

03072



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO

FACULTAD DE QUIMICA

3

2cp.

ANALISIS DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA
LIPASA DE *Bacillus pumilus* GMA1.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

ISMAEL BUSTOS JAIMES



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

258654

1998



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Luis Servín González

Secretario: Dr. Enrique Merino Pérez

Vocal: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Suplente: Dr. Laura Camarena Mejía

Suplente: Dr. Alejandro Fernández Velasco

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 312 de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Amelia Farrés González-Saravia.

Este trabajo contó con el apoyo financiero de los proyectos 4003131500N y F259 del CONACyT, así como con la beca con número de registro 88411 de la misma institución.

AGRADECIMIENTOS:

A mi madre, quien siempre me apoya.

A Carolina, por tantas cosas...

A Raquel que ha sido como una segunda madre para mí.

A la Dra. Amelia Farrés por la confianza que ha depositado en mí.

Al todos los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus acertados comentarios.

A los camaradas que han hecho la vida más llevadera: Rodolfo Cuervo, René De Los Ríos, Fabián Arechavaleta (quien además me facilitó la cepa DH5 α de *E. coli*), Armando Conca (quien me facilitó literatura), Adrián Becerril, Noé Ángeles y Adelfo Escalante.

A todos los compañeros del laboratorio con quienes pasé momentos divertidos y otros no tanto: Amanda, José Luis, Alicia, Maricarmen, Martha M., Martha G., Cristina, Cinthya, Tere, Idalia, Alberto, Demian y algunos otros que escapan a mi memoria.

A los amigos que aunque sea de lejos me ayudaron o al menos no intentaron detenerme: Sandy C., Fabiola A., Claudia Y., Jazmín G., Lorna, Pepe R. y los que faltaron también.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.	i
ABREVIATURAS USADAS.	ii
Capítulo 1. LIPASAS.	1
Capítulo 2. EL GÉNERO <i>Bacillus</i>.	8
Capítulo 3. OBJETIVOS.	16
Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS.	17
Capítulo 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	23
Capítulo 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.	51
BIBLIOGRAFÍA.	54
ANEXO I.	60

RESUMEN

Las lipasas son enzimas de creciente importancia industrial. En el presente estudio se analizó la secuencia de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1. Este microorganismo produce una lipasa termoestable y activa a valores de pH muy alcalinos (50°C y pH de 10.5). Lipasas de otros microorganismos del género *Bacillus* cuyos genes han sido clonados y secuenciados tienen la particularidad de ser relativamente pequeñas, 19.3 KDa, moderadamente alcalófilas y mesófilas. Estas características lo convierten en un modelo atractivo para el estudio de los fenómenos de termofilia y alcalofilia. En este estudio, la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 se logró identificar dentro de una genoteca realizada en *Escherichia coli*, sin embargo, las colonias recombinantes con el fenotipo lipasa positivo se lisaron y no se pudo obtener el DNA que codifica para esta lipasa *in vivo*. En experimentos posteriores se obtuvo la secuencia putativa de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 a partir de un ensayo de PCR. La secuencia fue manipulada con diversos recursos bioinformáticos. Se encontró que esta lipasa, a nivel de aminoácidos, presenta homología con la lipasa de *Bacillus subtilis* 168 (74% de identidad) e indudablemente con la lipasa de *Bacillus pumilus* DSM5776 con la que guarda un 98.34% de identidad. Sin embargo las propiedades catalíticas de temperatura y pH óptimos de la lipasa de la cepa DSM5776 difieren de aquellas de la cepa GMA1 por 20°C y una unidad, respectivamente. Las secuencias muestran sólo tres residuos de aminoácidos distintos, sin embargo esto es suficiente para aumentar la hidrofobicidad de la región en que se encuentran dos de estos residuos. Se realizó un modelo teórico de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 basado en su homología con otras lipasas del género *Pseudomonas* que fueron cristalizadas previamente. Este modelo ajusta a la estructura de una proteína con estructura α/β , característico de las lipasas y presenta dos de los aminoácidos distintos en un extremo de la cavidad catalítica. Sin embargo, no se logró establecer relación alguna entre la estructura y los fenómenos de termofilia y alcalofilia ya que los algoritmos actuales no son adecuados para tal propósito.

ABREVIATURAS USADAS

BAP	Fosfatasa alcalina bacteriana
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
LB	Caldo de cultivo Luria
LDH	Lactato deshidrogenasa
M9	Caldo de cultivo M9
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SM	Medio de suspensión para fagos
TE	Tris - EDTA

Capítulo 1. LIPASAS.

Introducción.

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) catalizan la reacción de hidrólisis de los enlaces éster de los triacilglicéridos, produciendo ácidos grasos libres y, dependiendo de la naturaleza de la lipasa y sus condiciones de actividad, glicerol, mono o diglicéridos con diferencias en las posiciones finales de esterificación (Godtfredsen, 1990). Las lipasas actúan en la interfase agua-lípido, a diferencia de otras esterasas que hidrolizan el mismo enlace pero el sustrato debe ser soluble en fase acuosa (Derewenda y Sharp, 1993). La actividad lipolítica es una función del área de la interfase por unidad de volumen, que se le ha denominado "concentración de interfase". Esta forma de medir la concentración de sustrato refleja la acción de la enzima en una interfase y su necesidad de entrar en la fase acuosa y posteriormente adsorberse en la interfase para interactuar con su sustrato. La actividad lipolítica está mediada en algunas ocasiones por efectores, como iones de metales alcalinos o alcalinotérreos; en el caso de la lipasa pancreática porcina, se pueden contar además a las sales biliares y cofactores proteicos (O'Connor y Bailey, 1988).

Importancia económica de las lipasas.

Los microorganismos productores de lipasa están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Las lipasas no han tenido una gran aplicación comercial como las proteasas o carbohidrasas. Esto podría deberse a que las áreas de aplicación industrial de las lipasas no

habían sido identificadas y a que la producción de lipasas ha presentado ciertas dificultades técnicas en la escala industrial. Los incrementos en rendimiento por mutagénesis clásica y desarrollo de medios de cultivo han hecho económicamente posible el uso industrial de las lipasas. Sin embargo, la mejora determinante en la producción se ha hecho por clonación de los genes de lipasa, más que por aislamiento selectivo, mutagénesis, desarrollos de medio de cultivo y sistemas de fermentación. Las lipasas recombinantes con aplicación industrial son la Lipolasa®, así como la lipasa de *Mucor miehei*, ambas producidas en *Aspergillus oryzae* como sistema de expresión (Godtfredsen, 1990).

Aplicaciones de lipasas microbianas.

Existen varias aplicaciones para las lipasas: una es la producción de nuevos tipos de triglicéridos con características modificadas, como punto de fusión bajo para las grasas de uso en alimentos sólidos, mediante la transesterificación enzimática de triglicéridos disponibles en presencia de bajas cantidades de agua para que el producto mayoritario de la reacción sea el de transesterificación. Otra aplicación es la síntesis de otros ésteres como los glicosídicos y tioésteres (Godtfredsen, 1990). Del mismo modo, cuando se ponen a reaccionar en un solvente orgánico con mínimo contenido de agua (ya que debe existir una pequeña cantidad de ésta que permanezca unida a la enzima para que ésta funcione; Miller y col., 1988), producen la esterificación de alcoholes con ácidos grasos. Estos compuestos son los responsables de los sabores y aromas en muchos productos, por lo cual este método se ha propuesto para la producción industrial de saborizantes y aromas aplicables a la industria alimentaria (Langrand y col., 1990). La maduración de quesos incluye la hidrólisis de lípidos para la producción de sabores, la cual se ha visto que no requiere ser específica en posición pero sí debe ser preferencial respecto al tamaño de la cadena de ácido graso siendo mejor cuando esta actividad es específica para cadenas cortas (Kwak y col., 1989). Las lipasas y las esterasas pueden utilizarse para la síntesis estereoquímica de ésteres. Estos ésteres estereoespecíficos son muy útiles en la industria farmacéutica y química (Katz y col., 1993), como por ejemplo el Naproxen®, Ketoprofen® y muchos intermediarios tanto de síntesis de medicamentos como de insecticidas y herbicidas (Hou,

1993). En la Tabla 1.1 se presenta una revisión de las distintas aplicaciones industriales de las lipasas.

Tabla 1.1. Áreas de aplicación industrial de las lipasas microbianas.

INDUSTRIA	EFEECTO
Lácteos	Hidrólisis de grasa de leche para producción de sabores, maduración de queso, modificación de mantequilla
Panadería	Mejora el sabor y prolonga la vida media
Bebidas	Mejora el aroma
Condimentos	Mejora la calidad de mayonesa y condimentos
Complementos alimenticios	Transesterificación
Cárnicos	Desarrollo de sabor y remoción de grasa
Grasas y aceites	Transesterificación en mantequilla de cacao y margarina Hidrólisis de lípidos, obtención de glicerol, mono y diglicéridos.
Química	Enantioselectividad para resolución de mezclas quirales
Farmacéutica	Síntesis de productos químicos, transesterificación para síntesis de lípidos especiales e hidrólisis en productos digestivos
Cosméticos	Síntesis de emulsificantes y agentes humectantes
Peletera y papelera	Hidrólisis
Limpieza	Hidrólisis, como aditivos en limpiadores y agentes surfactantes

Fuente: Bell y Parsons (1975); Godtfredsen (1990); Hou (1993) y Soberón-Chavez y Palmeros (1994).

Caracterización y estudio de lipasas.

Las lipasas han sido caracterizadas de acuerdo a parámetros como el perfil de actividad contra pH, estabilidad y actividad con respecto a la temperatura, especificidad posicional en la hidrólisis de triglicéridos y especificidad por ciertos ácidos grasos. La especificidad posicional es una característica importante para la aplicación industrial y analítica de las lipasas. Las lipasas de *A. niger*, *R. delemar*, *M. miehei* y *H. lanuginosa* poseen especificidad para la hidrólisis de ésteres de glicerol en posición 1,3, mientras que

las lipasas como la de *G. candidum* y *P. cyclopium* no muestran especificidad. La lipasa de *G. candidum* ha mostrado especificidad para la hidrólisis de lípidos insaturados mientras que la lipasa de *Fusarium oxysporum* aparentemente prefiere la hidrólisis de ácidos grasos saturados.

Varias lipasas han sido clonadas y secuenciadas y entre ellas están las de *Alcaligenes denitrificans*, *Pseudomonas fragi*, *Mucor miehei*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus* y *H. lamuginosa* en cuanto a las microbianas. Entre las no microbianas que se han estudiado de este modo, tenemos a la lipasa hepática de rata, la lipasa pancreática porcina, la lipasa lipoproteína humana y su enzima relacionada lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT). Una comparación entre estas secuencias se puede ver en la Tabla 1.2. Hay un residuo de serina estrictamente conservado, localizado en una región de residuos hidrófobos, muy conservada en todos los casos (Godtfredsen, 1990 y Derewenda y Sharp, 1993).

Tabla 1.2. Homología entre sitios de unión con el sustrato de distintas lipasas.

Lipasa	Aminoácidos													
<i>P. fragi</i>	R	V	N	L	I	G	H	S	Q	G	A	L	T	A
<i>S. aureus</i>	K	V	H	L	V	G	H	S	M	G	G	Q	T	I
<i>S. hyicus</i>	P	V	H	F	I	G	H	S	M	G	G	Q	T	I
<i>R. miehei</i>	K	V	A	V	T	G	H	S	L	G	G	A	T	A
<i>B. subtilis</i>	K	V	D	I	V	A	H	S	M	G	G	A	N	T
<i>B. pumilus</i>	K	V	D	I	V	A	H	S	M	G	G	A	N	T
<i>B. thermocatenuatus</i>	R	V	H	I	I	A	H	S	Q	G	G	Q	T	A
Lingual de rata	K	I	H	Y	V	G	H	S	Q	G	T	T	I	G
Hepática de rata	K	V	H	L	I	G	Y	S	L	G	A	H	V	S
Páncreas cerdo	N	V	H	V	I	G	H	S	L	G	S	H	A	A
Lipoprot. Humana	N	V	H	L	L	G	Y	S	L	G	A	H	A	A
LCAT Humana	P	V	F	L	I	G	H	S	L	G	C	L	H	L

Fuente: Godtfredsen (1990), Möller y col. (1991), Dartois y col. (1992), Derewenda y Sharp (1993) y Schmidt-Dannert, y col (1996).

Las lipasas poseen una estructura característica α/β , esto es, una estructura de varas hojas β -plegadas central con hélices α en menor proporción. En las lipasas hasta ahora estudiadas por cristalografía de rayos X, se ha visto que el sitio catalítico está localizado en el carboxilo terminal de la hoja central. El sitio catalítico de las lipasas presenta un residuo de histidina (H) y un residuo ácido como aspartato (D) o glutamato (E), los que, activan a un residuo de serina (S) que ataca nucleofílicamente el enlace éster de los ácidos grasos durante la catálisis. Este mecanismo de acción es semejante al observado en el caso de las serín-proteasas ya que el enlace peptídico resulta ser electrónicamente muy similar al enlace éster. La serina catalítica es activada por el acoplamiento entre los residuos Asp e His. En las lipasas el residuo Ser activo es el que se encuentra en la secuencia consenso mencionada anteriormente, aunque el resto de los aminoácidos de la tríada catalítica provienen de distintas regiones de la proteína pero siempre en el mismo orden. La serina encontrada dentro del pentapéptido consenso se encuentra en el caso de las lipasas en una conformación ϵ ($\phi = 62^\circ$, $\Psi = -121^\circ$). Este motivo estructural consiste en una cadena β seguida por un giro rígido que contiene al residuo de serina y en seguida un α hélice, a este motivo se le conoce como β -eSer- α (Derewenda y Derewenda, 1991). El análisis de secuencia de aminoácidos alrededor de residuos de serina activos, indican que este motivo puede constituir la característica estructural que agrupa a las familias de serín-hidrolasas.

En algunas lipasas estudiadas el centro catalítico está cubierto por una cadena superficial que consiste en una corta hélice anfipática. Bajo condiciones de inhibición, esta hélice se aleja del sitio activo y a través de la superficie de la molécula moviendo su centro de gravedad 8\AA y girando sobre su propio eje casi 180° . Como resultado de este movimiento se expone una gran superficie hidrofóbica de aproximadamente 750\AA^2 (Brockman y col., 1973) en la que participan principalmente 12 aminoácidos: Ile85, Trp88, Ile89, Leu92, Phe94, Val205, Leu208, Phe213, Val254, Leu255, Leu258 y Leu267 para el caso de la lipasa de *Mucor miehei* (Brzozowski y col., 1991 y Derewenda y col., 1992). Cuando se alinean estos aminoácidos con los otras cuatro lipasas conocidas, se ve que están altamente conservados confirmando así su significancia funcional. Este cambio conformacional está asociado a la activación de las lipasas por adsorción en la interfase

agua-aceite. La activación de lipasas mayores, como la humana pancreática (hpL), presentan un fenómeno más complejo, ya que éstas poseen cofactores como la colipasa para el caso de la hpL. Estudios estructurales mostraron que la colipasa se une exclusivamente al dominio del carboxilo terminal, no obstante aún no se sabe qué cambios conformacionales ocurren durante la adsorción de la enzima en la interfase lípido-agua, dejando a la colipasa en contacto con otras partes de la enzima, incluyendo la cubierta antes mencionada (Derewenda y Sharp, 1993).

Lipasas del género *Bacillus*.

Como se puede observar en la Tabla 1.2, la secuencia característica de las lipasas G-X-S-X-G, en las lipasas del género *Bacillus* cambia a A-X-S-X-G. Del mismo modo, el peso molecular de estas enzimas es pequeño, excepto por la de *B. thermocatenulatus*. Se ha visto que las lipasas del género *Bacillus* poseen un pH óptimo cercano a 10. La lipasa de *B. subtilis* no presenta el fenómeno de activación interfacial en el cual la enzima se activa en presencia de una interfase lípido-agua. Sin embargo, se ha demostrado que es una lipasa con preferencia por los ésteres de glicerol de ácidos grasos de cadena mediana. El hecho de no requerir activación interfacial y su tamaño reducido hacen suponer que estas enzimas no poseen la hélice que cubre el sitio activo de la enzima. Las cutinasas son esterasas/lipasas de peso molecular bajo que tampoco son activadas por interfases y que no presentan esta hélice cubriendo el sitio activo. Aunque sus secuencias no revelan una relación evidente con las cutinasas, se cree que podrían existir relaciones entre las lipasas del género *Bacillus* y éstas (Ransac y col., 1994).

