1959 -utilizando el ácido 3, 5 dinitro salicílico-, con algunas modificaciones en el caso de las reacciones en presencia de propanol (presentadas a continuación). Las reacciones se llevaron a cabo a 55°C aunque el óptimo para la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* es alrededor de 65°C-73°C según reporta Fogarty en 1983. Esto debido a que a temperaturas mayores de 55°C, la evaporación del alcohol del sistema es difícil de controlar.

Se intentó llevar a cabo algunas reacciones con otros alcoholes de cadena más larga pero la inmiscibilidad hacía imposible que las lecturas fueran reproducibles.

En cualquier caso, esta prueba nos permite darnos una idea en términos cuantitativos de lo que sucede en la reacción con y sin alcohol y poderlas comparar.

La reacción se modificó de la siguiente manera:

*2 volúmenes de sobrenadante de 12 hrs con 4 horas de inducción con IPTG (1*10⁻⁶ moles/mL).

*2 volúmenes de solución de almidón al 0.5% en buffer de acetatos 0.2 M pH=5.3 con CaCl₂ 0.02 M.

*1 volumen de buffer de acetatos 0.2M pH=5.3 con CaCl₂ 0.02 M ó propanol.

Resultados y discusión

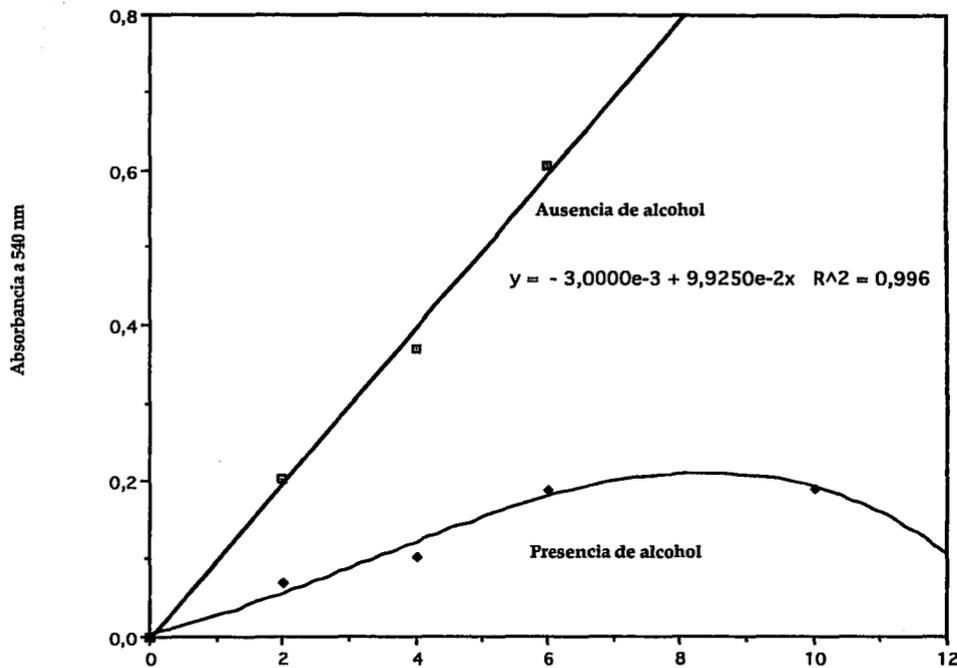


Figura 2RyD. Cinética de producción de azúcares reductores de la α -amilasa silvestre por DNS a 55 C.

Tiempo (min)

Resultados y discusión

En la figura 2RyD se presentan las cinéticas de producción de azúcares reductores. La presencia de azúcares reductores en presencia de propanol es menor comparándolo con la producción en ausencia de propanol. La disminución de azúcares reductores puede deberse a que disminuye la actividad en presencia del alcohol. Comparando estos resultados con los resultados en las cajas petri, donde no solo depolimeriza el almidón sino que en algunas ocasiones se encuentra un halo mayor, se puede pensar en la posibilidad de que haya alguna actividad alcohólica, misma que con estas dos pruebas no se puede comprobar. Sin embargo, este método nos permite de cierta manera titular la actividad hidrolítica en presencia y ausencia de alcohol y medir de manera cuantitativa la actividad de la enzima; otra estrategia es buscar la diferencia entre la actividad en ausencia y en presencia de alcohol y hablar de una actividad "residual" de la enzima.

d) Método de ensayo: Cromatografía en capa fina de los productos de reacción en presencia y ausencia de alcohol.

La cromatografía en capa fina (TLC) es una herramienta útil para poder observar de una manera clara el perfil de productos de reacción en presencia y ausencia de alcohol, ya que en las placas de cromatografía en capa fina las moléculas migran de acuerdo a su polaridad y su tamaño. Los productos de alcoholisis y de hidrólisis presentan distinto coeficiente de migración (Rf) debido a que la polaridad de los alquil-glucósidos es distinta a la de un carbohidrato. Se utilizaron como estándares maltooctaosa (G7), maltotriosa (G3) y una escalera de carbohidratos desde maltosa (G2) hasta maltooctaosa (G7). Se probaron distintos sistemas de eluyentes propuestos para diferentes sistemas de carbohidratos en placas de Silica-gel Merck® en donde se quería optimizar el Rf en general así como la resolución de las bandas de cada producto. Se probaron distintos sistemas de elución para las placas de los cuales se hará un comentario fundamentando por que no se utilizaron:

Sistema 1

Cloroformo 40

Metanol 60

reveladas con sulfato sérico y α -naftol

No se resolvieron adecuadamente las bandas de maltosa (G2) y glucosa (G).

