



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de una esterasa de *Alicyclophilus* sp. BQ1
inducida por *N*-metil-2-pirrolidona y análisis *in silico*
de su interacción con posibles sustratos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q. F. B. Jacqueline Fuentes Jaime

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Herminia Loza Tavera

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Amelia Farrés González Sarabia Facultad de Química, UNAM
Dr. Alejandro Sosa Peinado Facultad de Medicina, UNAM

MÉXICO, D. F., abril, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los proyectos CONACYT 82881, DGAPA-PAPIIT-UNAM IN222811 e IN217114.

A CONACYT por la beca que me otorgó para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas durante el período comprendido entre enero 2012 y enero 2014.

A DGAPA-PAPIIT-UNAM IN217114 por la beca que me otorgó para la conclusión de este trabajo (abril-junio 2014).

Al PAEP por el apoyo para asistir al Tercer Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias realizado del 3-7 de octubre de 2013 en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por permitir integrarme a su grupo de investigación.

Al Dr. Martín Vargas Suárez por su apoyo incondicional, consejos, sugerencias y disponibilidad bajo cualquier circunstancia.

A los miembros de mi comité tutorial Dra. Amelia Farrés González Sarabia y Dr. Alejandro Sosa Peinado por sus sugerencias durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Ignacio Regla (FES-Zaragoza, UNAM) por el diseño y síntesis del compuesto bis (4-nitrofenil) hexano-1,6-diil-dicarbamato.

Al Dr. Lenin Domínguez Ramírez por su asesoría en los acoplamiento *in silico*.

Al laboratorio de Físicoquímica de proteínas de la Facultad de Medicina donde se realizaron los acoplamiento flexibles.

A los miembros de mi jurado de examen por las sugerencias para la mejora de la presentación e interpretación de los resultados.

A mis compañeros del laboratorio 105 por las horas de pláticas, risas y diversión.



A Cate, por apoyarme, guiarme y alentarme a no olvidar mis sueños.

A Klebe, por recordarme a diario lo divertida que es la vida.

A aquel ángel maravilloso que ha alimentado mi alma y esencia durante todo este trayecto.



Abreviaturas

ADA	ácido adípico
CATH	class, architecture, topology and homologous superfamily
GC-MS	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
DEG	dietilenglicol
DLH	dienolactona hidrolasa
DO	densidad óptica
DPG	dipropilenglicol
EC	extracto citósolico
EM	extracto membranal
GABA	ácido γ -amino butírico
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kcal	kilocaloría
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	molar
MDI	4,4'-diisocianato de difenilmetano
MFS	Major Facilitator Superfamily
min	minutos
mL	mililitros
nano LC-ESI-MS/MS	cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
μL	microlitros
MM	medio mínimo
MM-PUh	medio mínimo con Hydroform [®]
MUB	butirato de 4-metil umbeliferona
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
ON	overnight



PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PU	poliuretano
RMSD	Root Mean Square Deviation
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
SDS	dodecil sulfato de sodio
TDI	2,4-diisocianato de tolueno
UV	ultravioleta



Contenido

Agradecimientos	ii
Abreviaturas	iv
Índice de tablas y figuras	ix
1. Resumen	xii
1. Abstract	xiv
2. Introducción	16
3. Hipótesis	19
4. Objetivo general	20
5. Metas	20
6. Estrategia experimental	21
7. Marco teórico	22
7.1 Poliuretano (PU)	22
7.2. <i>N</i> -metil-2-pirrolidona (NMP)	25
7.3. Biodegradación del PU	26
7.4. Hidrolasas	29
7.5. Características del género <i>Alicyclophilus</i>	33
8. Materiales y métodos	35
8.1. Activación de la cepa BQ1 y determinación de la inducibilidad de la esterasa de 24 kDa empleando diferentes fuentes de carbono	35
8.2. Extracción y cuantificación de proteínas	35
8.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	36
8.4. Zimografía para actividad esterasa	36
8.5. Purificación parcial de la esterasa de 24 kDa de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1	37



8.6. Geles de doble dimensión de alta resolución.....	38
8.6.1. Preparación de las proteínas.....	39
8.6.2. Primera dimensión.....	39
8.6.3. Segunda dimensión.....	40
8.7. Identificación de la proteína mediante nano LC-ESI-MS/MS	41
8.8. Clonación de los genes y expresión de las proteínas recombinantes....	42
8.8.1. Obtención y purificación de DNA genómico de BQ1	42
8.8.2. Amplificación de los genes <i>lamB/ycsf</i> y <i>dlh</i> mediante PCR	42
8.8.3. Clonación de los productos en el vector pET-21a	42
8.8.4. Inducción de las proteínas recombinantes	43
8.9. Modelaje de interacciones proteína-ligando por acoplamiento molecular <i>in silico</i>	44
8.9.1. Modelaje tridimensional de las proteínas	44
8.9.2. Preparación estructural de los ligandos.....	44
8.9.3. Acoplamiento molecular	45
8.9.4. Análisis post-docking.....	45
9. Resultados y discusión	46
9.1. Inducción de una esterasa de 24 kDa de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1.....	46
9.2. Identificación de la esterasa de 24 kDa mediante espectrometría de masas nano-LC-ESI-MS/MS.....	52
9.3. LamB/YcsF	55
9.4. Dienolactona hidrolasa (DLH).....	62
9.5. Expresión de las proteínas recombinantes LamB/YcsF y DLH.....	64
9.6. Análisis <i>in silico</i> de acoplamientos moleculares de LamB/YcsF y DLH con posibles substratos	66
10. Conclusiones.....	92



Apéndice 1. Medios de cultivo, soluciones y protocolos generales	93
Apéndice 2. Proteínas identificadas mediante nano LC-ESI-MS/MS	101
Apéndice 3. Clonación de los genes <i>lamb/ycsf</i> y <i>dlh</i>.	110
11. Bibliografía.....	112



Índice de tablas y figuras

Figura 1.	Reacción de síntesis del PU.....	22
Figura 2.	Clasificación del PU de acuerdo al tipo de polirol empleado.....	23
Figura 3.	Estructura química de la NMP.....	24
Figura 4.	Propuesta de los productos de hidrólisis para un PS-PU sintetizado a partir de poli(dietilenglicol adipato) y 2,4-tolileno diisocianato.....	28
Figura 5.	Estructura canónica del plegamiento α/β hidrolasa.....	32
Figura 6.	Patrón de proteínas y zimografía para actividad esterasa en medio LB y MM-PUh.....	45
Figura 7.	Fundamento de la reacción empleada en la zimografía para esterases.....	46
Figura 8.	Zimografía para esterases de los extractos citosólico y membranal de BQ1 cultivada en medio mínimo con tributirina (1% v/v).....	47
Figura 9.	Zimografía para esterases de los extractos citosólico y membranal de BQ1 cultivada en medio mínimo con aceite de oliva (1% v/v).....	48
Figura 10.	Comparación del patrón de esterases del extracto citosólico de BQ1 en medio mínimo adicionado con NMP(2.5 mg/mL) y LB.....	50
Figura 11.	Doble dimensión del EC de BQ1 cultivada en NMP (2.5 mg/mL), sin previa electroelución y eluido con el equipo Whole Gel Eluter.....	53
Figura 12.	Metabolismo de la 2-pirrolidona en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
Figura 13.	Contexto genómico del gen <i>lamb/yicsf</i> de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1.....	61
Figura 14.	Reacción catalizada por la DLH.....	63
Figura 15.	Amplificación del gen <i>lamb/yicsf</i> y <i>dlh</i> mediante PCR en gradiente...	64
Figura 16.	Inducción de la proteína recombinante LamB/YcsF.....	66
Figura 17.	Estructuras modeladas de los ligandos empleados en los acoplamientos moleculares.....	69
Figura 18.	Estructuras idealizadas de los PU's.....	73



Figura 19. Estructuras terciarias de LamB/YcsF y DLH de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1.....	71
Figura 20. Alineamiento de la secuencia LamB/YcsF de BQ1 con las reportadas en el PDB.....	73
Figura 21. Localización espacial del probable agujero oxaniónico de LamB/YcsF de BQ1.....	74
Figura 22. Localización espacial de la probable tríada catalítica de LamB/YcsF de BQ1.....	76
Figura 23. Acoplamiento molecular de LamB/YcsF con los ligandos MUB, NMP y NFHDC.....	78
Figura 24. Acoplamiento molecular de LamB/YcsF con los ligandos tipo poliuretano DPG-ADA-TDI.PU y DEG-ADA-MDI.PU.....	79
Figura 25. Energías de afinidad de los acoplamiento formados por diversos ligandos con LamB/YcsF de BQ1.....	81
Figura 26. Alineamiento de las secuencias de la DLH de BQ1, <i>Pseudomonas</i> sp. B13 y <i>Anabaena variabilis</i>	83
Figura 27. Estructura terciaria de la DLH de BQ1 y localización espacial de la tríada catalítica.....	84
Figura 28. Acoplamiento flexible de la DLH con los ligandos MUB, NMP y NFHDC.....	86
Figura 29. Acoplamiento flexible de la DLH con los ligandos tipo poliuretano DEG-ADA-MDI.PU y DPG-ADA-TDI.PU.....	87
Figura 30. Energías de afinidad de los complejos formados por diversos ligandos con la DLH de BQ1.....	88



Tabla 1.	Algunos polioles y diisocianatos empleados en la síntesis del PU.....	22
Tabla 2.	Actividades enzimáticas bacterianas relacionadas con la degradación del PU.....	27
Tabla 3.	Características generales de los genomas de <i>Alicyclophilus denitrificans</i> BC y K601 ^T	29
Tabla 4.	Familias de proteínas que conforman la subfamilia de las glicósido hidrolasas/deacetilasas (cd10785).....	59
Tabla 5	Proteínas de la familia LamB/YcsF reportadas en el PDB.....	60
Tabla 6.	Algunas DLH reportadas en el PDB.....	62
Tabla 7.	Ligandos modelados para ser empleados en los acoplamientos moleculares.....	68
Tabla 8.	Valores de RMSD (Root Mean Square Deviation) de los ligandos respecto a LamB/YcsF.....	81
Tabla 9	Valores de RMSD (Root Mean Square Deviation) de los ligandos respecto a DLH.....	88



1. Resumen

Trabajando con la bacteria *Alicyclophilus* sp. BQ1 en nuestro laboratorio se ha demostrado que cuando se cultiva en un barniz de poliéster poliuretano (PU) (Hydroform®) como única fuente de carbono, se induce en el citosol una actividad esterasa de 24 kDa, no presente cuando se cultiva en medio rico Luria-Bertani. Esta expresión diferencial nos condujo a pensar que esta esterasa podría estar involucrada en la degradación del PU, por lo que se propuso identificarla y estudiar su actividad enzimática empleando proteína recombinante. Como primera aproximación, observamos que la esterasa de 24 kDa era también diferencialmente expresada en *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), débilmente expresada en tributirina y no expresada en aceite de oliva, por lo que decidimos estudiar la esterasa de 24 kDa que se induce en NMP. Para aislar e identificar esta proteína se implementó un protocolo de geles en doble dimensión revelados por zimografía para esterases, con el cual se lograron detectar varias manchas de 24 kDa con esta actividad. El análisis por espectrometría de masas de una de estas manchas con actividad esterasa identificó, en dos experimentos independientes, varias proteínas en las que sólo dos correspondían a enzimas hidrolíticas. Una de ellas, identificada con una cobertura de 59%, pertenece a la familia LamB/YcsF, incluida dentro de la subfamilia de las glicósido hidrolasas/deacetilasas. LamB/YcsF ha sido relacionada con la utilización de lactamas, sugiriendo que podría ser una lactamasa con actividad amidasa. La otra proteína, identificada con una cobertura de 10%, fue una dieno lactona hidrolasa (DLH), la cual cataliza la conversión de *cis* o *trans*-4-carboximetilen-2-en-4-olida (dienolactona) a maleil acetato, siendo una esterasa. Considerando que la proteína de interés se induce con NMP, que la identificación de esta proteína fue con base en una zimografía para esterases y dado que algunas amidasas pueden presentar actividad esterasa, se propuso que la proteína encontrada, ya sea LamB/YcsF o DLH, podría actuar como amidasa sobre NMP y como esterasa hidrolizando el enlace éster del 4-metilumbeliferil butirato (MUB), substrato de la zimografía. Para probar esta hipótesis clonamos los genes *lamb/ycsf* y *dlh* de BQ1 en el vector pET 21a con el objetivo de producir proteína recombinante para ensayos enzimáticos con



estos substratos. Debido a que después de algunos intentos no fue posible obtener proteína recombinante activa para realizar los ensayos enzimáticos, decidimos analizar bioinformáticamente la posibilidad de que estas proteínas pudieran formar complejos con estos ligandos, empleando una aproximación *in silico* denominada acoplamiento molecular (docking). Asimismo, dado que esta bacteria es capaz de hidrolizar PU (Oceguera *et al.*, 2007), también exploramos *in silico*, la posibilidad de que estas proteínas pudieran interactuar con moléculas conteniendo grupos carbamato, los cuales contienen enlaces amida y son parte de la estructura del PU. Primeramente y dado que no está reportado el sitio catalítico de LamB/YcsF, mediante alineamientos y con modelaje tridimensional de la proteína, se identificó una probable tríada catalítica conformada por D10, C223 y H225, los cuales son residuos característicos de hidrolasas. Los residuos catalíticos de la DLH de *Pseudomonas* sp. B13 están ya reportados y son C123, D171 y H202, los cuales equivalen a la S112, D162 y H190 de BQ1. Una vez identificados los sitios catalíticos se realizaron los acoplamientos moleculares, encontrando que para LamB/YcsF los ligandos conteniendo el enlace carbamato, además de los formados con la MUB y la NMP se acercaron al sitio catalítico propuesto con energías cercanas a -8 kcal/mol y RMSD menores a 2 Å. Para la DLH, fue necesario flexibilizar la tríada catalítica para lograr que los ligandos se acercaran al sitio catalítico. Con esta modificación, tanto los ligandos conteniendo los enlaces carbamato así como la MUB y la NMP se localizaron cerca de la tríada catalítica con energías menores a -6 kcal/mol y RMSD menores a 3.41 Å. Estos resultados sugieren que es probable que ambas proteínas puedan hidrolizar el enlace éster del MUB, además de los enlaces amida de la NMP y de los dicarbamatos presentes en la estructura del PU. Sin embargo, con base en los porcentajes de cobertura de la espectrometría de masas, la localización espacial y la distancia de los ligandos respecto a los aminoácidos catalíticos, los valores de afinidad y de RMSD consideramos que la proteína con actividad esterasa, expresada de manera diferencial en el medio mínimo adicionado con NMP, y aislada e identificada mediante espectrometría de masas tiene mayor probabilidad de corresponder a LamB/YscF. Datos experimentales que soporten esta propuesta son necesarios para dar información concluyente.



