

100
2EJ-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IMPORTANCIA DEL DOMINIO B DE UNA α -AMILASA
DE *Bacillus stearothermophilus* PARA REACCIONES
DE TRANSFERENCIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

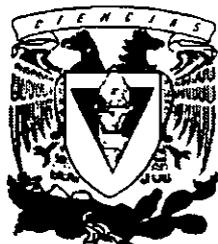
B I O L O G O

P R E S E N T A :

MANUEL

HERIBERTO

RIVERA



MEXICO, D.F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



Mat. Margarita Elvira Chávez Cano
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias

P R E S E N T E

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Importancia del dominio B de una α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*
para reacciones de transferencia"

realizado por Manuel Heriberto Rivera

Con número de cuenta 9034014-7 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A T E N T A M E N T E

Director de tesis

Propietario Dra.

Gloria

Saab Rincón

Gloria Saab Rincón

Propietario M. en C.

Víctor Manuel

Valdés López

Víctor Manuel Valdés López

Propietario M. en C

Sonia

Dávila Ramos

Sonia Dávila Ramos

Suplente Biol.

Alfonso José

Vilchis Peluyera

Alfonso José Vilchis Peluyera

Suplente M en C

Claudia Andrea

Segal Kischinevzky

Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Edna M. Suárez Díaz

Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz

Agradecimientos

Este trabajo lo dedico especialmente a la familia, por ser la base de todo esquema humano.

Con todo el cariño a mi Madre y Ale que sin su sacrificio quizá nunca se hubiese concluido el presente trabajo. A mis hermanos (Miguel, Arturo, Victor, Carlos y Edgar) por que de ustedes sólo tomé el ejemplo de salir adelante y nunca voltear y derrotarme. A Rosy y Esme por soportarme.

En memoria del abuelo, porque siempre nos procuró y nos dió sabios consejos y sobre todo mucho amor.

Con un especial interés a Giss por su gran valor a la vida, su tiempo, comprensión y su cariño. Por ser una gran Mujer.

A Irma y Lorenzo por todo su apoyo.

A Gloria por su confianza, entusiasmo, por ser una guía tan acertada, valiosa y por su gran calidad humana.

A los Dres. Agustín López-Munguía y Gloria Saab, a los M. en C. Víctor M. Valdés, Claudia Segal y Sonia Dávila, así como al Biol. Alfonso Vilchis por la revisión y comentarios a la escritura de esta tesis.

A los Dres. Agustín López-Munguía y Xavier Soberón, que me han permitido continuar en esta vía de curiosidad hacia la vida y sobre todo, que me han hecho ver que la inspiración llega, pero te tiene que encontrar trabajando.

A los Dres. Lorenzo Segovia, Joel Osuna, Humberto Flores, Brenda Valderrama y Gabriel Del Río, por su incondicional apoyo académico y sus valiosas observaciones a mi formación científica.

A mis compañeros de laboratorio y amigos (Gabriel Mercado, Victor Rivelino, Humberto Barrios, Maricela y Leticia Olvera, Gabriel Moreno, Ismael Hernández, Rodrigo Arreola, Filiberto Sánchez, Katy Juarez, Gabriela Flores, Mariana Peimbert, Ricardo Grande, Alejandra Pérez, María del Carmen Ramírez, Viviana Escobar, Rosy Mares, Luis Ledezma, Gustavo Arroyo y Lidia Riaño), por compartir su amistad y trabajo conmigo.

A la unidad de síntesis (Paul y Eugenio) por la eficiencia con los oligos.

A Toño y Yolo por esos momentos tan de sorpresa y mucha risa.

A los AD (Nacho, Carlos, Esmeralda, Blanca, Takuya, José Luis, Claudia, Carmen, Yuyu, Ricardo, Daniel, Gabriel y Felipe). Por que han hecho de la vida del laboratorio un punto a mi favor.

A BJ, PK, LK SPK y IRON que fueron muy importantes en lo que hasta ahora llevo de mi corta vida.

El presente trabajo fué realizado en el laboratorio del Dr. Xavier Soberón en el departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Gloria Saab Rincón

INDICE

	Páginas	
I	Resumen	1
II	Introducción	3
	II.1 La familia de las α -amilasas	4
	II.2 α -amilasa	5
	II.3 Ciclodextrin-glucanotransferasa CGTasa	5
	II.4 Relación entre α -amilasas y CGTasas	6
	II.5 Mecanismo catalítico de las α -amilasas	8
	II.6 Reacciones de transferencia o alcoholisis	10
III	Objetivos	15
IV	Diseño experimental	16
V	Material y Métodos	17
	V.1 Alineamiento de secuencias	17
	V.2 Traslocación del dominio B de una CGTasa hacia una α -amilasa	17
	V.3 Clonación en el vector pBGS18 bajo el promotor de Lac Z y en el vector pET bajo el promotor T7	19
	V.4 Transformación de los plásmidos en la cepas JM101 y BL21 de <i>E. coli</i>	21
	V.5 Confirmación de mutantes por análisis de secuencia	21
	V.6 Inducción de la sobreexpresión de la enzima quimérica	22
	V.7 Purificación de la proteína mutante con colas de histidina en condiciones desnaturalizantes	22
	V.8 Renaturalización <i>in vitro</i> de la enzima quimérica	23

VI	Resultados y Discusión	25
	VI.1 Análisis de secuencia	25
	VI.2 Mutagénesis dirigida para la construcción de la proteína quimérica	28
	VI.3 Expresión heteróloga de la proteína quimérica en E. coli y purificación de proteína mutante	28
	VI.4 Renaturalización in vitro de la proteína quimérica	30
	VI.5 Estabilidad de la enzima quimérica	33
VII	Conclusiones	36
VIII	Perspectivas	37
IX	Bibliografía	38

I RESUMEN

Las enzimas hidrolíticas, α -amilasas y ciclodextrin-glucosiltransferasas (CGTasas) son enzimas claves en la degradación del almidón y pertenecen a la familia de las α -amilasas (18, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 31, 32, 33, 37, 38, 39). Estas proteínas son un buen modelo para llevar a cabo una traslocación de dominios por diferentes razones. Ambas enzimas tienen en común tres dominios estructurales denominados A, B y C. El dominio A es el dominio catalítico con una estructura barril TIM (11, 14, 16, 29, 31, 33, 37, 44, 49, 51, 54, 56, 59, 65, 66, 69, 79). El dominio B interrumpe al barril TIM en el asa 3 y se encuentra sobre el sitio de catálisis. Un aspecto importante es que este dominio es el que presenta mayor variabilidad entre las diferentes enzimas de esta superfamilia. El dominio B de la CGTasa está involucrado en reacciones de transferencia; actividad que es de nuestro interés, ya que a partir de ésta catálisis y utilizando como base la estructura de la α -amilasa, se puede modificar su actividad para producir alquilglicósidos. El dominio C está formado por hojas β y parece estar involucrado con el enlace del sustrato a la enzima. Cabe mencionar que la CGTasa presenta dos dominios extras, el dominio D y el dominio E. Este último parece estar involucrado en la unión a sustrato, mientras que la función del dominio D no está bien definida.

En el presente trabajo se describe la construcción de una α -amilasa quimérica de *Bacillus stearothermophilus* (Bsta) en la que el dominio B fue sustituido por el dominio equivalente de una CGTasa de *B. circulans*. La similitud estructural en cuanto al barril TIM de estas proteínas sugería que nuestra construcción debería ser estable y con una actividad de transferencia. La construcción de ésta enzima se llevó a cabo por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se probaron dos vectores diferentes para la expresión de la proteína mutante; un vector pBGS18, el cual está bajo el control del promotor de Lac y un vector pET, el cual está bajo el control del promotor T7.

Con el primer sistema (promotor débil e inducible) no se pudo detectar la proteína por electroforesis utilizando azul de coomassie, ni actividad en los sobrenadantes. Por lo que se pasó a un sistema de expresión más fuerte (T7, inducible con IPTG). Bajo estas condiciones se detectó a la proteína mutante, la cual se encontraba precipitada en cuerpos de inclusión.

La purificación de la proteína se realizó bajo condiciones desnaturizantes para disolver los cuerpos de inclusión y se utilizó una columna de afinidad de Ni⁺⁺, dado que la mutante se construyó sobre un templado de la α -amilasa que contenía una cola de histidina en el carboxilo terminal. Una vez que fue purificada la proteína quimérica se intentaron diferentes estrategias para replegarla. Entre las estrategias que se intentaron para la renaturalización *in vitro* de la proteína se encuentran la dilución de agente desnaturizante en presencia de agentes antioxidantes, la coexpresión de la proteína mutante con chaperonas de *E. coli* GROEL y GROES y el uso de una columna de replegado con minichaperonas (3, 4).

Al parecer la enzima mutante pierde estabilidad, lo que muestra la importancia de las interacciones entre los dominios A y B para mantener su conformación espacial estable. Otra razón importante de estabilidad se debe a que la gran mayoría de las proteínas recombinantes que se sobreexpresan tienen problemas de adquirir su estado nativo porque tienden a formar un estado intermedio de plegamiento o agregados que no presentan actividad. Cabe mencionar que esto nos da información importante en el intento de modificar y mejorar la actividad de la enzima α -amilasa, así como la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.

II INTRODUCCION

El almidón es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza y está compuesto por amilosa y amilopectina. La amilosa es un polisacárido formado por residuos de glucosa unidos por un enlace glucosídico (α 1-4), dando lugar a un polímero lineal, en cambio la amilopectina contiene ramificaciones que derivan de un enlace (α 1-6). La importancia de este sustrato radica en su bajo costo y gran disponibilidad, por lo que funciona como materia prima para muchos procesos en las industrias alimenticia y farmacéutica, siendo por lo tanto relevante el estudio de la α -amilasa. La α -amilasa se utiliza principalmente para degradar el almidón a unidades más pequeñas de glucosa, con el objeto de servir como sustrato para la producción de cerveza, en el desteñido de telas o apresto, en la industria de la repostería, en la producción de adhesivos, fármacos y detergentes (18, 24, 40, 41, 57, 93). Cabe mencionar que dependiendo de las condiciones ambientales a las que los organismos estén adaptados, se podrán encontrar éstas enzimas con características distintivas, como por ejemplo, proteínas termoestables o proteínas psicrófilas (que toleran bajas temperaturas) (1, 2). Estas enzimas han despertado un especial interés por su capacidad de tolerar amplios intervalos de temperatura y de pH. En el caso de la temperatura, oscilan entre bajo cero en la α -amilasa de *Alteromonas haloplanctis*, hasta 100°C en el caso de *B. licheniformis*. En el caso del pH, éste varía desde 2.0 hasta 10.5 unidades de pH (16, 42, 94, 95, 96). Dado lo anterior, ha sido necesario clasificar a las proteínas en familias, basándose tanto en características estructurales como catalíticas. En el siguiente apartado nos abocaremos a ubicar a la α -amilasa dentro de la clasificación general de enzimas.

II.1 La familia de las α -amilasas

La resolución de la estructura de la enzima Triosa-Fosfato-Isomerasa (TIM) en el músculo de pollo hace veinte años, tuvo una repercusión importante en la investigación en bioestructura de proteínas que ahora se está realizando en todo el mundo (66). La familia de las α -amilasas consiste en un amplio grupo de enzimas (aproximadamente 20 tipos diferentes) que degradan almidón, las cuales tienen en común una estructura tipo barril TIM (22, 26, 27, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 79). El análisis de la estructura primaria muestra una gran similitud entre estas enzimas (37, 90). Existe un parecido funcional

EC*	Enzima/proteína
‡3.2.1.1	α -Amilasa
‡3.2.1.10	Oligo-1,6-glucosidasa
‡3.2.1.60	Maltotetrahidrolasa
‡2.4.1.19	Ciclodextrin-glucosiltransferasa
‡3.2.1.20	α -Glucosidasa
‡3.2.1.41	Pullulanasa
‡3.2.1.1/41	Amilopullulanasa
‡3.2.1.54	Ciclomaltodextrinasa
‡3.2.1.68	Isoamilasa
*3.2.1.70	Dextran glucosidasa
*3.2.1.93	Trehalosa-6-fosfato hidrolasa
*3.2.1.98	Maltohexahidrolasa
*3.2.1.116	Maltotriohidrolasa
*3.2.1.133	Maltogeni-amilasa
*3.2.1.135	Neopullulanasa
	Maltopentahidrolasa
	Maltooligosiltrehalosa hidrolasa
*2.4.1.18	Enzima glucanoramificadora
*2.4.1.25	Amilomaltasa
*2.4.1.25/3.2.1.33	Enzima glucanodesramificadora
	Maltooligosiltrehalosa sintetasa
*2.4.1.5	Glucosiltransferasa
‡	Proteína relacionada con el transporte de aminoácidos
‡	Antígeno de superficie celular de la cadena pesada 4F2

Cuadro 1 Miembros de la familia de las α -amilasas. EC* números dados por la Comisión de Enzimas.

‡ Miembros con estructura tridimensional reportada por cristalografía. * Transferasas-Glucanottransferasas que han sido propuestas por contener una versión de permutación circular del barril tipo TIM (α/β)₈.