Resultados y discusión

Sistema 2

Acetato de etilo	60
Acido acético	15
metanol	15
H ₂ O	10

Las placas se impregnaron con NaHSO₃ 0.1 M, se activaron a 100°C durante media hora y se revelaron con α -naftol.

(reportado por Fried & Sherma, Thin-Layer Chromatography, techniques and applications)

Aunque se resolvían bien G y G2, esto no ocurrió con las bandas de los carbohidratos de mayor peso molecular (de maltotriosa (G3) en adelante).

Sistema 3

Butanol	10
Metanol	6
H ₂ O	3

Placas impregnadas con buffer de fosfatos pH=7.0, activadas a 100°C durante media hora y reveladas con α -naftol.

(Vázquez-Duhalt & Arredondo Vega, 1991)

El sistema 3 fue el que finalmente se utilizó para llevar a cabo las TLCs. ya que la resolución es ligeramente mejor y por otro lado las muestras migran un poco más, permitiendo que los carbohidratos de mayor peso molecular migren poco y se puedan evaluar. Se observó que las placas sin impregnación corrían exactamente igual que las placas activadas.

Finalmente se corrieron las placas con el sistema 3 sin impregnación ni activación. Se evaluaron los distintos tiempos sugeridos para una placa de cromatografía donde en general se reporta que en el momento en el que el frente está a punto de llegar al final de la placa, se detenga la corrida, se saque de la cámara y se ponga a secar. Se realizó una cromatografía "de flujo" en donde se deja la placa corriendo tiempo después de que el frente alcanzó el final de la placa. El tiempo óptimo encontrado para esta cromatografía de flujo fue de 4-5 horas.

A pesar de que la resolución es buena, no se logró separar el supuesto producto de alcoholisis de los productos de hidrólisis. Lo más que se observa es que las bandas de los productos de reacción en presencia de alcohol tienen una tendencia de migración mayor, es decir, las bandas están desplazadas hacia arriba, en donde las moléculas menos polares o más pequeñas migran. Siendo que no se tuvieron estandares de c/u de los productos de alcoholisis posibles en una reacción con almidón, no es posible

Resultados y discusión

concluir que esta diferencia de migración se deba a este producto. Por otro lado, mucho del producto no migra del sitio de cargado, esto debido a que el almidón hidrolizado por α -amilasa presenta productos de alto peso molecular. Se optó entonces por realizar una cromatografía de reacciones en presencia y ausencia de propanol usando como sustrato un maltoheptaosa (G7), oligosacárido sintético con el que se pudieron observar los productos de reacción de una manera más clara.

Otra alternativa fue el montar el ensayo en papel, del cual se tienen varios reportes para las reacciones de α -amilasa, de los cuales la referencia original es el reporte de Mayer & Larner, 1959. La única limitación fue el papel, ya que recomiendan el uso de papel Whatman™ no. 1, no disponible para la cromatografía en términos de tamaños. Las pruebas que se hicieron con otro tipo de papeles no fueron satisfactorios por lo que se descartó este tipo de cromatografía.

e) Método de ensayo: HPLC

A partir de las muestras de reacción obtenidas para las TLCs, se prepararon éstas para analizarse por HPLC a través de una centrifugación 14000xg durante 10 min y una posterior filtración con filtros para soluciones acuosas de 0.45 μ m. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo/H₂O 75:25 % v/v. La columna utilizada es de intercambio iónico. Se observó el mismo perfil de productos en el HPLC y en la TLC.

3.- MODELADO MOLECULAR Y DISEÑO DE MUTANTES.

Se pensó, como parte de la estrategia de trabajo, realizar un modelo de la α -amilasa a fin de poder, por un lado, diseñar las mutaciones que se van a llevar a cabo con un sustento estructural de esta enzima y, por el otro, generar una herramienta de visualización útil para un mayor conocimiento de la estructura y las interacciones entre el sustrato y la proteína que permitiesen anticipar posibles consecuencias de los cambios. La importancia de poder modelar moléculas de las que no se conoce su estructura con base en la estructura conocida de una proteína homóloga es y ha sido una tarea importante para el estudio de la estructura/función.

Con base en el alineamiento de secuencia que presenta Holm *et al.*, 1990, se realizó el modelado molecular de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* a partir de las coordenadas de la estructura tridimensional de *Aspergillus oryzae* (TAKA amilasa) reportada por Matsuura *et al.*, 1984.