Las primeras lipasas del género *Bacillus* a las que se caracterizó bioquímicamente hicieron pensar que se trataba de enzimas de peso molecular bajo si se comparaban con otras lipasas conocidas. Sin embargo, Wang y col. (1995) y Schmidt-Dannert y col. (1996) encontraron que las lipasas de *Bacillus* sp. A30-1 y *B. thermocatenulatus* poseen pesos moleculares relativamente altos comparadas con las de *B. subtilis* 168 y *B. pumilus* DSM5776. La lipasa de *Bacillus* sp. A30-1 tiene un peso molecular de 65 KDa y la de *B. thermocatenulatus* de 32 KDa. Las características bioquímicas de las lipasas de *B. subtilis* (Lesuisse y col., 1993), *B. pumilus* (Möller y col., 1991), *B. thermocatenulatus* (Schmidt-

Dannert y col., 1996), *Bacillus* sp. (Sugihara y col., 1991) y *Bacillus* sp. A30-1 (Wang y col., 1995) se muestran en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Características bioquímicas de algunas lipasas producidas por microorganismos del género *Bacillus*

Organismo\Cualidad	T óptima (°C)	pH óptimo	Peso molecular (KDa)
<i>B. subtilis</i> 168	37	10.0	19.3
<i>B. pumilus</i> DSM5776	30	9.5	19.3
<i>B. thermocatemulatus</i> DSM730	60	8.0	32.0
<i>Bacillus</i> sp. A30-1 (ATCC 53841)	60	9.5	65.0
<i>Bacillus</i> sp.	60	6.4	22.0

Fuente: Sugihara y col. (1991), Möller y col. (1991), Lesuisse y col. (1993), Wang y col. (1995) y Schmidt-Dannert y col. (1996).

En el presente trabajo se estudió la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 que ha sido caracterizada previamente, encontrándose pH óptimo de 10.5, temperatura óptima de 50°C y preferencia por ácidos grasos de cadena corta (Bustos-Jaimes, 1995). Estas diferencias con respecto a la lipasa de *B. pumilus* DSM5776, particularmente en cuanto a temperatura óptima, nos hacen pensar que la lipasa de *B. pumilus* GMA1 es una enzima distinta a la de este último organismo. Además, existen diferencias bioquímicas entre ambos microorganismos, como son los resultados de las pruebas de Voges-Proskauer (+ para la cepa GMA1 y la cepa tipo) y utilización de citrato (- para la cepa GMA1 y + para la cepa DSM5776 y la cepa tipo). Dado que no se hicieron exactamente las mismas pruebas bioquímicas en ambos casos, las diferencias podrían ser más que las aquí enumeradas. Consideramos que las diferencias observadas son suficientes para apoyar la hipótesis de que se trata de un microorganismo distinto.

Capítulo 2. EL GÉNERO *Bacillus*.

Introducción.

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, que a su vez pertenece al orden de las bacterias con bajo contenido de G+C que está comprendido en la clase de los Firmicutes (Gram positivas) del phylum de las Eubacterias. En este género están clasificados los bacilos aerobios capaces de formar endosporas y presenta un gran número de especies debido a cierta ambigüedad en su clasificación original, como se comenta más adelante. Este género es interesante ya que estas bacterias presentan esporas que pueden ser termorresistentes y son capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos gracias a sus enzimas hidrolíticas (Berkeley y col., 1984). Esto les permite colonizar distintos ambientes que pueden ser muy calientes, ácidos o alcalinos. Esta plasticidad hace del género *Bacillus* un agente contaminante en potencia y también una fuente de enzimas con interés biotecnológico, dado que se ha reconocido como un género normalmente no patógeno para el humano (Harwood, 1992 y Sietske de Boer y col., 1994).

Importancia industrial y en investigación.

Los microorganismos del género *Bacillus* han sido usados por el hombre para muchos fines. Uno de los primeros reportes que se tienen es el uso de *Bacillus subtilis* var. *natto* en la fermentación de frijol de soya para la producción de "natto", un alimento tradicional japonés. El consumo anual de este alimento es del orden de 10^8 Kg y su baja

patogenicidad le han merecido el título GRAS (Generally Recognized As Safe) otorgado por la FDA (Food and Drug Administration) (Harwood, 1992). El mismo estatus se le ha dado a las preparaciones enzimáticas de carbohidrasas y proteasa de *B. licheniformis* (Sietske de Boer y col., 1994). *B. subtilis* presenta otras características que lo hacen atractivo como sistema industrial, como son la mayor simplicidad de su envoltura celular; comparándola con la de *E. coli*, *B. subtilis* no posee membrana externa, lipopolisacáridos asociados ni periplasma. Sin embargo, una de las desventajas de trabajar con *B. subtilis* es que produce al menos siete proteasas extracelulares, lo que puede ocasionar la degradación de proteínas secretadas por él mismo. Para evitarlo, se han construido cepas con actividad proteolítica disminuida hasta llegar a un 0.5% de la original, en la que las proteínas extracelulares han mostrado una mejor estabilidad (Harwood, 1992).

B. thuringiensis, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. propilliae* y *B. sphaericus* son bacterias capaces de producir toxinas con acción insecticida (Harwood, 1992). El caso más estudiado es el de *B. thuringiensis* cuyas proteínas actúan a nivel del intestino de insectos de manera específica. Existen varias subespecies de *B. thuringiensis* que presentan endotoxinas activas contra ciertos insectos, como ejemplo tenemos a *B. thuringiensis kurstaki*, *B. thuringiensis israelensis* y *B. thuringiensis tenebrionis* (Ibarra, 1994). En 1990 el mercado de insecticidas fue de 26000 millones de dólares de los cuales el 1% corresponde a los bioinsecticidas, entre los que la endotoxina de *B. thuringiensis* ocupa entre el 90 y 95% lo anterior demuestra la potencialidad de estos productos (Bravo y col., 1992). En la Tabla 2.1 se muestran algunas proteínas del género *Bacillus* con importancia industrial.

Dada esta importancia industrial, se ha profundizado en el estudio de las enzimas de estos microorganismos desde un punto de vista molecular. Como ejemplos tenemos a la amilasa acidófila de *B. acidocaldarius* (Koivula, 1993), la subtilisina J de *B. stearothermophilus* (Jang, 1992), la lipasa de *B. subtilis* (Dartois y col., 1992) y la 1,4- β -glucanasa de *Bacillus* sp. KSM-330 (Ozaki, 1991), entre otras muchas.

Tabla 2.1. Proteínas del género *Bacillus* con importancia industrial.

Proteína	Microorganismo
α -Amilasa	<i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. circulans</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. stearothermophilus</i>
β -Amilasa	<i>B. polymyxa</i>
Ciclodextrin-glicosil transferasa	<i>B. mascerans</i> <i>B. megaterium</i>
δ -Endotoxina	<i>B. thuringiensis</i>
Fosfatasa alcalina	<i>B. licheniformis</i>
β -Glucanasa	<i>B. subtilis</i>
Glucosa isomerasa	<i>B. coagulans</i>
β -Lactamasa	<i>B. licheniformis</i>
Proteasa alcalina	<i>B. subtilis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. licheniformis</i>
Proteasa neutra	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Pululanasa	<i>B. acidopullulyticus</i>
Xilanasa	<i>B. stearothermophilus</i>

Fuente: Harwood (1992), Gat y col. (1994) e Ibarra (1994).

Taxonomía.

El género *Bacillus* está compuesto de una gran cantidad de microorganismos dado que los únicos requisitos taxonómicos para pertenecer a éste son: ser un bacilo largo, formar endosporas, reacción de Gram positiva y reacción catalasa positiva. Dentro de estas pruebas caen muchos organismos y desde 1984 se sabía suficiente de la diversidad en la composición del DNA de éste genero, que se proponía dividirlo en seis géneros distintos; sin embargo, no se contaba con la suficiente información como para realizar tal clasificación en ese momento (Berkeley y col., 1984). Considerando que una característica morfológica universal para estos microorganismos es la formación de endosporas, uno de los criterios que más peso han tenido en la clasificación de microorganismos dentro de este género es la morfología de éstas. Así la forma, el tamaño y la posición del esporangio se usó en 1952 para reducir las más de 1000 especies a sólo 19. Muy a pesar de las enmiendas que se han hecho a esta clasificación se ha observado que es insuficiente y que hay cepas

que no pueden ser acomodadas en ninguna especie conocida. La aproximación con métodos moleculares a la clasificación original del género *Bacillus* ha puesto de manifiesto la ineficiencia de ésta. El análisis del contenido porcentual de guanina y citosina (%GC) demuestra que existe una gran diversidad dentro de este género. El análisis de rRNA por secuenciación parcial indica una relación muy cercana entre el género *Bacillus* y los géneros *Planococcus*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus* y *Thermoactinomyces* y muestra al género *Bacillus* más como un taxón que como un género, que debiera contener varios géneros. Estudios de homología de DNA han demostrado que algunas especies del género *Bacillus*, particularmente *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. sphaericus* y *B. stearothermophilus* son sumamente heterogéneos y requieren una revisión taxonómica (Priest, 1988).

Recientemente se han propuesto los cambios que se habían previsto desde la década de los 80's. Basados en estudios de secuencias de rRNA 16S se ha encontrado una fuerte relación entre *Bacillus pasteurii*, *Planococcus citreus* y *Sporosarcina ureae* (Farrow y col., 1992). Utilizando el mismo tipo de análisis se encontró que *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestis* y *B. cycloheptanicus* son suficientemente distintos del resto de los microorganismos tradicionalmente conocidos del género *Bacillus* como para clasificarlos en un género distinto denominado *Alicyclobacillus* (Wisotzkey y col., 1992). Las cepas termófilas del género *Bacillus* también han sido sometidas al análisis de rRNA y comparando contra bases de datos del rRNA de microorganismos de los géneros *Bacillus* y *Alicyclobacillus* se logró acomodar a la mayoría de estos organismos en dos grupos representados por *B. stearothermophilus* y *B. pallidus*. Mientras que *B. smithii*, *B. thermocloacae* y *B. thermoruber* se presentaron como organismos filogenéticamente separados que caen dentro de los miembros mesófilos del género. Otros miembros del género *Bacillus* no pudieron ser agrupados mas que lejanamente con miembros del género *Alicyclobacillus*, por lo que se deberá trabajar con ellos cuando se tenga más información fenotípica (Rainey y col., 1994). Se ha estudiado la diversidad dentro del género *Bacillus* usando un análisis de secuencia de la proteína ribosomal AT-L30, y nuevamente se demostró su heterogeneidad al compararlo con el mismo tipo de análisis practicado a los

géneros *Escherichia*, *Staphylococcus*, y *Thermoactinomyces*, que mostraron gran homogeneidad. Por otra parte el género *Bacillus* mostró tener al menos 4 grupos. El grupo en el que estaban *B. subtilis* y *B. stearothermophilus* mostró mas relación con el grupo de *Staphylococcus* que con los otros tres grupos de *Bacillus*. El grupo de *Thermoactinomyces* mostró una cierta relación con el grupo de *B. subtilis*, pero no mostró relación con los otros tres grupos del género *Bacillus* (Ochi, 1994). Un estudio reciente de comparación de secuencias de rRNA 16S en varias cepas de *Bacillus* propone la creación de dos géneros nuevos, basados en la formación de dos grupos: uno de *B. brevis* y el otro de *B. aneurinolyticus*. El grupo de *B. brevis* comprende a *B. brevis*, *B. agri*, *B. centrosporus*, *B. choshinensis*, *B. parabrevis*, *B. reuszeri*, *B. formosus*, *B. borstelensis*, *B. laterosporus* y *B. thermoruber*, mientras que el grupo de *B. aneurinolyticus* comprende a *B. aneurinolyticus* y a *B. migulamus*. Además estos dos grupos son genéticamente distintos de otras especies de los géneros *Bacillus*, *Amphibacillus*, *Sporolactobacillus*, *Paenibacillus* y *Alicyclobacillus*. Con estas evidencias se propuso la creación del género *Brevibacillus* para el grupo de *B. brevis* y el género *Aneurinibacillus* para el grupo de *B. aneurinolyticus* (Shida y col., 1996). Basados en un estudio de rRNA 16S y en la composición celular de ácidos grasos se ha propuesto la inclusión de *B. alginolyticus*, *B. chondroitinus*, *B. curdlanolyticus*, *B. glucanolyticus*, *B. koblenensis* y *B. thiaminolyticus* en el género *Paenibacillus* (Shida y col., 1997). En resumen, el género *Bacillus* muestra una gran diversidad, por lo que se presenta la necesidad de reclasificarlo con criterios taxonómicos más apropiados.

Algunas aplicaciones de *Bacillus pumilus*.

Las esporas de *Bacillus pumilus* han sido usadas como sistema para determinar la esterilización por radiaciones ionizantes. Las esporas deshidratadas poseen un valor D (tiempo de reducción logarítmica de la población original) estable de 0.17 a 0.18 Mrad tras un año de almacenamiento a 5 o 25°C, sin embargo ésta se pierde a 35°C. La refrigeración no posee efectos adversos en la resistencia a la irradiación. La presencia de agua puede aumentar el valor D hasta 0.23 a 0.25 Mrad (Prince, 1976). Un ejemplo aplicado del uso de esporas de *B. pumilus* consiste en el seguimiento de la esterilización de inmunoabsorbentes con fines terapéuticos (Kidata y Hori, 1986).

Bacillus pumilus presenta la capacidad de producir antibióticos, al igual que algunos otros miembros del género *Bacillus*. En un estudio *in vitro* se demostró que *B. pumilus* posee actividad contra *Botrytis cinerea*; sin embargo, en el ensayo directamente en semillas *B. pumilus* falló en evitar el deterioro por *B. cinerea* (Leifert y col., 1995). Otros antibióticos-antivirales producidos por *B. pumilus* han sido descritos y denominados pumilacidinas. Se han descrito las variedades A, B, C, D, E, F y G, que son acilheptapéptidos cíclicos compuestos de un β -hidroxi-ácido graso, dos moléculas de L-leucina, dos moléculas de D-leucina una molécula de ácido L-glutámico, una molécula de ácido L-aspartico y una molécula de L-isoleucina o L-valina. Estos antibióticos poseen actividad contra el virus del *Herpes simplex* tipo 1, inhiben a la ATPasa dependiente de H^+ y K^+ y son capaces de inhibir las úlceras en ratas (Naruse y col., 1990).

Existe la posibilidad de controlar biológicamente al hongo gris de las peras en la postcosecha mediante el uso de bacterias que antagonicen con éste. En un estudio realizado con peras artificialmente inoculadas con *B. cinerea* y almacenadas a 20°C por al menos 9 días, una cepa de *B. pumilus* no productora de antibióticos redujo significativamente el desarrollo del hongo gris. La aplicación de *B. pumilus* fue compatible con un tratamiento antifúngico basado en iprodiona y en combinación con ésta el tratamiento fue más eficiente que con el fungicida solo (Mari, 1996). No obstante los beneficios que se pueden obtener mediante el uso de *B. pumilus*, también es posible tener algunos efectos tóxicos, ya que se han encontrado cepas de *B. pumilus* con actividad citotóxica en células Vero y capaces de lisar eritrocitos de oveja (Hoult y Tuxford, 1991).

Como sistema molecular, se ha encontrado que *B. pumilus* 289 puede ser transformado con pUB110 a través de fusión de protoplastos con una frecuencia de 10^{-5} a 10^{-3} , similar a *B. subtilis* AS1-1176, una cepa derivada de *B. subtilis* 168. La frecuencia de regeneración de los protoplastos de *B. pumilus* fue menor a la mostrada por *B. subtilis* (0.30-12.00% contra 1.53-24.16%). El plásmido se mantuvo establemente en ambos microorganismos, con una frecuencia de pérdida de plásmido de 3% después de 45 generaciones en medio LB. Sin embargo cuando el plásmido lleva un fragmento de DNA

heterólogo de 3.9 Kbp, éste es mantenido de manera más estable en *B. pumilus* que en *B. subtilis*. La frecuencia de pérdida de plásmido en *B. pumilus* es menor al 5%, mientras que en *B. subtilis* es de 24% tras 25 generaciones en medio SH. El nivel de expresión del gen heterólogo fue también mayor en *B. pumilus* que en *B. subtilis*. Estas características hacen a *B. pumilus* una cepa receptora con potencial aplicación en ingeniería genética dentro del género *Bacillus* (Chen y col., 1989).

Microorganismo de estudio.

El presente estudio se realizó en una cepa de *Bacillus pumilus* denominada GMA1, aislada en las aguas termales de Los Azufres, Michoacán. Este microorganismo presenta características interesantes, y la cepa como tal se considera interesante por las actividades hidrolíticas que presenta además de las características de su lipasa. Este microorganismo se caracterizó bioquímicamente (Tabla 2.2).

La actividad lipolítica de este microorganismo se caracterizó encontrándose parámetros interesantes como su pH y temperatura óptimos de 10.5 y 50°C respectivamente. La lipasa de *B. pumilus* DSM5776 se ha caracterizado de manera bioquímica y molecular (Möller y col., 1991). Las propiedades bioquímicas de la lipasa de *B. pumilus* DSM5776 difieren de aquellas que exhibe la lipasa de *B. pumilus* GMA1 y del mismo modo, las características bioquímicas de ambos microorganismos difieren en algunos puntos como son la producción de acetoina y la utilización de citrato. Dentro de las lipasas del género *Bacillus* que han sido caracterizadas molecularmente se vislumbra la existencia de una familia de lipasas de peso molecular pequeño ya que en el caso de *B. pumilus* DSM5776 y *B. subtilis* 168 se ha encontrado que existe homología, con una identidad de 68% a nivel de DNA, 73% a nivel de proteína y hasta 83% si se hacen consideraciones funcionales con respecto a la naturaleza de los aminoácidos que las componen.