1. Abstract

In our group we study the bacterium *Alicyclophilus* sp. BQ1 as a model to understand the mechanism this bacterium uses to degrade polyurethane (PU). We have shown by esterase zymography (using as substrate 4-methylumbelliferyl butyrate (MUB)) that a 24 kDa cytosolic esterase activity is induced when BQ1 is cultured in a minimal media with a water based polyester (PS)-PU varnish (Hydroform[®]) as the sole carbon source, but not in the rich medium Luria-Bertani. This differential expression led us to hypothesize that this esterase could be involved in PU degradation. So, we set out to identify and study its enzymatic activity using recombinant protein. As a first approach, we demonstrated that the 24 kDa esterase was also expressed in *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), weakly expressed in tributyrin and not expressed in olive oil. In order to identify the protein exhibiting the esterase activity, we resolved fractionated cytosolic extracts by two-dimensional gel electrophoresis, identified several spots with esterase activity, and analyzed them by nano-LC-ESI-MS/MS. Spectrometry analysis of one spot with esterase activity identified in two independent experiments reported several proteins as possible hits, but only two of them were hydrolases. One of them, with 59% coverage turned out to be a LamB/YcsF protein, which belongs to the subfamily of the glycoside hydrolase/deacetylase. LamB/YcsF has been associated with the use of lactams, suggesting that it may be a lactamase, although has not been demonstrated. The other identified hydrolase, showing 10% percent coverage, was a DLH which catalyzes the conversion of dienolactone to maleyl acetate. Considering the protein interest is induced with NMP, that the identification of this protein was based on esterase's zymography and knowing some amidases may have esterase activity, we suggested the identified protein, either LamB/YcsF or DLH, could act as amidase for NMP and as esterase hidrolizing the MUB's ester bond. To test this hypothesis we cloned the BQ1's genes *lamb/ycsf* and *dlh* in the pET-21a vector in order to produce recombinant protein for enzyme assays with these substrates. After some attempts it was not possible to obtain active recombinant protein, so we decided analyze *in silico* by



molecular docking the possibility these proteins could form complexes with these ligands. Also, since BQ1 is able to hydrolyze PU's ester bonds (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007) also we explored *in silico* the possibility these proteins could interact with molecules containing carbamate groups. As the catalytic site of LamB/YcsF has not been reported, a likely catalytic triad was identified by alignments (Clustal W) and tridimensional modeling. The triad consisted of D10, C223, and H225, characteristic residues of esterases and proteases-type hydrolases. The DLH catalytic residues from *Pseudomonas* sp. B13 are already reported: C123, D171 and H202, which are equivalent to S 112, D162 and H190 of BQ1. After identification of the potential catalytic sites, molecular docking was carried out. For LamB/YcsF complexes formed with ligands containing carbamate bounds, besides those formed with MUB and NMP, approached the proposed catalytic site with energies closer than -8 kcal/mol and RMSD lower than 2Å. However, for DLH, it was necessary to perform a flexible docking to allow the ligands reach the catalytic site. With this approach all the ligands were located near the catalytic triad with energies lower than -6 kcal/mol and RMSD lower than 3.41 Å. These results suggest that both proteins could hydrolyze the ester bond of the MUB, in addition to the amide bond of the NMP and the amide bonds of the carbamate present in the PU's structure. However, given the coverage percentages of mass spectrometry, the spatial location and the distance of the ligands relative to the catalytic amino acids, the affinity values and the RMSD values, we consider the esterase expressed differentially in minimal medium supplemented with NMP, and isolated and identified by mass spectrometry is more likely to correspond to LamB/YscF. Further, if the esterase activity detected actually corresponded to an amidase, as suggested by molecular docking analysis, it would be possible then that LamB/YcsF could be able to hydrolyze both, ester and amide linkages and even carbamate bonds. Experimental data supporting this proposal are necessary to give conclusive information.



2. Introducción

Desde el descubrimiento de la síntesis del poliuretano (PU), éste ha tenido alto impacto en diversas aplicaciones comerciales debido a su gran versatilidad física y química. El PU ha reemplazado diversos materiales tales como la madera, el caucho e incluso el metal, por lo cual su uso se ha incrementado drásticamente, ocupando el sexto lugar (10 Mt/año) entre los plásticos más empleados en el mundo. El incremento en su manufactura y uso ha acarreado la inevitable acumulación de desechos, se sabe que tan sólo en Estados Unidos de Norteamérica se generan aproximadamente 1.3 millones de toneladas de residuos de PU cada año (Cregut *et al.*, 2013).

Entre las técnicas existentes de disposición de residuos de PU se encuentran: i) la acumulación en vertederos, opción que no es costeable debido a su baja sustentabilidad; ii) el reciclaje mecánico, el cual provoca que los productos obtenidos mediante este proceso tengan una vida de uso muy corta debido a la desaparición de sus propiedades químicas; iii) el procesamiento químico, caracterizado por producir, mediante hidrólisis, polioles que pueden ser reusados para la síntesis de nuevos polímeros, aunque este procedimiento no es viable económicamente debido al elevado consumo de energía; iv) el procesamiento térmico, el cual provoca gran impacto ambiental pues se generan óxidos de nitrógeno, amoníaco, piridinas y residuos tóxicos derivados de compuestos nitrogenados (Ignatyev *et al.*, 2014).

Debido a lo anterior y en vista de que actualmente no existe una tecnología de bioremediación para la degradación del PU, se han buscado microorganismos con la capacidad para emplearlo como fuente de carbono. Además, se ha indagado acerca del mecanismo bioquímico involucrado en la degradación del PU y se ha propuesto que la mayoría de las actividades enzimáticas involucradas en este proceso son proteínas de tipo hidrolasas, principalmente esterasas, aunque también se han reportado proteínas con actividad proteasa y una con actividad



amidasa (Akutsu-Shigeno *et al.*, 2006; revisado por Loredó-Treviño *et al.*, 2012; Russell *et al.*, 2011).

En el año 2002 se inició en nuestro laboratorio un proyecto de investigación cuyo objetivo fue aislar, identificar y caracterizar bacterias capaces de emplear el PU como única fuente de carbono, así como develar los mecanismos bioquímicos y moleculares inherentes al proceso de biodegradación. Para tal efecto, a partir de muestras de hule espuma en descomposición colectadas en el basurero del Bordo de Xochiaca, Nezahualcóyotl, estado de México y empleando un medio mínimo adicionado con un barniz comercial de poliéster PU base agua como fuente de carbono (Hydroform[®] de la marca Polyform[®]) (MM-PUh) se aislaron ocho cepas bacterianas capaces de crecer en ese medio (Carrillo-García, 2004; Ocegüera-Cervantes, 2007). Tres de las cepas aisladas y denominadas BQ1, BQ5 y BQ8 mostraron el mayor crecimiento en MM-PUh por lo que se decidió continuar con su caracterización. Mediante la secuenciación del gen rRNA 16S las tres cepas fueron identificadas como miembros del género *Alicyclophilus* (Ocegüera-Cervantes *et al.*, 2007; Solís-González, 2008). Por otro lado, mediante espectroscopía de infrarrojo se demostró que la cepa BQ1 es capaz de atacar los enlaces tipo éster del PU (Ocegüera-Cervantes *et al.*, 2007).

En vista de lo anterior, Moreno-González (2012) comparó por zimograma el patrón de esterases de extractos citoplásmico y membranal de la cepa BQ1, a lo largo de 120 h de cultivo en medio rico Luria-Bertani (LB) y en MM-PUh. Sus resultados mostraron la presencia diferencial de una esterasa de 24 kDa, más abundante en citosol, a partir de las 8 h de cultivo en MM-PUh. Estos resultados condujeron a pensar que esta actividad podría ser considerada una candidata para participar en la degradación del PU.

Desafortunadamente el Hydroform[®] fue retirado del mercado y no pudimos reproducir estas condiciones para aislar y purificar la esterasa, por lo tanto, fue necesario probar distintas fuentes de carbono para la inducción de esta proteína. En el desarrollo de este trabajo, observamos que una actividad esterasa de 24



kDa también se induce cuando se emplea la γ -lactama *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) como única fuente de carbono. Es importante señalar que el barniz Hydroform[®] contenía NMP en su formulación y en nuestro laboratorio demostramos que *Alicyclophilus* sp. BQ1 consumía el NMP en las primeras 12 h de cultivo en MM-PUh (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007), por lo que nos pareció lógico pensar que probablemente la NMP, presente en el Hydroform, podría ser el agente inductor de la actividad esterasa de 24 kDa observada en MM-PUh, lo cual era coincidente con la inducción observada cuando cultivamos a BQ1 en MM-NMP. Además, dado que BQ1 también era capaz de hidrolizar el PU del Hydroform (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007), pensamos que quizá esta esterasa podría jugar también un papel activo en la degradación del polímero. Por lo tanto, decidimos identificar a la esterasa de 24 kDa que se induce en MM-NMP y estudiar su actividad sobre diferentes posibles sustratos.



3. Hipótesis

Si la esterasa de 24 kDa de *Alicyclophilus* sp. BQ1 hidroliza los enlaces amida de la NMP, entonces es probable que también hidrolice los enlaces amida de los grupos carbamato presentes en la estructura del poliuretano.



4. Objetivo general

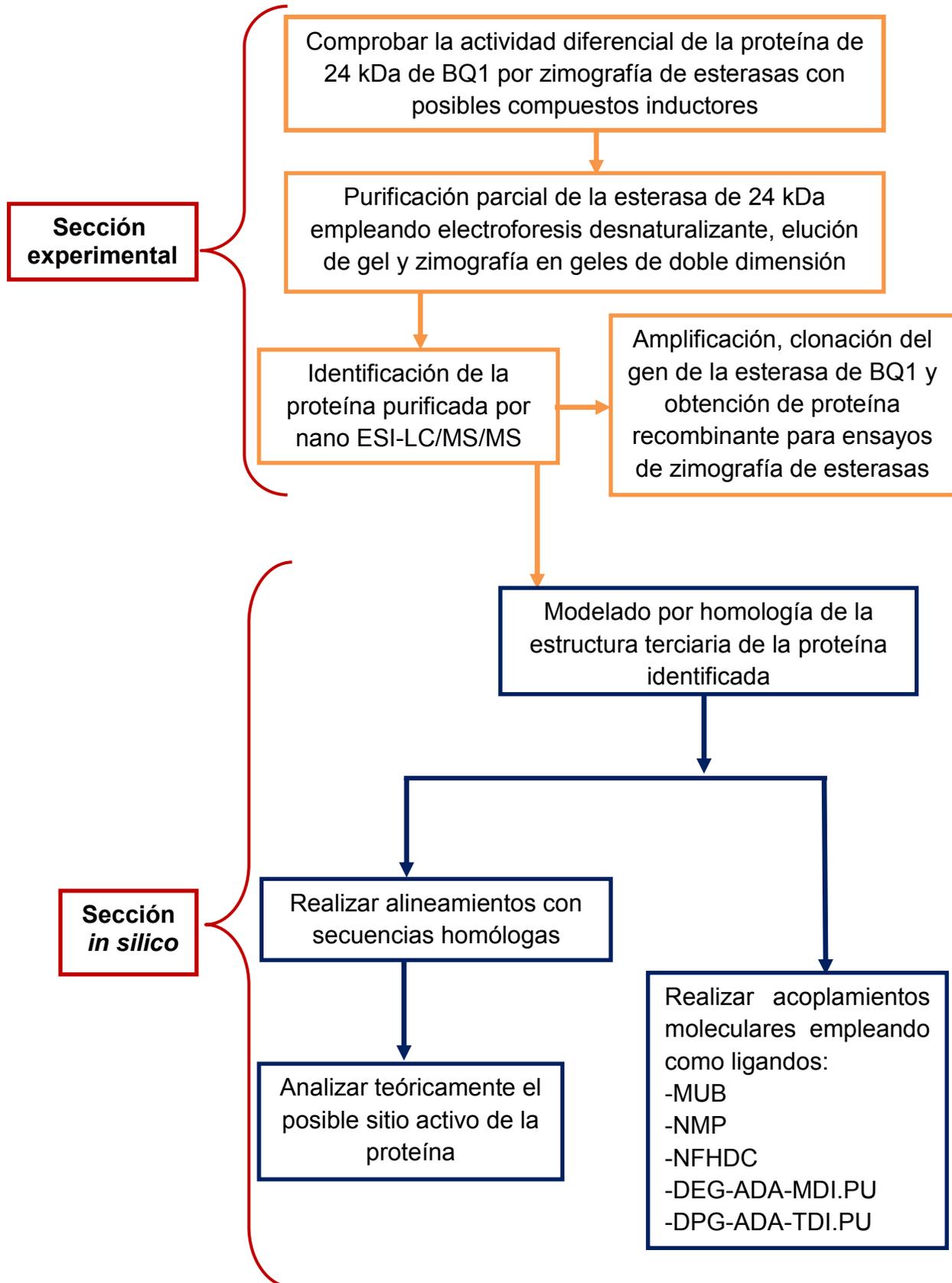
Caracterizar una proteína de 24 kDa con actividad esterasa de *Alicyclophilus* sp. BQ1 expresada de manera diferencial en *N*-metil-2-pirrolidona como fuente de carbono y analizar *in silico* sus posibles interacciones con diferentes sustratos.