Resultados y discusión

Esta estructura, depositada en el *Brookhaven Protein Data Bank* con la clave 2taa presenta la proteína sin sustrato y sin H₂O a 3Å de resolución. Utilizando el programa HOMOLGY (Biosym Tech. Inc.). No se asignaron coordenadas al dominio B, conocido también como loop 3, porción correspondiente a los residuos 142-189 de la taka amilasa, residuos 126-217 en la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, debido a que este porción de la molécula tiene 44 residuos más en la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* que en la TAKA amilasa. Los métodos utilizados para el modelado no permitieron que se obtuviera una estructura tridimensional para esta región.

a) Anclaje proteína-sustrato y dinámica Molecular

Se realizó el anclaje del sustrato con la proteína modelada sin la región 126-217 correspondiente al loop3 y se comparó con un modelo que contiene los residuos de α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, en la región cercana al sitio activo, utilizando los residuos y las coordenadas de la TAKA amilasa para el resto de la molécula. Para ambos complejos, el de la proteína modelada sin el loop 3 y el de la TAKA amilasa con residuos de α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, se llevaron a cabo minimizaciones de energía que tuvieron como fin eliminar las imprecisiones que el programa genera en cuanto a la estructura.

Se encontró que no existían diferencias significativas en cuanto al acomodo de las cadenas principales de ambas proteínas, aunque para el modelo de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, hacían falta residuos que pertenecen al loop 3 y que contactan al sustrato. Para poder realizar la visualización completa de la región, se trabajó con la proteína que contiene residuos de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, pero que tiene las coordenadas de TAKA amilasa para este loop3. El anclaje del sustrato, se realizó utilizando una maltooctosa (G8) construida por Gabriel Moreno a partir del programa BIOPOLYMER. Se minimizó la energía de esa molécula y a partir del programa DOCKING se colocó al sustrato en el sitio activo en la posición en donde se creaba una red de energía mínima entre la proteína y el sustrato. Se agregó una capa de 10Å de moléculas de H₂O alrededor del sitio activo y el sustrato. Las condiciones de las minimizaciones se presentan en Materiales y Métodos.

Resultados y discusión

Bst	136	<u>IQAWIKF</u>	142
Sh		<u>ISDYTRR</u>	
PPA		<u>IESYNDP</u>	
Bsu		<u>IKNWSDR</u>	
Bci		<u>-KLYDNG</u>	
SF		<u>ISNYDDQ</u>	
TAA		<u>IQNYEDQ</u>	
Bli		<u>IKAWTFE</u>	
Bamy		<u>IKAWTFE</u>	
Cebada		<u>ICRDDTK</u>	

Bst	227	<u>ILDGFRIDAVKH</u>	238
Sh		<u>GVDGFRIDAAKH</u>	
PPA		<u>GVAGFRIDASKH</u>	
Bsu		<u>GADGFRIDAAKH</u>	
Bci		<u>GIDGIRVDVAVKH</u>	
SF		<u>SIDGLRIDSAKH</u>	
TAA		<u>SIDGLRIDTVKH</u>	
Bli		<u>QLDGFRIDAVKH</u>	
Bamy		<u>SLDGFRIDAAKH</u>	
Cebada		<u>GFDAWRLDFARG</u>	

Bst	258	<u>PLFTVGEYWS</u>	267
Sh		<u>PGFWVQEVY</u>	
PPA		<u>RPFTVQEVLD</u>	
Bsu		<u>-EFOYCEILQ</u>	
Bci		<u>PVFTVGEVWEL</u>	
SF		<u>-VTSVGEVEQ</u>	
TAA		<u>-VYCIGEVLD</u>	
Bli		<u>EMFTVAEYWO</u>	
Bamy		<u>EMFTVAEYWO</u>	
Cebada		<u>PSLAVAEVWD</u>	

Alineamiento de secuencias de 10 distintas α -amilasas. Las abreviaturas corresponden a los siguientes organismos: Bst: *Bacillus stearothermophilus*, Sh: *Saccharomyces hygroscopicus*, PPA: páncreas de puerco, Bsu: *Bacillus subtilis*, Bci: *Bacillus circulans*, SF: *Sacharomycopsis fibuligera*, TAA: TAKA amilasa, Bli: *Bacillus licheniformis*, Bamy: *Bacillus amyloliquefaciens* y Cebada. Tomado de Holm *et al.*, 1990.

Resultados y discusión

Lo que podemos concluir a partir del trabajo de modelado es que ciertas cadenas laterales (Trp 139, Trp 268 en Bst) modificaron su posición a partir de que se ancló el sustrato. Lo que se observa es que el anillo aromático se apila con el heterociclo de una de las glucosas del carbohidrato (stacking). El residuo Thr 140 en Bst está fuera del radio de interacción del carbohidrato, siendo que su correspondiente en secuencia de la TAKA amilasa, TAA, el Glu156 forma parte de los subsitios de unión al carbohidrato. Observamos que la Val 264 en Bst tampoco tiene una interacción directa, más bien se encuentra interaccionando con cadenas laterales de la misma proteína. La His 238, misma que en la estructura de TAKA amilasa se encuentra junto a una molécula de H₂O, se encuentra formando parte de uno de los subsitios de la proteína modelada. Las cadenas laterales que interactúan con la porción no reductora del sustrato, en los subsitios iniciales, mantuvieron su interacción en similitud con aquellas encontradas en la cristalografía de TAKA amilasa.