‡ Proteínas sin función catalítica (Janecek, S. *et al.*, 1997).

en estas proteínas ya que presentan un mecanismo catalítico donde invierten o retienen la configuración del carbono anomérico (37). Se han reportado varias estructuras tridimensionales por cristalografía de rayos X, entre las cuales se encuentran: la α -amilasa de *Aspergillus orizea* (TAA) (69, 70); la α -amilasa de *B. Licheniformis* (BLA) (24, 25, 64, 65); el complejo enzima-inhibidor de la α -amilasa de la cebada (53); la α -amilasa del páncreas de cerdo (PPA) (11, 16, 79); la α -amilasa de *B. subtilis* (Amy_Bacsu) (31) y la Ciclodextrin-glucanottransferasa (CGTasa) de *B. Circulans* (56, 59, 86). En el cuadro 1 se pueden distinguir tres grupos importantes de los miembros de ésta familia.

II.2 α -amilasa

La α -amilasa (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa) es producida por organismos eucariontes y procariontes para hidrolizar almidón. Esta enzima cataliza la hidrólisis del enlace glucosídico α -1,4 en el almidón, glucógeno y varios oligosacáridos. Existe una clasificación general de las α -amilasas de acuerdo a los productos que se generan. En el caso de que los productos α -anoméricos generados en la hidrólisis sean maltosa y

Enzimas sacarificantes: α -amilasas que llevan a cabo un 50-60% de la hidrólisis generando productos tales como maltosa (G2) y maltotriosas (G3).

Enzimas licuefactantes: α -amilasas que llevan a cabo un 30-40% de la hidrólisis del sustrato dando como resultado la liberación de productos como maltopentosas (G5) y maltohexosas (G6)

Cuadro 2 Clasificación general de las α -amilasas de acuerdo a sus productos generados (Crabb, W. *et al.*, 1997; Vihinen, M. *et al.*, 1990)

maltotriosas, las enzimas son denominadas sacarificantes, mientras que si el grado de depolimerización es menor y se liberan productos tales como maltopentosas y maltohexosas, las enzimas son nombradas licuefactantes (ver cuadro 2) (18, 94, 96).

II.3 Ciclodextrin-glucanotransferasa (CGTasa)

La CGTasa es una enzima que produce ciclodextrinas (CDs) como producto mayoritario de la hidrólisis del almidón. Las CDs son estructuras en forma de anillo en la cual 6, 7 u 8 unidades de glucosa están unidas por un enlace glucosídico α ,1-4. Acorde con el número de unidades de glucosas que forman el anillo, son nombradas α , β y γ CDs respectivamente (32, 33), siendo las β -CDs las más producidas por ésta enzima. La CGTasa es una enzima importante para la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética, ya que sus productos son capaces de formar pequeños complejos con muchas moléculas orgánicas e inorgánicas con carácter hidrofóbico, cambiando sus propiedades fisico-químicas (26, 54, 56, 59).

II.4 Relación entre las α -amilasas y Las CGTasas

Las α -amilasas están relacionadas desde el punto de vista funcional y estructural con la CGTasa, ya que ambas degradan almidón, muestran cierto grado de identidad en su secuencia primaria y más aún, presentan un dominio catalítico que tiene un motivo estructural de barril TIM, es decir, tienen ocho cadenas β hacia el interior y ocho hélices α hacia el exterior que están conectadas entre sí por asas complejas (63, 65, 69, 89, 100, 101). La región de las asas que conectan las cadenas β y las hélices α son muy parecidas entre la CGTasa y TAA (68, 85). Esta región contiene los sitios de unión al calcio y cloro necesarios para mantener la estabilidad de la estructura tridimensional (78). El dominio A se encuentra interrumpido entre la hebra 3 y la hélice 3 para dar lugar al dominio B, el cual está formado principalmente por estructuras β . El dominio B es la región más variable entre las diferentes estructuras de α -amilasas reportadas (11, 24, 25, 31, 56, 59, 65, 66, 69, 70, 79). Igarashi (40, 41) encontró a partir del análisis de secuencia entre diferentes α -amilasas una región semi-conservada en el dominio B que consta de dos residuos Arg-Gly. Estos residuos están involucrados con una disminución en la termoestabilidad. El dominio C al igual que el dominio A está muy conservado. Este dominio está formado por hojas β y parece estar involucrado con la unión del sustrato (65, 66). Ver figura 1.

Las CGTasas son, por lo general, enzimas con un tamaño mayor que van de 70 a 75 KDa, mientras que las α -amilasas tienen un tamaño menor que va de 45 a 55 KDa. Esta diferencia en tamaño se debe principalmente a que las CGTasas poseen dos dominios adicionales, el dominio D y el dominio E (66). Los dominios A, B y C son estructuralmente homólogos a los tres dominios de las α -amilasas (65, 66, 69, 70). Los dominios C y E tienen sitios de unión de dos moléculas de maltosa, sugiriendo que su función es la de enlazar al sustrato, mientras que la función del dominio D no está definida todavía (59, 70). Respecto a la catálisis de éstas enzimas, hasta ahora no está muy claro qué determina la diferencia en la especificidad del producto (99, 101). Sin embargo, Del Río (26) propone que la diferencia catalítica entre estas enzimas radica en algunos residuos responsables de la actividad de transferencia presente en el dominio B de las CGTasas y algunas α -amilasas fungales. Se ha observado que este dominio varía mucho en la secuencia de sus aminoácidos (aa), así como en longitud entre las diferentes hidrolasas (51). No obstante, Janecek (47, 69, 70) ha propuesto que existe una región muy conservada en ésta asa, esta región contiene el aspártico 175 (numeración de TAA).



Figura 1. Modelo tridimensional diseñado por computadora de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, basado en la estructura cristalográfica de la α -amilasa de *B. licheniformis*. La representación esquemática muestra en forma de cilindros la estructura secundaria en forma de hélices α , mientras que la estructura secundaria en forma de hojas β , se aprecian como flechas planas. Los diferentes dominios que conforman esta enzima se aprecian en diferentes colores. En color rojo se aprecia el dominio B; en color amarillo, el dominio C; mientras que en color azul se muestra el dominio catalítico o barril TIM. El dominio B es el dominio más variable en la familia de las α -amilasas. El modelo fue creado en el programa Modeller V. 4.0 y la estructura secundaria de la caricatura en VMD.

El dominio B de la α -amilasa de *B. stearothermophilus* consta de 118 aa, siendo más grande que el correspondiente dominio de la CGTasa de *B. circulans*, que contiene aproximadamente 60 aa. Janecek (38, 59) y Del Río (20) coinciden en que existe una evolución divergente entre estas enzimas y que es justamente la estructura secundaria de este dominio la que proporciona variabilidad a la actividad de este grupo de enzimas. Por ejemplo, existen reportes recientes donde mencionan que la α -amilasa de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* produce CDs (26, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 100, 102). Lo anterior refuerza la idea de que los dominios juegan un papel fundamental en la especificidad de la actividad, dando origen a la diversidad funcional de algunas enzimas. Por ejemplo, algunas enzimas relacionadas con el transporte de aa en mamíferos presentan el mismo motivo estructural pero han perdido su actividad catalítica como el caso de la tRNA-guanidin transglucosidasa. El segundo ejemplo muestra la ausencia total del dominio B en antígenos con cadena pesada 4F2 que se encuentran en la superficie celular y que siguen manteniendo una estructura en forma de barril TIM (45, 46, 47, 49, 50, 51, 61), ver figura 2. Esto parece indicar que la naturaleza se basa en moldes ya construídos para luego añadirles o quitarles dominios, siendo por lo tanto la traslocación de dominios uno de los procesos o una de las vías importantes en la evolución para generar variabilidad.

II.5 Mecanismo Catalítico de las α -amilasas

La hidrólisis enzimática de enlaces glucosídicos se lleva a cabo por la vía de catálisis ácida que requiere de tres ácidos carboxílicos en el sitio activo Glu230^{TAA}, Asp206^{TAA} y Asp297^{TAA} (el Asp197^{PPA}, el Glu233^{PPA} y Asp300^{PPA} en la numeración de la PPA). El Glu230^{TAA} (Glu233^{PPA}) funciona como donador de protones, mientras que el Asp206^{TAA} (Asp197^{PPA}) funciona como base nucleofílica (70, 71, 81, 89). Brzozowski (14) y Davies (22) han propuesto que el Asp297^{TAA} (Asp300^{PPA}) está relacionado con el control del estado de ionización de los residuos arriba mencionados (16, 69, 70, 79).

Se han propuesto dos mecanismos principales para explicar la inversión o retención de la configuración del carbono anomérico (ver figuras 3A y 3B). En ambos mecanismos (inversión y retención) la posición del donador de protones Glu230^{TAA} (Glu233^{PPA}) es idéntica, permitiendo que se lleven a cabo las interacciones químicas tipo puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del Asp297^{TAA} (Asp300^{PPA}) y el oxígeno glucosídico.

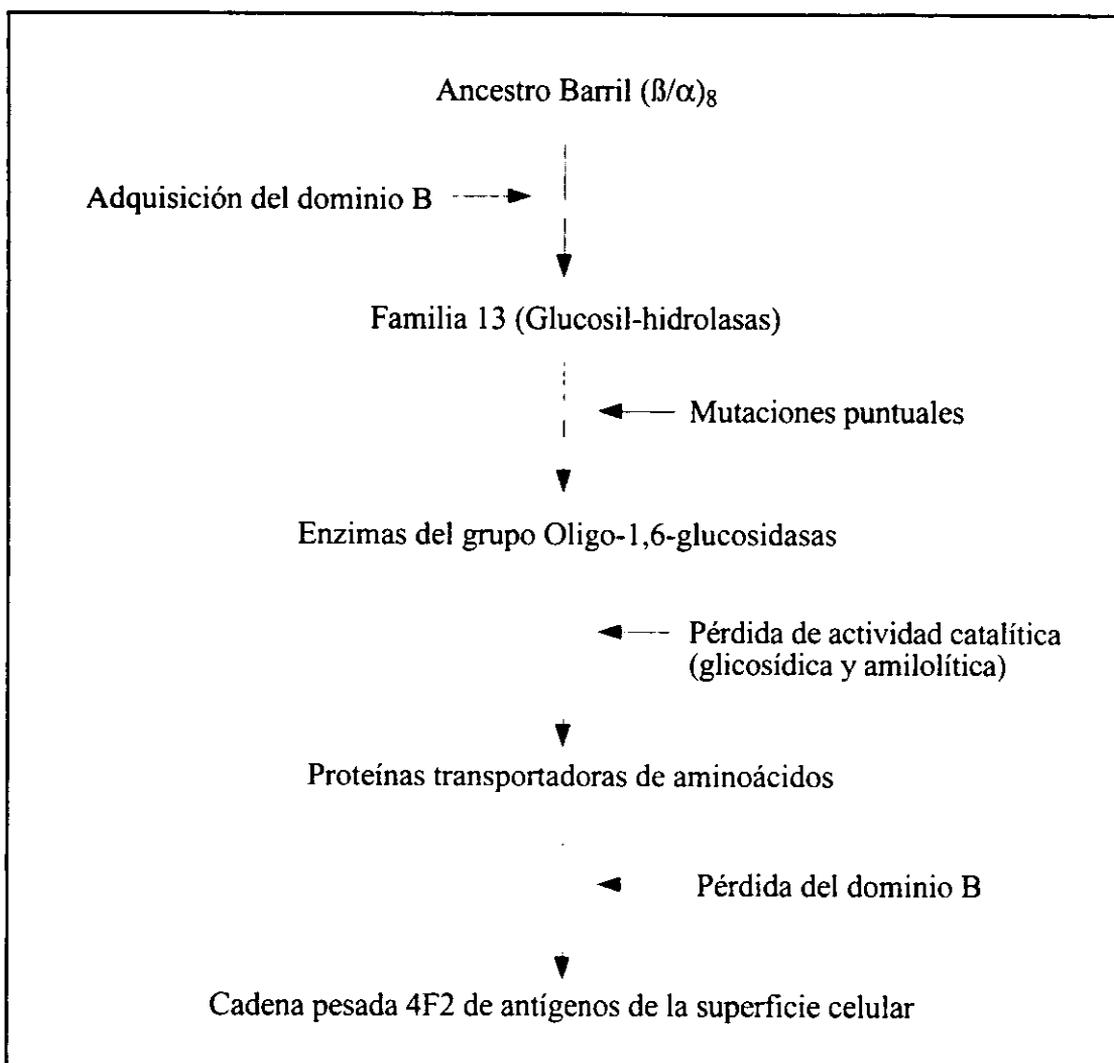


Figura 2. Posibles eventos en la evolución del dominio B de algunos miembros de la familia de las α -amilasas según Janecek, S.1997. Janecek se basó en el alineamiento de secuencias de dominios que están insertados entre la tercera cadena β y la tercera hélice α de enzimas con un motivo estructural barril TIM para relacionar al dominio B con otras enzimas. Bajo el criterio de la presencia del dominio B, él encontró a la tRNA-guanidin transglicosidasa y los antígenos con cadena pesada 4F2 de superficie celular como candidatos para explicar los eventos evolutivos que ha seguido el dominio B. Para el caso de tRNA-guanidin transglicosidasa, él propone que un ancestro de las enzimas del grupo Oligo-1,6-glucosidasas tuvo modificaciones en este dominio perdiendo especificidad en su actividad catalítica, por lo que fue seleccionada por las células para transportar aminoácidos, mientras que los antígenos con cadena pesada 4F2 reflejan una pérdida sustancial de este dominio (Janecek, S. *et al.*, 1997).