Tabla 2.2. Patrón de fermentación de carbohidratos y otras pruebas bioquímicas de *Bacillus pumilus* GMA1.

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

Fuente: Bustos-Jaimes (1995).

La lipasa de *B. pumilus* GMA1 no ha sido caracterizada molecularmente. Considerando lo expuesto aquí y en el capítulo anterior, cabe señalar que estamos hablando de microorganismos de la misma especie, pero de dos cepas que son definitivamente distintas. Las diferencias entre ambas enzimas: 20°C en la temperatura óptima y una unidad en el pH óptimo (Möller y col., 1991 y Bustos-Jaimes, 1995) hacen de esta enzima un buen modelo molecular para el estudio de los fenómenos de termofilia y alcalofilia en una región particular considerando el tamaño relativamente pequeño de estas enzimas (19.3 kDa).

Capítulo 3. OBJETIVOS.

Objetivo general:

-Analizar el gen de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 buscando coincidencias estructurales con lipasas, enzimas termófilas y enzimas alcalófilas.

Objetivos particulares:

-Aislar el gen de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 utilizando técnicas moleculares tradicionales.

-Secuenciar este gen.

-Analizar el gen con recursos bioinformáticos que permitan la comparación con secuencias de DNA disponibles en bancos de datos, manipulación de secuencia de nucleótidos, traducción de la secuencia de DNA en proteína, el análisis de las características fisicoquímicas de la proteína y la predicción de un modelo tridimensional.

Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

Microorganismos y vectores.

Los microorganismos y los vectores utilizados en este trabajo se encuentran listados en las Tablas 4.1 y 4.2 respectivamente.

Tabla 4.1. Microorganismos usados.

Microorganismo	Fenotipo
<i>Bacillus pumilus</i> GMA1	Lipasa+
<i>E. coli</i> C600 <i>hflA</i>	e14 ⁺ (<i>mcrA</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i> , <i>hflA150::Tn10</i>
<i>E. coli</i> BNN102	BNN93, <i>hflA150::Tn10</i> (igual a C600 <i>hflA</i>)
<i>E. coli</i> LE392	e14 ⁺ (<i>mcrA</i>), <i>hsdR514</i> , <i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>lacY1</i> o $\Delta(lacIZY)6$, <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>metB1</i> , <i>trpR55</i>
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(lac-proAB)$, [F ⁺ <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i>]
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , $\Delta lacU169$ ($\phi 80 lacZ\Delta M15$), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>

Fuente: Sambrook y col. (1989).

Tabla 4.2. Vectores usados.

Vector	Características
λ gt10	Sitio Eco RI dentro del represor cI para selección por lisis.
pIJ2925	Amp ^r , Lac Z.
pBluescript	Amp ^r , Lac Z.
pLIP2031	Neo ^r , lipasa de <i>Bacillus subtilis</i> 168.

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

- 1) Crecer 50 mL de *Bacillus pumilus* GMA1 toda la noche a 37°C con agitación de 250 r.p.m.
- 2) Centrifugar a 1000 r.p.m. en un rotor JA20.
- 3) Resuspender las células en 2 mL de amortiguador TE (10 mM, 0.2 mM, pH 8.0).
- 4) Adicionar 1 mg de lisozima e incubar a 37°C durante una hora.
- 5) Agregar 0.5 mg de pronasa E y 150 µL de SDS 10%. Mezclar suavemente e incubar a 37°C durante una hora.
- 6) Agregar 200 µL de NaCl 5 M y mezclar suavemente. Agregar 200 µL de solución de CTAB/NaCl (10%/0.7 M). Mezclar e incubar 15 min a 65°C.
- 7) Agregar un volumen de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1). Mezclar suavemente hasta que desaparezca la fase orgánica (inferior) y centrifugar a 1000 r.p.m. en un rotor JA20 durante 10 min.
- 8) Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y agregar un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1). Mezclar suavemente hasta que desaparezca la fase orgánica (inferior) y centrifugar a 1000 r.p.m. en un rotor JA20 durante 10 min.
- 9) Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y agregar 0.6 volúmenes de 2-propanol. Mezclar hasta que se observe el DNA precipitado
- 10) Retirar el líquido con una pipeta y enjuagar el precipitado con 2 mL de etanol al 70%. Secar el DNA a 50°C con vacío y resuspenderlo en 1.0 mL de amortiguador TE pH 8.0 y guardar a -20°C hasta ser usado.

Clonación en λ gt10 de la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

La clonación se realizó utilizando el sistema de lambda gt10 de Boheringer Mannheim Biochemica siguiendo el protocolo del fabricante, utilizando una digestión total del DNA cromosomal de *B. pumilus* GMA1. Se transformaron células competentes de *E. coli* C600 *hflA* preparadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante del sistema de clonación. La selección se realizó en agar NZ-amina con 0.5% de tributirina en el agar superficial.

Análisis de la expresión en λ gt10.

Se transformaron células competentes de *E. coli* C600 *hflA*, preparadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante del sistema de clonación. Para evaluar si se trataba de la misma enzima, se evaluó la actividad de ésta tras la transfección del mismo microorganismo y su cultivo a 29 y 37°C durante 24 h en medio M9 suplementado con 1% de casaminoácidos, 1% de tributirina y 0.02% de Tween 80.

Análisis molecular en λ gt10.

Se extrajo DNA del fago de acuerdo al protocolo de purificación con gradiente de CsCl de Ausubel y col. (1992) y fue digerido con enzimas de restricción de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Amplificación por PCR a partir de λ gt10.

La región que flanquea al sitio de clonación en λ gt10 fue amplificada con cebadores comerciales (USB al inicio y posteriormente de Clontech Laboratories Inc.) diseñados para tal fin modificando las temperaturas de alineamiento del cebador y la concentración total de ion Mg^{2+} .

Clonación en pIJ2925 y en pBluescript de la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

Se digirieron 25 μ g del DNA de *B. pumilus* GMA1 con 10 U de *Sau* 3A durante 5 minutos. Al término de este lapso se inactiva la enzima por calentamiento a 70°C durante 20 min. Se corrió un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se cortó la región del gel que contiene fragmentos entre 3 y 15 Kbp. Se purificó de acuerdo al protocolo de Ausubel y col. (1992). El vector fue digerido con 10 U de *Bam* HI durante 4 h y se desfosforiló con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El vector se ligó con el DNA digerido y purificado de *B. pumilus* GMA1 usando una relación de extremos ligables 1:5. La reacción con ligasa se llevó a cabo durante 18 h a 16°C. 2 μ L de esta mezcla se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* JM 101 y de *E. coli* DH5 α de acuerdo al protocolo de Ausubel, y col. (1992).

Hibridación de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 vs la lipasa de *B. subtilis* 168.**Dot blot.**

10.0 µg de DNA de *B. pumilus* GMA1 y 10.0 µg de DNA de esperma de salmón, como control negativo, se fijaron en una membrana de nylon (Hybond®-N, Amersham Life Science) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se amplificó la lipasa de *B. subtilis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando al plásmido pLIP2031 como molde para la polimerasa y los cebadores reportados por Dartois y col. (1994). El producto se marcó radiactivamente por amplificación al azar con el sistema de Amersham (Multiprime DNA labelling system). La hibridación se realizó de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante del sistema de marcaje.

Un marcaje no radiactivo se llevó a cabo utilizando 5.0 µg de DNA de *B. pumilus* GMA1 y 5.0 µg de DNA de pBluescript, como control negativo, se fijaron a una membrana de nylon (Hybond®-N, Amersham Life Science), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Southern blot.

Se realizaron digestiones exhaustivas de 10 µg de DNA de *B. pumilus* GMA1 con 10 U de cada una de las siguientes enzimas de restricción:

Bam HI *Bgl* II *Eco* RI *Hind* III *Kpn* I *Pst* I *Pvu* II *Sac* I *Sac* II *Sma* I

Se corrieron en gel de agarosa y posteriormente se transfirieron y fijaron a una membrana de nylon de acuerdo al protocolo de Ausubel y col. (1992). Se realizó el marcaje de la sonda (lipasa de *B. subtilis* 168), la hibridación y la detección utilizando el sistema no radiactivo ECL (Amersham Life Science), de acuerdo con sus propias instrucciones.

Amplificación por PCR de la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

La amplificación por PCR de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 se realizó diseñando oligonucleótidos complementarios para las regiones de inicio y término de la secuencia de la lipasa de *B. pumilus* DSM5776 reportada por Möller y col. (1991), y uno de la región de inicio de la lipasa de *B. subtilis* reportada por Dartois y col. (1992). Se contaba también con los cebadores con los que se amplificó la sonda (lipasa de *B. subtilis* 168). Se hizo un diseño factorial completo para las 2 variables (el cebador de la región de inicio y el cebador de la región de terminación). Los cebadores se diseñaron con el programa "Primers! V1.0 for the Mac" (Resnick, Ashland, MA, 1996) y otros según los criterios descritos por Rychlik (1993). Todos fueron analizados con respecto al ΔG del extremo 3' con los criterios de Rychlik (1993).

Cebadores de la región de inicio:

FBPLIP 5'→3': AAA-GAG-GCG-AAG-GCG-G

De *B. pumilus*. $\Delta G = -9.8$ Kcal/mol, calculado según Rychlik (1993).

KLIP 5'→3': CTT-AAT-TAA-TTT-GGT-ACC-GTA-ATA-TAA-TTG

De *B. subtilis* $\Delta G = -5.3$ Kcal/mol, calculado según Rychlik (1993).

Cebadores de la región terminal:

RBSLIP 5'→3': AGT-TTT-TCA-TTA-ATT-CGT-ATT-CTG-GCC-C

De *B. subtilis* $\Delta G = -9.3$ Kcal/mol, calculado según Rychlik (1993).

HLIP 5'→3': AAA-AAG-CTT-GCC-GAA-AGC-GGA-ATA-ACC-TTG

De *B. subtilis* $\Delta G = -5.4$ Kcal/mol, calculado según Rychlik (1993).

RBPLIP 5'→3': TTT-CGT-TTT-TTA-ATT-CGT-ATT-TTG-TCC-TCC

De *B. pumilus* $\Delta G = -6.3$ Kcal/mol, calculado según Rychlik (1993).

La amplificación se realizó usando las siguientes condiciones de reacción:

Reactivos		Condiciones de reacción	
Buffer 10X	10.0 µL	1 ciclo	94.0°C / 3.0 min.
Mezcla dNTP's (2.5 mM)	3.0 µL		
Cebador Inicio (20 µM)	5.0 µL	30 ciclos	93.0°C / 1.0 min.
Cebador Termino (20 µM)	5.0 µL		42.0°C / 1.0 min.
DNA molde (40 ng/µL)	1.0 µL		72.0°C / 3.0 min.
Mg ²⁺ (50mM)	5.0 µL	1 ciclo	72.0°C / 15.0 min.
H ₂ O	70.0 µL		
Taqpol (5 U/µL)	1.0 µL		

Secuenciación.

El procedimiento de secuenciación se realizó en un sistema automatizado ABI PRISM 377 DNA Sequencer de Perkin Elmer, division Applied Biosystems. Se utilizó el "Dye Terminator Kit" con DNA polimerasa AmpliTaq®, FS; catálogo 402079 (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction) de Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA 94404.

Análisis computacional.

El análisis computacional se realizó con ayuda de los programas CLUSTAL W 1.6 (Thompson y col., 1994), BLAST (Altschul y col. 1990), BLASTX (Gish y col. 1993), TREECON 1.2 (Van de Peer y De Wachter, 1994), MaxHom (Sander y Schneider, 1991) "multiple sequence alignment" de la Universidad de Heidelberg, Alemania, Insight II® y DISCOVER® (BIOSYM/MSI software) y GRASP (Nicholls, Sharp y Honig, 1991). Se utilizaron las bases de datos de secuencias de proteínas y nucleótidos GenBank, EMBL, DDBJ, PIR, SWISS-PROT, PRF, y PDB.

Capítulo 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Aislamiento del gen de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1.

Clonación en λ gt10 de la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

Se obtuvo una genoteca con 2553 placas de lisis (recombinantes) por lo que se puede suponer que se tiene representado mas del 90% del genoma (Clarke y Carbon, 1976), con lo cual se puede trabajar adecuadamente. Entre las placas recombinantes se observó una con un halo de lisis (Figura 5.1) sobre la tributirina del agar superficial por lo que se replaqueó encontrando que todos sus descendientes formaban este halo bajo condiciones de incubación prolongadas a temperatura ambiente. A este fago recombinante se le denominó λ LipB.

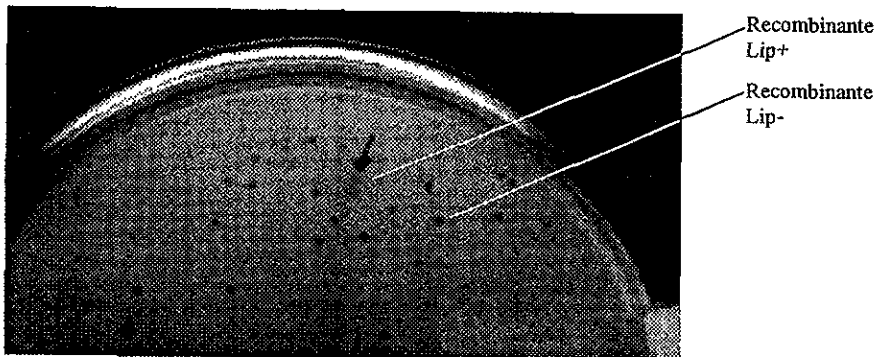


Figura 5.1. Placa recombinante con actividad lipolítica.

Análisis de la expresión en λ gt10 de la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

La placa recombinante se resuspendió en amortiguador SM y se utilizó para reinfectar células del mismo microorganismo las cuales se plaquearon de la misma manera, se incubó nuevamente a 37°C 6 horas y a 43°C durante 18 horas. La primera incubación tuvo por objeto el permitir que se produjera la lipasa antes de que ocurriera la lisis celular durante la segunda incubación, ya que el fago λ gt10 tiene el sitio único de clonación (*Eco* RI) en el represor λ , lo cual le impide entrar en fase lisogénica al tener un inserto. Las placas de lisis que se obtuvieron no presentaron halo de hidrólisis en ese momento, sin embargo tras 24 horas de incubación a temperatura ambiente, todas las placas mostraron halo de claridad que podría ser hidrólisis de tributirina o deshidratación.

Se reinfectaron células de *E. coli* con el fago λ LipB y no se encontró expresión ni tras la incubación en la estufa, ni tras una incubación a temperatura ambiente durante dos semanas. Esto podría deberse a que las condiciones en las que se había producido la hidrólisis de tributirina alrededor de las colonias son muy difíciles de reproducir, y que además la temperatura ambiente fue relativamente baja.

Análisis molecular en λ gt10 de la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

Para evaluar el tamaño del inserto se realizó una extracción de DNA del fago el cual se digirió con *Eco* RI considerando que la clonación se realizó en el sitio único de restricción para esta enzima. La digestión se evaluó a intervalos de 5 minutos durante 30 minutos y se analizó por electroforesis en gel de agarosa. Se encontró que el DNA del fago se encontraba íntegro y que no hubo corte a ningún tiempo. Esto podría deberse a la presencia de inhibidores de la enzima de restricción en la preparación. Al usar el método de purificación en gradiente de CsCl se obtuvo un DNA de buena pureza ($A_{260}/A_{280}=1.87$) el cual no pudo ser digerido por *Eco* RI. A manera de DNA control se utilizó DNA del fago λ (Boheringer Mannheim) digerido con la misma enzima, encontrando que en este caso sí hubo digestión y se generaba el patrón característico de esta enzima sobre dicho sustrato.

Considerando que la pureza del DNA no era el factor que determinó la imposibilidad de realizar la digestión, se probó cambiar la cepa del microorganismo

receptor argumentando que era posible que en la cepa original, C600 *hflA*, pudiese ocasionar algún problema en la purificación del DNA del fago que impidiera la acción sobre la enzima. Se infectó entonces a las cepas de *E. coli*, BNN102 *hflA*, LE392 y JM101 con el fago λ LipB y se purificó el DNA de éstos en gradiente de CsCl (Figura 5.2).