Con respecto al H₂O no se encontró alguna molécula que se mantuviera unida en un sitio específico en la interface carbohidrato-proteína, a pesar de que si se encuentran algunas atrapadas. En la mayoría de los casos, la trayectoria que el H₂O siguió a partir de cada una de las minimizaciones fue la de alejarse del sitio de unión del carbohidrato, simplemente rodeándolo. Cabe aclarar que a partir de esta metodología utilizada, usando un baño de H₂O, no es posible determinar con toda seguridad la trayectoria de cada molécula por separado. Es necesario utilizar otro tipo de estrategias para simular las trayectorias del solvente.

Por su parte, el carbohidrato sufrió un ligero cambio en uno de los ángulos correspondientes al enlace glicosídico entre la glucosa 4 y 5, haciendo más cerrada la curvatura propia de la cadena de 8 glucosas, esto con el fin de poder establecer mejor los contactos con la proteína, acercándose a ella.

b) diseño de mutantes

Se escogieron tres zonas contiguas en secuencia para realizar la mutagénesis:

Val264 Trp268. El Trp268 (Leu 232 en Taka amilasa) pertenece al subsitio 5 de interacción con el carbohidrato según se reporta en (Matsuura *et al.*, 1984). A partir del subsitio 4 se tienen interacciones con la parte saliente del carbohidrato. Nuestra hipótesis con respecto a este residuo y otros pertenecientes a esta zona es que si de alguna manera se debilita la interacción con el carbohidrato -sin eliminarla- éste tenderá a salir más rápidamente. Por otro lado, también se puede favorecer la interacción con la porción hidrofóbica del alcohol alifático que pensamos entraría en contacto con el intermediario-enzima una vez llevada a cabo la ruptura del enlace glicosídico.

Resultados y discusión

La Val264 es un residuo que en todas las α -amilasas se conserva como Val, Leu o Ile. En las Ciclodextrin glucosil transferasas, enzimas que realizan una reacción de transglucosilación con la misma cadena de carbohidrato, generando ciclodextrinas, este residuo es un Trp, Phe o Tyr. En el modelo que se obtuvo, este residuo no establece un contacto directo con el carbohidrato, pero se encuentra muy cercano a uno de los probables residuos catalíticos de la α -amilasa, el Glu266(Glu230 en Taka amilasa). Fujiwara *et al.*, en 1992, reportaron que una mutación F255I elimina la actividad de ciclización de la CGTasa y aumenta su poder sacarificante (producción de carbohidratos pequeños G2 ó G3), lo que hace pensar que este residuo juega un papel important en la transglucosilación. Ya que la reacción de transglucosilación es una reacción de "alcohólisis" (el carbohidrato es un polialcohol) se piensa que la mutación en este residuo puede, de cierta manera, origen al cambio buscado.

Lys237 His238. Estos dos residuos están conservados a lo largo de toda la escala filogénética de las α -amilasas. La Lys209 en TAKA amilasa se encuentra en el subsitio 6 de interacción con el carbohidrato, mismo sitio donde la Lys237 se situó en nuestro modelo. La His238 está en el subsitio 5. Este es el único residuo de los seleccionados que tienen mutantes reportadas en la literatura. Holm *et al.*, en 1990 reportaron que dentro de su banco de 98 mutantes tres mutantes en este residuo: H238N, H238D y H238Y de las cuales la primera fue la única que mantuvo su capacidad de depolimerizar el almidón y dar halos en caja petri. Este es un residuo importante ya que se ha propuesto como uno de los responsables de la interacción con el Calcio, mismo que tiene un papel importante para lograr la conformación adecuada de la catálisis; además, Matsuura *et al.*, 1984 reportan que en la cristalografía encontraron una molécula de H₂O junto a este residuo. Este residuo podría ser uno de los responsables de orientar al H₂O en la posición correcta para llevar a cabo el ataque nucleófilo. En estos términos, resultó interesante probar si mutando este residuo se puede desplazar el papel del nucleófilo del H₂O al alcohol, evitando que el agua se oriente de manera adecuada.

Trp139 Thr140. Estos residuos están localizados en la cercanía del sitio de interacción con el extremo REDUCTOR del carbohidrato; en la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, estos residuos son Tyr155 y Asp156, pertenecientes al subsitio 6 y 7 de interacción con el carbohidrato (Matsuura *et al.*, 1984). Cabe destacar que estos dos residuos pertenecen al dominio B, situado en el llamado Loop 3, que no se pudo modelar. Fueron escogidos basicamente por el alineamiento en secuencia realizado con la Taka amilasa y porque en el modelo reportado por Holm *et al.*, 1990 se reporta que la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* al menos tiene 6 subsitios de interacción con el almidón.

Resultados y discusión

Cabe destacar que el trabajo de modelado realizado no solamente sirvió en el diseño de las mutantes sino que complementó el conocimiento teórico de la literatura con respecto a las interacciones carbohidrato-proteína así como un mayor conocimiento sobre el sitio activo de la α -amilasa. Quedan muchas cosas por hacer en este rubro, como el mejoramiento del modelo ya obtenido y la asignación de coordenadas al loop3.