En enzimas con mecanismo de retención (ver figura 3A) como el caso de la α -amilasa, el residuo básico Asp206^{TAA} (Asp197^{PPA}) que efectúa el ataque nucleofílico tiene una distancia menor al carbono anomérico del azúcar (5.5Å). Mientras que en las enzimas que llevan a cabo la catálisis invirtiendo la configuración del carbono anomérico, la distancia entre el ácido y la base es mayor (10Å), permitiendo el acceso a la molécula de agua que puede permanecer entre la base y el azúcar. (37, 72, 82, 91, 92).

Las α -amilasas han logrado bajar la energía de activación llevando a una conformación de silla al sustrato (ver fig 3). Un aspecto importante es la descripción de la forma del sitio de unión al sustrato que tiene forma de zurco o herradura. Se cree que el patrón de digestión de ésta enzima se debe principalmente a la estructura, número y localización de subsitios (38) que se definen como una región de la enzima que interactúa con un residuo de glucosa del sustrato.

II.6 Reacciones de transferencia o alcoholólisis

En nuestro grupo estamos interesados en estudiar reacciones de transferencia en α -amilasa ya que ésta enzima ha sido poco estudiada para este tipo de reacciones, por lo que no se ha explotado el potencial que posee (30, 35, 36, 39, 58, 67, 68, 90, 92). Nosotros creemos que el poder sacarificante que tienen algunas α -amilasas, se relaciona con la capacidad de llevar a cabo reacciones de transferencia o transglucosidación después del rompimiento del enlace glucosídico del sustrato. Así, las α -amilasas que son licuefactantes (como el caso de la α -amilasa de *B. stearothermophilus*), prácticamente no son capaces de llevar a cabo reacciones de transferencia (Santa María, R.I., *et al.*, 1998, sometido). El modelo catalítico que proponemos se basa en el reciclado de productos de tamaño mediano (G3-G6) a oligosacáridos más grandes, que entonces pueden ser un buen sustrato para hidrólisis. Esta reacción de transglucosidación se caracteriza por transferir el grupo glucosídico a otra molécula de sustrato que funciona como aceptor, formando productos más grandes. A partir de esto, se puede utilizar un alcohol como aceptor y por lo tanto generar reacciones de alcoholólisis, dando como resultado productos como los alquilglucósidos (Santa María, R.I., *et al.*, 1998 sometido).

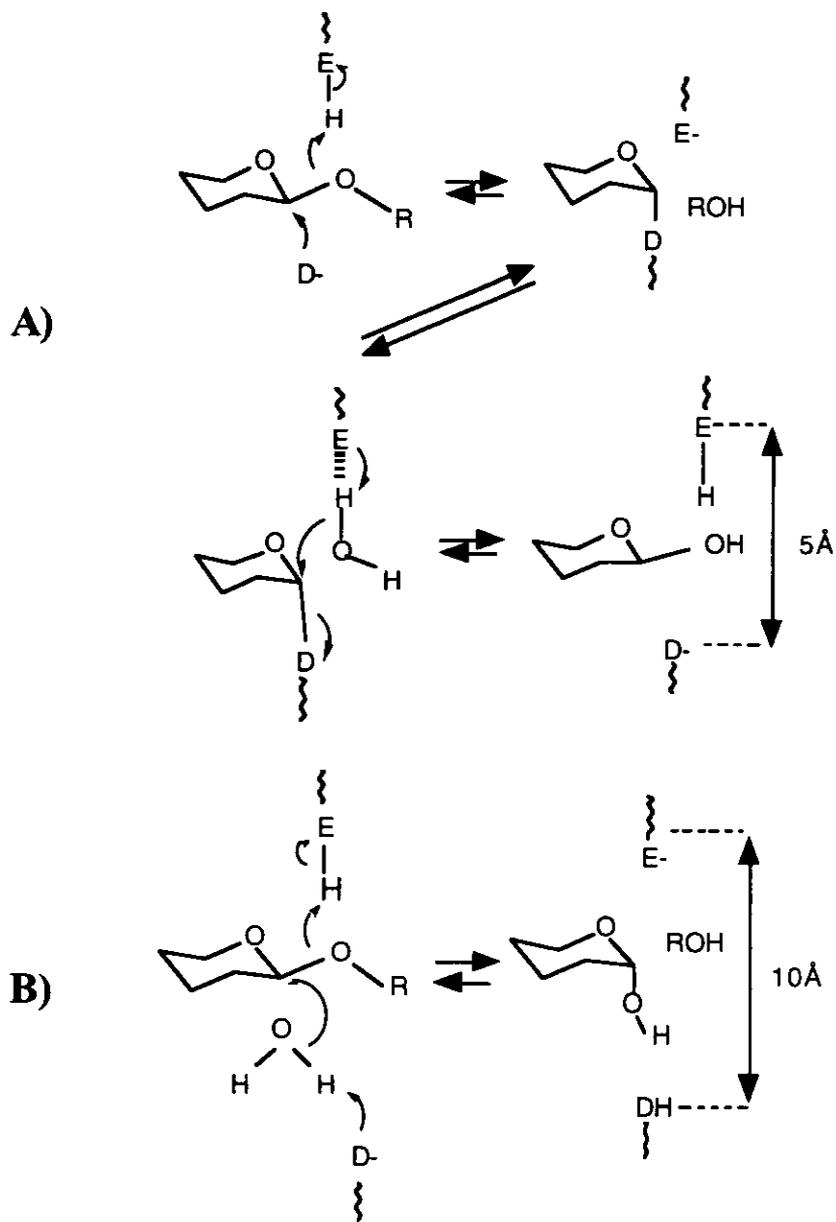


Figura 3. Mecanismo catalítico de la hidrólisis enzimática del enlace glucosídico. (A) Mecanismo de retención de la configuración del carbono anomérico en el cual el carbono anomérico es atacado por una base nucleofílica (D^-), al mismo tiempo el oxígeno glucosídico desprotona el residuo ácido (EH) que queda cargado negativamente. En un segundo paso, el ácido cargado negativamente sustrae un protón del agua, mientras que el grupo hidroxilo ataca al carbono anomérico. Al mismo tiempo la base nucleofílica sustrae el par de electrones del carbono anomérico. La distancia entre los dos residuos (EH y D^-) es de aproximadamente 5 \AA lo que impide la presencia de una molécula de agua y por lo tanto, el mecanismo se lleva a cabo en dos pasos, dando lugar a un producto con la misma estereoquímica que el sustrato. (B) Mecanismo en donde se invierte la configuración del carbono anomérico, en el cual la base nucleofílica (D^-) sustrae un protón del agua. El grupo hidroxilo ataca el carbono anomérico, quedando libre el oxígeno glucosídico que desprotona el residuo ácido (EH). La distancia entre los residuos catalíticos es de aproximadamente 10 \AA y permite el posicionamiento de una molécula de agua en el sitio catalítico, lo que permite un mecanismo concertado en el que se genera un producto con la estereoquímica opuesta al sustrato (Koshland, D. *et al.*, 1953; Henrissat, B. *et al.*, 1995; McCarter, J. *et al.*, 1994).

Los alquilglucósidos son compuestos con capacidad biosurfactante, es decir, tienen la habilidad de producir una emulsión de aceite y agua al disminuir la tensión superficial de la solución, siendo por lo tanto capaces de producir micelas, micelas invertidas y bicapas. Los biosurfactantes actúan en distintas interfases: líquido-sólido; aire-agua y aceite-agua. Estos compuestos tienen una amplia gama de usos en los procesos industriales, dentro de los cuales cabe mencionar, el espumado, solubilización, reducción de la viscosidad, emulsificación e inhibición de la corrosión, además de que tienen un valor agregado muy alto. Por sus características, estos compuestos son de gran utilidad en las industrias alimenticia, cosmética, de materiales, textil, papelera, peletera, petrolera y farmacéutica (17, 57).

La tentativa de producir biosurfactantes a partir de recursos renovables y por lo tanto biodegradables, así como modificar su producción por ingeniería de proteínas, presentan uno de los objetivos del presente trabajo (ver figura 4).

Una de las estrategias para obtener la actividad deseada de una proteína es mediante ingeniería de proteínas. La ingeniería de proteínas se basa en el análisis de estructuras tridimensionales así como de su secuencia primaria para predecir residuos importantes para la catálisis y diseñar cambios para mejorar la actividad de una enzima. Cabe mencionar que existe un esfuerzo invaluable para comprender con más detalle los aspectos bioquímicos de estas enzimas, por ejemplo, Ishikawa (42) reporta un análisis detallado de los perfiles de pH de la PPA, con el objeto de encontrar los posibles residuos de aminoácidos relacionados con la función catalítica, así como la importancia de los subsitios en la unión del sustrato y su catálisis. Asimismo Lissa Holm (38) describe algunas mutaciones puntuales llevadas a cabo en el gene de la Bsta, que identifica residuos importantes en diferentes regiones: el sitio activo, el surco de unión al sustrato y alrededor de la interfase entre los dominios A y C. Siendo de especial interés las mutaciones halladas en el surco de unión al sustrato y que además están involucradas con los subsitios. La autora muestra que la región del surco de unión al sustrato de la TAA está bloqueada por una asa entre los residuos 17-38 y 333-350. Mientras que ésta región en la α -amilasa de *B. stearothermophilus* está formada por los residuos 15-19 y 370-374, siendo mucho más pequeña respecto a la TAA. Por lo que propone que la ausencia de subsitios pueden explicar el hecho de que la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (TAA) es más sacarificante que las α -amilasas bacilares (38). Mientras que Wind (100, 101) construyó la mutante F196G de la CGTasa de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenis* EM1 para

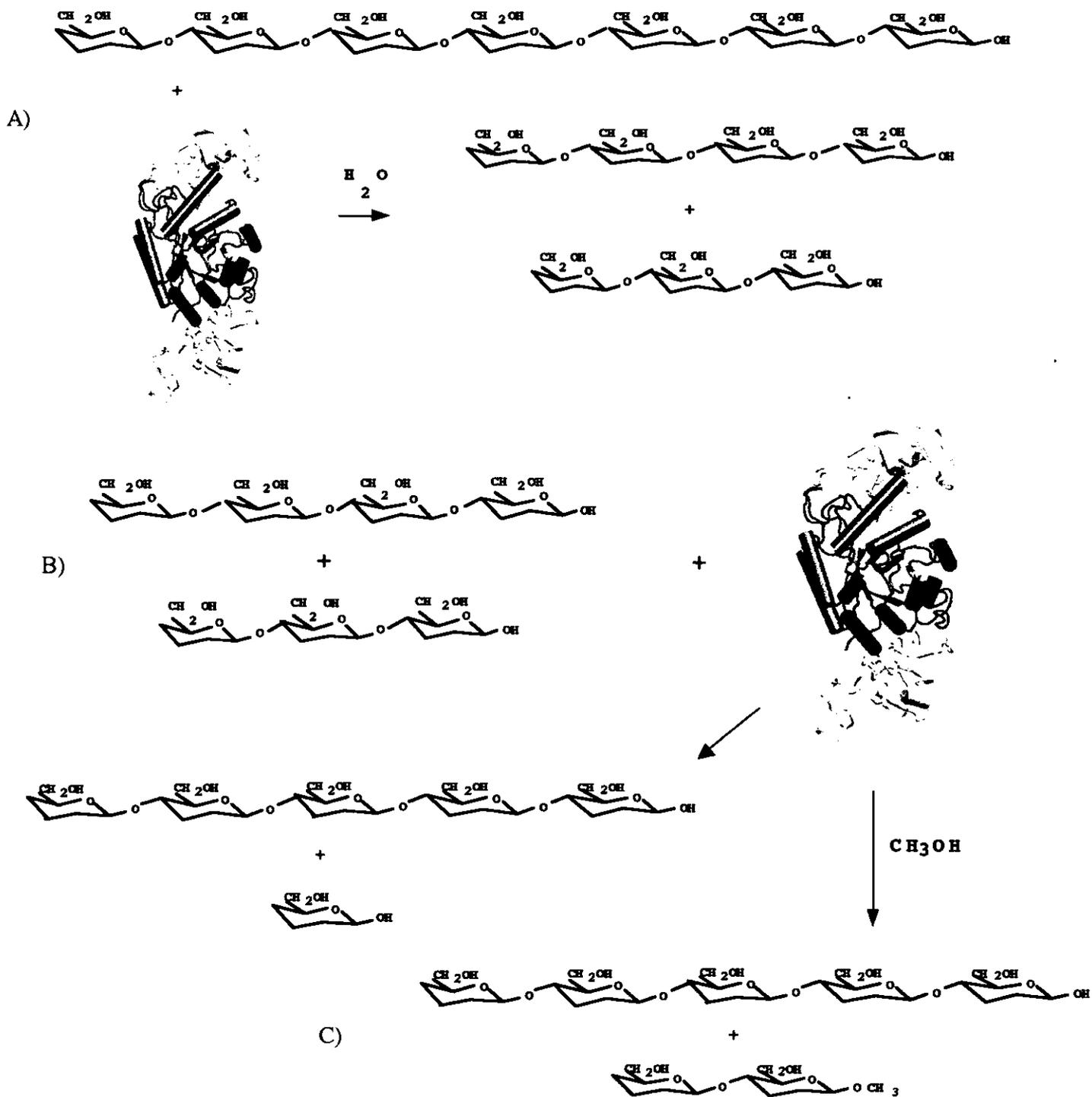


Figura 4. Modelo catalítico para la α -amilasa en reacciones de transferencia. Este modelo se basa en el reciclado de productos de tamaño mediano (G3-G6) a oligosacáridos más grandes. A) En la hidrólisis simple se rompe el enlace glucosídico del sustrato formándose dos productos. B) Las reacciones de transferencia se caracterizan por transferir el grupo glucosídico a otra molécula de sustrato que funciona como aceptor, formando productos más grandes. Alternativamente, como se observa en C), se puede utilizar un alcohol como aceptor y generar productos de alcoholólisis, por ejemplo los alquilglucósidos (SantaMaría, R.I., *et al.*, 1998. Sometido).