5. Metas

1. Determinar la actividad diferencial de la esterasa de 24 kDa de *Alicyclophilus* sp. BQ1 empleando diferentes sustratos para determinar su inducibilidad.
2. Purificar parcialmente la proteína de 24 kDa con actividad de esterasa de *Alicyclophilus* sp. BQ1 e identificarla mediante espectrometría de masas.
3. Amplificar y clonar el gen de la esterasa de *Alicyclophilus* sp. BQ1 en un vector de expresión y producir proteína recombinante para determinar su actividad.
4. Modelar bioinformáticamente por homología la estructura terciaria de la proteína identificada y localizar su posible sitio catalítico.
5. Modelar las estructuras moleculares de los ligandos de interés: 4-metilumbeliferil butirato (MUB), *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), bis (4-nitrofenil) hexano-1,6-diil-dicarbamato (NFHDC) y dos PUs derivados de ácido adípico (DEG-ADA-MDI.PU y DPG-ADA-TDI.PU).
6. Simular acoplamiento moleculares de tipo proteína-ligando a efecto de predecir la energía de afinidad y selectividad de la proteína hacia los ligandos moleculares individuales.



6. Estrategia experimental



7. Marco teórico

7.1 Poliuretano (PU)

Un siglo después de que Henri Victor Regnault descubriera la reacción de polimerización del cloruro de vinilo (1835), se inventó el PU. Éste es un polímero sintético clasificado como el sexto tipo más empleado en todo el mundo, representando el 6-7% (10 Mt/año) del total de plásticos producidos tan solo en Europa (Cregut *et al.*, 2013).

Sus aplicaciones comerciales son muy versátiles, pudiéndose clasificar de acuerdo a su uso en: i) espumas flexibles, empleadas en la manufactura de mobiliarios, asientos, tableros e interiores acolchados para la industria automotriz, paneles de instrumentos, alfombras y empaques; ii) espumas rígidas, que se utilizan como material de aislamiento y carrocerías de camiones; iii) recubrimientos, como pinturas y barnices; iv) elastómeros, empleados en industria automotriz, suelas de zapatos, neumáticos industriales y prendas deportivas (Kroschwitz *et al.*, 1997).

El descubrimiento de la reacción de polimerización del PU se remonta a 1937 y fue realizado por el Dr. Otto Bayer y colaboradores, lo que permitió que el PU fuera empleado en la segunda guerra mundial. La síntesis del PU se basa en la gran reactividad del doble enlace del grupo isocianato que permite la fácil adición de compuestos tipo poliol en una reacción de condensación, uniéndose por enlaces tipo carbamato o uretano (Figura 1).



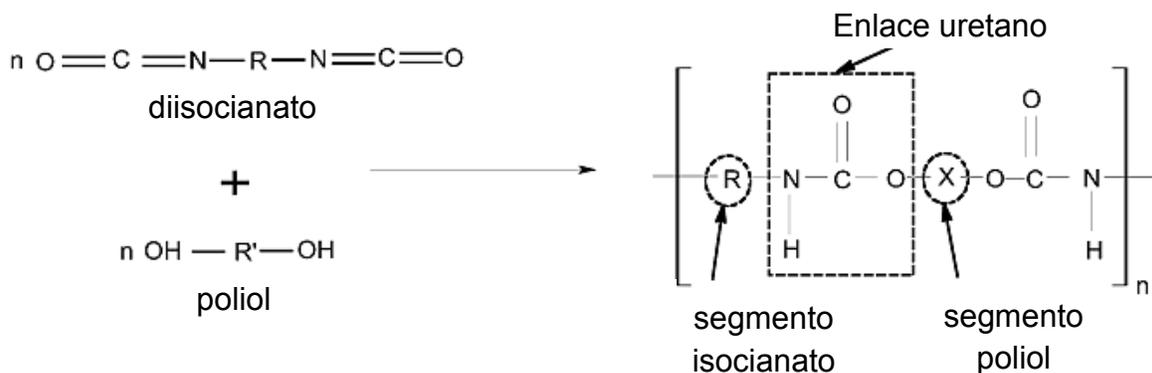


Figura 1. Reacción de síntesis del PU (modificado de Gautam *et al.*, 2007).

En la reacción de polimerización del PU los precursores empleados son diisocianatos y polioles (Tabla 1) además de aditivos y solventes, los cuales de acuerdo a su estructura generan la amplia versatilidad que se puede lograr en este polímero.

Tabla 1. Algunos polioles y diisocianatos empleados en la síntesis del PU.

Poliol		Diisocianatos
Poliéster	Poliéter	
polibutilen adipato polietilenbutilen adipato polietilen adipato polipropilen adipato policaprolactona	polioxitetrametilenglicol polioxipropilenglicol	2,4- y 2,6-diisocianato de tolueno (TDI) 4,4-diisocianato de difenilmetano (MDI) 1,3-diisocianato de xileno hexametilén diisocianato (HDI)

A pesar de que la estructura de los PUs es heterogénea y su composición química varía enormemente de acuerdo a ello, los PUs se pueden clasificar dependiendo del tipo de polioli empleado en su síntesis en: poliéster (PS)-PU y poliéter (PE)-PU (Figura 2) (Gautam *et al.*, 2007).



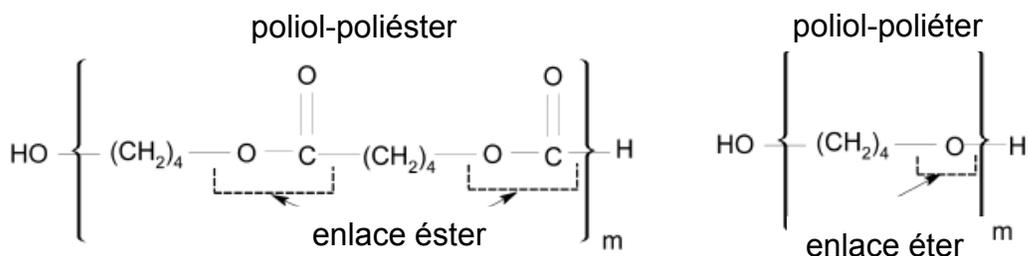


Figura 2. Clasificación del PU de acuerdo al tipo de poliol empleado (modificado de Gautam *et al.*, 2007).

Por difracción de rayos X se demostró que los PU poseen una región o área cristalina conocida como segmento duro y una región amorfa conocida como segmento blando, el segmento duro corresponde a los radicales poliisocianato y sirve como extensor lateral proporcionando dureza y resistencia al polímero, mientras que el segmento blando está compuesto de radicales poliol confiriendo los rasgos de absorción, elasticidad y elongación (Cregut *et al.*, 2013).

En el proceso de manufactura del PU también se incluyen catalizadores y aditivos, los cuales tienen dos funciones: i) aumentar la condensación de los polioles y ii) mejorar la función antimicrobiana. Estos compuestos tienen una vida útil variable en el entorno y algunos como el catalizador dilaurato de dibutil estaño (DBTDL) pueden ser muy tóxicos y persistentes. De acuerdo al aditivo empleado, la toxicidad del polímero puede acrecentarse con el tiempo debido a la liberación de sustancias peligrosas durante su degradación o descomposición, cuando es sometido a perturbaciones ambientales (Cregut *et al.*, 2013). Por otro lado, la función de los solventes reside en actuar como vehículos o matriz del conjunto de precursores o monómeros empleados en la polimerización del PU, un reactivo ampliamente usado para tal efecto es la *N*-metil-2-pirrolidona (NMP).



7.2. *N*-metil-2-pirrolidona (NMP)

La NMP (CAS N°872-50-4) es una amida cíclica (γ -lactama), conocida también como 1-metil-2-pirrolidona, 1-metilpirrolidinona y metilpirrolidona. Se clasifica como solvente dipolar aprótico miscible en agua y solventes orgánicos (Jouyban *et al.*, 2010) (Figura 3).

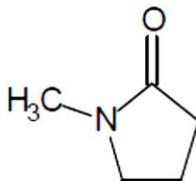


Figura 3. Estructura química de la NMP.

La producción anual mundial estimada de NMP es de 100,000 a 150,000 toneladas (Flick *et al.*, 2009). Esta γ -lactama es empleada en una gran variedad de procesos industriales, entre ellos: ingeniería de plásticos, procesamiento de petroquímicos, revestimientos (resinas, pinturas, barnices, acabados, tintas y esmaltes), decapado de pintura, productos químicos agrícolas e industria electrónica (EPA, 2012).

A pesar de estar clasificado como reactivo teratogénico, pues se demostró que en fetos de ratas expuestos a 6 mmol/L produce toxicidad visceral, malformaciones esqueléticas, de vasos sanguíneos y del arco cervical (Flick *et al.*, 2009), en el área farmacéutica se emplea como cosolvente. Por otro lado, en humanos se ha demostrado que es fácilmente absorbido por la piel y por los tractos respiratorio y gastrointestinal, su volumen de distribución es de 0.7 L/Kg y su vida media en plasma después de su administración oral es de 9-12 horas, mientras que por administración dérmica o exposición por inhalación es de 4 horas (Jouyban *et al.*, 2010).

Se sabe que tan sólo en Estados Unidos en el año 2006, se liberaron al ambiente 2,450 toneladas de NMP como desecho de industrias textiles, papeleras,



químicas, plásticas y electrónicas, incorporándose la mayor parte a ambientes marinos (Flick *et al.*, 2009 y Lan *et al.*, 2004), por lo que desde el punto de vista ambiental, la toxicidad y biodegradabilidad de la NMP son de interés primordial debido al aumento de su uso como producto químico.

Chow y Ng (1983) demostraron que bacterias de aguas residuales biodegradan la NMP a una concentración inicial de 100 ppm, mediante un análisis de los compuestos generados determinaron que el 95% de la NMP fue removida y empleando DQO (Chemical Oxygen Demand) demostraron que el 45% era empleada por las bacterias. Estos resultados indicaron que la mayoría de la NMP sufría modificaciones moleculares pero no era completamente mineralizada.

7.3. Biodegradación del PU

El proceso de degradación de la mayoría de los plásticos sintéticos en la naturaleza es bastante lento, calculándose en decenas o cientos de años dependiendo del material, e involucra tanto factores abióticos como la participación de microorganismos silvestres oriundos del lugar. La biodegradación implica transformar los contaminantes o xenobióticos en metabolitos que puedan ser introducidos en las vías metabólicas de los microorganismos para que en el mejor de los casos puedan ser mineralizados, es decir, que el producto final sea H₂O, CH₄ o CO₂ (Seo *et al.*, 2009).

A efecto de desarrollar tecnologías para la biodegradación del PU, se han aislado microorganismos heterótrofos con capacidad metabólica para emplearlo como fuente de carbono. Con base en la estructura del PU se han propuesto actividades enzimáticas hidrolíticas de tipo esterasa, lipasa, proteasa y ureasa capaces de atacar a esta molécula. En algunos de los microorganismos descubiertos, se han encontrado algunas de estas actividades candidatas y se ha propuesto que participan en el proceso degradativo del PU (Gu *et al.*, 2000) (Tabla 2).



Entre estas actividades, en *Comamonas acidovorans* TB-35 se identificaron dos esterazas, una de ellas extracelular y la otra unida a membrana, esta última catalizó la mayor parte de la hidrólisis del PS-PU, presentando un tamaño de 62 kDa y conteniendo el motivo Gly-X-Ser-X-Gly característico de las serina-hidrolasas (Akutsu *et al.*, 1998). Vega y col. (1999) identificaron en *Pseudomonas fluorescens* una esterasa de 48 kDa la cual presentaba una secuencia consenso tipo serina-hidrolasa relacionada con la degradación del Impranil DLN[®] (poliéster-PU). En *Pseudomonas chlororaphis* se han reportado tres proteínas extracelulares relacionadas también con la degradación del Impranil[®], una de ellas de tipo esterasa, la otra de tipo proteasa y una tercera proteína que no fue identificada (Howard *et al.*, 1999).

Aunque la mayoría de los reportes de proteínas relacionadas con la degradación del PU son esterazas, también se han reportado algunas proteasas y uretanasas, de las cuales se tiene poca información. Howard y Blake (1998) fueron los primeros en purificar una proteína extracelular de 29 kDa con actividad tipo proteasa en *Pseudomonas fluorescens* capaz de atacar un barniz de PU (Impranil[®]).

En *Rhodococcus equi* TB-60 se identificó una uretano hidrolasa de 55 kDa capaz de hidrolizar el ácido 2,4-tolueno dibutil éster dicarbámico (TDCB), identificándose, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), que el producto de esta hidrólisis era tolueno diamina. Esta actividad se inhibió al usar PMSF y HgCl₂, lo cual sugirió que en su sitio activo se encuentra un residuo de serina o bien, un residuo de cisteína (Akutsu *et al.*, 2006). Cabe mencionar que esta actividad no se estudió en el contexto de la degradación de PU.



Tabla 2. Actividades enzimáticas bacterianas relacionadas con la degradación del PU.

Microorganismo	Actividad enzimática	Referencia
<i>Corynebacterium</i> sp.	Esterasa	Kay <i>et al.</i> , 1993
<i>Comamonas acidovorans</i> TB 35	Esterasa	Nakajima-Kambe <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Proteasa	Howard <i>et al.</i> , 1998
<i>Comamonas acidovorans</i>	Esterasa	Allen <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Esterasa	Vega <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Esterasa/ Proteasa	Ruiz <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	Esterasa y lipasa	Rowe <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodococcus equi</i> TB-60	Uretano hidrolasa (amidasa)	Akutsu-Shigeno <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus pumilus</i>	Lipasa	Nair y Kumar, 2007

Se ha sugerido que la hidrólisis enzimática de los PUs es un proceso de dos pasos: i) la enzima se une a la superficie del polímero a través de un dominio hidrófobo llamado dominio de unión al sustrato y ii) la tríada catalítica hidroliza los enlaces tipo éster liberándose intermediarios solubles de bajo peso molecular que pueden ser metabolizados por los microorganismos (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

A pesar de que existen reportes de actividades enzimáticas capaces de hidrolizar el PU, aún no se ha elucidado el mecanismo catalítico ni los productos de degradación del polímero. En 1999, Nakajima-Kambe y colaboradores propusieron que el sitio de hidrólisis de un PS-PU diseñado *ex profeso* a partir de poli (dietilenglicol adipato) y 2,4-tolileno diisocianato, se produce en los enlaces tipo éster provenientes de las moléculas de los polioles, resultando como producto de hidrólisis dietilenglicol, ácido adípico, trimetilolpropano y otros productos desconocidos (Figura 4), sin embargo, aún no se tienen avances al respecto.