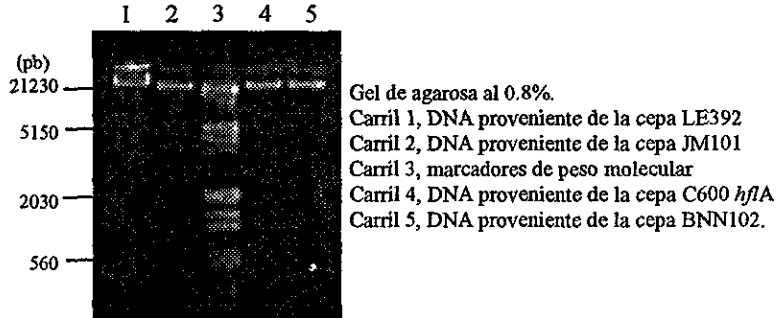


Figura 5.2. DNA del fago λ LipB purificado en gradiente de CsCl a partir de varias cepas de *E. coli*.

Se hicieron digestiones totales este DNA con *Hinf* I, *Pvu* II, *Sau* 3A, *Bam* HI, *Hind* III y *Eco* RI. En la Figura 5.3 se muestran los resultados obtenidos al digerir el DNA del fago λ LipB obtenido de las cepas JM101 y LE392. Se encontró que hubo digestión con otras enzimas, no así con *Eco* RI.

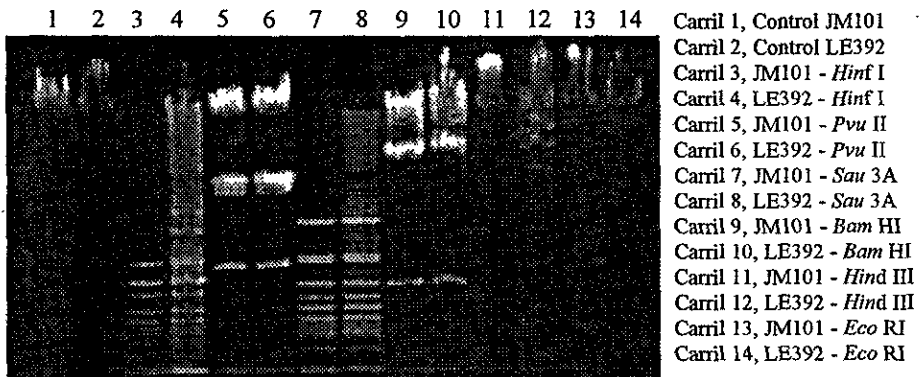


Figura 5.3. Digestiones con varias enzimas de restricción del DNA de λ LipB amplificado por infección de las cepas LE392 y JM101 de *E. coli*.

El DNA obtenido de la purificación en gradiente de CsCl (de la cepa JM101) se sometió a un proceso de limpieza para plásmidos con polietilenglicol (Sambrook y col., 1989) para eliminar restos de CsCl que pudiesen afectar la acción de las enzimas de restricción. Se repitió el experimento de digestión con varias enzimas de restricción y se encontró que el DNA del fago se encontraba parcialmente dañado tras el procedimiento de limpieza ya que se observa un barrido en la parte inferior del DNA genómico, de cualquier modo, no hubo digestión en el caso de *Eco* RI (Figura 5.4).

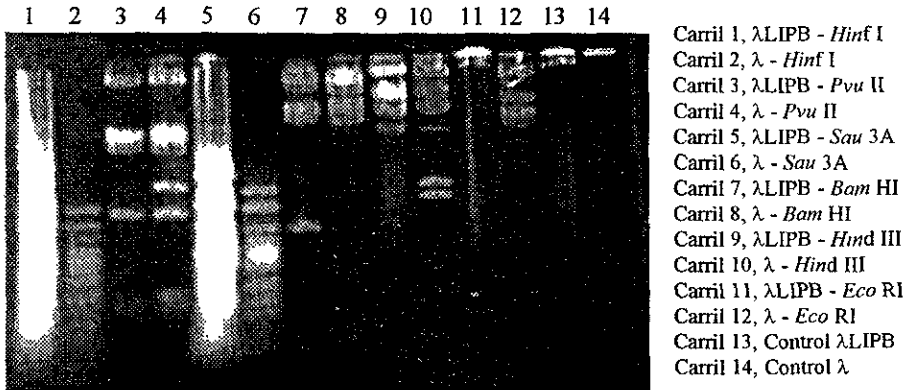


Figura 5.4. Digestión con varias enzimas de restricción del DNA del fago λ y del fago λ LipB sometido a purificación en gradiente de CsCl y posteriormente una limpieza para plásmidos.

Se seleccionaron entonces las enzimas que generan un patrón de restricción manejable, esto es que encuentran pocos sitios de restricción en λ LipB, y se repitió el experimento en el DNA obtenido en la cepa JM101 encontrando los mismos resultados (Figura 5.5).

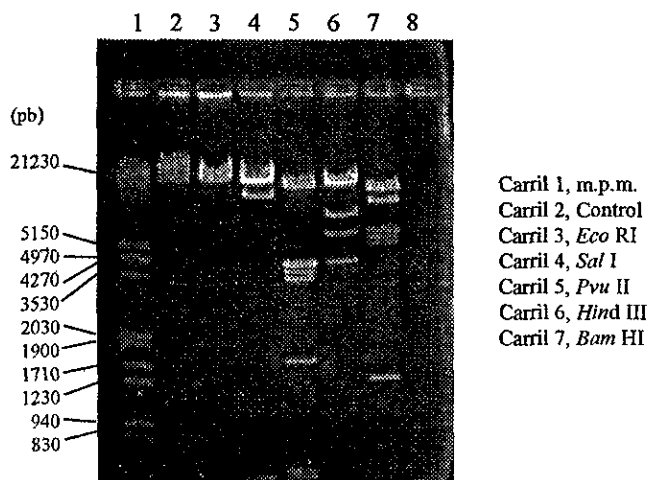


Figura 5.5. Digestión con varias enzimas de restricción del DNA del fago λ LipB obtenido a partir de la cepa de *E. coli* JM101.

El patrón de los fragmentos de restricción es el característico en todos los casos, excepto en *Bam* HI y *Hind* III, por lo que se decidió hacer una digestión doble con estas enzimas para evidenciar el inserto dentro del genoma de λ LipB (Figura 5.6 y Tabla 5.1).

La doble digestión demuestra que existe una cantidad extra de DNA que probablemente corresponde al inserto de DNA de *B. pumilus* GMAI. Este fragmento es de aproximadamente 7.3 Kpb aunque en el caso de la digestión doble con *Hind* III y *Bam* HI pareciera ser de más de 11 Kpb situación muy extraña considerando que el tamaño máximo reportado para insertos en este vector es de 7.3 Kpb lo que pudiese repercutir en la estabilidad de la construcción molecular.

Las digestiones con otras enzimas de restricción muestran que aparentemente el resto de los sitios de restricción se encuentran intactos lo que sugiere un evento recombinatorio localizado. Como se puede ver en el Figura 5.7, la digestión con *Hind* III nos debería arrojar un fragmento de 6530 pb de no existir inserto, sin embargo en la Figura 5.6 se puede ver que existe una banda de 7284 pb aproximadamente, la cual podría deberse a una banda con un peso molecular similar, que podría corresponder al fragmento de 6530 pb más un fragmento del inserto, que pudiese tener un sitio para esta misma enzima.

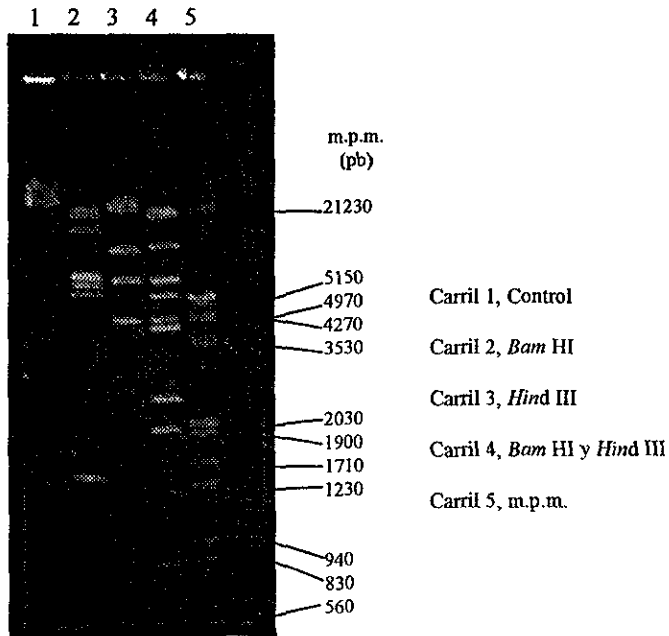


Figura 5.6. Digestión con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III del DNA del fago λ LipB.

Tabla 5.1. Resumen de los resultados de la digestión con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III del DNA del fago λ LipB.

Enzima	<i>Bam</i> HI*	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III*	<i>Hind</i> III	Ambas*	Ambas
peso	16840	16840	23130	23130	16840	16121
	6750	13343	9340	9340	6530	10634
	6530	7565	6430	7284	5510	7014
	6090	6602	4340	4340	4340	5805
molecular	5510	5510			4120	4340
	1620	1620			2410	3936
					1970	2434
					840	1942
(pb)					781	771
						666
Total	43340	44094	43340	44094	43340	54939
Diferencia		+8140		+754		+11599

*Digestión teórica sobre λ gt10

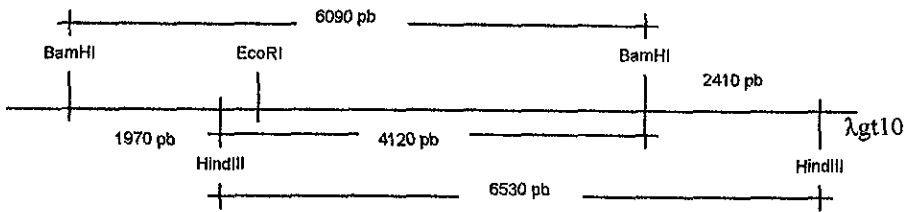


Figura 5.7. Mapa parcial de restricción de λ gt10.

Por otra parte en la digestión con *Bam* HI se puede ver una banda con un peso estimado de 13343 pb un poco tenue y no se encuentran las bandas de 6090 y 6530 pb que teóricamente debieran aparecer, sin embargo hay una banda de 7565 y otra de 6602 pb. Esto podría deberse a que el inserto posea un sitio para esta enzima, pero la digestión por alguna razón no fue completa. Hay que remarcar la intensidad de las bandas pequeñas con respecto a la banda de 13343 pb. En la digestión doble se observa un bandeo que corresponde de manera parcial al bandeo teórico del vector sin inserto, excepto por una banda de 10634 pb, que podría corresponder a la región del inserto de 13343 pb que se observa con *Hind* III, pero que de acuerdo al mapa de restricción posee un sitio interno de *Bam* HI a 2410 pb, entonces al cortar este fragmento, el tamaño se reduce a 10933 pb, lo cual es consistente con el tamaño estimado del fragmento en la digestión doble. De acuerdo a esto y considerando la posibilidad de un evento recombinatorio, este debe estar localizado entre el sitio *Hind* III y *Bam* HI, a 32470 y 36590 pb respectivamente dentro del vector.

Otra explicación para este fenómeno es la formación de fragmentos con unión no covalente. La digestión con *Bam* HI debe arrojar un patrón de 6 bandas, sin embargo, si consideramos los extremos *cos* del fago y suponemos que estos pueden moverse unidos en el gel, tendríamos una banda extra de 12260 pb lo cual podría explicar la presencia de la banda de 13343 pb. Del mismo modo, en el caso de la digestión con *Hind* III obtendríamos una banda extra de 27470 pb, la cual seguramente no podríamos diferenciar de la banda de 23130 en este tipo de gel. En el caso de la doble digestión encontraríamos una banda extra de 9850 pb lo que coincidiría con la banda de 10634 pb encontrada experimentalmente. Sin embargo, esto no explica todas las observaciones hechas, ni la ausencia del sitio de

restricción de *Eco* RI (recordemos que de no haber inserto, el fago no podría entrar en fase lítica ya que el sitio de clonación está en el represor λ)

Amplificación por PCR del inserto en λ gt10 de la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

Se intentó amplificar el inserto utilizando cebadores específicos para regiones que flanquean el sitio de clonación de *Eco* RI en λ gt10. Se probaron inicialmente dos cebadores comerciales (USB), pero no se encontró producto de amplificación en las condiciones estándar de amplificación, por lo que se variaron condiciones de temperatura de alineamiento, concentración de ion magnesio y tiempos de elongación (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Experimento de amplificación in vitro del inserto por PCR.

Temperatura de alineam. (°C)	Concentración de Mg ²⁺ (mM)	Concentración de DNA molde (ng)	Tiempos (desnat/alín/elong)	Resultado
65	1.50	20	1'/1'/1'	N
65	3.00	20	1'/1'/1'	N
42	1.50	20	1'/1'/1'	N
42	3.00	20	1'/1'/1'	N

N- Negativo

Dado que los resultados fueron negativos, se modificó el tiempo de elongación y la concentración de DNA molde (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Experimento de amplificación in vitro del inserto por PCR modificando tiempo de elongación y concentración de DNA molde.

Temperatura de alineam. (°C)	Concentración de Mg ²⁺ (mM)	Concentración de DNA molde (ng)	Tiempos (desnat/alín/elong)	Resultado
42	1.50	20	1'/1'/3'	N
42	3.00	20	1'/1'/3'	N*
42	1.50	100	1'/1'/3'	N
42	3.00	100	1'/1'/3'	N*

N- Negativo

*- Existe amplificación pero esta aparece como una banda difusa de menos de 100 pb.

Nuevamente ante resultados negativos, se consideró que ya que el inserto poseía un tamaño de aproximadamente 7 Kbp, la enzima Taq polimerasa era incapaz de amplificar el

inserto. Por ello se probó amplificar con una mezcla comercial de polimerasas (Expand ®, Boehringer Mannheim) capaz de amplificar hasta 40 Kbp de DNA proveniente del fago λ . En este caso se probaron varias condiciones, como son la concentración de iones magnesio y la concentración del templado (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Experimento de amplificación in vitro del inserto por PCR con una mezcla de polimerasas para amplificar fragmentos de hasta 40 Kbp.

Temperatura de alineam. (°C)	Concentración de Mg^{2+} (mM)	Concentración de DNA molde (ng)	Tiempos (desnat/alin/elong)	Resultado
42	1.75	20	1'/1'/3'	N
42	2.25	20	1'/1'/3'	N*
42	3.50	20	1'/1'/3'	N*
42	5.00	20	1'/1'/3'	N*
42	2.25	100	1'/1'/3'	N*
42	3.50	100	1'/1'/3'	N*
42	5.00	100	1'/1'/3'	Ai
42	2.25	1000	1'/1'/3'	Ai
42	3.50	1000	1'/1'/3'	Ai
42	5.00	1000	1'/1'/3'	Ai

*- Existe amplificación pero esta aparece como una banda difusa de menos de 100 pb.

N- Negativo, Ai- Amplificación no específica.

Como es notorio, las altas concentraciones de DNA molde hicieron que se obtuviera una amplificación no específica, que aparecía como un conjunto de bandas de distintos pesos moleculares a lo largo del gel de electroforesis sin que se pudiera observar alguna banda cuya concentración destacase, por lo cual se decidió que la concentración de DNA molde tan alta no era adecuada para este ensayo. En el caso de la amplificación con 100 ng de molde, se observó el mismo bandeo cuando se utilizó cloruro de magnesio 5 mM, lo cual indica que esta concentración de magnesio a esa concentración de molde tampoco es adecuada para el ensayo. En los otros casos se encontró siempre la misma banda difusa de menos de 100 pb lo que hizo reconsiderar las características de los cebadores y la posible interacción entre ellos para generar dicha banda. En el análisis de la estructura de los cebadores se encontró lo siguiente que podrían formar un dímero no muy estable. Otra probabilidad es que hubiera degradación de alguno o de ambos cebadores.

Para evaluar esto se realizó un ensayo utilizando uno de los cebadores cada vez y observando que ocurría en cada caso (Tabla 5.5 y Figura 5.8). En este caso se decidió utilizar la concentración de magnesio recomendada por el fabricante para amplificar fragmentos mayores a 10 Kbp.

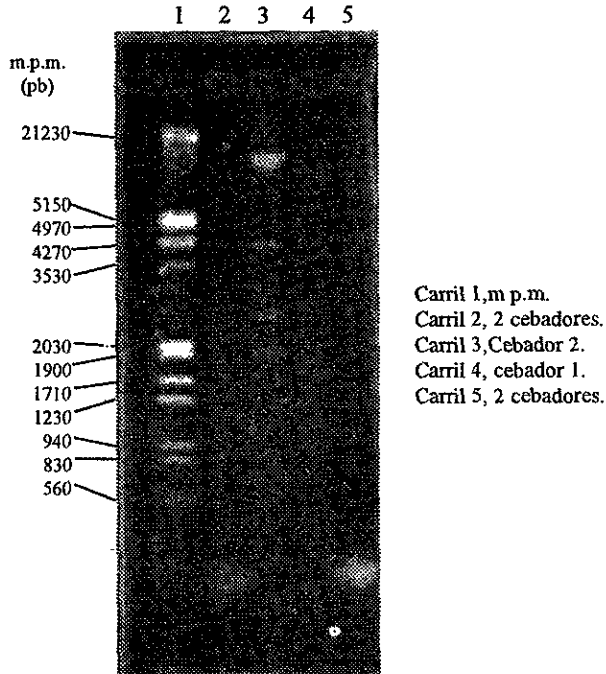


Figura 5.8. Amplificación por PCR del inserto del fago recombinante λ LipB.