explicar el hecho de que este residuo juega un papel importante en la ciclización de oligosacáridos, y que surgió del análisis de secuencia entre CGTasas y α -amilasas. El residuo 196 está presente en una posición semi-conservada en el dominio B. La caracterización bioquímica de esta mutante indicó un cambio de una CGTasa a una α -amilasa que convierte el almidón a un 18 % de oligosacáridos, mientras que la producción de ciclodextrinas es de 21 %, manteniéndose las ciclodextrinas como producto principal de la actividad de esta enzima (100, 102).

Se han desarrollado distintas técnicas para comprender con más detalle los aspectos bioquímicos de estas enzimas, como es el caso del intercambio o traslocación de dominios completos para lograr una actividad combinada, estudios de plegamiento y la búsqueda de los pasos previos de la evolución química de una biomolécula (35, 36, 49, 52, 75). Por ejemplo, una α -amilasa quimérica construida a partir de dos isoenzimas de la α -amilasa del arroz mostró la hidrólisis del almidón y maltoheptaosa, sugiriendo que los módulos o dominios de enzimas homólogas son intercambiables (53, 93), siendo por lo tanto ésta estrategia una de las técnicas de evolución más exitosas para estudiar a las proteínas (30). Otras más recientes como el “DNA-shuffling”, la complementación de fragmentos y la permutación circular (36), también están teniendo una sustancial atención. El “DNAshuffling” o PCR sexual, es una herramienta de evolución dirigida *in vitro* que se basa en la recombinación homóloga de una serie de genes mutados por fragmentación al azar y después unidas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que a su vez se introducen mutaciones puntuales, todo esto con el propósito de incrementar la actividad de proteínas o rescatar enzimas con actividades mínimas (5, 19, 20, 84, 85, 102, 103, 104). La complementación de fragmentos o “medias naranjas” tiene su principio en la separación del polipéptido original en sus respectivos dominios, que a su vez mantienen un comportamiento independiente de plegamiento, así el ensamblaje de estos dominios al azar reestablece la actividad casi igual al de la proteína nativa (9, 55, 74). La permutación circular consiste en que los extremos amino y carboxilo terminal pueden ser movidos en posiciones alternadas de su estructura primaria con pequeños efectos en la estructura terciaria y su función. La alteración de una proteína por esta técnica se lleva a cabo mediante la conexión del amino o carboxilo terminal con un péptido, generando nuevos extremos amino y carboxilo terminales (27, 43). Las técnicas arriba descritas se han desarrollado para facilitar el estudio de las proteínas así como para tratar de discernir su origen evolutivo.

III Objetivos

- **Objetivo general**

Determinar la importancia del dominio B de la α -amilasa de *B. stearrowthermophilus* en reacciones de transferencia.

- **Objetivos particulares**

Construcción de una enzima quimérica mediante la traslocación del dominio B de una CGTasa de *B. circulans* a una α -amilasa de *B. stearrowthermophilus* por ingeniería de proteínas.

Producción de la enzima mutante a partir de vectores de expresión bajo diferentes promotores.

Purificación de la proteína quimérica.

Renaturalización in vitro de la proteína mutante.

Caracterización enzimática de la mutante.

Diseño experimental

Los puntos claves para la elaboración de este trabajo son los siguientes:

- Diseño de un modelo tridimensional por computadora de la proteína silvestre.
- Construcción de la mutante mediante la traslocación del dominio B de la CGTasa a la α -amilasa por PCR.
- Clonación en el vector pBGS18 bajo el promotor de Lac Z y en el vector pET bajo el promotor T7.
- Transformación de los plásmidos en las cepas JM101 y BL21 de *E. coli*.
- Optimización de las condiciones de purificación.
- Diseño de técnicas de renaturalización in vitro.
- Caracterización enzimática de la mutante.

V Material y Métodos

V.1 Alineamiento múltiple de secuencia

El alineamiento múltiple de secuencias entre la α -amilasa de Bsta; BLA y la CGTasa se realizó con la secuencias tomadas del Protein Data Bank (PDB) utilizando los programas pileup y fasta del paquete Wisconsin Package (12).

V.2 Traslocación del dominio B de una CGTasa hacia una α -amilasa

- Para la traslocación del dominio fue necesario purificar y digerir el vector pBGS18-amy-his con Nae I (reactivos de Böehringer/Mannheim), así como el diseño de cuatro oligos (A1, A2, B1, B2, para apreciar detalles de secuencia ver cuadro 3) que fueron purificados previamente en un gel de poli-acrilamida al 20 % con 8 M UREA. Posteriormente se llevaron a cabo tres PCRs distintas. Ver tabla 1.

Oligo A1 5' CGA-GGC-GGG-CGA-CGT-ATG-GTC-GAA-CAC-GAC-ATC-GGC3'
Oligo A2 5' CGC-CGA-CCT-GAA-CAA-TAA-CCA-TCC-CGA-AGT-CGT-GAC-TG3'
Oligo B1 5' ACC-ATA-CGT-CGC-CCG-CCT-CG3'
Oligo B2 5' GTT-ATG-GTT-CAG-GTC-GGC-G3'
Oligo Reverso tapón 5' GGA-ATA-GCC-GAT-CGA-GAT-CTA-GGA-AAC-AGC-TAT-GAC-CAT-G3'
Oligo Tapón 5' GGA-ATA-GCC-GAT-CGA-GAT-CT3'
Oligo Universal 5' GTT-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-GT3'

Cuadro 3 Secuencia de oligos utilizados para la traslocación del dominio B. La secuencia reverso tapón, tapón y universal se diseñaron a partir del operón lac Z dentro del plásmido pBGS18 donde se insertó el gene de la α -amilasa silvestre (Merino, E. *et al.*,1992).

Para amplificar el dominio B de la CGTasa se emplearon los oligos B1 y B2 generando el megaprimer III (ver figura 5.3). Cabe mencionar que el gene de la CGTasa se encontraba clonado en el plásmido pDP66K. Por otra parte, se utilizó el oligonucleótido A1 y el reverso tapón (RT) para amplificar de la hebra 1 a la hebra 3 de la α -amilasa generando el megaprimer I (ver figura 5.1). Para amplificar el resto del gene de la α -amilasa se recurrió a los oligos A2 y universal. Al producto de ésta PCR se le denominó megaprimer II (ver figura 5.2). Para traslocar, extender y amplificar el dominio B de la CGTasa en la α -amilasa, fue necesario llevar a cabo una última PCR que contenía los tres megaprimers así como los oligos tapón y universal, descritos anteriormente (ver figura 5.4 y 5.5).

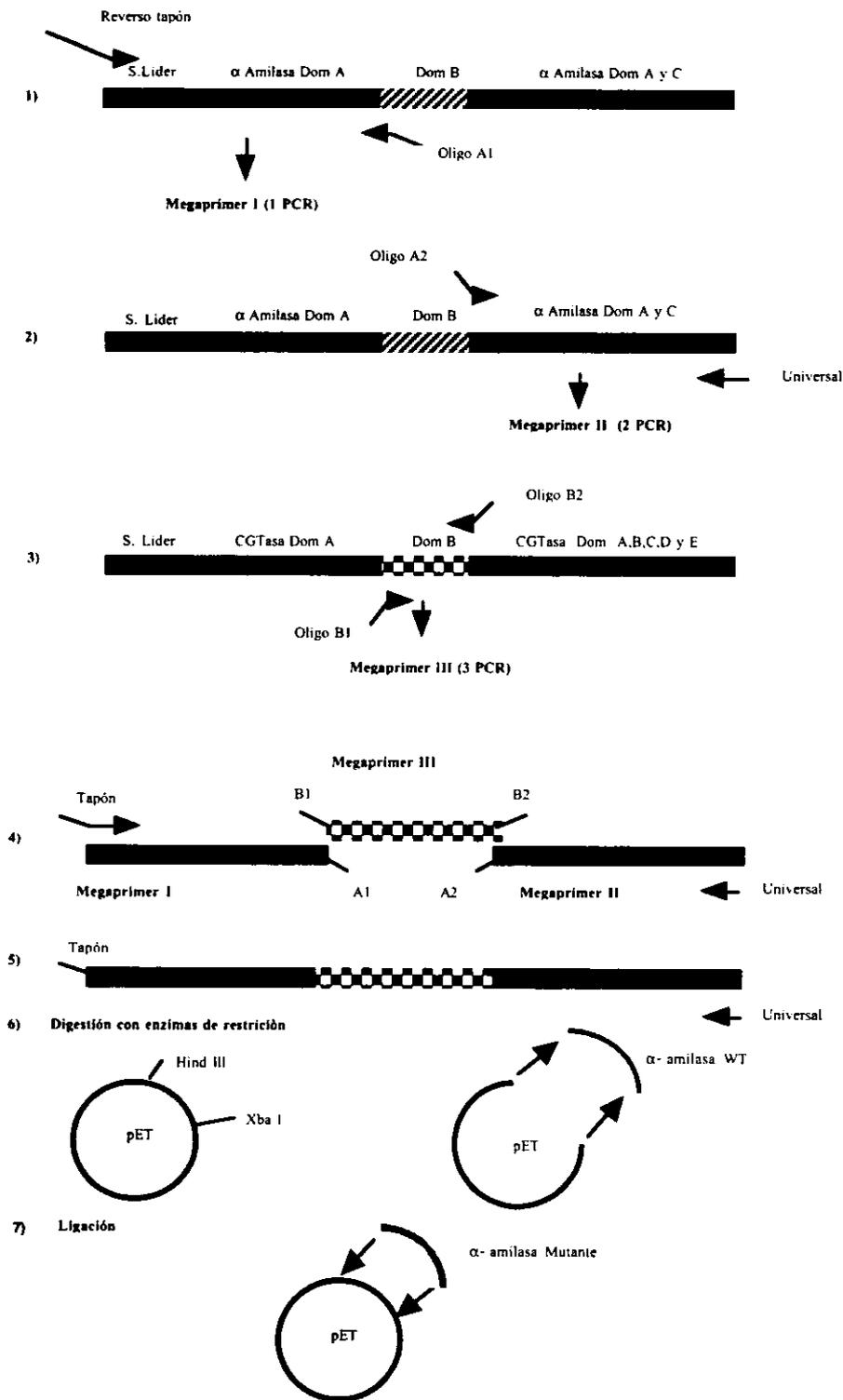


Figura 5. Estrategia para traslocar el dominio B de la CGTasa de *B. circulans* a la α -amilasa de *B. stearothermophilus* y clonación de la enzima quimérica en el vector de expresión pET, el cual se encuentra bajo el control del promotor de sobreexpresión T7. En la caricatura se aprecian las regiones de ambas enzimas: la secuencia líder (S. líder); los dominios (A,B,C,D y E); los oligos utilizados (Reverso tapón, A₁, A₂, B₁, B₂, Universal y Tapón); los megaprimer (I, II, III); las enzimas de restricción (Hind III y Xba I); el vector de sobreexpresión pET.