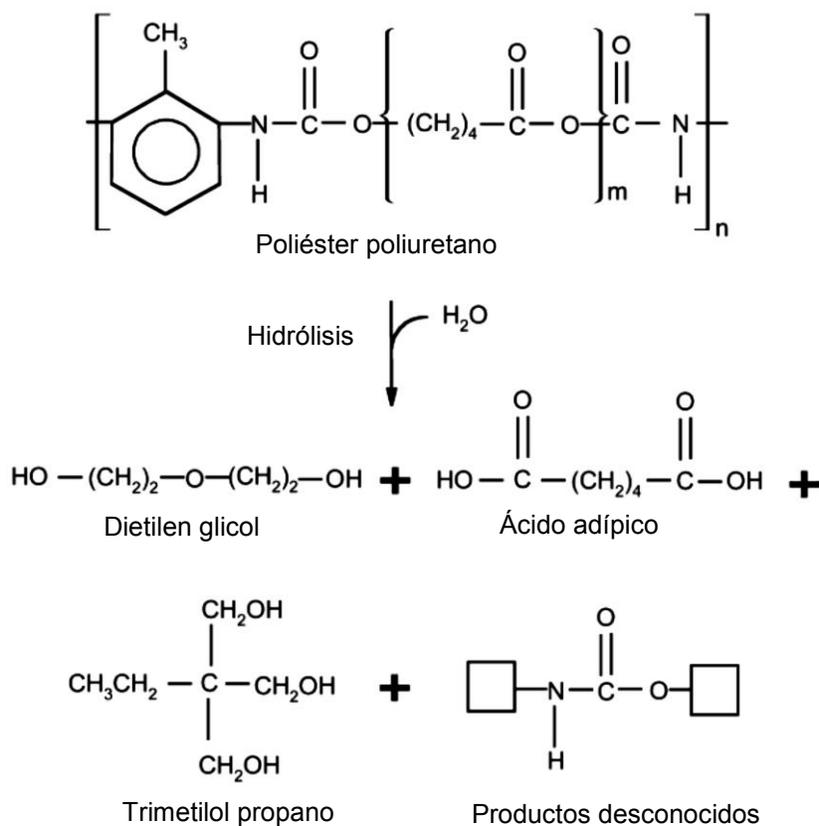


Figura 4. Productos de hidrólisis propuestos para un PS-PU sintetizado a partir de poli (dietilenglicol adipato) y 2,4-tolileno diisocianato (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

7.4. Hidrolasas

Según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las hidrolasas (EC 3) son enzimas que pertenecen a una familia con amplio poder catalítico para diferentes sustratos. Con la incorporación de una molécula de agua pueden hidrolizar enlaces tipo éster (EC 3.1), enlaces peptídicos (EC 3.4), enlaces C-N, como los de amidas lineales y cíclicas (EC 3.5), entre otros. En el grupo de las enzimas que hidrolizan enlaces tipo éster se encuentran: i) carboxilesterasas o esterasas verdaderas (EC 3.1.1.1), que actúan sobre ésteres carboxílicos de cadena corta, liberando los ácidos correspondientes, ii) lipasas (EC 3.1.1.3), que catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles a ácidos



grasos, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol, iii) esteroles esterases (EC 3.1.1.13), hidrolizan ésteres de esteroides liberando esteroides y ácidos grasos, entre otras.

La diferenciación entre las tres diferentes actividades descritas anteriormente es complicada, además de que es necesario tener en cuenta que el modo de presentación del sustrato es importante, pues la enzima es susceptible de exhibir distinta selectividad según se encuentre el sustrato en forma de micelas, películas monocapa o disuelto en solventes orgánicos, por lo que no es fácil clasificarlas con base a su especificidad por el sustrato. Sin embargo, de manera general, se ha denominado a las lipasas como aquellas enzimas capaces de actuar sobre ésteres de glicerol con una cadena acilo igual o superior a 10 átomos de carbono, en tanto que la hidrólisis de sustratos solubles con cadenas acilo de longitud inferior a 10 átomos de carbono se atribuye a las carboxilesterasas (Jaeger *et al.*, 1999).

Algunas hidrolasas tienen en común una región llamada “tapa” la cual consiste en un bucle peptídico anfipático que bloquea el sitio catalítico de la enzima en su estado inactivo (conformación cerrada) y es desplazado, en diferente extensión, durante el proceso de activación interfacial, permitiendo así la entrada del sustrato lipídico al centro activo (conformación abierta). La apertura de la tapadera consiste en la rotación del loop alrededor de sus regiones bisagra y es estabilizada mediante puentes de hidrógeno y contactos polares establecidos con el esqueleto de la proteína (Ferrato *et al.*, 1997). Este desplazamiento implica el enmascaramiento de cargas positivas y la exposición de cargas negativas en la superficie proteica, formando regiones hidrofóbicas de interacción proteína-lípido.

De manera general las hidrolasas pertenecen a la familia de proteínas con plegamiento α/β , el cual está conformado por 8 hebras β de las cuales sólo la segunda es antiparalela. Esta estructura de hebras β se encuentra rodeada por 6 hélices α , uniéndose entre sí mediante bucles cuya longitud depende del tipo de proteína (Figura 5). El sitio activo de las proteínas de la familia α/β hidrolasas está conformado por tres residuos catalíticos: un residuo nucleofílico (serina o cisteína),



un residuo ácido (aspartato o glutamato) y un residuo de histidina, encontrándose siempre en este orden en la secuencia de aminoácidos.

Las diferencias más significativas en esta disposición espacial residen en las hélices α que conectan las hebras β de la lámina central. En algunos casos, una o más de estas hebras pueden estar ausentes, sin embargo, la hélice αC parece estar conservada pues participa en el correcto posicionamiento del residuo nucleofílico del centro activo. Las grandes diferencias en la conformación tridimensional del núcleo α/β entre las distintas proteínas son consecuencia, principalmente, del grado de curvatura de la lámina central, el cual está determinado por el ángulo formado entre las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$ (Ollis *et al.*, 1992). Este hecho implica la formación de un lado cóncavo y otro convexo en la lámina central, caracterizándose por poseer un fuerte carácter hidrofóbico, predominando en el lado convexo agrupaciones de aminoácidos alifáticos, mientras que en el lado cóncavo abundan residuos aromáticos (Cygler *et al.*, 1994).

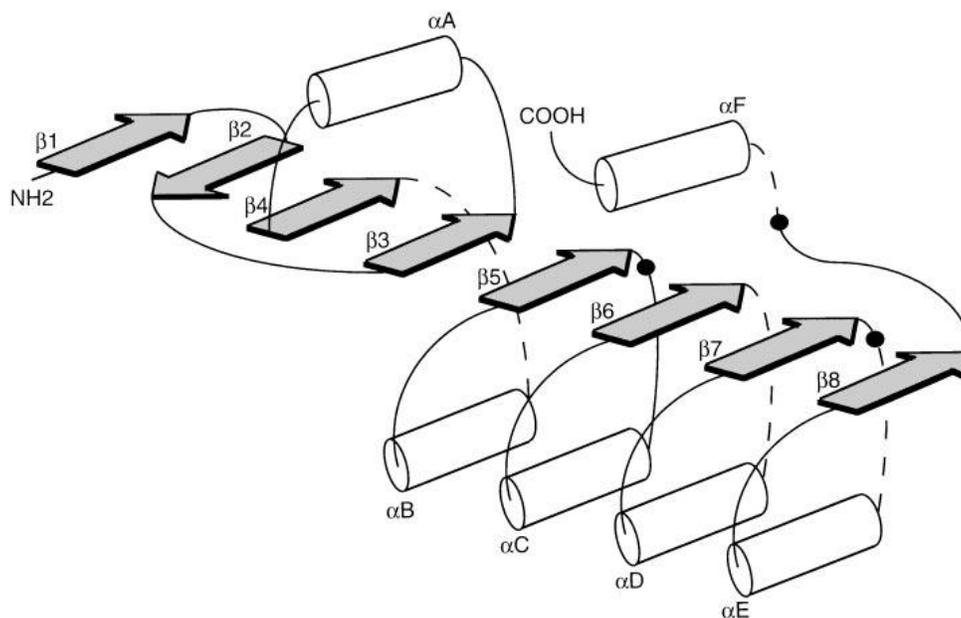


Figura 5. Estructura canónica del plegamiento α/β hidrolasa. La tríada catalítica está representada con círculos negros sólidos. El residuo nucleofílico se localiza después de la hebra $\beta 5$, el residuo ácido después de la hebra $\beta 7$ y el residuo de histidina próximo a la hebra $\beta 8$ y la hélice αF (Jaeger *et al.*, 1999).



Otras hidrolasas, entre las que se encuentran las serina proteasas, expresan un motivo estructural análogo, sin existir una homología de secuencia, lo cual sugiere una relación evolutiva divergente a partir de un antecesor común (Nardini y Dijkstra, 1999).

Heikinheimo y col. (1999) establecieron cuatro características esenciales para pertenecer a la familia α/β hidrolasa: i) el orden de la tríada catalítica debe ser nucleófilo-ácido-histidina, con el nucleófilo ubicado cerca de la hebra $\beta 5$, ii) la presencia del codo nucleófilo ($\beta 5$), iii) la estructura debe comenzar en la lámina $\beta 3$ y poseer al menos 5 hebras β paralelas, y iv) la existencia de un bucle largo al final de la hebra $\beta 7$ que permita que las cadenas laterales de los residuos catalíticos establezcan puentes de hidrógeno. De las tres últimas, al menos dos de ellas deben de estar presentes en las α/β hidrolasas.

El codo nucleófilo pertenece a una estructura supersecundaria en la que se encuentra la serina catalítica, éste se localiza entre la hebra $\beta 5$ y la hélice αC , identificándose por la secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly (Jaeger *et al.*, 1999). La rigidez de este motivo (hebra-giro-hélice) induce al nucleófilo a adoptar ángulos de torsión en la cadena lateral energéticamente no favorables, imponiendo de esta forma restricciones estéricas a los residuos de sus proximidades. Esta conformación de la serina provee de una buena disposición a su cadena lateral corta, proyectándose hacia el resto de la estructura proteica, que la hace fácilmente accesible a la histidina activa y al sustrato (Cygler *et al.*, 1992; Ollis *et al.*, 1992). Además, su geometría contribuye a la formación del agujero oxaniónico, por lo que podría tener un papel en la estabilización del intermediario tetraédrico durante la reacción. El pentapéptido y su estructura hebra-giro-hélice antes mencionado también está presente en la familia de las serina-proteasas y otras hidrolasas cuyo residuo nucleofílico no es una serina sino una cisteína (Ollis *et al.*, 1992).



7.5. Características del género *Alicyclophilus*

El género *Alicyclophilus* pertenece a la subclase *beta proteobacteria*, familia *Comamonadaceae*, son bacilos cortos Gram negativos, mesófilos y anaerobios facultativos. En la literatura está reportada sólo la especie *denitrificans* que incluye las cepas BC y K601^T. La primera cepa descrita fue K601^T la cual es capaz de degradar ciclohexanol, se aisló a partir de una muestra acuosa de una planta de tratamiento de aguas residuales en Alemania (Mechichi *et al.*, 2003). La cepa BC se aisló a partir de suelo contaminado con benceno y se sabe que emplea cloratos como aceptores de electrones durante el proceso de degradación del benceno. Debido a los ambientes en los que fueron aisladas estas cepas, se ha sugerido su probable utilización en procesos de biorremediación de suelo y agua (Oosterkamp *et al.*, 2011).

El tamaño del genoma de la cepa BC es ligeramente más pequeño que el de la cepa K601^T, en tanto que su contenido de G+C es comparable, siendo de cerca del 70%. La cepa BC tiene un plásmido y un mega plásmido, mientras que K601^T sólo tiene un plásmido (Tabla 3). En ninguna cepa se tiene evidencia de la existencia de transportadores para azúcares, por lo que no asimilan glucosa ni fructosa. Mediante un análisis comparativo de ambos genomas se determinó que contienen todos los genes requeridos para la vía de los ácidos tricarbóxicos (Oosterkamp *et al.*, 2013).



Tabla 3. Características generales de los genomas de *Alicyclophilus denitrificans* BC y K601^T (Tomado de Oosterkamp *et al.*, 2013).

		Cepa BC	Cepa K601^T
Tamaño del genoma		4,835,713 bp	5,070,751 bp
Contenido de G+C		67.9%	67.8%
Cromosoma	Tamaño	4,637,013 bp	4,995,263 bp
	DNA codificante	91%	90%
	Contenido de G+C	68%	67%
Plásmido	Tamaño	78,982 bp	75,488 bp
	DNA codificante	84%	87%
	Contenido de G+C	64%	62%
Megaplásmido	Tamaño	119,718 bp	-
	DNA codificante	78%	-
	Contenido de G+C	58%	-
Número total de genes		4709	4899
Genes que codifican proteínas		4542	4696



8. Materiales y métodos

8.1. Activación de la cepa BQ1 y determinación de la inducibilidad de la esterasa de 24 kDa empleando diferentes fuentes de carbono

1. Descongelar un tubo eppendorf almacenado a -70°C con células de *Alicyclophilus* sp. BQ1 preservadas en glicerol al 30% y sembrar por estría cruzada en una caja con LB sólido. Incubar a 37°C durante 48 h.
2. A partir de una colonia aislada de BQ1, inocular un tubo con 5 mL de LB líquido y dejarlo en cultivo overnight (ON) a 37°C y 200 rpm.
3. Medir la densidad óptica a 660 nanómetros ($\text{DO}_{660 \text{ nm}}$) y tomar el volumen necesario para inocular 25 mL de medio LB líquido y ajustarlo con lo equivalente a una $\text{DO}_{660 \text{ nm}}$ de 0.1, incubar a 37°C , 200 rpm hasta alcanzar una $\text{DO}_{660 \text{ nm}}$ no mayor a 0.8 (pre-cultivo).
4. Una vez obtenido el crecimiento se calcula el volumen necesario para inocular el medio mínimo adicionado con cada una de las diferentes fuentes de carbono a emplear: NMP (2.5 mg/mL) (SIGMA No. Cat. M6762), tributirina 1% (v/v) (SIGMA No. Cat. T8626) y aceite de olivo 1% (v/v). Se inocula con la cantidad de pre-cultivo necesario para obtener una $\text{DO}_{660 \text{ nm}}$ de 0.02.
5. Cosechar las células centrifugando a 7500 rpm durante 15 minutos a 4°C (centrífuga RC5C PlusSorvall[®], rotor CSA Sorvall[®]). El sobrenadante se descarta y las células se lavan con amortiguador de fosfatos 20 mM [pH 7]. Se centrifuga una vez más en las condiciones descritas previamente. Con el pellet obtenido se hace una suspensión 25% (w/v) con solución amortiguadora de fosfatos 20 mM [pH 7] y se somete a ultrasonificación.