Tabla 5.5. Experimento de amplificación in vitro del inserto por PCR usando un cebador a la vez.

Temperatura de alineam. (°C)	Concentración de Mg ²⁺ (mM)	Concentración de DNA molde (ng)	Cebadores	Tiempos (desnat/alin/elong)	Resultado
42	2.25	20	Ambos	1'/1'/3.5'	N*
42	2.25	20	2	1'/1'/3.5'	A**
42	2.25	20	1	1'/1'/3.5'	N
42	2.25	0	Ambos	1'/1'/3.5'	N*

*- Existe amplificación pero esta aparece como una banda difusa de menos de 100 pb.

N Negativo, A** Amplificación con bandeo poco específico.

Dado que se produjo un bandeo poco específico se pensó que los cebadores estaban mal, ya sea degradados o mal purificados. Se hizo un nuevo intento en busca de probar la hipótesis anterior aumentando la temperatura de alineamiento a 52°C y disminuyendo el tiempo de este a 30 segundos para aumentar la especificidad del mismo (Tabla 5.6 y Figura 5.9).

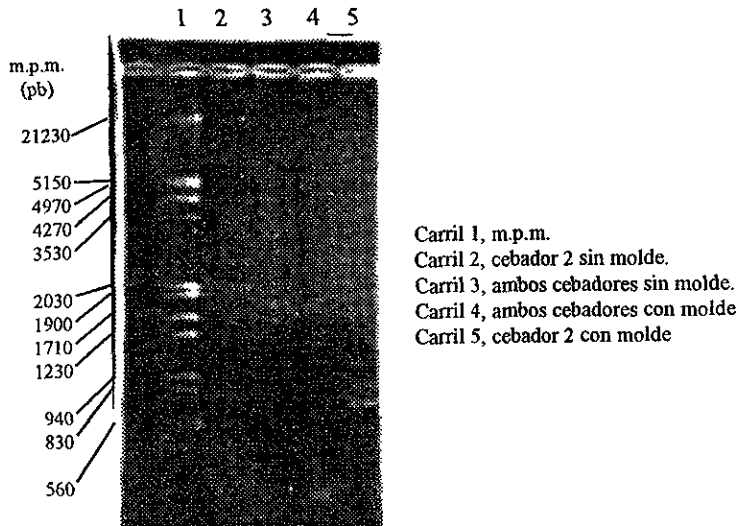


Figura 5.9. Amplificación por PCR del inserto del fago recombinante λ LipB aumentando temperatura y reduciendo el tiempo de alineamiento.

Tabla 5.6. Experimento de amplificación in vitro del inserto por PCR con temperatura de alineamiento más astringente y menor tiempo con respecto a las condiciones descritas en la Tabla 5.5.

Temperatura de alineam. (°C)	Concentración de Mg ²⁺ (mM)	Concentración de DNA molde (ng)	Cebadores	Tiempos (desnat/alin/elong)	Resultado
52	2.25	0	2	1'/0.5'/3.5'	N
52	2.25	0	Ambos	1'/0.5'/3.5'	N*
52	2.25	20	2	1'/0.5'/3.5'	N*
52	2.25	20	Ambos	1'/0.5'/3.5'	A**

*- Existe amplificación pero esta aparece como una banda difusa de menos de 100 pb.
 N Negativo, A** Amplificación con bandeo poco específico.

En este caso se observaron dos bandas de 800 y 700 pb aproximadamente, las cuales corresponden a bandas que aparecieron con anterioridad. Esto sirvió de pauta para

confirmar que este cebador estaba de algún modo en mal estado o en el molde había ocurrido algún evento recombinatorio que pudo modificar la región cercana al sitio de clonación *Eco* RI, lo cual se puede coincide con el hecho de que esta enzima no es capaz de digerir el DNA del fago recombinante. Así pues, se decidió utilizar otros cebadores de una firma comercial (Clontech Laboratories Inc.) con otra secuencia en su extremo 3' y valores de T_m mayores (64 y 58°C). En este experimento se variaron temperatura de alineamiento, concentraciones de Mg y concentración de templado (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Amplificación in vitro del inserto por PCR con cebadores distintos.

Temperatura de alineam. (°C)	Concentración de Mg ²⁺ (mM)	Concentración de DNA molde (ng)	Tiempos (desnat/alín/elong)	Resultado
64	2.25	20	1'/1'/3.5'	N
52	2.25	20	1'/1'/3.5'	N
42	2.25	20	1'/1'/3.5'	N
42	3.50	20	1'/1'/3.5'	N
42	2.25	100	1'/1'/3.5'	N
42	3.50	100	1'/1'/3.5'	N

N- Negativo.

Nuevamente no hubo amplificación en ninguna de las condiciones utilizadas. Finalmente se decidió utilizar nuevamente *Taq* polimerasa con los nuevos cebadores para eliminar cualquier duda sobre la imposibilidad de amplificar el inserto por PCR. En este experimento se variaron concentraciones de Mg y templado pero los resultados nuevamente fueron negativos (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Experimento de amplificación in vitro del inserto por PCR usando cebadores distintos y *Taq* polimerasa a distintas concentraciones de Mg y DNA molde.

Temperatura de alineam. (°C)	Concentración de Mg ²⁺ (mM)	Concentración de DNA molde (ng)	Tiempos (desnat/alín/elong)	Resultado
42	2.00	20	1'/1'/3.5'	N
42	3.00	20	1'/1'/3.5'	N
42	4.00	20	1'/1'/3.5'	N
42	2.00	100	1'/1'/3.5'	N
42	3.00	100	1'/1'/3.5'	N
42	4.00	100	1'/1'/3.5'	N

N- Negativo.

Con base en los resultados tanto de digestiones como de amplificación, es posible que se tenga un problema de recombinación en la región del sitio *Eco* RI del vector utilizado, lo cual nos impide tanto digerirlo con la misma enzima como amplificarlo por PCR.

Un factor más que puede apoyar la hipótesis de la recombinación, es el hecho de que los fenotipos de las cepas usadas para amplificar el fago recombinante (Tabla 5.9) no tienen mutaciones en los genes *rec*.

Tabla 5.9. Fenotipo de las cepas de *E. coli* usadas para transformar con λ gt10.

Cepa	Fenotipo
C600 hflA	e14' (<i>mcrA</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i> , <i>hflA150::Tn10</i>
BNN 102	BNN93, <i>hflA150::Tn10</i>
LE 392	e14' (<i>mcrA</i>), <i>hsdR514</i> , <i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>lacY1</i> o Δ (<i>lacIZY</i>)6, <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>metB1</i> , <i>trpR55</i>
JM 101	<i>supE</i> , <i>thi-1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i>]

Fuente: Sambrook y col. (1989).

Clonación en pIJ2925 y en pBluescript de la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

Teniendo como antecedente que las lipasas de *B. subtilis* 168 (Dartois y col. 1992), *B. pumilus* DSM 5776 (Møller y col. 1991) y *B. thermocatenuatus* DSM730 (Schmidt-Dannert y col. 1996) fueron clonadas en *E. coli* usando plásmidos como vectores, se decidió hacer lo mismo utilizando pBluescript y con pIJ2925. Se obtuvieron genotecas del DNA de *B. pumilus* GMA1 en ambos vectores transformando *E. coli* DH5 α y JM101; entre las cuales aparecieron algunas colonias con halo de hidrólisis con una frecuencia de 1/1500 aproximadamente (Figura 5.10).

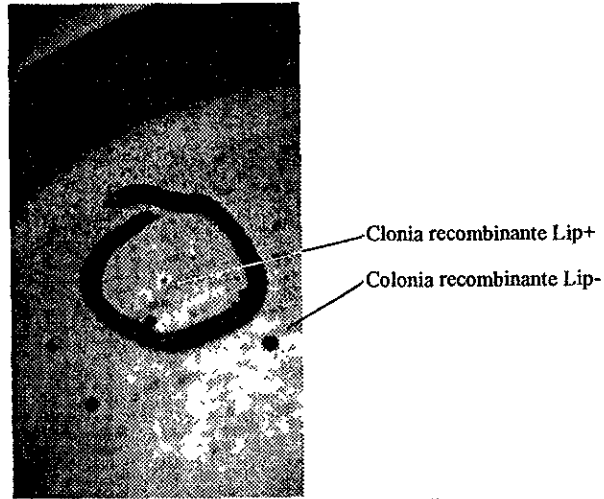


Figura 5.10. Colonia con fenotipo lipasa positivo de *E. coli* DH5 α transformada con pBluescript conteniendo fragmentos de restricción del DNA genómico de *B. pumilus* GMA1.

Al tratar de resembrar estas colonias en el mismo medio no se observó desarrollo. Se resembraron entonces en el mismo medio sin ampicilina y tampoco se obtuvo desarrollo después de 72 h a 37°C. Estas colonias presentaban una consistencia sólida, vítrea y gomosa. Se repitió el experimento utilizando otras cepas de *E. coli*, como las LE 392, C600 *hflA* y DH5 α obteniéndose resultados similares. Se ha observado que algunas enzimas heterólogas pueden resultar tóxicas para *E. coli*, como la lipasa de *Rhizopus delemar* (Joerger y Hass, 1993) y la lipasa de *Streptomyces cinnamomeus* que se acumula en el espacio periplásmico de *E. coli* causando una lisis de la membrana celular (Sommer, Bormann y Gotz, 1997) También se ha visto que algunas proteínas pueden inducir mutaciones que pueden modificar el número de copias en plásmidos con alto número de copias e incluso podrían alterar el sistema de excreción de *E. coli* (Martin y col., 1989). Así pues, no se puede desechar la idea de que la lipasa de *B. pumilus* GMA1 resulte tóxica para *E. coli*, aunque tampoco que ésta se encuentre en la vecindad de alguna otra enzima que lo fuera y por ello encontrar asociado el fenotipo lipasa positivo con el fenómeno de toxicidad. Sin embargo, como ya se mencionó antes, las lipasas de otros microorganismos

del género *Bacillus* fueron clonadas en *E. coli* sin demasiados problemas (Dartois y col., 1992; Möller y col., 1991 y Schmidt-Dannert y col., 1996).

Considerando que esta lipasa se estaba expresando, era obvio que el gen que la producía había sido clonado y que se encontraba en las células muertas de *E. coli*, por lo tanto sería posible hacer una amplificación *in vitro* del fragmento de DNA que se había clonado. Sin embargo, al intentar manipular estas colonias, se comportaban como una unidad gomosa que no se pudo disgregar usando métodos mecánicos (maceración directa con varilla de vidrio) ni enzimáticos (pronasa y lisozima). Los extractos obtenidos por estos métodos se sometieron a amplificación por PCR en condiciones relativamente laxas y no se pudo observar banda alguna. Se decidió entonces poner a una de estas colonias completas dentro del sistema de reacción de PCR para que el efecto de los cambios de temperatura liberase a los plásmidos de la matriz gomosa de las células y se diera la amplificación. El resultado fue, sin embargo, negativo. Muy probablemente el DNA de las células se degradó al morir éstas.

Hibridación de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 vs la lipasa de *B. subtilis* 168.

El Dr. Karl Erich Jaeger (Lehrstuhl Biologie der Mikroorganismen, Ruhr-Universität D-44780 Bochum, Germany) tuvo la gentileza de proporcionarnos el plásmido pLIP2031 que contiene la lipasa de *B. subtilis* para usarla como sonda contra la lipasa de *B. pumilus* GMA1, ya que la lipasa de *B. subtilis* y la de *B. pumilus* DSM 5776 muestran 73% de identidad a nivel de aminoácidos y 83% de identidad considerando a los aminoácidos que funcionalmente pueden comportarse de manera semejante. A nivel de DNA sólo hay 68% de identidad pero es bastante como para proceder a hacer análisis por hibridación.

Dot blot.

El experimento muestra que si hay hibridación entre la lipasa de *B. subtilis* y el DNA genómico de *B. pumilus* GMA1 como se muestra en la Figura 5.11. Para evaluar si se trata de una región única en que se presentó la hibridación se procedió a hacer un Southern blot.

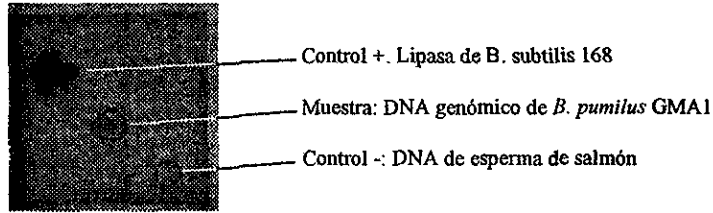


Figura 5.11. Hibridación entre el DNA genómico de *B. pumilus* GMA1 y la lipasa de *B. subtilis* 168.

Southern blot.

El análisis en Southern blot demostró que, en efecto, se trataba de una región ya que hay bandas de hibridación únicas con la lipasa de *B. subtilis* (Figura 5.12).

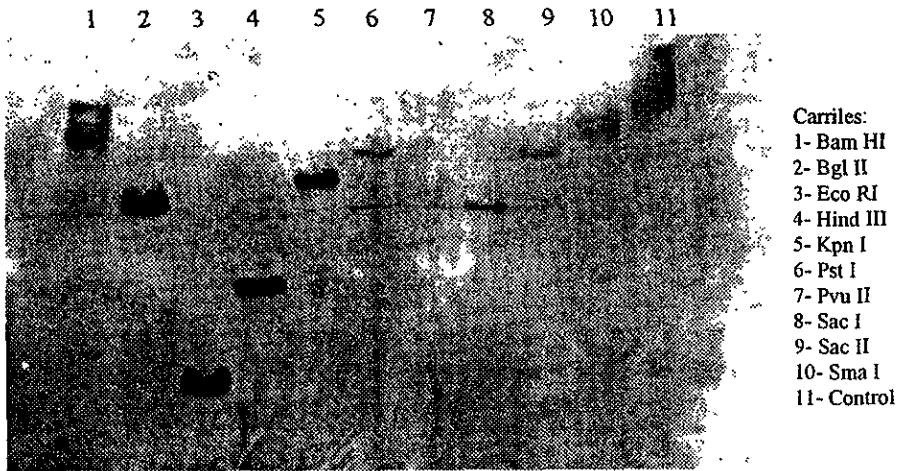


Figura 5.12. Hibridación entre digestiones del DNA genómico de *B. pumilus* GMA1 y la lipasa de *B. subtilis* 168.

Amplificación por PCR de la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

Se encontró una banda relativamente tenue utilizando los cebadores FBPLIP y RBPLIP, diseñados para la lipasa de *B. pumilus* DSM 5776. Esto habla posible similitud de las enzimas lipolíticas de *B. pumilus* DSM 5776 y *B. pumilus* GMA1. El fragmento

amplificado es de 560 pb aproximadamente, lo cual concuerda con los 561 pb que se deberían de amplificar a partir de la lipasa de *B. pumilus* DSM 5776 (Figura 5.13).

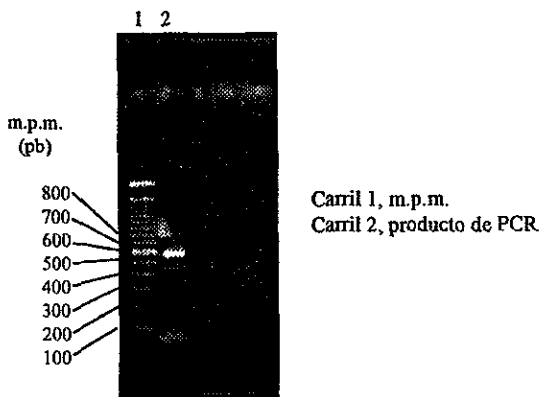


Figura 5.13. Producto de PCR obtenido con los cebadores FBPLIP y RBPLIP usando DNA genómico de *B. pumilus* GMA1 como molde.

Podría tratarse de la misma lipasa, sin embargo como se ha mencionado anteriormente, sus características fisicoquímicas muestran que son distintas. Para corroborar que este fragmento es el responsable de la hibridación con la lipasa de *B. subtilis* se sometió a hibridación en *dot* dando positivo (Figura 5.14).

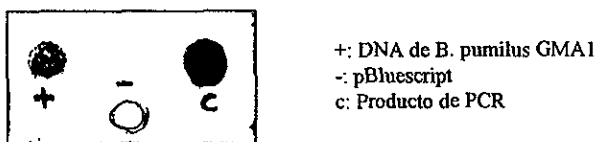


Figura 5.14. Hibridación entre el producto de PCR obtenido a partir de DNA genómico de *B. pumilus* GMA1, con los cebadores para la lipasa de *B. pumilus* DSM 5776 y la lipasa de *B. subtilis* 168.