- Para llevar a cabo lo anterior, se utilizó la máquina de PCR (Robot cylcler con gradiente modelo número 40 de Stratagene) programada con los siguientes parámetros, (ver tabla 2).
- Tabla 1 Condiciones para la PCR

Megaprimer I	Megaprimer II	Megaprimer III
Templado PBGS 18 α -amyH3 digerido con Nae I 1 μ l	Templado PBGS 18 α -amyH3 digerido con Nae I 1 μ l	Templado pDP66K 1 μ l
Oligo A1 (40 pmoles/ μ l)	Oligo A2 (40 pmoles/ μ l)	OligoB1 (40 pmoles/ μ l) 1 μ l
Reverso tapón (40 pmoles/ μ l)	Universal (40 pmoles/ μ l)	OligoB2 (40 pmoles/ μ l) 1 μ l
Enzima (Expand/Böehringer) 10 U/ μ l	Enzima (Expand/Böehringer) 10 U/ μ l	Enzima (Expand/Böehringer) 10 U/ μ l
Buffer (Expand/Böehringer) 10 X 10 μ l	Buffer (Expand/Böehringer) 10 X 10 μ l	Buffer (Expand/Böehringer) 10 X 10 μ l
DNTPs 8 μ l	DNTPs 8 μ l	DNTPs 8 μ l
Agua bidestilada 78.2 μ l	Agua bidestilada 78.2 μ l	Agua bidestilada 78.2 μ l

- Tabla 2 Programación del Robot cylcler

Ventanas	Ventana 1	ventana 2	Ventana 3	Ventana 4
Bloques	B1 B2 B3 B4			
Temperatura °C	94 : 55 : 72 : 6	94 : 55 : 72 : 6	94 : 55 : 72 : 6	94 : 55 : 72 : 6
Tiempo (min)	6 00 00 00	1 1 2 00	00 00 10 00	00 00 00 00
No de ciclos	1	25	1	0

Una vez obtenidos los productos de PCR, se purificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Posteriormente, los fragmentos de gel con el producto de PCR purificado, fueron sometidos a una extracción fenol-cloroformo, ésto con el objeto de extraer el DNA de la agarosa. Finalmente, los fragmentos de DNA purificados se verificaron nuevamente en geles de agarosa al 1%.

V.3 Clonación en el vector pBGS18 bajo el promotor de Lac Z y en el vector pET bajo el promotor T7

El producto de la última PCR fue clonado en pBGS18 y subclonado en pET (87, 88) (ver figura 6). Los plásmidos fueron previamente digeridos con Xba I y Hind III (ver figura 5.6). Una vez digeridos se desfosforilaron con fosfatasa alcalina. La fosfatasa se inactivó calentando 10 minutos a 75°C en presencia de EDTA 5 mM a pH 8.0 (todas las enzimas utilizadas durante la elaboración de este proyecto fueron adquiridas del laboratorio Böehringer).

- La ligación se llevó a cabo a 16 °C durante toda la noche (ver figura 5.7)

V.4 Transformación de los plásmidos en la cepas JM101 y BL21 de *E. coli*

- Se llevó a cabo la transformación de los plásmidos pBGS18 que proporciona resistencia a kanamicina y pET que proporciona resistencia a ampicilina en células competentes de *E. coli* de la cepa JM101 y BL21, respectivamente. Se utilizó el electroporador *BIORAD* GENE PULSER a corriente constante de 1.8 Volts. Las células se recuperaron en medio SOC incubando a 37°C por una hora (60, 83). Posteriormente se platearon 200 µl de cultivo en placas de agar con medio LB mas antibiótico.

V.5 Confirmación de mutantes por análisis de secuencia

Se seleccionaron 5 colonias para secuenciar la región del gene donde se realizó la traslocación, y se secuenciaron siguiendo el método descrito por Sanger (81) (ver figura 7).

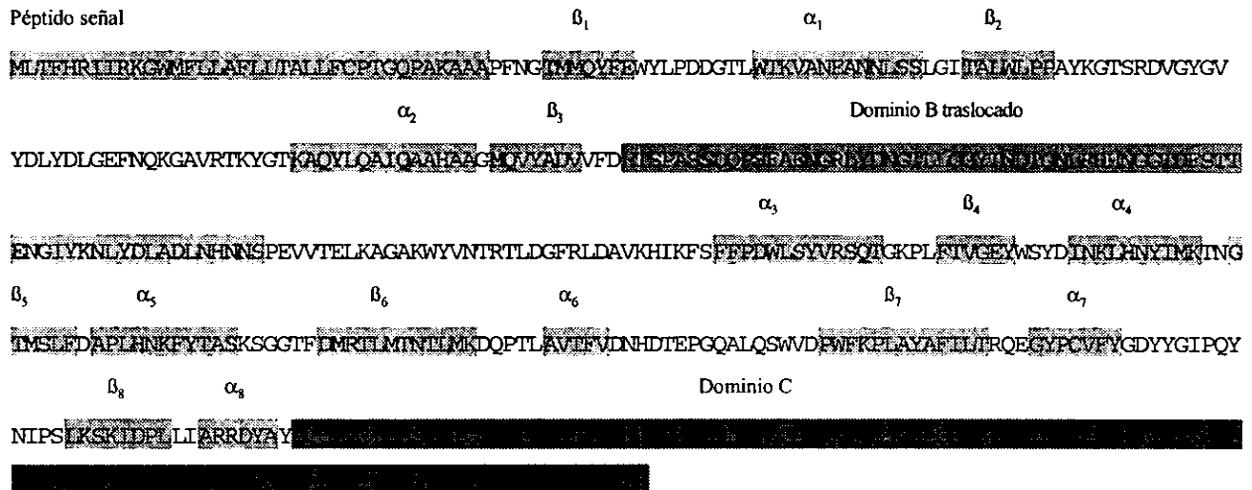


Figura (7) Estructura primaria de la α -amilasa de Bsta mutante, donde se pueden distinguir diferentes regiones de la estructura secundaria; el péptido señal; las α hélices y las hojas β alternadas (comenzando con $\beta_1, \alpha_1 \dots \beta_8$) que conforman el dominio A o dominio catalítico; el dominio B de la CGTasa traslocado y el dominio C de la alfa-amilasa.

V.6 Inducción de la sobreexpresión de la enzima quimérica

- Las células transformadas se cultivaron en 1L de medio mínimo M9 a 30°C con agitación constante toda la noche. La inducción de la sobreexpresión de la proteína quimérica se realizó con isopropilthio-β-galactósido (IPTG) 1 mM hasta que la lectura del cultivo en el espectrofotómetro llegara a una densidad optica (O.D₆₀₀) de 0.5.

V.7 Purificación de la proteína mutante con colas de histidina en condiciones desnaturalizantes

- Una vez sobreexpresada la proteína mutante, el cultivo se centrifugó a 10000 revoluciones por minuto (rpm) por 30 min en una centrífuga Beckman JA201. La lisis se realizó en 40 ml de la solución A. Se agitó vigorosamente durante aproximadamente 1 hr. Se centrifugó la muestra a 10000 rpms por 20 min. El sobrenadante se filtró con membranas de 0.4 μm. Se agregaron 500 μl de agarosa con níquel NTA de QIAGEN al filtrado y se agitó cuidadosamente a 4°C por 45 min. Una vez montada la columna con la proteína se realizaron lavados con 4 ml de la solución A; el segundo lavado se realizó con la solución B hasta obtener una lectura (O.D.₂₈₀) de 0.01; en el tercer lavado se utilizó la solución C hasta obtener una lectura (O.D.₂₈₀) menor o igual a 0.01. Finalmente, se llevó a cabo la elución con 1ml de la solución D (ver tabla 4).
- Una vez obtenida la proteína purificada por columna de Ni⁺⁺ se corrió un gel de poliacrilamida al 10 % a 20 mA 100 V aproximadamente por 2 hrs en una cámara de electroforesis Hoefer Scientific Instruments (HIS) modelo SE280.
- **Tabla 4 Soluciones para purificar proteínas en condiciones desnaturalizantes.**

Solución A	Solución B	Solución C	Solución D
6 M Guanidinio/HCl	8 M UREA	8 M UREA	200 mM de imidazol
100 mM de fosfato de sodio monobásico			
10 mM TRIS/HCl	10 mM TRIS/HCl	10 mM TRIS/HCl	10 mM TRIS/HCl 8 M UREA
pH 8.0	pH 8.0	pH 6.3	pH 6.3

V.8 Renaturalización *in vitro* de la enzima quimérica

Se probaron diferentes estrategias para renaturalizar la proteína mutante:

- La primera estrategia consistió en diluir el agente desnaturante 1:20 en buffer de renaturalización en presencia de agentes antioxidantes como el ditioneitol (DTT) 1 mM. Para ello, se adicionó lentamente la proteína desnaturada con cargas de 10 µl sobre el buffer de replegado a pH 5.5, con agitación constante y a 4°C (ver tabla 5). Una vez renaturalizada, se concentró la proteína a 4°C con la ayuda de un dispositivo Amicon con una membrana de ultrafiltración de 10 KDa hasta reducir su volumen 4 veces aproximadamente. Una vez concentrada la proteína, se dializó toda la noche con agitación constante en buffer con TRIS 20 mM; CaCl₂ y Glicerol 1.63 M y a 4°C. Posteriormente se realizó un mini ensayo de actividad con almidón soluble al 1 % en buffer MOPS y en buffer de replegado.
- Debido a que esta estrategia no dió buenos resultados, se decidió intentar una segunda estrategia en donde coexpresamos las chaperonas GROEL Y GROES (23, 28, 34, 98) con nuestra proteína mutante. Lo anterior se realizó con el objeto de obtener actividad en la fracción soluble contenida en el sobrenadante. El sobrenadante obtenido fue sometido a un mini ensayo de actividad con almidón soluble al 1 % en buffer MOPS y en buffer de replegado.
- Ya que el método anterior no dió resultado, decidimos probar una tercera estrategia en donde aumentamos la concentración de DTT de 1 M a 2M y al buffer de replegado le agregamos trimetilamina n-óxido (TMAO) 2.7 M ya que ésta sustancia ayuda desde el punto de vista termodinámico a que proteínas desplegadas se plieguen (6, 7). La proteína desplegada se depositó con cargas de 10 µl en el buffer de replegado a pH 6.5 a 4°C con agitación constante (ver tabla 5). Se concentró la proteína quimérica a 4°C con la ayuda de una membrana Amicon de ultrafiltración de 10 Kda hasta reducir su volumen 4 veces aproximadamente. La proteína concentrada se dializó toda la noche con agitación constante en buffer con TRIS 20 mM; CaCl₂ y Glicerol 1.63 M a 4°C. Se realizó un mini ensayo de actividad con almidón soluble al 1 % en buffer MOPS y en buffer de replegado.

Finalmente se intentó replegar la proteína quimérica por medio de una columna de renaturalización que contenía, disulfuro isomerasas (DsbAs), peptidil-prolil isomerasas y minichaperonas (GROEL y GROES). Esta columna fué proporcionada gentilmente por la Dra. Myriam Altamirano (3, 4, 97). Se realizó un ensayo previo de renaturalización en la proteína silvestre con el objeto de probar el buen funcionamiento de la columna. Una vez llevado a cabo lo anterior, decidimos replegar la enzima quimérica. Para replegar la proteína mutante a partir de una columna de renaturalización que contiene minichaperonas fue necesario incubar a temperatura ambiente 100 μ l de la proteína quimérica desnaturalizada con DTT a una concentración final de 10 mM en agitación constante por 2 hrs. Posteriormente se adicionó la proteína quimérica en lotes de 10 μ l a la columna con mini-chaperonas previamente equilibrada con el buffer de replegado (ver tabla 5), manteniéndose a temperatura ambiente y con agitación constante durante 4 hrs. Una vez replegada la proteína quimérica, se centrifugó la columna con minichaperonas para recuperar la proteína mutante contenida en el sobrenadante. Se concentró la proteína quimérica a 4°C con ayuda de un dispositivo Amicon que contenía una membrana de ultrafiltración de 10 KDa hasta reducir su volumen 4 veces aproximadamente. La proteína concentrada se dializó toda la noche con agitación constante en buffer con TRIS 20 mM; CaCl₂ 1 mM y Glicerol 1.63 M a 4°C. Se realizó un mini ensayo de actividad con almidón soluble al 1 % en buffer MOPS y en buffer de replegado.

- Tabla 5 Diferentes estrategias seguidas para el replegado de la proteína quimérica

Estrategia 1	Estrategia 2	Estrategia 3	Estrategia 4
Buffer de replegado:	Buffer de replegado:	Buffer de replegado:	Buffer de replegado:
TRIS 20 mM	TRIS 20 mM	TRIS 20 mM	TRIS 20 mM
DTT 1mM	DTT 1mM	DTT 2mM	DTT 2mM
CaCl ₂ 1 mM			
	GROEL y GROES	TMAO 2.7 M	TMAO 2.7 M
		Glicerol 1.63 M	Glicerol 1.63 M
pH 5.5	PH 6.5	pH 6.5	Columna c/minichaperonas pH 6.5

El análisis de secuencia sugiere que existe una región involucrada con la termoestabilidad de la enzima entre el residuo 205-227 de la numeración de la Bsta y no sólo la región hallada por Igarashi (41). Es decir, creemos que existe una coordinación entre los residuos de aminoácidos de esta región y el ión Ca^{++} que se encuentra entre el dominio B y el dominio catalítico. La coordinación de enlaces establecidos por el Ca^{++} y los residuos de la región termoestable le dan a la enzima una rigidez en su estructura, permitiendo que soporte altas temperaturas.