4.- EVALUACION DEL METODO DE MUTAGENESIS COMBINATORIA PROPUESTO POR MERINO *et al.*, (1992) COMO UNA ALTERNATIVA PARA OBTENER MUTANTES DE LA α -amilasa DE *Bacillus stearothermophilus*.

Pensando que la mutagénesis combinatoria permite explorar un mayor número de combinaciones en cada una de las posiciones escogidas para mutar, se evaluó el método de mutagénesis combinatoria propuesto por Merino *et al.*, en 1992 el cual se basa en generar mutaciones sitio-específicas y dirigidas por oligonucleótidos. Este sistema tiene la ventaja de que utiliza primers universales que flanquean la región de clonación de vectores pUC/M13 y que utiliza un oligonucleótido que dentro de su secuencia tiene una porción no complementaria al templado (oligonucleótido tapón). En el momento en el que este oligonucleótido extiende el producto, solamente extiende el aquel producto que contenga esta porción no complementaria, por lo que esto permite la posibilidad de llevar a cabo varias reacciones de PCR, incorporando mutaciones distales con distintos oligonucleótidos mutagénicos y además, eliminar la contaminación de la silvestre. El modelo utilizado en este reporte es el plásmido M13mp19PHEco y los tamaños de los productos amplificados son de 267, 458 y 587 pb. Los productos de reacción de PCR a partir de los cuales se generaron las mutaciones fueron los mostrados en la figura 3, 4 y 5 RyD:



Figura 3RyD. PCR de la construcción NNG/C139NNG/C140. Carril 1 marcadores de peso molecular. Carril 2 y 3 reacción de PCR NNG/C139NNG/C140. El protocolo de PCR fue: 1a. PCR con oligo región uno y rev.: 30 x (92°C, 1.5; 55°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x 72°C, 15. 2a. PCR 5 x (92°C, 1.5; 62°C, 1.5; 72°C, 3.0) adición de oligonucleótido tap. univ. 25 x (92°C, 1.5; 60°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x 72°C, 15.0.

Resultados y discusión

2322 →
2027 →



Figura 4RyD. PCR de la construcción NNG/C264NNG/C268. Carril 1: marcador de Peso Molecular. Carril 2: PCR NNG/C264NNG/C268. El protocolo fue: 1a. PCR con oligo región dos y rev.: 30 x (92°C, 1.5; 58°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x 72°C, 15.
2a. PCR 5 x (92°C, 1.5; 62°C, 1.5; 72°C, 3.0) adición de oligonucleótidos tap. y univ. 25 x (92°C, 1.5; 60°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x 72°C, 15.0.

322 →
027 →



Figura 5RyD. PCR de la construcción NNG/C237NNG/C238. Carril 1: marcador de Peso Molecular. Carril 2: PCR NNG/C237NNG/C238. El protocolo fue: 1a. PCR con oligo región tres y rev.: 5 x (92°C, 1.5; 30°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 30 x (92°C, 1.5; 55°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x 72°C, 15.
2a. PCR 5 x (92°C, 1.5; 62°C, 1.5; 72°C, 3.0) adición de oligonucleótidos tap. y univ. 25 x (92°C, 1.5; 60°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x 72°C, 15.0.

Resultados y discusión

a) Resultados obtenidos de los bancos construidos

Se construyeron 5 bancos a partir de los productos de PCR de los tres oligonucleótidos mutagénicos; tomando la población inicial como un 100% (el tamaño de las poblaciones variaron de banco a banco) en dos bancos se obtuvieron aproximadamente 0.2% de transformantes que depolimerizaban el almidón en presencia del alcohol, aunque no lo hacían mejor que la silvestre de manera reproducible. De la siguiente serie de bancos (3), se encontraba que el 7.08% presentaba halos con alcohol, sin discriminar si lo hacía a veces mejor que la silvestre o no. Las transformantes escogidas y secuenciadas (8) resultaron ser silvestres. Cabe destacar que la metodología utilizada tenía como objetivo eliminar la contaminación de silvestre, misma que se presentó en todos los casos. Debido a esta contaminación de silvestre, se pensó que se necesitaba un ensayo para rastrear transformantes con enzima mutante, partiendo de un mayor conjunto de transformantes obtenidas. Para este propósito, se realizó hibridación en colonia con uno de los bancos (correspondiente a la primera región) buscando otra alternativa para rastrear en un número grande de transformantes aquellas que no hibridaran con un oligonucleótido de secuencia silvestre marcado con ^{32}P . Los resultados no fueron satisfactorios, ya que los plásmidos que presentaban halos de almidón en cajas y que no hibridaron con la sonda silvestre no presentaba inserto del gen por secuencia. Este problema no fue exclusivo de un banco y la posible explicación al hecho es que recientemente se encontró una α -amilasa citoplasmática proveniente de cierta cepa de *Escherichia coli*. Una probable recombinación o actividad proveniente de citoplasma pudo haber actuado como un artificio.