8.2. Extracción y cuantificación de proteínas

1. La suspensión de células al 25% (w/v) se coloca dentro de un baño con hielo y se somete a sonicación (Vibra Cell, Sonics) por 6 ciclos de 15 segundos de interrupción por 15 segundos de descanso a amplitud de 21%.



2. La suspensión se centrifuga a 14,000 rpm durante 15 minutos (microcentrifuga 5417C, Eppendorf). Se separa el sobrenadante, el cual corresponde a la fracción soluble o extracto citoplásmico (EC). El pellet, en el que se encuentra la fracción insoluble o membranal (EM) se resuspende con amortiguador de fosfatos 20 mM [pH 7].
3. Se cuantifica la cantidad de proteína mediante ensayos de Bradford (BIO-RAD) (Bradford, 1976).

8.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis es un método analítico semipreparativo en el que se separan macromoléculas cargadas que migran a través de un campo eléctrico. En el SDS-PAGE se emplea el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), éste se une a las proteínas por absorción no específica, desnaturalizándolas y rompiendo las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria confiriéndoles carga negativa, por lo que las proteínas migran al polo positivo separándose de acuerdo a su tamaño molecular (Laemmli, 1970).

1. El protocolo que se siguió para los SDS-PAGE se encuentra descrito por Laemmli (1970).
2. Cargar 5 μ L de marcador molecular (Precision Plus Protein Standards, Dual Color de BIO-RAD) para el caso en el que se realizará zimografía o si no, 5 μ L del marcador Unstained de BIO-RAD.

8.4. Zimografía para actividad esterasa

Para revelar la actividad tipo esterasa se emplea el reactivo 4-metilumbeliferil butirato, el cual, al ser objeto de la actividad hidrolítica de la esterasa, genera el producto 4-metilumbiliferona, el cual es fluorescente en presencia de luz UV (Díaz *et al.*, 1999).



1. Los extractos proteicos se cargan en un SDS-PAGE, el control positivo corresponde a lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (5 μ L, 0.05 U es suficiente para cada gel) (Sigma, No Cat. 95608).
2. Después de la corrida electroforética el gel se lava dos veces por 30 minutos con 15 mL de Tritón X-100 al 2.5% (Sigma, No Cat. T8787).
3. Retirar el Tritón X-100 y enjuagar con solución amortiguadora de fosfatos 20 mM [pH 7] durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Preparar una solución 1.6 mM de 4-metilumbeliferil butirato a partir de un stock de 4-metilumbeliferil butirato 50 mM (BioChemica No. Cat. 19362) utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, No. Cat. 200-664-3) como disolvente.
5. Agregar el sustrato al gel e incubar 30 min con agitación media a temperatura ambiente. Revelar en un transiluminador UV. Las proteínas con actividad esterasa se observarán como bandas de color blanco brillante sobre un fondo negro.

8.5. Purificación parcial de la esterasa de 24 kDa de *Alicyclophilus* sp. BQ1

Con el propósito de realizar una purificación parcial de la esterasa, se realizó una electroforesis SDS-PAGE empleando el equipo PROTEAN[®] II xi Cell (BIO-RAD) (formato del gel 16 x 20 cm). Después de resolver las proteínas, la zona del gel de poliacrilamida con la proteína de interés se sometió a electro-elución empleando el equipo Whole gel Eluter (BIO-RAD). Este sistema permite la electro-elución de múltiples proteínas contenidas en un gel de poliacrilamida, al aplicar una corriente eléctrica las proteínas difunden a través del gel recolectándose en la cámara de elución.

1. El procedimiento para los SDS-PAGE se encuentra descrito por Laemmli (1970).
2. Llenar el serpentín de la cámara de enfriamiento con agua corriente y mantenerla a 4°C hasta su uso.
3. Cargar en cada carril 180 μ g de muestra, 20 μ L de marcador molecular (Precision Plus Protein Standards, Dual Color de BIO-RAD) y 10 μ L de lipasa



de *Pseudomonas fluorescens* (0.05 U) (Sigma, No Cat. 95608). Esta última sólo si se realizará zimografía. Correr a 25 mA durante 6 h.

4. Cortar horizontalmente la sección de bandas de proteínas localizadas entre 22 y 30 kDa sin incluir el marcador de peso molecular. Esta sección del gel es la que se electroeluirá.
5. Nivelar el elutor y colocar el electrodo inferior encima de la base.
6. Poner sobre el electrodo tres hebras de papel filtro y una de celofán previamente humedecidas con amortiguador de corrida 1X teniendo cuidado de retirar todas las burbujas.
7. Insertar la cámara de elución y llenar los carriles con amortiguador de corrida 1X evitando la formación de burbujas.
8. Colocar la sección del gel de poliacrilamida sobre la cámara de elución y quitar las burbujas que hayan quedado debajo del gel. Identificar el orificio en el que se espera la elución de la proteína para su posterior recolección.
9. Humedecer con amortiguador de corrida 1X dos hebras de papel filtro y con mucho cuidado ponerlas sobre el gel, retirar el exceso de amortiguador y colocar cinta Scotch[®] sobre los orificios de recolección.
10. Poner el electrodo superior en la superficie de la cámara alineando los orificios de los tornillos y suavemente apretar hacia abajo. Para comenzar la elución aplicar una corriente de 250 mA durante 30 min.
11. Al terminar la corrida aplicar durante 10 s corriente inversa para evitar que las proteínas queden adheridas a la membrana. Para comprobar la completa elución de las proteínas se tiñe con azul de Coomassie el gel y no se deben observar bandas teñidas.
12. Los eluatos recolectados se filtran con una membrana Millipore con corte de 10 kDa. Una vez concentrados los eluatos se mide cantidad de proteína mediante ensayos de Bradford (BIO-RAD) (Bradford, 1976).

8.6. Geles de doble dimensión de alta resolución

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D PAGE) es una técnica que permite la separación de proteínas en un único gel. En la primera



dimensión también llamada isoelectroenfoque las proteínas se separan en base a su punto isoeléctrico en gradientes de pH inmovilizados (IPGs), mientras que en la segunda dimensión se separan en función de su tamaño molecular.

8.6.1. Preparación de las proteínas

1. Adicionar a los eluatos recolectados 5 volúmenes de acetato de amonio 100 mM en metanol, agitar y poner a reposar 16 h a -20°C .
2. Centrifugar a 6,000 rpm (microcentrifuga 5417C, Eppendorf) durante 30 min, descartar el sobrenadante y lavar el pellet 2 veces con 5 mL de acetato de amonio en metanol, agitar muy bien y centrifugar a 6,000 rpm por 10 min.
3. Lavar de igual manera el pellet 2 veces con acetona al 80% (v/v) y realizar un último lavado con etanol al 70% (v/v), dejar secar la pastilla a temperatura ambiente durante 10 min.
4. Disolver la pastilla en 400 μL de amortiguador IEF (Apéndice) evitando la formación de espuma. Cuando la pastilla esté casi resuspendida centrifugar a 14,000 rpm (microcentrifuga 5417C, Eppendorf) durante 15 min, el sobrenadante (cristalino) se puede almacenar a -70°C para su posterior análisis. Tomar una alícuota para cuantificar la proteína por Bradford y otra alícuota de 20 μg correrla en un gel SDS-PAGE para observar su integridad.

8.6.2. Primera dimensión

1. Se emplean 500 μg de proteínas para una tira de 11 cm, agregar amortiguador IEF hasta alcanzar el volumen de 215 μL . Agregar 2.5 μL de anfolinas según el gradiente de pH, Bio-Lyte 3/10 (No Cat. 163-1182) o 5/8 (No Cat 163-1192) de BIO-RAD, mezclar con vórtex y centrifugar 5 min a 14,000 rpm (microcentrifuga 5417C, Eppendorf). La mezcla se aplica en el carril de la bandeja y se distribuye homogéneamente.
2. Tomar una tira IPG del gradiente deseado, retirar el recubrimiento plástico con pinzas y colocarla boca abajo sobre la mezcla distribuida en el carril evitando la formación de burbujas.



3. Poner la tapa de la bandeja y mantenerla así durante 90 min a temperatura ambiente, posteriormente agregar 2 mL de aceite mineral cubriendo la totalidad de la tira y colocarla a 20°C durante 16 h.
4. Terminada la hidratación de las tiras, se retiran de la charola y se escurren sobre papel absorbente. Si se presentan grumos de sales entonces la tira se lava vertiéndole aceite mineral.
5. Colocar en la charola de focalización la tira boca abajo procurando que la parte del gel toque los puentes de papel que previamente se hidratan en agua, una vez colocada la tira se agregan 2 mL de aceite mineral para cubrirla por completo, se coloca la charola en el focalizador y se corre el programa que consiste en: 100V por 100 V/h, 500V por 500 V/h, 8000V por 99 kV/h y 12 h a 20°C a 50V.

8.6.3. Segunda dimensión

1. Terminado el programa de focalización las tiras se lavan con 2 mL de solución de reducción con agitación durante 15 min a temperatura ambiente.
2. Retirar la solución de reducción, agregar 2 mL de solución alquilante y agitar durante 15 min a temperatura ambiente. Retirar la solución alquilante y lavar la tira con SDS 1X, posteriormente se dispone a correr el gel SDS-PAGE.
3. Montar un gel de poliacrilamida SDS-PAGE y colocar la tira con el lado positivo contiguo al marcador de peso molecular. Correr a 50 V durante 20 h hasta que el frente de corrida alcance 2 cm del final del gel.
4. Realizar zimografía para esterasa e identificar los spots con actividad para escindirlos del gel.
5. Después de revelar la zimografía colocar el gel en solución de Coomassie coloidal e incubar 18 horas a temperatura ambiente con agitación muy lenta.
6. Al término de la tinción descartar el Coomassie y lavar el gel con agua destilada varias veces con agitación muy lenta hasta que esté completamente claro y las manchas muy nítidas.



8.7. Identificación de la proteína mediante nano LC-ESI-MS/MS

La espectrometría de masas es una herramienta espectroscópica analítica que puede ser usada para el análisis de muchos tipos de muestras, desde unidades elementales hasta grandes proteínas y polímeros. Esta técnica es esencial en el contexto de la proteómica actual debido a su alta capacidad de análisis, sensibilidad y precisión en la determinación de masas moleculares proteicas. Se fundamenta en la generación de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, los cuales se analizan de acuerdo a su relación masa/carga (m/z).

1. A partir de la zimografía para esterasas de la 2D, identificar los spots con actividad y pI cercano a 7 y escindirlos del gel.
2. Colocar el pedazo del gel en un tubo eppendorf de 0.6 mL y lavar dos veces con amortiguador de fosfatos 20 mM.

Las muestras se analizaron en la Medical School Proteomics and Mass Spectrometry Facility, University of Massachusetts donde se llevó a cabo un análisis espectrométrico por nano LC-ESI-MS/MS para la identificación de la proteína. Para ello, la muestra se digiere con tripsina y se disuelve en 25 μ L de ácido tricloroacético (1%) (v/v). Una alícuota de 4 μ L se inyecta en una columna de C18 (2 cm x 100 μ m) para concentrarla y desalarla. Los péptidos se eluyen en una columna analítica de C18 (75 μ m x 25 cm) con un gradiente lineal de 100% de fase móvil A (0.1% de ácido fórmico en 5% de acetonitrilo) a 35% de fase móvil B (0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo) en un período de 35 min a una velocidad de flujo de 300 nL/min. El sistema LC/MS empleado consta de un cromatógrafo líquido de nano-flujo Proxeon Easy nano LC acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific) con un sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Se empleó un sondeo de scan MS establecido a 350-2000 m/z con una resolución de 60,000, seguido por 10 MS/MS scans conseguidos mediante LTQ ion trap. Los archivos de datos espectrométricos se procesaron con el software Extract_MSN (Thermo Scientific) y posteriormente se sometieron a la búsqueda contra la base de datos NCBI nr empleando el programa



Mascot Search 2.4 (Matrixsciences, Ltd.). Finalmente, los resultados arrojados con Mascot Search 2.4 se compararon con el software Scaffold (Proteome Software, Inc.).

8.8. Clonación de los genes y expresión de las proteínas recombinantes

8.8.1. Obtención y purificación de DNA genómico de BQ1

El DNA se purificó empleando el protocolo descrito en Current Protocols in Molecular Biology (1995) y modificado para BQ1 por Domínguez-Cárdenas (2012). Una vez obtenido el DNA genómico se verificó su integridad, pureza y concentración.

*8.8.2. Amplificación de los genes *lamb/ycsf* y *dlh* mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)*

La síntesis de los oligonucleótidos para amplificar los genes *lamb* y *dlh* se realizó en la Unidad de Síntesis de oligos y secuenciación del Instituto de Biotecnología (UNAM) (Apéndice 3).

A efecto de encontrar la temperatura óptima de complementación de los oligonucleótidos se probaron las temperaturas de alineamiento: 40, 45, 50, 55 y 60 °C, la elección de estas Tms fue de acuerdo a la Tm calculada y la proporcionada por el proveedor (Apéndice 3).

Para la amplificación de ambos genes se empleó DMSO 10% (v/v), en la mezcla de reacción.