Secuenciación del producto de PCR.

La secuencia de nucleótidos obtenida a partir del producto de PCR se llevó a cabo usando los mismos cebadores que en la amplificación por PCR. Las secuencias

correspondientes a cada uno de los cebadores se encuentran listada en las Tablas 5.10 y 5.11:

Tabla 5.10. Secuencia de nucleótidos obtenida con el oligo RBPLIP como cebador.

1	GCCGTTCA	GTCCTTTAA	TGTAGCCTT	CACTTGGCTT	GAGGTTAATA
51	GACCGATATG	GCCAACGCCA	TGGATCAGAA	CGTTTCTTGC	GCCAATTTAAA
101	CGAGAGAGGC	TGTTGACGAC	GATGAGATCA	GCTGAGCTGT	AGACAGATGT
151	GTAAAGAATT	TTTTGATTTG	GATCTGTGCC	TGGTAATGCT	CTGCTTGAAA
201	CGAGTCCGTT	TGCTCCACCA	ATTGTGACAA	CGTTTTCAAT	TTATCGCCG
251	CCATCTAGAT	TCTTAATATA	GTATAATGTG	TTCGCTCCGC	CCATACTATG
301	AGCCACAATA	TCTACTTTTT	TGGCACCCGT	TTGTCTAAC	ACATCTTTGA
351	CGAATCTGGA	TAGACGCGGA	CCATTGTTGC	GGTTATTTC	TGTTTTGTCT
401	ATGAAATCGA	TAGCATATAA	TTGGTTTCGA	TCCAGCCTT	GTCCAACCAA
451	ATAACTTTTA	ATAGAAAAAA	AGTTATAAGA	GGCACCGCCA	ATGCCGTGTA
501	CCATCACAAC	CGGATT			

Tabla 5.11. Secuencia de nucleótidos obtenida con el oligo FBPLIP como cebador.

1	AATCCGGTTG	TGATGGTACA	CGGCATTGGC	GGTGCCTCTT	ATAACTTTTT
51	TTCTATTAAA	AGTTATTTGG	TTGGACAAGG	CTGGGATCGA	AACCAATTAT
101	ATGCTATCGA	TTTCATAGAC	AAAACAGGAA	ATAACCGCAA	CAATGGTCCG
151	CGTCTATCCA	GATTCGTCAA	AGATGTGTTA	GACAAAACGG	GTGCCAAAAA
201	AGTAGATATT	GTGGCTCATA	GTATGGGCGG	AGCGAACACA	TTATACTATA
251	TTAAGAATCT	AGATGGCGGC	GATAAAATTG	AAAACGTTGT	CACAATTGGT
301	GGAGCAAACG	GACTCGTTTC	AAGCAGAGCA	TTACCAGGCA	CAGATCCAAA
351	TCAAAAAATT	CTTACACAT	CTGTCTACAG	CTCAGCTGAT	CTCATCGTCG
401	TCAACAGCCT	CTCTCGTTTA	ATTGGCGCAA	GAAACGTTCT	GATCCATGGC
451	GTTGGCCATA	TCGGTCTATT	AACCTCAAGC	CAAGTGAAAG	GCTACATTAA
501	AGAAGGACTG	AACGGC			

Ambas secuencias presentan 516 nucleótidos, son perfectamente complementarias y no presentan ambigüedades. La secuencia de los oligonucleótidos no se muestra. El electroferograma se encuentra en el Anexo I.

Análisis comparativo de secuencias por computadora.

La comparación de secuencias se hizo considerando como base a la lipasa de *B. pumilus* DSM 5776. El primer análisis fue la comparación de ambas secuencias con el programa CLUSTAL W 1.6 (Thompson y col., 1994). El resultado (Figura 5.15) mostró que hay un gran parecido entre ambas secuencias, pues ocurren únicamente 20 nucleótidos distintos entre ambas secuencias, los cuales se encuentran dispersos de manera aparentemente discreta. Se presumía, por el ensayo de PCR, que la secuencia completa de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 debía poseer secuencias de inicio y término bastante similares a aquéllas de *B. pumilus* DSM 5776 y, por lo tanto, se decidió completar la secuencia de nucleótidos con la secuencia de los cebadores FBPLIP y RBPLIP. Una vez que se completó la secuencia, se hizo la traducción conceptual a aminoácidos usando el mismo marco de lectura que tiene la lipasa de *B. pumilus* DSM 5776 mediante el programa BLASTX (Gish y col., 1993) y su interfase BLAST (Altschul y col, 1990). La secuencia de aminoácidos obtenida de esta manera se muestra en la Figura 5.16. La lipasa consta de 181 aminoácidos y no se considera el péptido líder, que no estaba incluido íntegramente en el fragmento delimitado por de los cebadores. Se encuentra subrayado el pentapéptido considerado como consenso en las lipasas del género *Bacillus*

Figura 5.15. Comparación de secuencias entre la lipasa de *B. pumilus* DSM 5776 y la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

DSM5776	TTGGTTCAATGGCGTTTATCCAGCCGAAAGAGCGAAGGCGGCTGAGCATAATCCGGTTG
GMA1	-----AATCCGGTTG *****
DSM5776	TGATGGTGACGGCATTGGCGGTGCCCTCTATAACTTTTTTCTATTAAAAGTTATTGG
GMA1	TGATGGTACACGGCATTGGCGGTGCCCTCTATAACTTTTTTCTATTAAAAGTTATTGG *****
DSM5776	CCACACAAGGCTGGGATCGAAACCAATTATATGCTATTGATTTTCATAGACAAAACAGGAA
GMA1	TTGGACAAGGCTGGGATCGAAACCAATTATATGCTATCGATTTTCATAGACAAAACAGGAA *****
DSM5776	ATAACCGCAACAATGGTCCGCGTCTATCGAGATTCGTCAAAGATGTTAGACAAAACGG
GMA1	ATAACCGCAACAATGGTCCGCGTCTATCCAGATTCGTCAAAGATGTTAGACAAAACGG *****
DSM5776	GTGCCAAAAAGTAGATATTGTGGCTCATAGTATGGGCGGAGCGAACACCGCTATACTATA
GMA1	GTGCCAAAAAGTAGATATTGTGGCTCATAGTATGGGCGGAGCGAACACATTATACTATA *****
DSM5776	TCAAGAACTAGATGGCGGCGATAAAATGGAACCGTTGTCACAATGGTGGAGCAAACG
GMA1	TFAAGAACTAGATGGCGGCGATAAAATGAAAACCGTTGTCACAATGGTGGAGCAAACG * *****
DSM5776	GACTCGTTTCAAGCAGAGCATTACCAGGCCACAGATCCAAATCAAAAAATCTTTACACAT
GMA1	GACTCGTTTCAAGCAGAGCATTACCAGGCCACAGATCCAAATCAAAAAATCTTTACACAT *****
DSM5776	CCGTCTATAGCTCAGCAGATCTTATTGTCGTCAACAGCCTCTCTCGTTTAATTGGCGCAA
GMA1	CTGTCTACAGCTCAGCTGATCTCATCGTCAACAGCCTCTCTCGTTTAATTGGCGCAA * *****
DSM5776	GAAACATCCTGATCCATGGCGTTGGTCATATCGGTCTATTAACTCAAGCCAAGTGAAG
GMA1	GAAACGTTCTGATCCATGGCGTTGGCCATATCGGTCTATTAACTCAAGCCAAGTGAAG *****
DSM5776	GGTATATTAARGAAGGACTGAACGGCGAGGACAAAATACGAATTA AAAAACGAAAAAG
GMA1	GCTACATTAARGAAGGACTGAACGGC----- * * *****

El siguiente paso fue el comparar la secuencia obtenida de aminoácidos de la lipasa putativa de la cepa GMA1 con la de la cepa DSM 5776 y localizar en dónde se encuentran las diferencias que pudieran explicar los cambios en los puntos óptimos de pH y temperatura que fueron mencionados previamente. La comparación de secuencias realizada con el programa CLUSTAL W 1.6 se muestra en la Figura 5.17.

Figura 5.16. Secuencia de aminoácidos propuesta para la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

```
GCTGAGCATAATCCGGTTGTGATGGTGCACGGCATTGGCGGTGCCTCTTATAACTTTTTTCTATT
A E H N P V V M V H G I G G A S Y N F F S I
AAAAGTTATTTGGCCACACAAGGCTGGGATCGAAACCAATTATATGCTATTGATTCATAGACAAA
K S Y L A T Q G W D R N Q L Y A I D F I D K
ACAGGAATAACCGCAACCAATGGTCCGCGTCTATCGAGATTCGTCAAAGATGTGTAGACAAAACG
T G N N R N N G P R L S R F V K D V L D K T
GGTGCCAAAAAGTAGATATTGTGGCTCATAGTATGGCGGAGCGAACACGCTATACTATATCAAG
G A K K V D I V A H S M G G A N T L Y Y I K
AATCTAGATGGCGCGATAAAATGAGAACGTTGTCAAAATGGTGGAGCAAACGGACTCGTTTCA
N L D G G D K I E N V V T I G G A N G L V S
AGCAGAGCATTACCAGGCACAGATCCAAATCAAAAAATCTTTACACATCCGCTCTATAGCTCAGCA
S R A L P G T D P N Q K I L Y T S V Y S S A
GATCTTATTGTGCTCAACAGCCTCTCTCGTTAATTGGCGCAAGAAACATCCTGATCCATGGCGTT
D L I V V N S L S R L I G A R N I L I H G V
GGTCATATCGGTCTATTAACCTCAAGCAAGTGAAAGGGTATATTAAAGAAGGACTGAACGGCGGA
G H I G L L T S S Q V K G Y I K E G L N G G
GGACAAAATACGAATTAA
G Q N T N STOP
```

Se encuentran subrayados los aminoácidos de pantapéptido consenso de las lipasas del género *Bacillus*.

Figura 5.17. Comparación de secuencias de aminoácidos entre la lipasa de *B. pumilus* DSM 5776 y la secuencia de la lipasa putativa de *B. pumilus* GMA1.

GMA1	1	A E H N P V V M V H G I G G A S Y N F F S I K S Y L V Q G W D R N Q L Y A I D F I D K T G N N R N N G P R L S R F V K
DSM5776	1	A E H N P V V M V H G I G G A S Y N F F S I K S Y L A T Q G W D R N Q L Y A I D F I D K T G N N R N N G P R L S R F V K

GMA1	61	D V L D K T G A K K V D I V A H S M G G A N T L Y Y I K N L D G G D K I E N V V T I G G A N G L V S S R A L P G T D P N
DSM5776	61	D V L D K T G A K K V D I V A H S M G G A N T L Y Y I K N L D G G D K I E N V V T I G G A N G L V S S R A L P G T D P N

GMA1	121	Q K I L Y T S V Y S S A D L I V V N S L S R L I G A R N V L I H G V G H I G L L T S S Q V K G Y I K E G L N G G Q N T
DSM5776	121	Q K I L Y T S V Y S S A D L I V V N S L S R L I G A R N I L I H G V G H I G L L T S S Q V K G Y I K E G L N G G Q N T
		*****+*****
GMA1	181	N
DSM5776	181	N
		*

* = idéntico; + = funcionalmente parecido

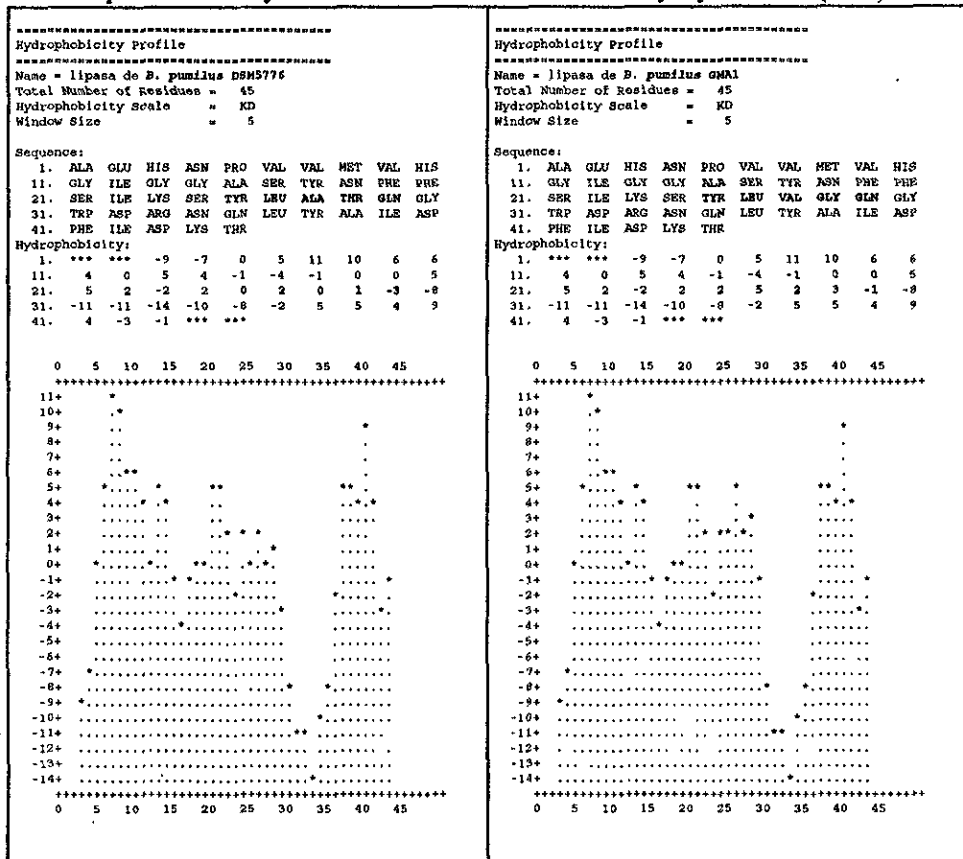
De la Figura 5.17 se puede observar que la diferencia en aminoácidos entre ambas lipasas es de sólo 3. Uno de los cambios pudiera no presentar modificaciones estructurales, como es el cambio de isoleucina por valina en la posición 149. Sin embargo, en las posiciones 27 y 28 se hallan dos sustituciones que pudieran tener mas repercusión en la

estructura de la proteína. El cambio de alanina a valina en la posición 27, que si bien no presenta modificaciones electrostáticas muy marcadas, podría modificar estructuralmente a la proteína debido a un efecto estérico, al ser la valina de un tamaño considerablemente mayor. Este efecto ha sido visto en la mutante Gly240Ala de la 3-isopropilmalato deshidrogenasa de *Thermus thermophilus*, en la que a pesar de lograr plegarse, la modificación de las distancias de los puentes de hidrógeno entre dos cadenas en conformación β es suficiente para disminuir la termoestabilidad de la enzima (Moriyama y col., 1995). Si esta región de la proteína participa en el empaquetamiento hidrófobo de la proteína o en la superficie que entra en contacto con el sustrato durante la catálisis, estos cambios podrían explicar en parte la modificación de las propiedades fisicoquímicas de la proteína. Un efecto similar se ha visto en la α -amilasa de *B. licheniformis*, la cual presenta una mayor termoestabilidad en la mutante Ala209Val, triplicando su vida media a 80°C (Declerck y col., 1995). Otro cambio que ha mejorado la termoestabilidad es Glu por Lys en la luciferasa de *Photinus pyralis* (White y col., 1996) y en la β -glucosidasa de *B. polymyxa* (Lopez-Camacho y col., 1996), poniendo de manifiesto que, además de la hidrofobicidad y el tamaño de la cadena lateral, la carga del residuo es importante. El cambio de treonina por glicina en la posición 28 podría afectar, además del empaquetamiento, dado que la glicina es considerablemente menor en tamaño, otras propiedades como son la capacidad de formar puentes de hidrógeno con el sustrato o algún intermediario de reacción. Es el caso del intermediario tetrahédrico formado durante el ataque nucleofílico por la serina del sitio activo al carbonilo del enlace éster, que requiere ser estabilizado en una cavidad oxianiónica. En la literatura se ha reportado que un cambio de Thr por Ala en la posición 29 de la lactato deshidrogenasa (LDH) de *B. megaterium* provoca un aumento en la termoestabilidad. En este caso al evaluar las sustituciones que ocurren de manera natural en las LDH de distintos organismos en función de la temperatura, se encontró que la sustitución de Thr y Ser por Ala, en las posiciones 29 y 39 respectivamente, se encontraban conservadas en las enzimas de los microorganismos termófilos (Zulli y col., 1991).

Análisis de la secuencia de proteína.

Dado que del análisis resultaban muchas interrogantes se procedió a evaluar la hidrofobicidad de la secuencia. En la Figura 5.18 podemos ver el mapa de hidrofobicidad del aminoácido 1 al 45, que es la zona donde se encuentran los cambios en la secuencia para las lipasas de *B. pumilus* cepas DSM 5776 y GMA1. Este análisis se realizó por el método de Kyte y Doolittle (1982), usando 5 aminoácidos como unidad para el cálculo de la hidrofobicidad. El cambio en la hidrofobicidad no es, en apariencia, muy marcado. La región de los residuos 25 al 29 sí altera su perfil de hidrofobicidad, aumentándola, significativamente debido a la presencia de estos dos aminoácidos.