Osuna (1992) concluye en relación a este método de mutagénesis combinatoria que dado que se ha experimentado con dificultades tanto en la clonación como de contaminación cuando se trabaja con reacciones de PCR, se debe ser extremadamente cuidadoso con el diseño y la ejecución de los experimentos de PCR. Concluye también que la presencia de una fuente de contaminación de gen silvestre puede ser desastrosa para el desarrollo exitoso del proyecto. Esto es precisamente lo que sucedió en la construcción de los bancos, siendo el tamaño del gen de la α -amilasa (1951 pb) la única diferencia entre el trabajo de Osuna, 1992, Merino *et al.*, 1992 y este trabajo.

b) Diseño y modelado de la mutante Bgl II 139140 (minimización y Delphi).

De acuerdo con los resultados anteriores, se pensó en realizar una mutagénesis sitio dirigida. Se decidió mutar sobre los residuos W139 y T140; el cambio de residuo se planteó en base a la importancia que tienen los residuos aromáticos en las interacciones de van der Waals entre el carbohidrato y la proteína, estableciendo un apilamiento entre el heterociclo del carbohidrato y el anillo aromático del

Resultados y discusión

triptofano. Se pensó en la arginina como un cambio apropiado para evaluar la importancia del triptofano y su rigidez o flexibilidad estructural para ser mutado. Para el sitio 140 se pensó en cambiar a serina como un cambio conservativo. Con este cambio, además, se generó un sitio Bgl II único en el gen, útil para tener un control sobre la contaminación de silvestre. De esta manera, una digestión con esta enzima nos puede dar idea de que tanta contaminación se tiene y controlarla de esta manera.

Se varió la relación del templado pBGS19 α -amy con respecto al producto de la primera PCR (mutagénico) con el fin de poder controlar la contaminación de silvestre. Se encontró que con una relación 1-1000 se obtenía entre 3-5 μ g de producto de PCR y se presentaba una contaminación del 50% de silvestre. Si se disminuía esta relación, el rendimiento de la reacción bajaba a 1 μ g o menos en algunas ocasiones. Como un control de reactivos, se realizaron PCRs sin templado, con el producto de la 1a. PCR buscando que la contaminación viniera de algún reactivo. No se encontró ninguna contaminación.

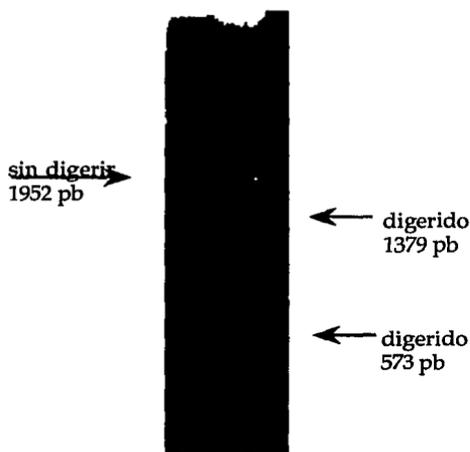


Figura 6RyD. Carril 1:PCR para construir la mutante W139RT140S. El protocolo fue: 1a. PCR: 25 x (92°C, 1.5; 62°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x (72°C, 15.0). los oligos usados fueron rev. y Bgl II. 2a. PCR: 25 x (92°C, 1.5; 60°C, 1.5; 72°C, 3.0) + 1 x (72°C, 15.0). Los oligonucleótidos usados fueron tap. y univ. Carril 2: PCR Bgl II digerida con Bgl II.

Resultados y discusión

Con el fin de poder predecir que comportamiento tendría la mutante con respecto a la silvestre, se realizó modelamiento por minimización con los cambios W139R T140S y se midieron las energías electrostáticas entre el carbohidrato y la proteína silvestre y la mutante respectivamente.

Cálculos obtenidos del Delphi realizado a la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* silvestre con una maltooctaosa modelada a partir de la Taka amilasa

aminoácido	carga	energía (kcal/mol)
TYR	134 0.00	0.005
GLN	135 0.00	-0.061
ILE	136 0.00	-0.004
GLN	137 0.00	-0.040
ALA	138 0.00	-0.017
TRP	139 0.00	-0.384
<u>THR</u>	<u>140 0.00</u>	<u>-0.008</u>
LYS+	141 -1.00	-0.046
PHE	142 0.00	-0.021

Total charge -24.58

Charged res.: 0.0000E+00 kcal/mol

Non-charged: -44.30 kcal/mol

Cálculos obtenidos del Delphi realizado a la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* BgIII 139140 con una maltooctaosa modelada a partir de la Taka amilasa

aminoácido	carga	energía (kcal/mol)
TYR	134 0.00	0.005
GLN	135 0.00	0.043
ILE	136 0.00	-0.198
GLN	137 0.00	-0.065
ALA	138 0.00	-0.015
<u>ARG+</u>	<u>139 1.00</u>	<u>-0.249</u>
<u>SER</u>	<u>140 0.00</u>	<u>-0.009</u>
LYS+	141 -1.00	-0.048
PHE	142 0.00	-0.023

VIII. CONCLUSIONES

Se montó un método de ensayo en dos pasos para poder discriminar entre reacciones de alcoholisis y de hidrólisis. Se encontró que los métodos de búsqueda de un paso no eran concluyentes.