Los residuos propuestos para unir Ca^{++} en la CGTasa coinciden en el alineamiento, sin embargo, un análisis de estructura reveló que los sitios de unión a Ca^{++} distan de la región del dominio B, por lo que se derivaron dos importantes propuestas. La primera de ellas establece que sí es posible modificar la distancia entre los residuos involucrados en la coordinación con iones específicos, es decir, la naturaleza nos está mostrando que se puede explotar la posibilidad de establecer contactos sin la necesidad de utilizar iones metálicos. Esto sin lugar a duda llama la atención de los que se encargan de procesos industriales a gran escala, ya que el proceso involucrado para retirar iones como el Ca^{++} es muy costoso. La segunda propuesta se basa en el hecho de que no fue posible obtener la proteína mutante soluble debido a que no se formó una coordinación adecuada entre el dominio traslocado de la CGTasa y el sitio catalítico de la Bsta. Ambas propuestas en sí nos muestran que se está haciendo lo posible para entender las reglas para diseñar una proteína a partir de la información de su estructura terciaria.

A través del análisis de secuencia del alineamiento múltiple entre diferentes α -amilasas (hidrolasas) y CGTasas (transferasas), fue posible reconocer la variabilidad en secuencia del dominio B en α -amilasas tanto en organismos termófilos como en organismos mesófilos (ver figura 9). Algo que llamó nuestra atención fue que a pesar de esta variabilidad existen regiones o residuos que están bien conservados. Los residuos de Gly y las regiones KWHWYHFD y PGR en las α -amilasas nos sugieren que muy probablemente jueguen un papel importante en la estructura de estas enzimas, por lo que hacer mutagénesis al azar en ésta región resultaría muy interesante. Más aún, si ponemos algo de atención en la región conservada con los residuos PGR, la prolina en esta región podría tener alguna relación importante de tipo estructural, por ejemplo la movilidad o flexibilidad del dominio. Asimismo, se ha contemplado que residuos que se encuentran en la vecindad de prolinas están generalmente cargados positivamente, como el caso de la glicina y la arginina. Estos residuos promueven una conformación *cis* de la prolina evitando un conflicto estérico que resultaría de una conformación *trans* (63, 99). Por otro lado, las enzimas que llevan a cabo reacciones de transferencia muestran un grado de similitud mayor en el dominio B, quizá esta diferencia sea la clave para reconocer los residuos involucrados en las diferencias catalíticas entre estas enzimas involucrando directamente al dominio B.

VI.2 Mutagénesis dirigida para la construcción de la proteína quimérica

Una vez realizado el análisis de secuencia, recurrimos a la mutagénesis dirigida para construir la enzima quimérica. Para llevar a cabo la construcción se realizaron diferentes PCRs (ver figura 5), como resultado de estas PCRs, se obtuvieron tres fragmentos de distinto tamaño; el primero se denominó megaprimer I de 0.5 Kb; el segundo fragmento fue denominado megaprimer III de aproximadamente 1.2 KB, mientras que el tercer fragmento fue nombrado megaprimer II con un peso de 0.3 Kb. A partir de estos fragmentos se obtuvo la construcción del gene de la α -amilasa quimérica con un peso de 2 Kb como se muestra en la figura 10.

VI.3 Expresión heteróloga de la proteína quimérica en *E. coli* y purificación de la proteína mutante

Una vez obtenida la construcción del gene de la enzima quimérica, nos avocamos a la expresión heteróloga de proteínas en *E. coli*, con el objeto de obtener la nueva variante modificada por mutagénesis en una cantidad considerable y facilitar su purificación. Partimos de un sistema de expresión bajo el control del promotor del operón de Lac Z inducible con IPTG contenido en el plásmido pBGS18 (ver figura 5) dando como resultado una pobre expresión de la proteína y por lo tanto indetectable en gel de poliacrilamida. Por lo anterior decidimos subclonar el gene de la enzima mutante en el vector de expresión pET bajo el control del promotor del fago T7 (87,88) inducible con IPTG. Con este sistema logramos que se excediera la producción que normalmente es extraída de la fuente natural.

La expresión heteróloga de proteínas en *E. coli* nos ayudó a identificar a la α -amilasa mutante a partir de la sobreexpresión en el vector pET bajo el control del promotor T7 con un tamaño de 53.69 KDa respecto a la α -amilasa silvestre de 58.7 KDa en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % (ver figura 11). Un problema metodológico asociado con la purificación de proteínas no propias de *E. coli* a partir de su sobreexpresión es la formación de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son agregados insolubles de proteína que se precipitan, por lo que la proteína recombinante tiene que ser solubilizada de dichos cuerpos de inclusión (10, 15, 77, 78, 89).

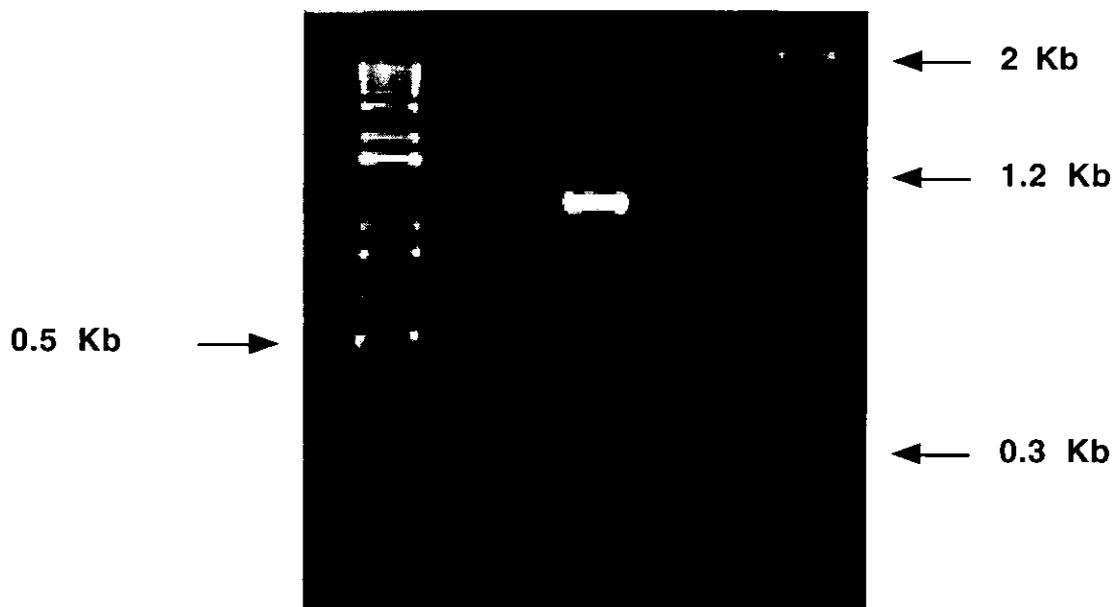


Figura 10. Extensión y amplificación de las PCRs. Gel de agarosa al 1 % que contiene el producto de diferentes PCRs. Se cargó en el carril 1 el marcador de pesos moleculares de 1 kilobase (Kb); en el carril 2, el megaprimer I con aproximadamente 500 pares de bases (pb); en el carril 3, el megaprimer III de aproximadamente 1200 pb; en el carril 4, el megaprimer II de aproximadamente 300 pb; en el carril 5 el producto de PCR de 2 Kb que corresponde a la reconstrucción del gene de la α -amilasa quimérica.

VI.4 Renaturalización in vitro de la proteína quimérica

El principio de regeneración de proteínas a partir de cuerpos de inclusión se basa en la solubilización de proteínas agregadas mediante el uso de desnaturalizantes fuertes como la UREA, seguido de una reactivación de la proteína bajo condiciones controladas de plegamiento. Dado este problema, buscamos diferentes alternativas para lograr solubilizar a las proteínas que conforman los cuerpos de inclusión. Aún no está claro qué es lo que induce la formación de cuerpos de inclusión, no obstante, existen varias propuestas al respecto. La primera de ellas se basa en una competencia entre la velocidad de plegamiento y de agregación, así como por la solubilidad y estabilidad termodinámica de intermediarios de plegamiento. Mientras que la segunda propuesta toma como base la velocidad de expresión a la que la proteína se está produciendo y procesando (10, 23). En el caso de la enzima mutante, nosotros creemos que se debe a la combinación de ambos efectos. Además creemos que la formación de cuerpos de inclusión por el estado agregado de la enzima quimérica representó una ventaja ya que la mantuvo insoluble, quedando protegida de la actividad proteolítica.

En nuestro caso desafortunadamente no fue posible replegar la proteína quimérica desnaturalizada sólo con buffer de replegado, por lo que recurrimos a la coexpresión de la proteína mutante con chaperonas. Las chaperonas, de manera general, son proteínas encargadas de asistir a otras proteínas para que obtengan un plegamiento adecuado, estas proteínas se encuentran distribuidas en el citoplasma de *E. coli*, mientras que en eucariotes se localizan tanto en citoplasma como en el interior de diferentes organelos. Nosotros pensamos que la proteína quimérica una vez que fue producida por la maquinaria traduccional, muy probablemente adquiriría una conformación adecuada al ser asistida por GroEL/GroES para obtener un plegamiento adecuado y al mismo tiempo ser transportada hacia el periplasma (23, 28, 34, 98). Sin embargo no fue posible replegarla, esto nos sugirió que la proteína sencillamente no fue transportada hacia el periplasma y que se encontraba en general en cuerpos de inclusión.

Por lo anterior decidimos buscar otras alternativas para renaturalizar a la enzima mutante. Basados en que la naturaleza ha utilizado el enorme potencial que tiene una solución dada (medio en donde se encuentran embebidas las proteínas) para mantener la estructura y función de las proteínas, encontramos que osmolitos orgánicos como el TMAO forzan, desde el punto de vista termodinámico a que proteínas desplegadas se plieguen (6). El TMAO es una sustancia que se localiza en células de elasmobranquios (tiburones y rayas). Esta sustancia ayuda a estabilizar a las

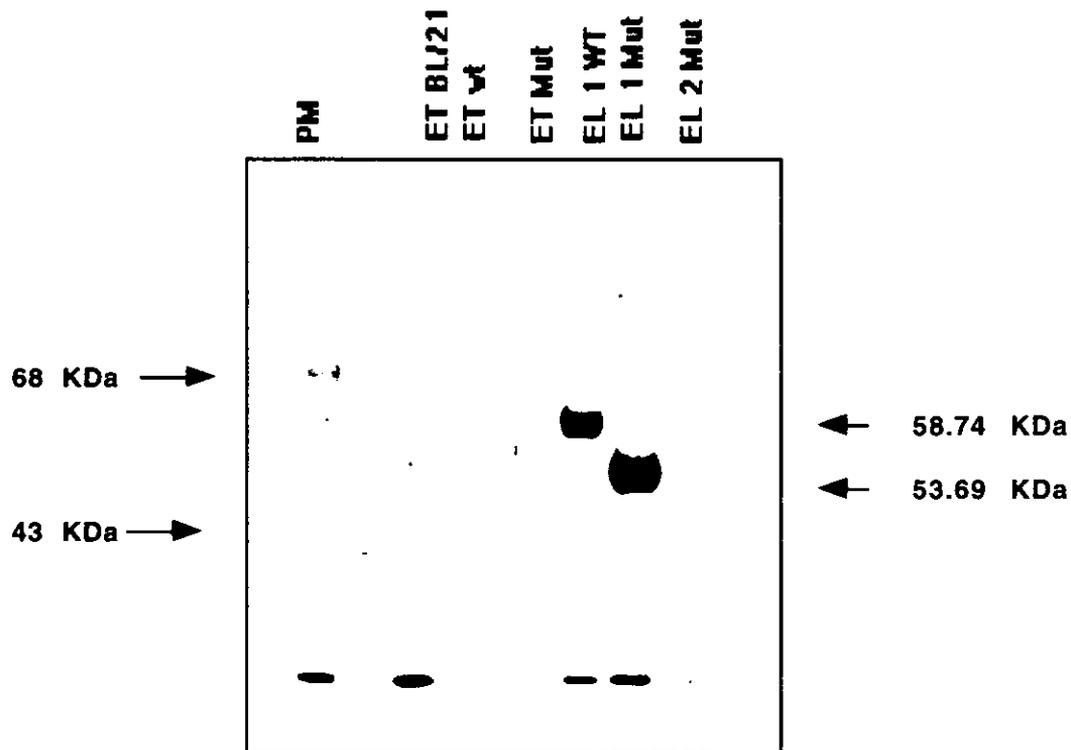


Figura 11. Expresión y purificación de la proteína mutante en un SDS-PAGE al 10 %. Sobreexpresión de la proteína mutante (Mut) y de la proteína silvestre (WT) y la diferencia en tamaños entre estas dos enzimas expresado en kilodaltones (KDa); en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (PM) de 200 KDa; en el carril 2, el extracto total de la cepa BL/21 (ET BL/21); en el carril 3, el extracto total con la proteína silvestre (ET WT); en el carril 4, el extracto total con la enzima mutante (ET Mut); en el carril 5, la elución de la proteína wt (ELWT) después de un paso previo de purificación a través de columnas de afinidad de Ni^{++} ; en el carril 6 la elución 1 de la enzima mutante (EL Mut1) y en el carril 7 la elución 2 de la misma enzima (EL Mut 2). Lo anterior se llevo acabo con una columna de Ni^{++} bajo condiciones desnaturizantes ya que las proteínas se encontraban en cuerpos de inclusión.

proteínas intracelulares de la presencia de UREA y ha sido utilizada para aumentar el rendimiento de repliegado en otras proteínas (6, 7, 10). Dado lo anterior, decidimos agregar el TMAO a nuestra solución de renaturalización, obteniendo una solución más viscosa y que en un principio le proporcionaría un medio adecuado para que indujera a la α -amilasa mutante a obtener una estructura estable. Desafortunadamente para nuestra enzima esto no fue posible.