Figura 5.18. Mapa de hidrofobicidad para un fragmento de las lipasas de *B. pumilus* cepas DSM5776 y GMA1 de acuerdo al método de Kyte y Doolittle (1982).



Como se discutió anteriormente, el aumento de la hidrofobicidad en una región hace que ésta, de estar formando parte del centro hidrófobo de la enzima, le pudiese conferir mayor estabilidad a las proteínas a altas temperaturas ya que, desde un punto de vista fisicoquímico, al aumentar el área no polar oculta en la proteína nativa, aumenta la temperatura media de desnaturalización de esta última.

Construcción de un modelo tridimensional de la lipasa de *B. pumilus*.

La construcción del modelo tridimensional de la lipasa de *B. pumilus* requirió del alineamiento previo de la secuencia de la lipasa de *B. pumilus* con las lipasas cristalizadas presentes en la base de datos Swiss-Prot y PDB con ayuda del programa MAXHOM "multiple sequence alignment" de la Universidad de Heidelberg, Alemania. En este alineamiento se encontró homología con 30% de identidad con las lipasas cuyos códigos PDB son 1THA y 2LIP, de *Pseudomonas glumae* y *Pseudomonas cepacia*, respectivamente. El alineamiento mostró una serie de inserciones y deleciones entre la lipasa de *B. pumilus* y aquéllas del género *Pseudomonas*, pero las regiones que no correspondieron en una secuencia tuvieron correspondencia en la otra, de modo que se pudo completar el modelo para la secuencia completa de *B. pumilus*. El alineamiento se realizó usando el módulo HOMOLOGY del programa InsightII. La obtención de coordenadas iniciales del modelo de *B. pumilus* se obtuvo sustituyendo la secuencia de aminoácidos de las estructuras cristalográficas con la secuencia de la lipasa de *B. pumilus*.

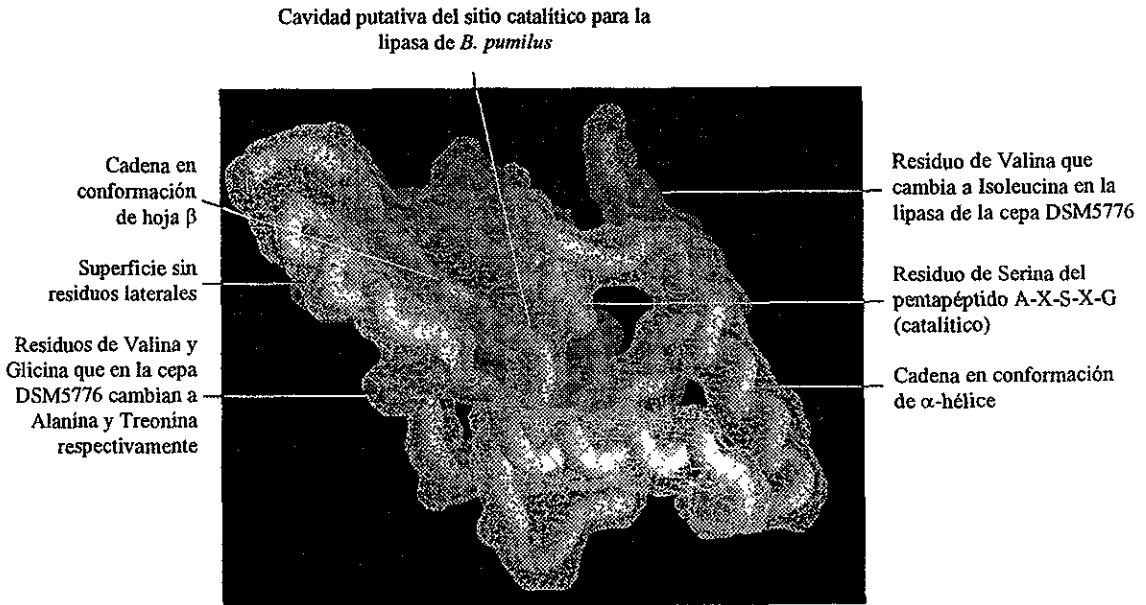
El modelo inicial, basado sólo en la alineación de aminoácidos sobre las estructuras cristalográficas, se refinó mediante el programa InsightII® y el módulo DISCOVER®, con el cual se realizó una minimización de energía y una dinámica. El modelo se trató como una proteína monomérica

Se realizó una dinámica molecular global de toda la estructura de 20,000 interacciones, equivalente a 20 picosegundos de simulación, con un resumen de simulación de 500 pasos, de los cuales se obtuvo un promedio de las últimas conformaciones para obtener un modelo final de la dinámica molecular. El proceso se realizó a 300° K con una constante dieléctrica de 1 dependiente de la distancia. Los cálculos se realizaron con base

en un corte (cut-off) de 10 Å para las interacciones entre átomos que no presentan enlaces covalentes. para la simulación se adicionó una esfera de solvente (agua) de 3 Å al rededor de la proteína a pH 7. Durante la minimización de energía, así como durante la dinámica molecular, no hubo restricciones de los movimientos de los átomos y el modelo se refinó como un monómero.

El modelo obtenido (Figura 5.19) muestra una proteína α/β , al igual que el resto de las lipasas descritas previamente (Derewenda y Sharp, 1993). Al buscar la posición de la serina del pentapéptido Ala-X-Ser-X-Gly, encontramos que ésta se encuentra dentro de una cavidad que bien podría corresponder al sitio catalítico activo y los residuos modificados entre las dos cepas de *B. pumilus* están en los bordes de dicha cavidad. Cerca de esta serina no se han localizado, a una distancia lógica, los otros aminoácidos propuestos para la triada catalítica (His y Asp o Glu) que, de acuerdo a estudios estructurales, sirven para activar a la serina para que efectúe el ataque nucleofílico. Sin embargo a pH de 10.5, que es el óptimo para esta lipasa, se podría esperar, como se discutió previamente, que otros aminoácidos podrían estar haciendo la labor de activación (lisina o tirosina). Esto podría, por otro lado, indicar que el modelo no corresponde a la realidad. La estructura secundaria se muestra en la Figura 5.19 en una representación cilíndrica y en malla, de superficie, rasurando cadenas laterales.

Figura 5.19. Modelo de estructura terciaria propuesto para la lipasa de *B. pumilus*.



La figura muestra que los aminoácidos modificados y, en particular, el cambio de glicina a treonina, modifican la hidrofobicidad de la entrada al probable sitio activo, lo que de manera inicial podría explicar las diferencias en temperatura y pH óptimos observados entre las dos lipasas de *B. pumilus*.

Relaciones a nivel de estructura primaria con otras enzimas.

Se comparó la secuencia de aminoácidos de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 con otras enzimas termófilas y/o alcalófilas con el programa CLUSTAL W 1.6. Para este análisis se seleccionaron al azar 16 enzimas con actividad hidrolítica y comportamiento alcalófilo. Se procedió a hacer un alineamiento de dichas secuencias con la lipasa de *B. pumilus* GMA1

(resultado no presentado). En el alineamiento no se logró detectar alguna relación estructural evidente de la lipasa de la cepa GMA1 con alguna otra enzima alcalófila. Lo mismo se hizo con 17 enzimas hidrolíticas termófilas y se encontró el mismo comportamiento de independencia aparente. Es evidente que la comparación de secuencias no es el algoritmo adecuado para la detección de relaciones estructurales en proteínas de origen diverso. Desde un punto de vista evolutivo, este tipo de relaciones estructurales sólo podrían percibirse en proteínas divergentes ya que, por el contrario, si existe convergencia estructural, la comparación de secuencias no es una herramienta útil para nuestro análisis.

Se hizo el mismo análisis con la secuencia de proteínas de 18 lipasas de diversos orígenes. Además se elaboró un árbol filogenético utilizando los datos del alineamiento en el programa TREECON. Para calcular la distancia evolutiva se usaron los criterios de Tajima y Nei (1984) tomando en cuenta inserciones y deleciones. La topología del árbol filogenético fue inferida por el método de distancias transformadas y con el método de agrupación por unión completa. El alineamiento muestra que existe una división evidente entre las lipasas. Esta agrupación de lipasas podría deberse a su origen taxonómico, es decir a la divergencia a partir de un ancestro común, aunque en algunos casos la convergencia evolutiva o la transferencia horizontal de información genética pareciera ser la explicación posible, tal es el caso de las lipasas de *Candida antarctica* y la lingual de rata. En cuanto a la lipasa de *B. pumilus*, ésta se agrupa perfectamente dentro de un grupo de lipasas de organismos del género *Bacillus* que sólo está representado por las especies *B. pumilus* y *B. subtilis* (Figura 5.20).

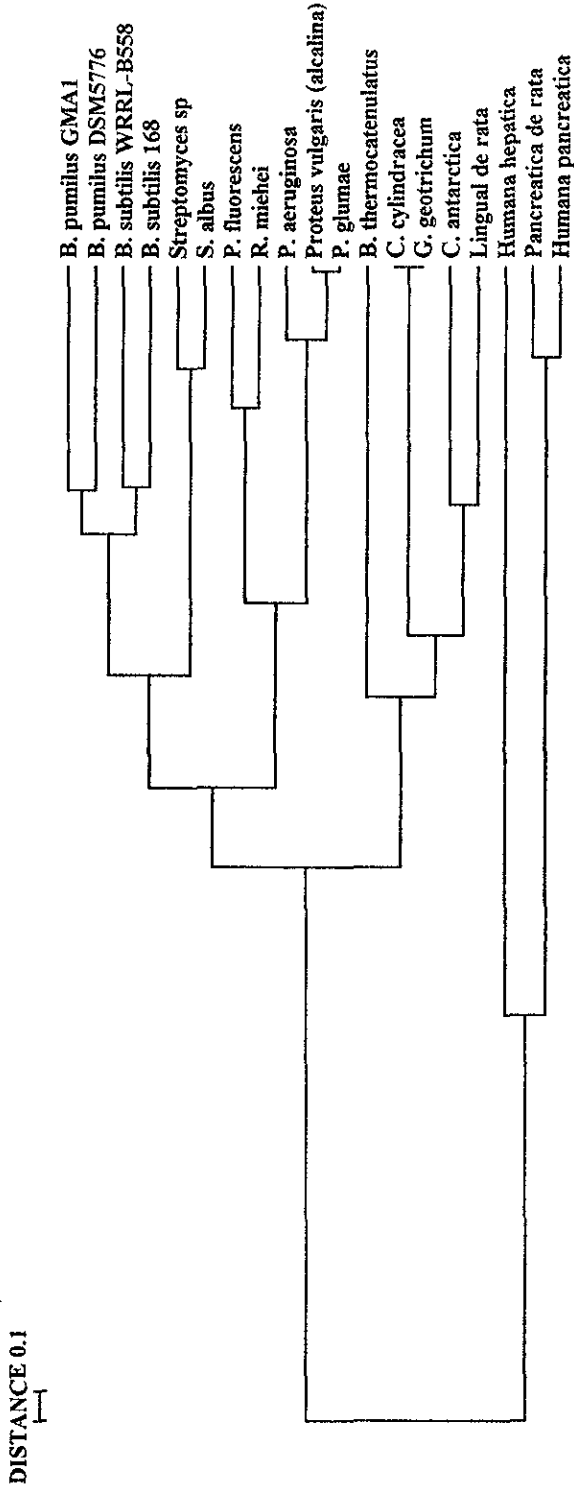


Figura 5.20. Árbol filogenético para lipasas de diversos organismos.

Capítulo 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

Conclusiones.

La lipasa de *B. pumilus* GMA1 o algún gen contiguo a ésta podrían tener un efecto tóxico en *E. coli*.

Es posible detectar la lipasa de *B. pumilus* GMA1 por hibridación con la lipasa de *B. subtilis* 168. Esto se corrobora con la cercanía mostrada entre ambas lipasas mediante la comparación de sus secuencias. Este análisis demuestra que se trata de una región única dentro del cromosoma de *B. pumilus* GMA1.

Se logró aislar un fragmento significativo de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 mediante un ensayo de PCR utilizando para tal fin, cebadores diseñados para una lipasa de otra cepa de *B. pumilus*.

La secuencia de aminoácidos de la lipasa de *B. pumilus* cepa GMA1 es idéntica en un 98.34% a aquélla de la cepa DSM5776.

En la secuencia se observa la presencia de el motivo A-X-S-X-G, característico de otras lipasas de microorganismos del género *Bacillus*.

Una diferencia de tres aminoácidos en la secuencias de las lipasas de *B. pumilus*, cepas GMA1 y DSM5776, podría ser responsable del cambio de las propiedades catalíticas de éstas en cuanto a pH (una unidad) y temperatura (20°C) óptimas.

La lipasa de *B. pumilus* GMA1 puede ser un modelo interesante para el estudio del fenómeno de termofilia y alcalofilia por mutagénesis dirigida. Requiere, sin embargo, de complementarse con una componente de cristalografía para evaluar de manera más objetiva el resultado estructural de las sustituciones que se planteen y su relación con las propiedades catalíticas de la enzima.

El análisis filogenético muestra que las lipasas del género *Bacillus* pertenecen a un grupo bien definido cuyas sustituciones de aminoácidos, aunque son pocas, son significativas desde un punto de vista funcional.

Perspectivas futuras.

Existe la posibilidad de clonar este gen para analizar su posible efecto tóxico sobre *E. coli*. Para ello sería conveniente fusionarlo con la secuencia perteneciente al péptido señal de la lipasa de *B. pumilus* DSM5776 que permita la secreción de la proteína hacia el espacio periplásmico. Simultáneamente se deberá utilizar un promotor regulable, como el de β -galactosidasa, para que fuese posible inducir la producción de la enzima una vez que se tenga la cantidad de células adecuada.

Se deben seguir estudiando las propiedades catalíticas de esta enzima para buscar aplicaciones alternas. Otra línea que pudiese ser explotada es la hiperproducción de esta enzima con fines comerciales. Dadas sus características, sería posible utilizarla en limpieza de equipo industrial y probablemente existan otras aplicaciones que no se han explorado.

Es factible realizar estudios de mutagénesis dirigida para comprobar la importancia funcional de Val27, Gly28 y Val149 en las propiedades catalíticas y estructurales de la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

BIBLIOGRAFIA.

- Altschul, S. y col. (1990). "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Ausubel, F. y col. (1992). "Short protocols in molecular biology. A compendium of methods from Current protocols in molecular biology." Second edition. John Wiley & Sons, New York.
- Bell, L. y Parsons, J. G. (1975). "Factors affecting lipase flavor in butter." *J. Dairy Sci.* **60** (1), 117-122.
- Berkeley, N. y col. (1984). "Identificación de *Bacillus* species." *Meth. Microbiol.* **16**, 291-328.
- Bravo, A., Lorence, A. y Quintero, R. (1992). "Perspectivas en la utilización de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida." *Biotechnología* **2** (5 y 6), 139-154.
- Brockman, H. L., Law, J. H. y Kezdy, F. J. (1973). "Catalysis by adsorbed enzymes. The hydrolysis of tripropionin by pancreatic lipase adsorbed to siliconized glass beads." *J. Biol. Chem.* **248** (14), 4965-4970
- Brzozowski, A., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G., Lawson, D., Turkenburg, J., Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S. y Thim, L. (1991). "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex." *Nature* **351**, 491-494
- Bustos-Jaimes, I. (1995). "Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasa proveniente de un ambiente extremo." Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Clarke, L. y Carbon, J. (1976). "A colony bank containing syntetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome." *Cell* **9**, 91-99.

-
- Chen, Q. y col. (1989). "Study on *Bacillus pumilus* as a recipient strain for genetic engineering of *Bacillus*." I. Chuan. Hsueh. Pao. **16** (3), 206-212.
- Dartois, V. y col. (1992). "Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168." Biochim. Biophys. Acta **1131**, 253-260.
- Dartois, V. y col. (1994). "Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*." Appl. Environ. Microbiol. **60** (5), 1670-1673.
- Declerck, N., Joyet, P., Trosset, J. Y., Garnier, J. y Gaillardin, C. (1995). "Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase: multiple amino acid replacements and molecular modelling." Protein Eng. **8** (10), 1029-1037.
- Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. y Derewenda, Z. S. (1992). "Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase." Biochemistry **31** (5), 1532-1541.
- Derewenda, Z. S. y Sharp, A. M. (1993). "News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases." Trends Biochem. Sci. **18**, 20-25.
- Derewenda, Z. S. y Derewenda, U. (1991) "Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases." Biochem. Cell. Biol. **69** (12), 842-851.
- Farrow, J. y col. (1992). "Phylogenetic analysis of the genera *Planococcus*, *Marinococcus* and *Sporosarcina* and their relationships to members of the genus *Bacillus*." FEMS Microbiol. Lett. **72**, 167-72.
- Gat, O. y col. (1994). "Cloning and DNA sequence of the gene coding for *Bacillus stearothermophilus* T-6 xilanase." Appl. Environ. Microbiol. **60** (6), 1889-1896.
- Gish, W. y David, S. (1993). "Identification of protein coding regions by database similarity search." Nat. genet. **3**, 266-272.
- Godtfredsen, S. E. (1990) en Fogarty y Kelly "Microbial enzymes and biotechnology" Capitulo 7: Microbial lipases. pp 255-274. Ed. Elsevier Applied Science. Northern Ireland.
- Harwood, C. (1992). "*Bacillus subtilis* and its relatives: molecular, biological and industrial workhorses." TIBTECH **10**, 247-256.
- Hou, C. T. (1993). "Screening of microbial esterases for asymmetric hydrolysis of 2-ethylhexil butyrate." J. Indust. Microbiol. **11**, 73-81.