Se realizó un modelado molecular de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* anclando su sustrato. Este modelo sirvió para diseñar las mutaciones que se realizaron evaluando el método de mutagénesis combinatoria de Merino *et al.*, 1992.

Se llevaron a cabo mutagénesis combinatoria, clonándose los productos de éstas. Se encontró que los bancos de mutantes presentaban una alta concentración de contaminación silvestre. Se diseñó una mutante doble en la zona 139140 que a su vez sirvió para poder evaluar la contaminación de silvestre. Se predijo la capacidad de interacción electrostática sustrato-enzima de la silvestre y la mutante.

Se modeló y construyó la mutante R139 S140 y se monitoreó a través de digestiones con Bgl II. Se predijo que la mutante mantendría su capacidad de unir almidón. Se caracterizó posteriormente y se observó que efectivamente seguía llevando a cabo reacciones de hidrólisis.

Bibliografia

IX. BIBLIOGRAFIA

Amersham UK, (1988). Oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis system version 2.

Arnold, F. H. (1990) Engineering enzymes for non-aqueous solvents. Trends in Biotechnology, vol. 8 244-249.

Bourne Y., van Tilbeurgh H. and Cambillau Ch. (1993) Protein-carbohydrate interactions. Current Opinion in Structural Biology no. 3, 681-686.

Campbell M. K. (1991) Biochemistry. Saunders College Publishing, 46-47.

Erllich H., Gelfand D. & Saiki R. (1988) Specific DNA amplification. Nature vol. 331. 461-470.

Farber G.K. and Petsko G. A. (1990). The evolution of a/b barrel enzymes. TIBS vol. 15, 228-234.

Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: Moving towards industrial application. Tibtech. Vol. 10, 208-217.

Fried B. & Sherma J. Thin-Layer chromatography. Techniques and Applications. Second Edition. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel 281-294.

Fogarty W.(edited by) (1988) Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishers, London and New York.

Fogarty W. M., Brosnan M. P., Doyle E. M. and Kelly C. T. (1992) the carbohydrases of *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11412 and NCIB 10814. Applied Microbiology and Biotechnology vol. 37, 191-196.

Fujiwara Sh. Kakiyama H., Sakaguchi K. and Imanaka T. (1992) Analysis of mutation in Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and Thermostability. Journal of Bacteriology vol. 174 no. 22 7478-7481.

Hanahah, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology, 166, 557-580.

Bibliografía

- Hanzawa S., Odagawa A., Sakata H., Takeuchi M. and Ichishima E. (1986) Degradation of α -amylase from *Aspergillus oryzae* with firmly bound proteinases at pH 3.0. *Current Microbiology*, vol. 14 235.
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. Vol. 286, 309-316.
- Holm L., Koivula A.K., Lehtovaara P.M., Hemminki A. and Knowles J.K.C. (1990) Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Protein Engineering* vol. 3 no. 3 181-191.
- Hutchinson C., Phillips S., Edgell M., Gillam S., Jahnke P., and Smith M. (1978) Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 253, 6551-6560.
- Inoue H., Najima H. and Okayama H. (1990) High efficiency transformation of E.coli with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Janeček, S. (1992) New conserved amino acid region of α -amylases in the third loop of their $(\alpha/\beta)_8$ -barrel domain. *Biochemical Journal*. Vol 288, 1069-1070.
- Jespersen H.M., MacGregor A., Sierks M. and Svensson B. (1991) Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochemical Journal*. Vol. 280, 51-55.
- Larson S., Greenwood A., Cascio D., Day J., and McPhenson A. (1994) Refined molecular structure of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol* Vol. 235, 1560-1584.
- MacGregor A. (1988) α -amylase structure and activity. *J of Protein Chemistry*, Vol. 7 no.4, 399-415.
- Matteucci M. & Heyneker H. (1983). Targeted random mutagenesis: the use of ambiguously synthesized oligonucleotides to mutagenize sequences immediately 5' of an ATG initiation codon. *Nucleic Acid Research* vol. 11, 3113-3118.
- Matsubara Sh. (1961). Studies on Taka amylase A. VII. Transaltilosidation by Taka amylase A. *Journal of Biochemistry*, vol. 49 no. 3, 226-231.
- Matsuura Y. Kusunoki M., Harada W. and Kakudo M. (1984). Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *Journal of Biochemistry*, vol. 95 697-702.

Bibliografía

Merino E., Osuna J., Bolívar F. and Soberón X. (1992) A general PCR-based method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on pUC/M13 vectors. *Biotechniques* vol. 12, no. 4, 8-9.

Miller G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* vol. 31 no. 3, 426-428.

Mott J., van Arsdell J., and Platt T. (1984) Targeted mutagenesis *in vitro*, lac repressor mutations generated using AMV reverse transcriptase and dBrUTP. *Nucleic Acid Research*, 12, 4139-4152.

Nakajima R., Imanaka T., and Aiba Sh. (1985) Nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* α -amylase gene. *Journal of Bacteriology*, vol. 163 no. 1, 401-406.