En los casos anteriores se observó la proteína agregada. El estado agregado de una proteína es el mal plegamiento de la estructura tridimensional de la misma, dando como resultado una proteína insoluble e inactiva. La renaturalización óptima de la proteína depende en gran medida de

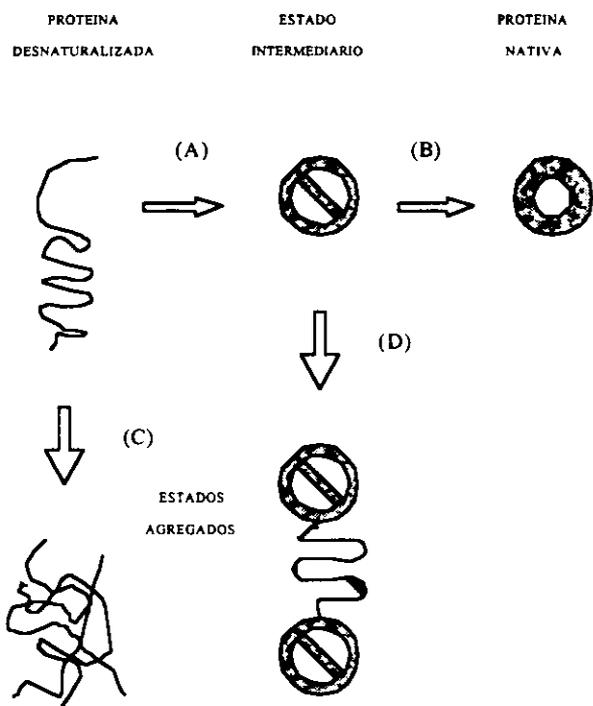


Figura 12. Cinética de plegamiento que explica la producción de agregados de proteínas. (A) Formación del estado intermedio de plegamiento a partir de la proteína desnaturalizada. (B) Cambios de conformación del estado intermedio para dar como resultado al estado nativo. (C) Estado agregado de varias proteínas desnaturalizadas. (D) Condición de agregados entre estados intermedios unidos por proteínas desnaturalizadas.

mantener bajas concentraciones de la proteína durante la renaturalización para evitar la formación de agregados, por lo que se adicionan pequeñas fracciones a grandes volúmenes de buffer de renaturalización lentamente y con agitación constante. La dinámica de plegamiento de una proteína puede ser explicada en el siguiente esquema, donde la proteína desnaturalizada pasa a un estado intermedio de plegamiento para finalmente dar el estado nativo. Lo anterior es siguiendo una dinámica normal de plegamiento, sin embargo, existe la posibilidad de formar un estado en donde varias moléculas de la proteína semi-desnaturalizada se asocian entre sí produciendo agregados que evitan que se pliegue correctamente. La otra posibilidad de formar agregados es que una vez que se formó el estado intermedio, éste puede unirse a otra molécula de la misma condición mediante enlaces disulfuro entre proteínas desnaturalizadas, evitando que se llegue al estado nativo (ver figura 12).

La otra alternativa para renaturalizar la enzima quimérica fue replegarla con un columna que contenía un fragmento (residuos 191-345) de GroEL, el cual puede prevenir el estado agregado de la proteína; DSbA la cual cataliza la formación de puentes disulfuro oxidados y la peptidil-prolil-isomerasa, que cataliza la isomerización *cis-trans* de enlaces peptidil-prolina (3, 4). El principio en el que se basa es en la inmovilización del fragmento de chaperonas en un gel de agarosa, para que luego así puedan unirse las proteínas con plegamiento inadecuado, hasta que el plegamiento sea el correcto y las minichaperonas ya no tengan afinidad por ésta. Una vez replegada y con una estructura estable se liberan en la solución de replegado. Algo notable fue que con este método, a diferencia de los otros, no se observaron agregados. Sin embargo no se logró obtener la actividad de la proteína mutante. La enzima silvestre se sometió al mismo tratamiento que la enzima quimérica, lográndose replegar. Esto nos sugirió que la proteína mutante no era estable o en su defecto era estable pero no activa, la única respuesta a esto nos lo darían estudios de plegamiento, por lo que se decidió hacer un ensayo de fluorescencia para obtener datos cualitativos. Sin embargo, la cantidad de proteína obtenida a partir de la columna no fue lo suficiente para hacer mediciones confiables (ver figura 13).

VI.5 Estabilidad de la enzima quimérica

Nosotros proponemos que la naturaleza ha utilizado como estrategia la mutagénesis en los dominios para explotar diferentes condiciones ambientales, por ejemplo, temperaturas extremas. Los dominios juegan un papel muy importante para generar una amplia diversidad de catálisis bajo un mismo plegamiento (21). Por lo tanto son críticos los cambios efectuados en las regiones conservadas de los dominios para la identidad tanto estructural como funcional de cualquier enzima. Por lo que las regiones conservadas o semiconservadas en el dominio de la α -amilasa de *B. stearothermophilus* llamaron nuestra atención, ya que están relacionadas (como se muestra en las figuras 8 y 9) con un residuo de prolina y con residuos que interaccionan principalmente con grupos metálicos tales como el Ca^{++} o iones como el Cl^- o el Na^+ (65, 66). En el primer caso, permite una estructura más robusta a partir del posicionamiento adecuado de estructuras secundarias. Mientras que en el segundo, está relacionado con interacciones moleculares tipo salino. Lo anterior pone en claro una estrategia para matener una estructura rígida y funcional. Al parecer, el papel del Ca^{++} es indispensable para mantener la estructura funcional de esta enzima ya que existe la posibilidad de que ciertos residuos estén coordinando sus enlaces con este ión.

Finalmente, basados en los resultados obtenidos en el presente trabajo, nosotros especulamos que la enzima quimérica está exponiendo residuos hidrofóbicos que desestabilizan la estructura, promoviendo siempre un estado inactivo. Por otro lado también suponemos que la actividad o la estructura de la enzima quimérica fue afectada al realizar el intercambio de dominios, ya que en el dominio nativo existe una región conservada que está relacionada con la termoestabilidad, mientras que en el dominio traslocado esta región no está presente.

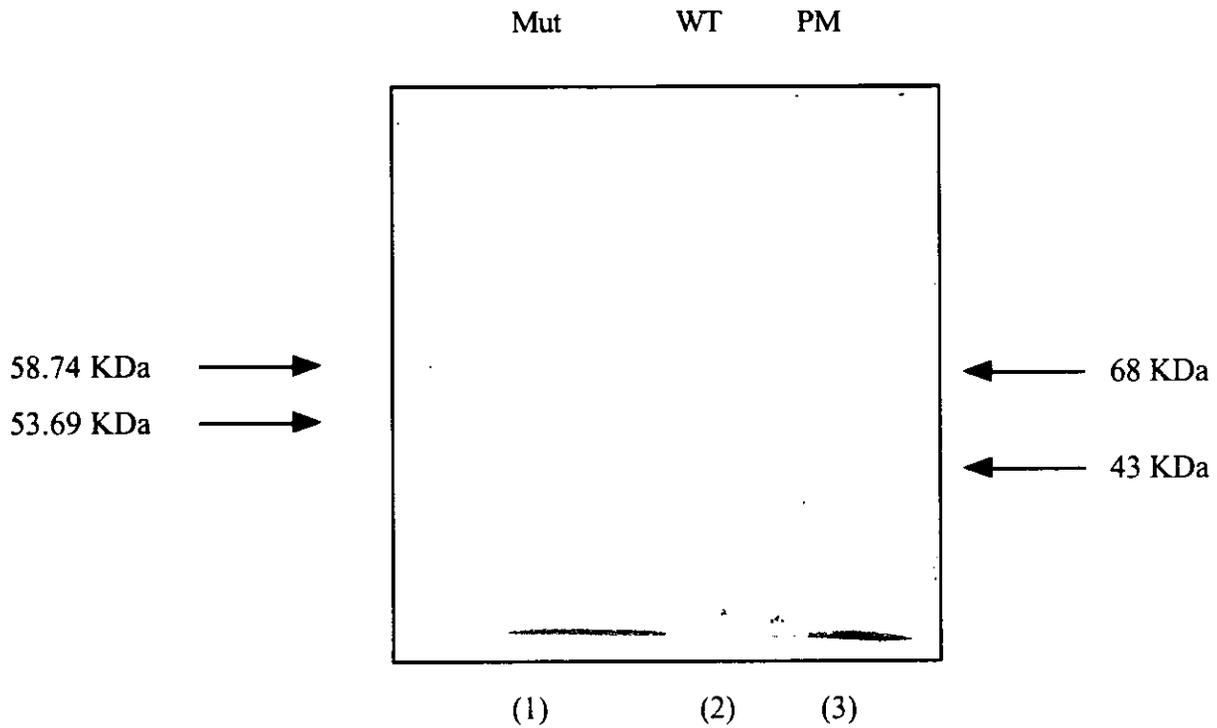


Figura (13) Recuperación de la proteína mutante y silvestre en un gel de SDS-PAGE al 10 %. Proteína recuperada después del tratamiento con la columna de minichaperonas y posteriormente concentrada en un dispositivo Amycon. Se cargaron aproximadamente 25 μ l por muestra. (1) Carril cargado con la enzima mutante (Mut). (2) Carril cargado con la enzima silvestre (WT). (3) Carril 3 cargado con marcador de peso molecular (PM) de 200 KDa.

Conclusiones

La modificación o traslocación de un dominio que en principio interaccionaba muy poco con el resto de la proteína fue suficiente para desestabilizar e impedir un plegamiento adecuado en la proteína quimérica. Esto nos llevó a pensar que el dominio B de la α -amilasa de *B. stearothermophilus* juega un papel fundamental para mantener la estructura tridimensional de esta enzima, ya que a pesar de que se conoce bien la estabilidad de estructuras tipo barril TIM (8, 13, 64, 80) existen otros factores estructurales que no se han tomado en cuenta y que son importantes para el diseño de proteínas. Nosotros nos percatamos de dos factores estructurales importantes, el primero está basado en las diferencias encontradas entre las secuencias de la α -amilasa de Bsta, α -amilasa de BLA y la CGTasa de *B. circulans*, mientras que el segundo se basó en el análisis de alineamiento de estructura entre diferentes hidrolasas. El primero de estos factores es una región involucrada con la estabilidad de la enzima; esta región está presente únicamente en el dominio B en la α -amilasa de Bsta y la α -amilasa de BLA, mientras que la misma región se encuentra ausente en el dominio B de la CGTasa. Esta región encontrada en el dominio B, explica la estabilidad de la enzima en términos de una coordinación de enlaces entre iones metálicos tales como el Ca^{++} o iones Cl^- o Na^+ con ciertos residuos de esta región. El segundo factor también es una secuencia bien conservada entre α -amilasas de organismos termófilos (P^{145} G^{146} R^{147} numeración de la Bsta). Este hallazgo nos hace pensar en el papel de las prolina para estabilizar la estructura tridimensional de una enzima, es decir, los residuos de prolina juegan un papel primordial en la rigidez de la estructura (63, 69), ya que permiten posicionar correctamente una beta plegada presente en éste dominio, esto provoca una disminución local de entropía y al mismo tiempo aumentan la estabilidad global de la enzima. Finalmente, si se contara con un método de selección para la α -amilasa, la enzima quimérica hubiese sido sometida a pruebas de evolución dirigida, como mutagénesis al azar y PCR sexual o "DNA shuffling", como lo que se realizó con la proteína verde fluorescente (20). Esto último, con el objeto de obtener a la enzima quimérica soluble y, por lo tanto, funcional.

Perspectivas

La naturaleza tiene la oportunidad de explorar distintos diseños para generar una amplia diversidad de catálisis con un mismo plegamiento, gracias a que cuenta con medios de selección idóneos para evolucionar cualquier enzima. Creemos que es importante diseñar un medio de selección para la α -amilasa, con el objeto de recuperar la actividad y mejorar la estabilidad de la enzima mutante mediante mutagénesis al azar y PCR sexual o “DNA shuffling”. Con un medio de selección, podemos pensar en generar mutantes con un aumento en la estabilidad y solubilidad respecto a la enzima silvestre y más aún, con una actividad catalítica específica para ciertos procesos industriales. Por último, estamos seguros que en un futuro cercano, podremos entender algunas de las reglas (que por lo pronto falta por descubrir) para diseñar y construir enzimas por ingeniería de proteínas.