-
- Hoult, B y Tuxford, A. (1991). "Toxin production by *Bacillus pumilus*." J. Clin. Pathol. **44** (6), 455-458.
- Ibarra, J. (1994). "Los bioinsecticidas como alternativa ecológica." Biotecnología **4** (1), 3-10.
- Jang, J. y col. (1992). "Molecular cloning of a subtilisin J gene from *Bacillus stearothermophilus* and its expression in *Bacillus subtilis*." Biochem. Biophys. Res. Commun. **184** (1), 277-282.
- Joerger, R. y Hass, M. (1993). "Overexpression of a *Rhizopus delemar* lipase gene in *Escherichia coli*." Lipids **28** (2), 81-88.
- Katz, L. y col. (1993). "Screening and selection of a microbial lipase for the stereospecific hydrolysis of verlukast." J. Indust. Microbiol. **11**, 89-94.
- Kawak, H. S., Jeon, I. L. y Perng, S. K. (1989). "Statistical patterns of lipase activities on the release of short-chain fatty acids in Cheddar chesse slurries." J. Food Sci. **54** (6), 1559-1564.
- Koivula, T. y col. (1993). "Cloning and sequencing of a gene encoding acidophilic amylase from *Bacillus acidocaldarius*." J. Gen. Microbiol. **139**, 2399-2407.
- Kyte, J. y Doolittle R. (1982). "A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein." J. Mol. Biol. **157** (1), 105-132.
- Langrand, G. y col. (1990) "Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases." Biotechnol. Lett. **12** (8), 581-586.
- Leifert, C. y col. (1995). "Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45." J. Appl. Bacteriol. **78** (2), 97-108.
- Lesuisse, E., Schanck, K. y Colson, C. (1993). "Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH tolerant enzyme." Eur. J. Biochem. **216**, 155-160.
- Lopez-Camacho, C., Salgado, J., Lequerica, J. L., Madarro, A., Ballestar, E., Franco, L. y Polaina, J. (1996). "Amino acid substitutions enhancing thermostability of *Bacillus polymyxa* β -glucosidase A." Biochem. J. **314** (3), 833-838.
- Mari, M., Guizzardi, M. y Pratella, G. (1996). "Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria." Biol. Control **7** (1):30-37.

- Martin, B. y col. (1989). "The difficulty of cloning *Streptococcus pneumoniae* mal and ami loci in *Escherichia coli*: toxicity of malX and amiA gene products." *Gene* **80** (2), 227-238.
- Miller, C. y col. (1988). "Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters." *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **65** (6), 927-931.
- Möller, B. y col. (1991). "Alcaline *Bacillus* lipases, coding DNA sequences therefore and bacilli which produce these lipases." Patente internacional WO 91/16422.
- Moriyama, H., Onodera, K., Sakurai, M., Tanaka, N., Kirino-Kagawa, H., Oshima, T. y Katsube, Y. (1995). "The crystal structures of mutated 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8 and their relationship to the thermostability of the enzyme." *J. Biochem.* **117** (2), 408-413.
- Naruse, N. y col. (1990). "Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity." *J. Antibiot. (Tokyo)* **43** (3), 267-280.
- Nicholls, A., Sharp, K. y Honig B. (1991). "Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons." *Proteins* **11**, 281-296.
- O'Connor, K. C. y Bailey, J. E. (1988). "Hydrolysis of emulsified tributyrin by porcine pancreatic lipase" *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 352-356.
- Ochi, K. (1994). "Phylogenetic diversity in the genus *Bacillus* and comparative ribosomal protein AT-L30 analyses of the genus *Thermoactinomyces* and relatives." *Microbiology* **140** (Pt 8): 2165-2171.
- Ozaki, K., Sumitomo, N. e Ito, S. (1991). "Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding an endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330." *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2299-2305.
- Priest, F. G., Goodfellow, M. y Todd, C. (1988). "A numerical classification of the genus *Bacillus*." *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1847-1882.
- Prince, H. (1976). "Stability of *Bacillus pumilus* spore strips used for monitoring radiation sterilization." *Appl. Environ. Microbiol.* **31** (6), 999-1000.
- Rainey, F., Fritze, D. y Stackebrandt, E. (1994) "The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis." *FEMS Microbiol. Lett.* **115**, 205-211.
- Ransac, S. y col. (1994). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of a lipase from *Bacillus subtilis*." *J. Mol. Biol.* **238**, 857-859.

- Rychlik, W. (1993). "Selection of primers for polymerase chain reaction." *Meth. Mol. Biol.* **15**, 31-40.
- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
- Sander, C. y Schneider, R. (1991). "Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment." *Proteins* **9**, 56-68.
- Sato, H., Kidaka, T. y Hori, M. (1986). "Sterilization of therapeutic immunoadsorbents by ionizing radiation." *Int. J. Artif. Organs* **9** (2), 131-136.
- Schmidt-Dannert, C. y col. (1996). "Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties." *Biochim. Biophys. Acta* **1301**, 105-114.
- Shida, O. y col. (1996). "Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 939-946.
- Shida, O. y col. (1997). "Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 289-298.
- Sietske de Boer, A., Priest, F. y Diderichsen, B. (1994). "On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 595-598.
- Soberón-Chávez, G. y Palmeros, B. (1994). "*Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential applications." *Crit. Rev. Microbiol.* **20** (2), 95-105.
- Sommer, P., Bormann, C. y Gotz, F. (1997). "Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*." *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (9), 3553-3560.
- Suguhara, A., Tani, T. y Tominaga, Y. (1991). "Purification and characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp." *J. Biochem.* **109**, 211-216.
- Thompson, J., Higgins, D. y Gibson, T. (1994) "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Van de Peer, Y. y De Wachter, R. (1994) "TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment." *Comput. Applic. Biosci.* **10**, 569-570.

-
- Wang, Y. y col. (1995). "Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841)." *J. Ferm Bioeng.* **79** (5), 433-438.
- White, P. J., Squirrell, D. J., Arnaud, P., Lowe, C. R. y Murray, J. A. (1996). "Improved thermostability of the North American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354." *Biochem. J.* **319** (2), 343-350.
- Wisotzkey J. y col. (1992). "Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 263-269.
- Zulli, F., Schneider, R., Urfer, R. y Zuber, H (1991). "Structure and function of L-lactate dehydrogenases from thermophilic and mesophilic bacteria, XI. Engineering thermostability and activity of lactate dehydrogenases from bacilli." *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **372** (5), 363-372.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Model 377
Version 2.1.1

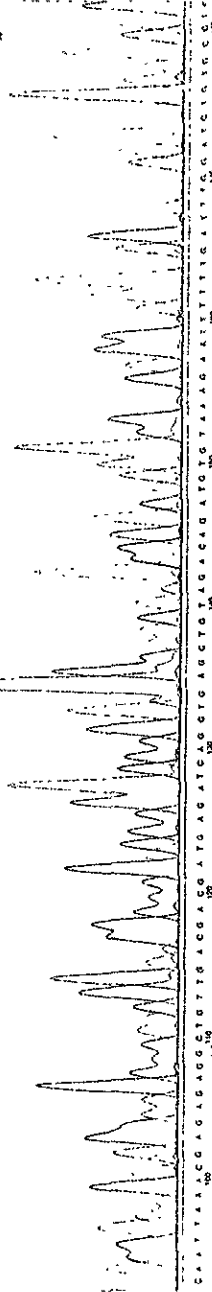


PCR 580bp_pRBP-2x
ISML-5 (PCR/6P)
14-PCR 580bp_pRBP-2x
Lane 27

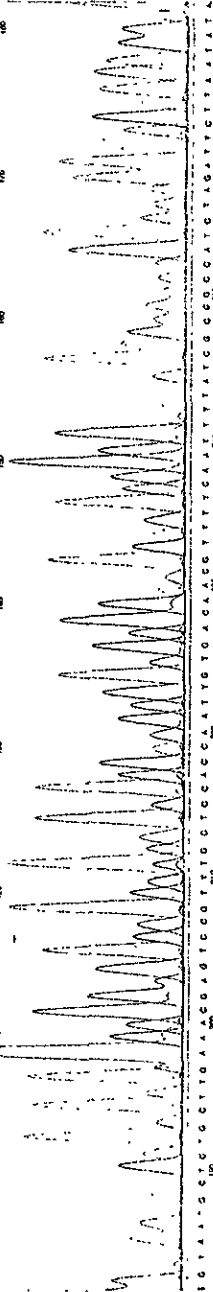
Signal G 327 A 985 T 561 C 998
D14Ac(A Set-AnyPrimer)
sn 58031328 matrix
Points 1098 to 8252 Base 1: 1098

Page 1 of 3
Wed, Oct 15, 1997 5:31 PM
Thu, Oct 9, 1997 11:29 AM
Spacing 10.49 Adaptive

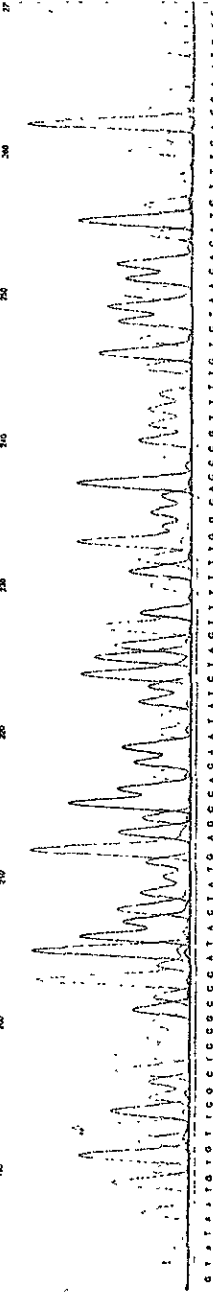
GGCCATCGAAGCCTTCTTATATGTAGCCCTTCACTGCTGCTTGAAGTTAATAGACCCATATGCCCCAAGCCCTATGGATCCAGACCGTTTCTTCCGC



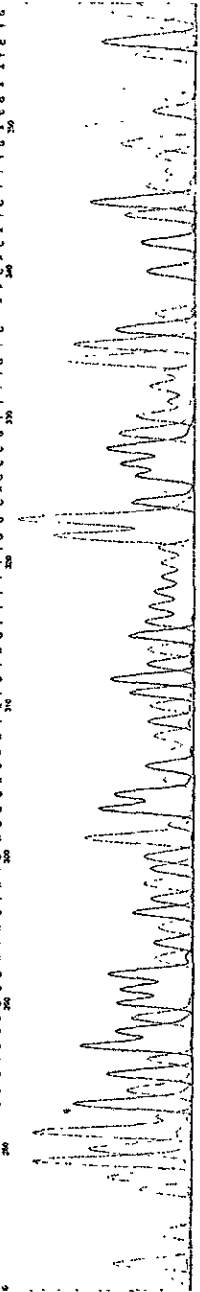
CATTTAAACGAGAGAGCGCTGTTGACCGAAGATGATCAGCTCAGCTGATGCTGAAAGATTTTTCATTTCCATTCCTCCATCCCTCC



TGTAATGCTGCCTGTAACCGATGCGTTGTCCTCCAGCAATTGTAACCAAGCTTTCATTTATCGCCCGATCTGGATCTTATATAT



CTTATATGTTGTCGCCGCCATACTAAGCCGATCTCTAGCTTGTGGACCCGTTTTCCTTTCATGTCGATGTCGATGTC

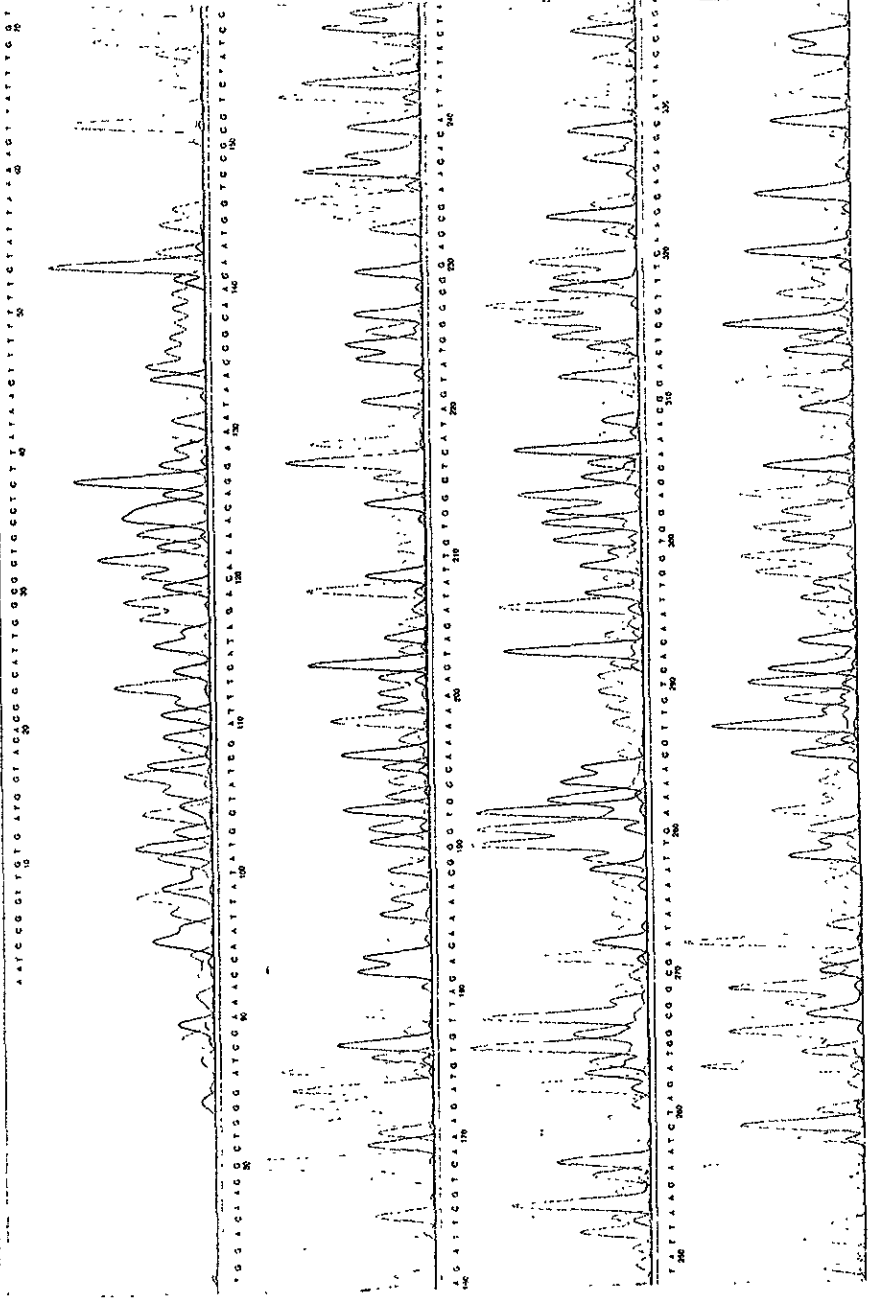


Wed, Oct 15, 1997 5:35 PM
Thu, Oct 9, 1997 11:29 AM
Spacing: 10 19 Adaptive

Signal G:355 A:931 T:400 C:285
DI:46.0 (3.0) (Self-priming)
P: 96331928 matrix
Points 926 to 9263 Base 1, 926

PCR 560bp.pFBP.2x
ISWABL 51.PCR51c
IS-PCR 560bp.pFBP.2x
Lane 29

Model: 3177
Version 2.1.1



Model 977
Version 2.1.1



PCR 560pb.pFBP.2x
ISMAEL.B.PCRs.c
15-PCR.560pb.pFBP.2x
Lane 29

Signal G:355 A:931 T:400 C:285
DJ4%AsiA.Sel-AnyPrimer)
sn 96031328 matrix
Points 926 to 8252 Base 1: 926

Page 2 of 3
Wed, Oct 15, 1997 5:35 PM
Thu, Oct 9, 1997 11:29 AM
Spacing: 19 Adaptive