8.8.3. Clonación de los productos en el vector pET-21a

Las endonucleasas de restricción *NdeI* (5' CA/TATG 3'), *HindIII* (5' A/AGCTT 3') y *XhoI* (5' C/TCGAG 3') cortan dejando extremos pegajosos y las tres tienen una temperatura óptima de reacción de 37°C. Como vector se utilizó el plásmido pET-21a, dentro de su secuencia se encuentra un cassette de resistencia a ampicilina y un sitio múltiple de clonación con 14 sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción y una secuencia para que la proteína que de sobreexpresión



contenga una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal, para posteriormente ser purificada por cromatografía de afinidad con una resina de níquel (Apéndice 3). La secuencia que codifica a la proteína LamB/YcsF de BQ1 tiene sitios de restricción para *XhoI* y *NcoI*, por lo que se eligió clonar en los sitios *NdeI* y *HindIII* de pET-21a, mientras que la secuencia que codifica a DLH tiene sitios de restricción para *NotI* y *NcoI*, por lo que se eligió clonar en los sitios *NdeI* y *XhoI* de pET-21a, teniendo cuidado de que estas secuencias entraran en fase con la secuencia de la etiqueta de histidinas localizada en el carboxilo terminal. Los amplicones fueron purificados de un gel de agarosa empleando el kit GeneJET PCR Purification kit (Thermo Scientific), número de catalogo K0701. Se llevaron a cabo las digestiones con las enzimas de restricción correspondientes, en reacciones con 10 µg de inserto. Para la ligación de los insertos en el vector se utilizó la T4 DNA ligasa. Se establecieron reacciones de ligación conteniendo proporciones de inserto:vector 1:3, 1:5 y 1:7. Para calcular esta proporción se empleó la siguiente ecuación (tomada del protocolo de Promega para la T4 DNA ligasa):

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño en kb del inserto}}{\text{tamaño del vector en kb}} \times \text{relación molar inserto/vector} = \text{ng de inserto}$$

El producto de ligación se transformó en células de *E. coli* BL21. En las transformantes se realizó PCR de colonia usando los primers diseñados *ex profeso* para identificar las que contenían el inserto de interés.

8.8.4. Inducción de las proteínas recombinantes

La expresión de las proteínas recombinantes LamB/YcsF y DLH conteniendo la etiqueta de histidinas se indujo con IPTG a una concentración final de 0.6 mM, durante 4 horas de incubación a 37 °C y 200 rpm.

Para solubilizar los cuerpos de inclusión se siguió el protocolo descrito por QIAGEN (2003) y el reportado por Singh y col. (2015) los cuales se basan en la solubilización de los cuerpos de inclusión usando urea (6 M-8 M) como agente



desnaturalizante seguido del replegamiento de la proteína disminuyendo gradualmente la concentración de urea.

8.9. Modelaje de interacciones proteína-ligando por acoplamiento molecular *in silico*

Los primeros trabajos de docking o acoplamiento molecular datan de la década de los 80's, siendo ésta una herramienta muy empleada para el descubrimiento de nuevos fármacos (Sousa *et al.*, 2006). Estos ensayos intentan explorar y predecir *in silico* las diferentes conformaciones de los complejos proteína-ligando, aquel arreglo que tenga más probabilidad de unión será el que presente una energía de afinidad más negativa (ΔG).

8.9.1. Modelaje tridimensional de las proteínas

Empleando el software Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org>) se modeló por homología, la estructura tridimensional de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas. Se emplearon los monómeros de las estructuras cristalográficas con PDB (Protein Data Bank) id 2DFA (LamB/YcsF) y 2O2G (dienolactona hidrolasa) a una resolución de 1.90 Å y 1.92 Å respectivamente. De la estructura 2O2G se removieron las moléculas de agua (H₂O), los iones sulfato (SO₄²⁻) y el 1,2-etanodiol (C₂H₆O₂). Ambas estructuras proteicas se trabajaron en formato pdb.

8.9.2. Preparación estructural de los ligandos

Las estructuras de los ligandos: 4-metilumbeliferil butirato (MUF), *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), bis (4-nitrofenil) hexano-1,6-diil dicarbamato (NFHDC), dos PUs idealizados DEG-ADA-MDI.PU (sintetizado a partir de 4-4'-diisocianato de difenilmetano, dietilenglicol y ácido adípico), DPG-ADA-TDI.PU (sintetizado a partir de 2,4-diisocianato de tolueno, dipropilenglicol y ácido adípico), benceno y etanol fueron creadas usando el software MarvinSketch 6.2.1 (<http://www.chemaxon.com>). Estas estructuras se trabajaron en formato .mol2.



8.9.3. Acoplamiento molecular

Se realizó docking ciego con los monómeros de las proteínas modeladas empleando el software PyRx 0.8 (<http://pyrx.scripps.edu>). El tamaño de la rejilla para 2DFA fue de 48 x 44 x 48 Å con espaciado de 0.375 Å, mientras que para 2O2G fue de 49 x 46 x 45 Å con espaciado de 0.375 Å. Para el docking no rígido de la estructura 2O2G se mantuvieron flexibles los residuos: S112, D162 y H190. Todos los acoplamientos se realizaron por triplicado. Por defecto, los ligandos tienen sus enlaces sp³ libres de rotar.

8.9.4. Análisis post-docking

El análisis de los acoplamientos se realizó empleando PyMOL (DeLanoScientific, 2009) y UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Los acoplamientos se evaluaron en función de su energía de interacción con el campo de fuerza AMBER, así como de la posición relativa que toman los ligandos en relación con los aminoácidos que forman el sitio catalítico.



9. Resultados y discusión

9.1. Inducción de una esterasa de 24 kDa de *Alicyclophilus* sp. BQ1

En nuestro laboratorio, en cultivos de *Alicyclophilus* sp. BQ1 en medio mínimo adicionado con un barniz comercial de PU base agua llamado Hydroform® (MM-PUh al 0.3%) como única fuente de carbono, Moreno González (2012) identificó la actividad diferencial de una proteína de aproximadamente 24 kDa presente en el extracto citosólico (EC) de los cultivos de BQ1 en MM-PUh, pero no en los extractos de los cultivos procedentes de medio rico Luria-Bertani (LB), analizándolos en la fase exponencial de crecimiento (36 h para el cultivo en MM-PUh y 7 h para el cultivo en LB) (Figura 6).

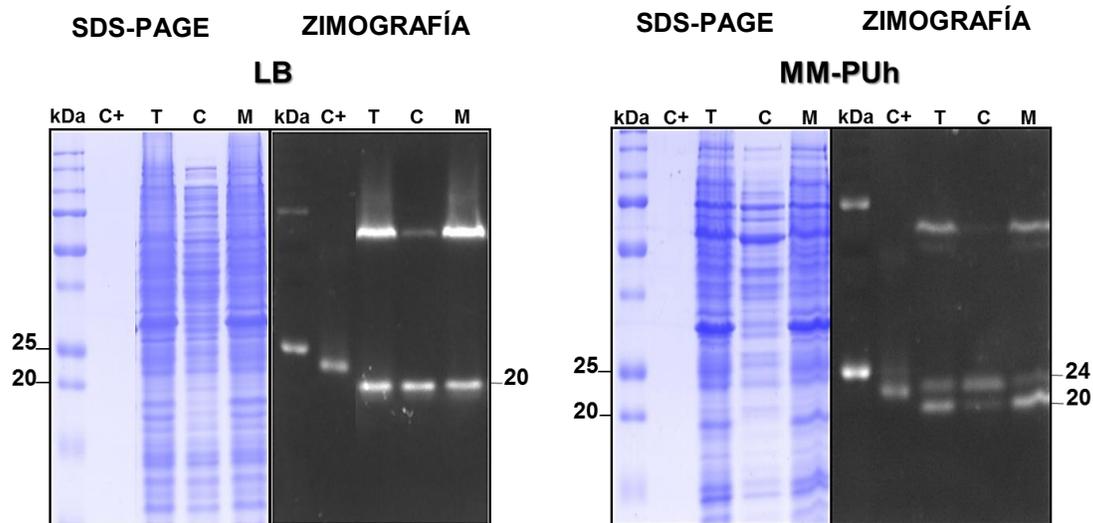


Figura 6. Patrón de proteínas y zimografía para actividad esterasa en medio LB y MM-PUh. Se cargaron 20 μ g de proteína de cada extracto obtenido de cultivos en fase exponencial, extracto total (T), citosólico (C) y membranal (M). MM marcador molecular Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD), C+ control positivo, 0.05 U de lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (Tomado de Moreno-González, 2012).

La técnica para identificar esta proteína fue la zimografía para esterases, empleando como sustrato al 4-metilumbeliferil butirato, que al ser hidrolizado en



su enlace éster produce 4-metilumbeliferona, molécula fluorescente observable con luz ultravioleta (Díaz *et al.*, 1999) (Figura 7).

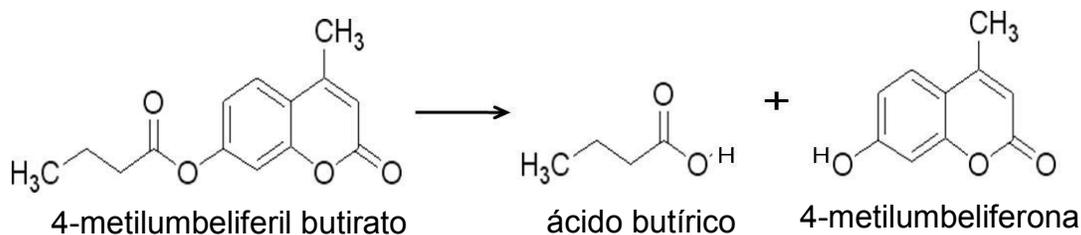


Figura 7. Fundamento de la reacción empleada en la zimografía para esterases.

Habiendo detectado una actividad esterasa que de manera específica se presentaba en los cultivos de BQ1 en Hydroform, se pensó que podría estar involucrada en el proceso degradativo del PU. Desafortunadamente el Hydroform[®] fue retirado del mercado por lo que se tuvo que buscar una nueva fuente de carbono para re-crear los experimentos en donde se observara la inducción de esta actividad esterasa. Se probaron entonces sustratos específicos que regularmente se emplean para evidenciar actividades de tipo esterasa. Uno de ellos fue la tributirina, el cual es un triglicérido de cadena corta (Nawani y Kaur, 2006) y otro fue el aceite de oliva, conformado principalmente por triglicéridos de cadena larga, siendo un sustrato generalmente empleado en la inducción de actividades tipo lipasa.

El crecimiento de BQ1 en el medio mínimo con tributirina fue muy lento comparado con el crecimiento observado en MM-PUh, sólo después de 96 h de incubación (fase exponencial) se logró recuperar pellet celular y la actividad de la esterasa de 24 kDa se observó muy tenue (Figura 8).



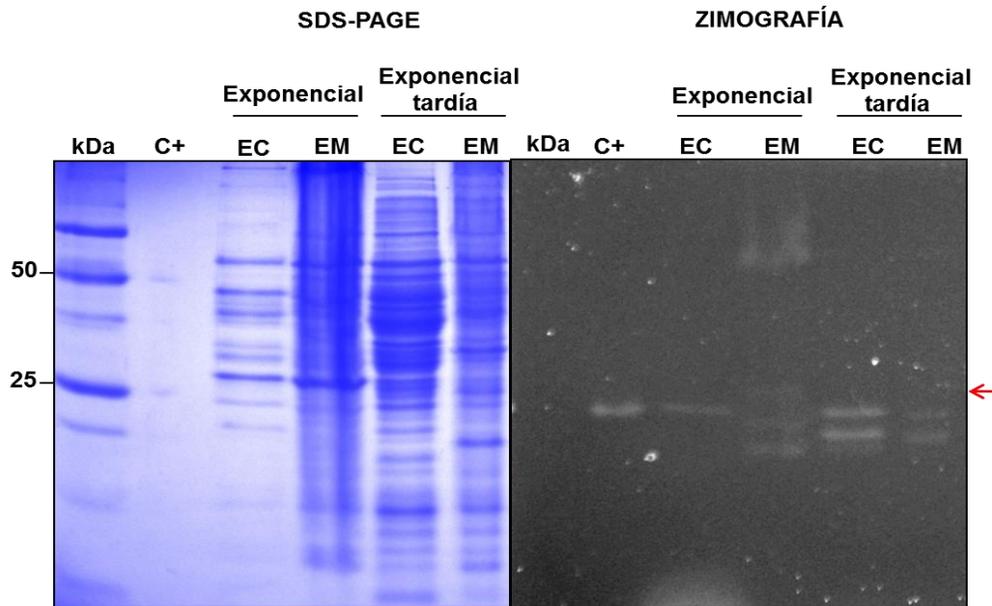


Figura 8. Zimografía para esterasas de los extractos citosólico (EC) y membranal (EM) de BQ1 cultivada en medio mínimo con tributirina (1% v/v). Las fases de crecimiento analizadas fueron exponencial (96 h) y exponencial tardía (120 h). Se cargaron 25 μ g de proteína en cada carril. Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD), C⁺ control positivo 5 μ g de lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (0.05 U). La flecha señala la posición en la que debería encontrarse la esterasa buscada.

En los cultivos con aceite de oliva como única fuente de carbono el crecimiento de BQ1 también fue lento, no observándose la esterasa de 24 kDa (Figura 9). Esta ausencia probablemente esté relacionada con la falta de actividad de la esterasa hacia triglicéridos de cadena larga, es decir, que esa esterasa no posee actividad de tipo lipasa (Jaeger *et al.*, 1999). Sin embargo, son necesarias más evidencias para aseverarlo.