Nakajima R., Imanaka T., and Aiba Sh. (1986). Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 23, 355-360.

Nakamura A., Haga K., Ogawa Sh., Kuwano K., Kimura K. and Yamane K. (1992) Functional relationships between cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* and α -amylases. Site directed mutagenesis of the conserved two Asp and one Glu residues. *FEBS Letters*. Vol. 296, no. 1, 37-40.

Nelson R. & Long G. (1989). A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the *Thermus aquaticus* polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* vol. 180, 147-151.

Norris K., Norris F., Christiansen L. and Fiil N. (1983) Efficient site-directed mutagenesis by simultaneous use of two primers. *Nucleic Acid Research*, vol. 11, 5103-5112.

Olsen D. B. & Eckstein F. (1989) Incomplete primer extension during *in vitro* DNA amplification catalyzed by Taq polymerase: exploitation for DNA sequencing. *Nucleic Acid Research*, vol. 17 no. 23 9613-9619.

Osuna J. (1992) Análisis del sitio activo de enzimas mediante mutagénesis combinatoria. Tesis de Doctorado en Investigación Biomédica Básica, UNAM.

Qian M., Haser R. Buisson G. Duée E. and Payan F. (1994) The active center of a mammalian α -amylase. Structure of the complex of a pancreatic α -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2Å resolution. *Biochemistry* 33, 6284-6294.

Bibliografía

Quioco F.A. (1989) Protein-carbohydrate interactions: basic molecular features. Pure & Applied Chemistry. Vol. 61, no. 7. 1293-1306.

Raha M., Kawagishi I., Müller V., Kihara M. and Macnah R. (1992) Escherichia coli produces a cytoplasmic α -amylase, Amy A. Journal of Bacteriology vol. 174 no. 20, 6644-6652.

Rodríguez R. & Tait R. (1983) Recombinant DNA techniques. An Introduction. Addison and Wesley, Massachussets.

Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis M.W. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd. Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science-USA, vol 74, 5463-5468.

Satoh H., Nishida H. and Isono K. (1988). Evidence for movement of the α -amylase gene into two phylogenetically distant *Bacillus stearothermophilus* strains. Journal of Bacteriology vol. 170, 1034.

Sawadogo M. & Van Dyke M.W. (1991) A rapid method for purification of deprotected oligodeoxynucleotides. Nucleic Acid Research vol. 19, no. 3, 674.

Shortle D., and Nathans D. (1978) Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome. Proceedings of the National Academy of Science USA. 75, 2170-2174.

Simons G., Veeneman G., Konings R., van-Boom J. and Shoemakers J. (1982) Oligonucleotide-directed mutagenesis of gene IX of bacteriophage M13. Nucleic Acid Research vol. 10, 821-832.

Sirotkin, K. (1986) Advantages to mutagenesis techniques generating populations containing the complete spectrum of single codon changes. Journal of Theoretical Biology. vol. 123, 261-279.

Spratt B.G., Hedge Ph. J., Telteesen S., Edelman A. and Broome-Smith J.K. (1986) Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. Gene 41, 337-342.

Bibliografía

Stemmer W.P.C. (1994) Molecular evolution of proteins: >10⁴-fold increased resistance by DNA shuffling of a β -lactamase gene. *Nature* (in press).

Stemmer W. P.C. (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Science-USA* (in press).

Svensson, B. (1988). Regional distant sequence homology between amylases, α -glucosidases and transglucanoylases. *FEBS Letters*. Vol.230, num. 1,2, 72-76.

Svensson B., Jespersen H., Sierks M.R. and MacGregor A. (1989) Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch degrading enzymes. *Biochemical Journal*. Vol. 264, 309-311.

Svensson B., & Søgaard M. (1993) Mutational analysis of glucosylase function. *Journal of Biotechnology* 29, 1-37.

Takase K. (1993). Effect of mutation of an amino acid residue near the catalytic site on the activity of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase. *European Journal of Biochemistry* vol. 211, 899-902.

Tao B.Y. Reilly P.J. and Robyt J. F. (1989) Detection of a covalent intermediate in the mechanism of action of porcine pancreatic α -amylase by using ¹³C nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta* vol. 995, 214-220.

Vázquez-Duhalt R. & Arredondo-Vega B.O. (1991) Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* (race A). *Phytochemistry* vol. 30 no. 9, 2919-2925.

Vihinen M. & Mäntsälä P. (1989) Microbial Amylolytic enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. vol. 24 no. 4 329-418.

Wells T., Vasser M. & Powers D. (1985). Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene* vol. 34, 315-323.

Wells J. A. (1990) *Biochemistry* vol. 29, 8509-8517.

Wong Ch-H. (1992) Engineering enzymes for chemoenzymatic synthesis. *Tibtech*. vol. 10 337-341.

Bibliografia

Yutani K. (1973) Molecular weight of a thermostable α -amylase from *B. stearothermophilus*. *Journal of Biochemistry* vol. 74, 581.

Zoller M. & Smith M. (1982). Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acid Research* vol. 10, 6487-6500.