BIBLIOGRAFIA

1. Aghajari, N., et al., Crystal structures of the psychrophilic alpha-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci*, 1998. 7(3): p. 564-572.
2. Aghajari, N., et al., Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of alpha- amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *Protein Sci*, 1996. 5(10): p. 2128-2129.
3. Altamirano, M.M., et al., Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(8): p. 3576-3578.
4. Altamirano, M.M., et al., Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nature Biotechnology*, 1999. 17: p. 187-191.
5. Arnold, F. H. (1998). "Enzyme engineering reaches the boiling point." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2035-2036.
6. Baskakov, I. and D.W. Bolen, Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. *J Biol Chem*, 1998. 273(9): p. 4831-4834.
7. Baskakov, I. and D.W. Bolen, Time-dependent effects of trimethylamine-N-oxide/urea on lactate dehydrogenase activity: an unexplored dimension of the adaptation paradigm. *Biophys J*, 1998. 74(5): p. 2658-2665.
8. Beatsy, A.M., C.R. Matthews, Effects of the phenylalanine-22-leucine, glutamic acid-49-methionine, glycine-234-lysine mutations on the folding and stability of the alpha subunit of tryptophan synthase from *E. coli*. *Biochemistry*, 1986.25(10): p. 2965-2974.
9. Bertolaet, B.L. and J.R. Knowles, Complementation of fragments of triosephosphate isomerase defined by exon boundaries. *Biochemistry*, 1995. 34(17): p. 5736-5743.
10. Betton, J. and M. Hofnung, Folding of a mutant maltose-binding protein of *Escherichia coli* which forms inclusion bodies. *J Biol Chem*, 1996. 271(14): p. 8046-8052.
11. Brayer, G.D., Y. Luo, and S.G. Withers, The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci*, 1995. 4(9): p. 1730-1742.
12. Brenner, S.E., et al., Assessing sequence comparison methods with structurally identified distant evolutionary relationship. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(11): p. 6073-6078.
13. Brzovic, P.S., E.W. Miles., Characterization of the functional role of a flexible loop in the alpha subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium* by rapid scanning, stopped-flow spectroscopy and site directed mutagenesis. *Biochemistry*, 1993. 32(39): p. 10404-10413.
14. Brzozowski, A.M. and G.J. Davies, Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, 1997. 36(36): p. 10837-10845.
15. Buchner, J. and R. Rudolph, Routes to active proteins from transformed microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, 1991. 2(4): p. 532-538.
16. Buisson, G., et al., Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *Embo J*, 1987. 6(13): p. 3909-3916.

17. Cardamone, M., et al., A spectroscopic and equilibrium binding analysis of cationic detergent- protein interactions using soluble and insoluble recombinant porcine growth hormone. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1206(1): p. 71-82.
18. Crabb, W.D. and Mitchinson, Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Tibtech*, 1997. (15): p.349-352.
19. Cramer, A., S. A. Raillard, et al. (1998). "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution." *Nature* 391(6664): 288-291.
20. Cramer, A., P.C. Stemmer, et al. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology* 14: 315-319.
21. Creighton, T.E., *Proteins, structures and molecular properties*. W. H. Freeman. 1993.p 244-249
22. Davies, G. and B. Henrissat, *Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases*. *Structure*, 1995. 3(9): p. 853-859.
23. De Bernardez, C.E., Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998(9): p. 157-163.
24. Declerck, N., et al., Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase: multiple amino acid replacements and molecular modelling. *Protein Eng*, 1995. 8(10): p. 1029-1037.
25. Declerck, N., et al., Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase: thermodynamic studies and structural interpretation. *Protein Eng*, 1997. 10(5): p. 541-549.
26. Del-Rio, G., E. Morett, and X. Soberon, Did cyclodextrin glycosyltransferases evolve from alpha-amylases? *Febs Lett*, 1997. 416(2): p. 221-224.
27. Eder, J. and K. Kirschner, Stable substructures of eightfold beta alpha-barrel proteins: fragment complementation of phosphoribosylanthranilate isomerase. *Biochemistry*, 1992. 31(14): p. 3617-3625.
28. Fayet, O., J.M. Louarn, and C. Georgopoulos, Suppression of the *Escherichia coli* dnaA46 mutation by amplification of the groES and groEL genes. *Mol Gen Genet*, 1986. 202(3): p. 435-445.
29. Feller, G., et al., Stability and structural analysis of alpha-amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *Eur J Biochem*, 1994. 222(2): p. 441-447.
30. Fuchs, M. A. a. B., Christiane (1997). "The role of peptide modules in protein evolution." *Biophysical Chemistry*(66): 203-210.
31. Fujimoto, Z., et al., Crystal structure of a catalytic-site mutant alpha-amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *J Mol Biol*, 1998. 277(2): p. 393-407.
32. Fujiwara, S., et al., Analysis of mutations in cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. *J Bacteriol*, 1992. 174(22): p. 7478-7481.
33. Fujiwara, S., et al., Cyclization characteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the NH2-terminal region of the enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 1992. 58(12): p. 4016-4025.
34. Govezensky, D., et al., Involvement of GroEL in nif gene regulation and nitrogenase assembly. *J Bacteriol*, 1991. 173(20): p. 6339-6346.

35. Hasson, M.S., et al., Evolution of an enzyme active site: the structure of a new crystal form of muconate lactonizing enzyme compared with mandelate racemase and enolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(18): p. 10396-10401.
36. Hedstrom, L. (1994). "Engineering for redesign." *Current Opinion in Structural Biology*(4): 608-611.
37. Henrissat, B., et al., Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(11): p. 5674.
38. Holm, L., et al., Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Protein Eng*, 1990. 3(3): p. 181-191.
39. Ibuka, A., et al., Conversion of neopullulanase-alpha-amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 into an amylopullulanase-type enzyme. *J Biochem (Tokyo)*, 1998. 123(2): p. 275-282.
40. Igarashi, K., et al., Enzymatic properties of a novel liquefying alpha-amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Appl Environ Microbiol*, 1998. 64(9): p. 3282-3289.
41. Igarashi, K., et al., Improved thermostability of a *Bacillus* alpha-amylase by deletion of an arginine-glycine residue is caused by enhanced calcium binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 248(2): p. 372-377.
42. Ishikawa, K., et al., Substrate-dependent shift of optimum pH in porcine pancreatic alpha- amylase-catalyzed reactions. *Biochemistry*, 1990. 29(30): p. 7119-7123.
43. Iwakura, M. and T. Nakamura, Effects of the length of a glycine linker connecting the N-and C- termini of a circularly permuted dihydrofolate reductase. *Protein Eng*, 1998. 11(8): p. 707-713.
44. Janecek, S. and S. Balaz, Functionally essential, invariant glutamate near the C-terminus of strand beta 5 in various (alpha/beta)₈-barrel enzymes as a possible indicator of their evolutionary relatedness. *Protein Eng*, 1995. 8(8): p. 809-813.
45. Janecek, S., alpha-Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol*, 1997. 67(1): p. 67-97.
46. Janecek, S., B. Svensson, and B. Henrissat, Domain evolution in the alpha-amylase family. *J Mol Evol*, 1997. 45(3): p. 322-331.
47. Janecek, S., Close evolutionary relatedness among functionally distantly related members of the (alpha/beta)₈-barrel glycosyl hydrolases suggested by the similarity of their fifth conserved sequence region. *Febs Lett*, 1995. 377(1): p. 6-8.
48. Janecek, S., Does the increased hydrophobicity of the interior and hydrophilicity of the exterior of an enzyme structure reflect its increased thermostability? *Int J Biol Macromol*, 1993. 15(5): p. 317-318.
49. Janecek, S., Parallel beta/alpha-barrels of alpha-amylase, cyclodextrin glycosyltransferase and oligo-1,6-glucosidase versus the barrel of beta- amylase: evolutionary distance is a reflection of unrelated sequences. *Febs Lett*, 1994. 353(2): p. 119-123.
50. Janecek, S., Sequence similarities in (alpha/beta)₈-barrel enzymes revealed by conserved regions of alpha-amylase. *Febs Lett*, 1993. 316(1): p. 23-26.

51. Jespersen, H.M., et al., Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic (beta/alpha)₈-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J Protein Chem*, 1993. 12(6): p. 791-805.
52. Jones, S., M. Stewart, et al. (1998). "Domain assignment for protein structures using a consensus approach: characterization and analysis." *Protein Sci* 7(2): 233-242.
53. Juge, N., B. Svensson, and G. Williamson, Secretion, purification, and characterisation of barley alpha-amylase produced by heterologous gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998. 49(4): p. 385-392.
54. Kadziola, A., M. Sogaard, et al. (1998). "Molecular structure of a barley alpha-amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis." *J Mol Biol* 278(1): 205-217.
55. Kishan, R., et al., Modular mutagenesis of a TIM-barrel enzyme: the crystal structure of a chimeric *E. coli* TIM having the eighth beta alpha-unit replaced by the equivalent unit of chicken TIM. *Protein Eng*, 1994. 7(8): p. 945-951.
56. Knegtel, R.M., et al., Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 with natural substrates and products. *J Biol Chem*, 1995. 270(49): p. 29256-29264.
57. Kosaric, N. *Biosurfactants, Production, Properties and Applications*, Marcel Dekker, NY, 1993, Vol.48.
58. Kuriki, T., et al., Controlling substrate preference and transglycosylation activity of neopullulanase by manipulating steric constraint and hydrophobicity in active center. *J Biol Chem*, 1996. 271(29): p. 17321-17329.
59. Lawson, C.L., et al., Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose- dependent crystal form. *J Mol Biol*, 1994. 236(2): p. 590-600.
60. Lee, S., et al., A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Biotechniques*. 1994. (16): p. 206-208.
61. MacBeath, G., P. Kast, et al. (1998). "Redesigning enzyme topology by directed evolution." *Science* 279(5358): 1958-1961.
62. MacGregor, E.A., H.M. Jespersen, and B. Svensson, A circularly permuted alpha-amylase-type alpha/beta-barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *Febs Lett*, 1996. 378(3): p. 263-266.
63. Malcolm, W. MacArtur and Janet M. Thornton. Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.*, 1991. 218, p. 397-412.
64. Matthews, C.R., M.M. Crisanti. Effect of a single amino substitution on the folding of the alpha subunit of tryptophan synthase. *Biochemistry*, 1983. 22(6): p. 1445-1452.
65. Machius, M., G. Wiegand, and R. Huber, Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* alpha-amylase at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol*, 1995. 246(4): p. 545-559.

83. Siguret, V., et al., A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Biotechniques*. 1994. (16): p. 422-426.
84. Stemmer, W. P. (1994). "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling." *Nature* 370(6488): 389-391.
85. Stemmer, W.P., DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(22): p. 10747-10751.
86. Strokopytov, B., et al., X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. *Biochemistry*, 1995. 34(7): p. 2234-2240.
87. Studier, F. W. (1991). "Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system." *J Mol Biol* 219(1): 37-44.
88. Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* 189(1): 113-130.
89. Suominen, I., et al., Effects of signal peptide mutations on processing of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1995: p. 649-654.
90. Svensson, B., Protein engineering in the alpha-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol Biol*, 1994. 25(2): p. 141-157.
91. Takase, K., Site-directed mutagenesis reveals critical importance of the catalytic site in the binding of alpha-amylase by wheat proteinaceous inhibitor. *Biochemistry*, 1994. 33(25): p. 7925-7930.
92. Takata, H., et al., Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at alpha-(1----4)- and alpha-(1----6)-glucosidic linkages. *J Biol Chem*, 1992. 267(26): p. 18447-18452.
93. Terashima, M., et al., Characterization of rice alpha-amylase isozymes expressed by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995. 43(6): p. 1050-1055.
94. Vihinen, M. and P. Mantsala, Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* alpha- amylase. *Biotechnol Appl Biochem*, 1990. 12(4): p. 427-435.
95. Vihinen, M. and P. Mantsala, Microbial amylolytic enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1989. 24(4): p. 329-418.
96. Vihinen, M., et al., Site-directed mutagenesis of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues. *J Biochem (Tokyo)*, 1990. 107(2): p. 267-272.
97. Werner, M.H., et al., Refolding proteins by gel filtration chromatography. *Febs Lett*, 1994. 345(2-3): p. 125-130.
98. Widersten, M., Heterologous expression in *Escherichia coli* of soluble active-site random mutants of haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 by coexpression of molecular chaperonins GroEL/ES. *Protein Expr Purif*, 1998. 13(3): p. 389-395.
99. Williams, J.C., et al., Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convrt a mesophilic enzima into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein engineering*, 1999. 12(3): p. 243-250.

100. Wind, R.D., et al., Cyclodextrin formation by the thermostable alpha-amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. *Appl Environ Microbiol*, 1995. 61(4): p. 1257-1265.
101. Wind, R.D., R.M. Buitelaar, and L. Dijkhuizen, Engineering of factors determining alpha-amylase and cyclodextrin glycosyltransferase specificity in the cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *Eur J Biochem*, 1998. 253(3): p. 598-605.
102. Zhang, J.H., G. Dawes, and W.P. Stemmer, Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(9): p. 4504-4509.
103. Zhao, H. and F.H. Arnold, Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(15): p. 7997-8000.
104. Zhao, H. and F.H. Arnold, Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(6): p. 1307-1308.