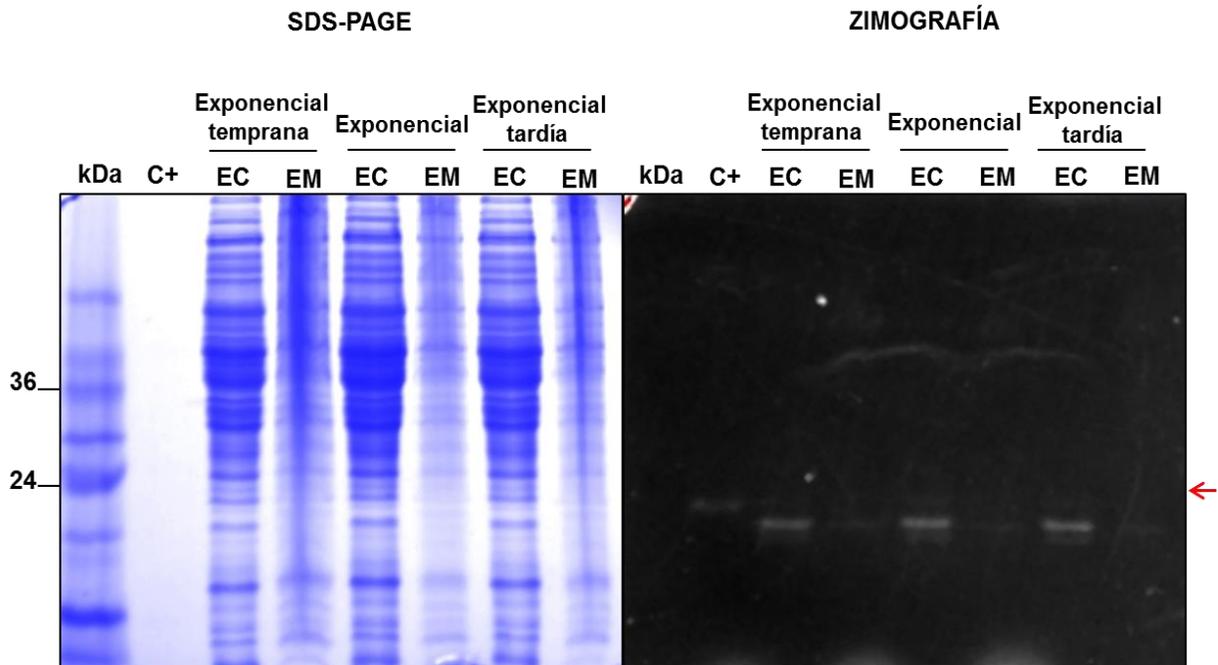


Figura 9. Zimografía para esterasas de los extractos citosólico (EC) y membranal (EM) de BQ1 cultivada en medio mínimo con aceite de oliva (1% v/v). Las fases de crecimiento analizadas fueron exponencial temprana (72 h), exponencial (96 h) y exponencial tardía (120 h). Se cargaron 25 µg de proteína en cada carril. Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards™ (BIO-RAD); C⁺ control positivo 5 µg de lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (0.05 U). La flecha señala la posición en la que debería encontrarse la esterasa buscada.

Obtenidos los resultados negativos previamente descritos y recordando que en nuestro laboratorio se había demostrado mediante análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) que el barniz Hydroform contenía el solvente NMP y que BQ1 era capaz de crecer empleando esta γ -lactama como única fuente de carbono (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007), decidimos probar si el cultivar a BQ1 en NMP inducía una actividad esterasa de 24 kDa. BQ1 cultivada en NMP mostró buen crecimiento. Se realizó un análisis curso temporal para monitorear esta inducción en diferentes etapas del crecimiento de BQ1. Se encontró que la esterasa de 24 kDa, cuya señal se localiza abajo del marcador de 25 kDa y ligeramente arriba del control positivo (lipasa de *P. fluorescens*), se sintetiza en el citosol durante la fase exponencial temprana (12 h



de incubación) y se mantiene hasta la fase estacionaria (48 h de incubación) (Figura 10), en el cultivo en NMP pero no en LB. En el extracto citosólico se observaron también esterases de otros tamaños las cuales no fueron motivo de nuestro estudio por estar expresadas tanto en LB como en MM-NMP. Con este resultado se identificó una actividad de tipo esterasa de aproximadamente 24 kDa inducida por NMP en el medio de cultivo, lo que sugiere su posible participación en el metabolismo de este compuesto.



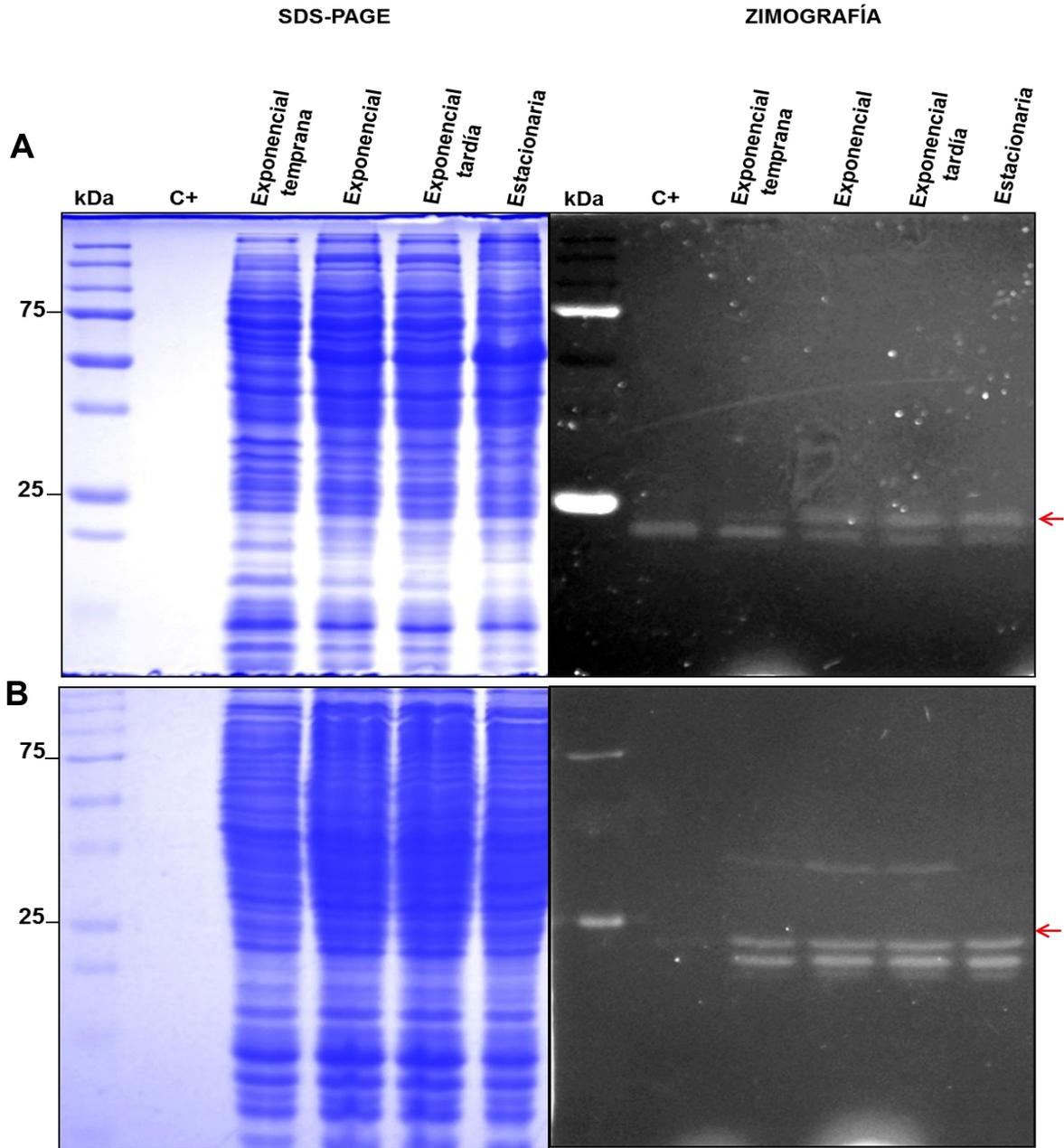


Figura 10. Comparación del patrón de esterases del extracto citosólico de BQ1 en medio mínimo adicionado con NMP (2.5 mg/mL) (A) y LB (B). Las fases de crecimiento analizadas fueron exponencial temprana (4 h LB/12 h en NMP), exponencial (6 h en LB/24 h en NMP), exponencial tardía (9 h en LB/36 h en NMP) y estacionaria (12 h en LB/48 h). Se cargaron 25 μ g de proteína en cada carril. Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD); C+ control positivo (5 μ g de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*) (0.05 U). La flecha señala la posición de la esterasa buscada.



9.2. Identificación de la esterasa de 24 kDa mediante espectrometría de masas nano-LC-ESI-MS/MS

Para la inducción de la actividad de la esterasa de BQ1 se empleó como fuente de carbono NMP (2.5 mg/mL), cosechándose las células al inicio de la fase estacionaria (48 h). En un primer análisis, el EC total, se sometió a una 2D-PAGE, seguida de la zimografía para esterases. En este 2D-PAGE se observó buena distribución de las proteínas, sin embargo se produjo un barrido que provocó que algunos spots no tuvieran buena resolución y nitidez, esto probablemente, como consecuencia de los solventes orgánicos empleados en la extracción de las proteínas. En la zimografía para esterases se observaron varias señales con actividad de aproximadamente el mismo tamaño, menor a 25 kDa, presentando diferentes pls, estas señales correspondieron a puntos definidos en el gel teñido con azul de Coomassie (Figura 11A). El montaje de la zimografía en la la 2D-PAGE fue complejo, ya que debido a los tratamientos que se le dieron a las proteínas para ser resueltas en la electroforesis, no se lograba obtener una señal para actividad esterasa. No fue sino hasta que realizamos una incubación más extensa en la solución de Tritón X-100 (2.5% v/v) (dos lavados de 45 min cada uno), que logramos la renaturalización *in situ* de las proteínas, con la consecuente detección de la actividad esterasa buscada. Este protocolo ha sido muy importante pues con base en él hemos podido rastrear la actividad de la esterasa de interés. De las señales con actividad encontradas se eligió el spot con un pl cercano a 7, se cortó del gel y se envió a la Proteomics and Mass Spectrometry Facility, de la Medical School at Massachussets University, para ser identificada mediante espectrometría de masas nano-LC-ESI-MS/MS. Un análisis bioinformático (NCBI) del genoma de *Alicyclophilus denitrificans* BC reveló que la mayoría de las esterases de 24 kDa presentaban un pl cercano a 7 (<http://www.expasy.org/proteomics>), por lo que el encontrar varias manchas proteicas con este tamaño y diferentes pls resultó una sorpresa. Posibles explicaciones son, que estos distintos spots sean la misma proteína con diferente carga generadas por modificaciones post-traduccionales, o que en BQ1 existan



otras esterasas de 24 kDa con diferentes pIs, que no están presentes en BC, que fue el que analizamos bioinformáticamente. Desafortunadamente no fue posible analizar por espectrometría de masas todas las señales que presentaban actividad esterasa, para saber con precisión a qué correspondían.

En un segundo análisis, a efecto de purificar parcialmente la esterasa de 24 kDa y lograr una mejor separación en los patrones de proteínas de los geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se emplearon geles de 16 x 20 cm usando el sistema PROTEAN® II xi Cell, en los que fue posible cargar más cantidad de proteína que en un gel pequeño. Posterior a la corrida electroforética y empleando como referencia el marcador de peso molecular, se cortó la sección horizontal del gel comprendida entre 22 y 30 kDa, evitando incluir las proteínas de 20 kDa, para posteriormente someterla a electro-elución. Éste no es estrictamente un método de purificación pero es posible eliminar una gran cantidad de proteínas con base en su tamaño, antes de eluir las proteínas de interés del gel (Andersen y Heron, 1993). Posteriormente, las proteínas eluidas se separaron por electroforesis en geles de doble dimensión (2D-PAGE), que fueron revelados por zimografía para esterasas. En esta segunda réplica en el gel se observó buena distribución de las proteínas además de un ligero barrido que provocó baja nitidez de los diferentes spots. El patrón de proteínas teñidas con azul de Coomassie mostró sólo proteínas con tamaños esperados, entre 22 y 30 kDa. En la zimografía para esterasas nuevamente se eligió un spot con actividad con un pI alrededor de 7 (Figura 11B) y se envió para su análisis a la misma Unidad de Proteómica de la Medical School at Massachusetts University.



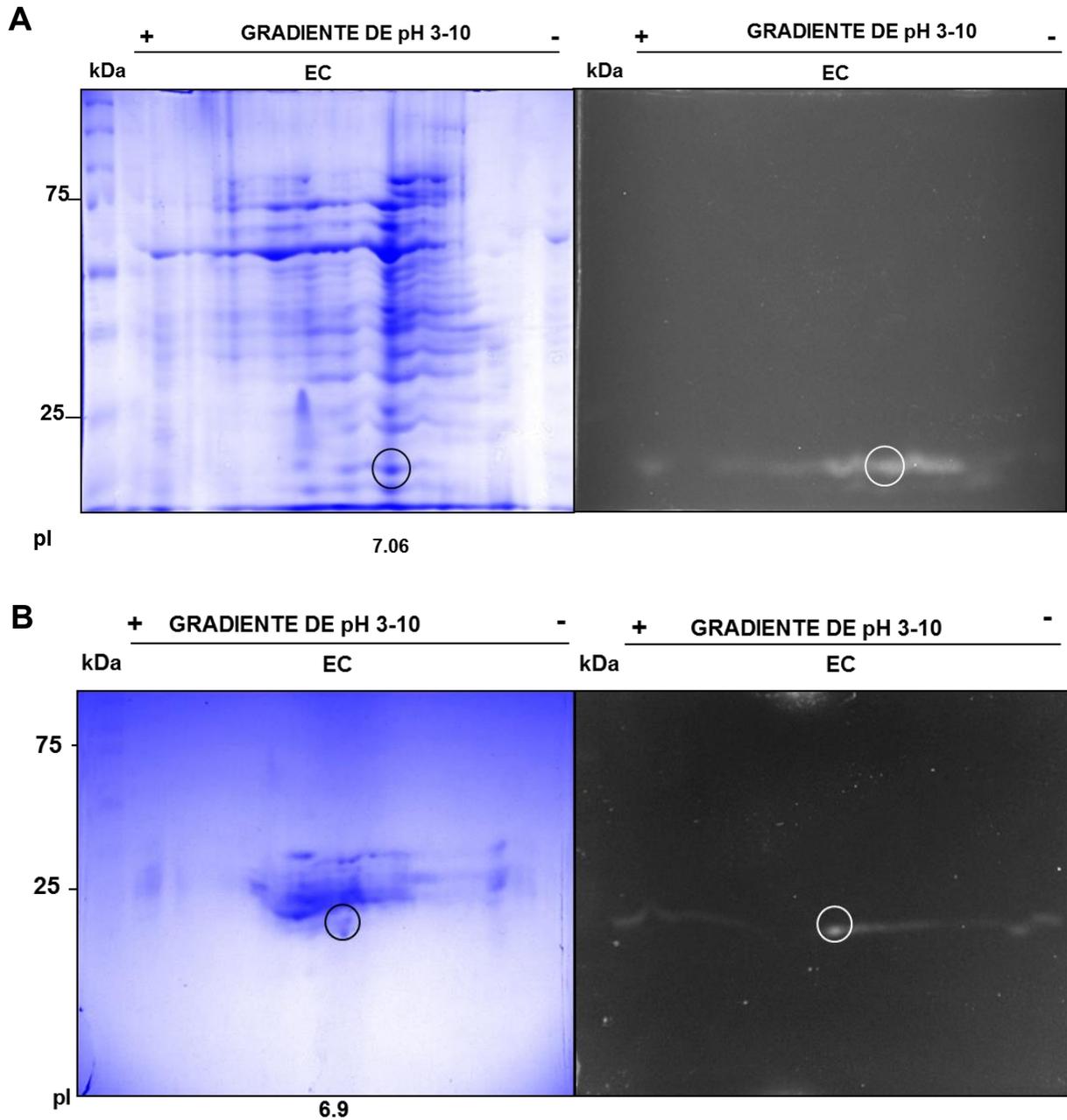


Figura 11. Doble dimensión del EC de BQ1 cultivada en NMP (2.5 mg/ml), sin previa electro-elución (A) y eluido con el equipo Whole Gel Eluter (BIO-RAD) (B). Patrón de proteínas teñidas con azul de Coomassie coloidal (izquierda) y zimografía para esterasa (derecha). Se empleó un gradiente de pH inmovilizado de 3 a 10. Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). Los círculos indican el spot escindido para su análisis por nano-LC-ESI-MS/MS.



El resultado de la identificación mediante nano-LC-ESI-MS/MS de los dos spots analizados arrojó, cada uno, cerca de 50 proteínas (Apéndice 2, Tablas iii y iv). A efecto de integrar ambos resultados, se conjuntaron los datos en un solo análisis con Scaffold (Apéndice 2, Tabla v). En este análisis, la mayoría de las proteínas identificadas correspondían a enzimas con actividad de tipo oxido-reductasa y en las restantes ninguna presentaba actividad enzimática de tipo esterasa. Por lo tanto, cada una de las posibles proteínas reportadas en los análisis de masas fue detalladamente analizada con respecto a su posible actividad enzimática. Dado que el criterio para rastrear experimentalmente a la proteína de interés fue su actividad hidrolítica sobre un substrato con un enlace éster, nuestro principal criterio fue precisamente el buscar una actividad hidrolítica en las proteínas resultante del análisis de masas. Con este criterio, solamente dos proteínas presentaron actividad de tipo hidrolasa. La primera correspondió a una proteína de la familia LamB/YcsF de *Alicyclophilus denitrificans* BC, gi|319762338, que presentó una cobertura del 59% y un tamaño de 26 kDa. La segunda fue una dienolactona hidrolasa (DLH) de *Alicyclophilus denitrificans* BC, gi|319764604, que mostró una cobertura del 10% y un tamaño de 23 kDa (Apéndice 2, Tabla vi). Como ambas proteínas fueron identificadas con base en el genoma de *A. denitrificans* BC, se realizó una búsqueda con las secuencias correspondientes, en el genoma de BQ1 que estamos secuenciando en nuestro grupo y que aún no está ensamblado por completo, a efecto de encontrar los respectivos genes homólogos. El gen de LamB/YcsF se localizó en el contig 75 y el de la DLH se localizó formando parte del contig 5.

9.3. LamB/YcsF

En *Aspergillus nidulans* el gen *intA* también llamado *amdR* es un factor de transcripción con dominio de unión a ADN en el extremo amino terminal, de tipo “zinc finger”, este gen actúa como regulador positivo coordinando la expresión de genes estructurales involucrados en el catabolismo de amidas, lactamas y α aminoácidos (Andrianopoulos y Hynes, 1988). A principios de los 70s se sabía que



intA regulaba los genes *amdS*, *gatA* y *gabA*, en 1978 Arst y col. en su búsqueda por saber si había otros genes regulados por *intA* encontraron un cuarto gen al que denominaron *lamA*. La función exacta de la proteína codificada por *lamA* no la pudieron determinar, pero demostraron con evidencias genéticas, que el producto de *lamA* es imprescindible para el uso de la 2-pirrolidona y 2-piperidona y que su función es el primer paso para la metabolización de éstas pues cuando mutaron el gen *lamA*, se evitaba la formación de GABA el cual es producto de la hidrólisis de la 2-pirrolidona. Sin embargo, no pudieron demostrar *in vitro* la actividad tipo lactamasa de esta proteína, por lo que no determinaron si su función era realmente de lactamasa o de permeasa.

Por su parte, Katz y Hynes (1989) descubrieron que el locus *lam* en *A. nidulans* estaba conformado por dos genes transcritos de manera divergente, el gen *lamA* y el gen *lamB*, ambos fuertemente regulados por limitación de carbono y nitrógeno. Con este descubrimiento sugirieron que uno de ellos podría funcionar como permeasa y el otro como lactamasa. Al mutar el gen *lamA* demostraron que su función era el paso limitante en la utilización de la 2-pirrolidona, mientras que al mutar el gen *lamB* no se tuvo mucho impacto en el empleo de este sustrato, por lo que propusieron o que la 2-pirrolidona podía difundirse de manera pasiva a través de la membrana o bien, que existía otra proteína que podía suplir su función. A pesar de este resultado, en este reporte tampoco se demostró qué gen codificaba para la permeasa y cuál para la lactamasa, por lo que controversia permaneció.

La función exacta de estas proteínas no se ha podido determinar por métodos genéticos, sólo se ha propuesto que tanto la permeasa como la lactamasa son necesarias para la utilización de las lactamas 2-pirrolidona y 2-piperidona. Más aún, Richardson y col. (1992) compararon la secuencia de *lamB* con las bases de datos del National Biomedical Research Foundation y del GenBank, y no encontraron homología alguna con ninguna clase de proteínas. En vista de que una propuesta era que *lamB* codificaba para una permeasa y sabiendo que éstas poseen regiones altamente hidrofóbicas capaces de formar dominios intermembranales, se analizó su secuencia con un algoritmo diseñado para



predecir dichos dominios, sin embargo no se encontraron regiones con dicho perfil de hidrofobicidad, por lo que en ese trabajo, los autores indicaron que muy probablemente *lamB* no codifica para una permeasa sino para la lactamasa, por lo que *lamA* codificaría entonces para la permeasa, aunque señalan que también es posible que ambas proteínas formen un complejo cuya característica sea tener ambas funciones.

Hasta ahora, no se tiene más información para dilucidar cuál de los dos genes codifica para la proteína con actividad hidrolítica y cual para la permeasa, sin embargo en el GenBank (NCBI) se encuentran ya registrados ambos genes de *Aspergillus nidulans*, con el número de acceso gi|168059 para *lamA* y gi|168060 para *lamB*, además en el PDB se encuentra anotado que el producto del gen *lamB* es una proteína hidrolítica llamada LamB/YcsF relacionada con la hidrólisis de lactamas.

La capacidad de BQ1 para metabolizar la NMP es de gran relevancia ya que esta γ -lactama es un solvente tóxico y teratogénico cuya biodegradabilidad es de inherente importancia debido al incremento en su uso en diversas industrias (Payan *et al.*, 2003). Sólo existe un reporte relacionado con la biodegradación de la NMP en el cual se emplearon tanto un sistema estático como otro semi-continuo de lodos activados, en los que se observó que la concentración de NMP disminuía durante la biodegradación y, empleando espectroscopía de infrarrojo (FTIR), encontraron que mientras la NMP presenta una señal característica a una longitud de 1665 cm^{-1} , correspondiente al grupo carbonilo adyacente a un átomo de nitrógeno, el espectro FTIR de la NMP sometida a dos semanas de tratamiento presentó dos señales, una a 1700 cm^{-1} y otra a 1680 cm^{-1} . Este cambio en las señales del espectro para NMP indicó que en el proceso de biodegradación ocurrió una escisión entre el átomo de nitrógeno y el átomo de carbono del grupo carbonilo, generándose como producto principal un compuesto carbonilo no identificado (Chow y Ng, 1983). En otro estudio se identificó una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de suelo, capaz de utilizar la 2-pirrolidona, una lactama relacionada con la NMP, como única fuente de carbono y nitrógeno. Los



autores proponen que el primer paso en el metabolismo de esta lactama es una hidrólisis del enlace amida cuyo producto es el ácido- γ -aminobutírico (GABA), el cual después se transamina para formar ácido glutámico y succinaldehído (Figura 12) (Noe y Nickerson, 1958). De manera interesante, esta cepa de *P. aeruginosa* no fue capaz de crecer en NMP, posiblemente debido al metilo que está unido al nitrógeno del anillo lactámico, el cual puede representar algún impedimento para la o las proteínas involucradas en su hidrólisis.

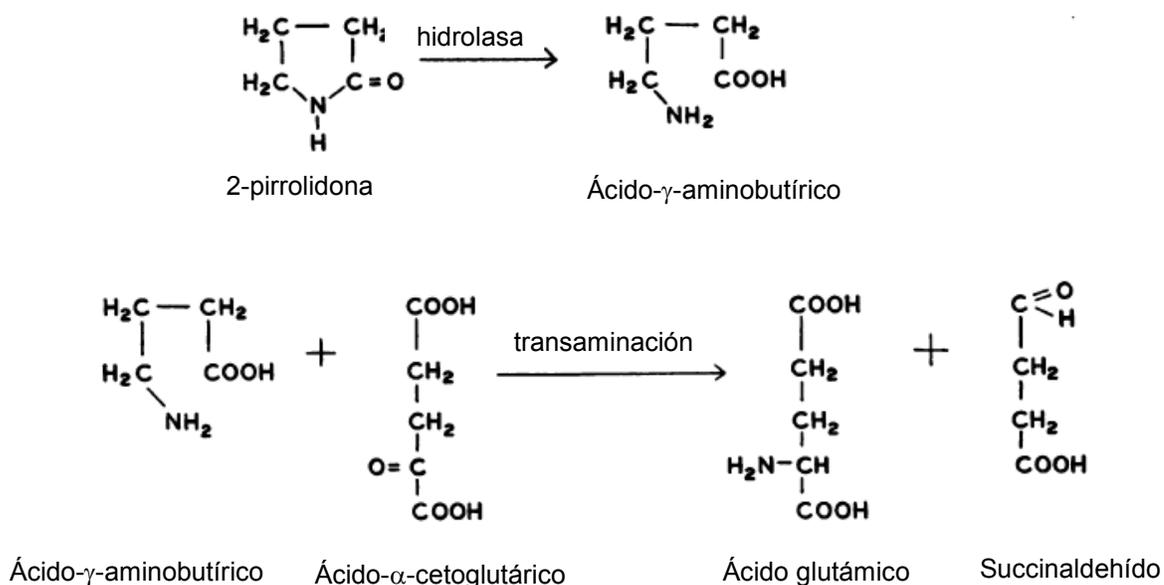


Figura 12. Metabolismo de la 2-pirrolidona en *Pseudomonas aeruginosa* (Tomado de Noe y Nickerson, 1958).

En vista de lo anterior, se sugieren dos reacciones que podría estar empleando BQ1 para metabolizar la NMP, la primera es la hidrólisis del enlace amida sin que el grupo metilo unido al anillo lactámico represente un impedimento estérico; la segunda es la escisión del grupo metilo por oxidación produciendo 2-pirrolidona, seguida de la hidrólisis del enlace amida para producir GABA. Son necesarios



experimentos posteriores para demostrar si alguna de las dos reacciones puede ser llevada a cabo por la esterasa de 24 kDa.

Por otro lado, realizamos un análisis bioinformático en el Conserved Domains Database (CDD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) a efecto de obtener más información de la función de LamB/YcsF. Este análisis arrojó que LamB/YcsF ha sido clasificada dentro de la subfamilia de las glicósido hidrolasas/deacetilasas (GH) (cd10785) la cual forma parte de la superfamilia de la carbohidrato esterasa 4 (CE4) (cd15692). Las proteínas clasificadas en esta superfamilia catalizan la hidrólisis de grupos acetilo unidos a N u O. En su mecanismo catalítico participan una H y un D, además del motivo H-H-D el cual se une a los iones divalentes Zn^{2+} o Co^{2+} . Algunas proteínas de esta superfamilia son quitina deacetilasas (EC 3.5.1.41), quitina oligosacárido deacetilasas (3.5.1.-), peptidoglicano *N*-acetilglucosamina deacetilasas (EC 3.1.1.-), acetil xilan esterases (EC 3.1.1.72) y xilanasas (EC 3.2.1.8).

La subfamilia de las glicósido hidrolasas/deacetilasas (cd10785) está integrada por cuatro familias en las que se incluye LamB/YcsF. Aunque la función de LamB/YcsF es desconocida se incluyó dentro de esta subfamilia debido a la homología estructural con las GH38 y GH57 (Tabla 4).

Tabla 4. Familias de proteínas que conforman la subfamilia de las glicósido hidrolasas/deacetilasas (cd10785).

Familia	Funciones y características
Glicósido hidrolasa 38 (GH38)	Clase II α -manosidasa (EC 3.2.1.24), catalizan la degradación de oligosacáridos unidos a nitrógeno
Glicósido hidrolasa 57 (GH57)	Sólo se encuentran en procariontes, la mayoría son termoestables, catalizan la hidrólisis de enlaces α -glucosídicos (EC 3.2.1.1; 2.4.1.25; 3.2.1.1/41 y 3.2.1.22)
LamB/YcsF	Función desconocida, asociada a hidrólisis de lactamas
YdjC	Función desconocida



Es interesante señalar que algunas de las proteínas incluidas en la superfamilia cd15692 y en la subfamilia cd10785 están relacionadas con la hidrólisis de polímeros, lo cual implica que estas proteínas tienen capacidad para interactuar con macromoléculas de gran tamaño, por lo que quizá LamB/YcsF también pudiera tener esa capacidad.

La proteína de la familia LamB/YcsF pertenece a la clase alfa/beta, su plegamiento está conformado por ocho hebras β paralelas y una antiparalela formando un barril rodeado por ocho hélices alfa (SCOP, Structural Classification of Proteins). Existe muy poca información de esta familia de proteínas, en el PDB (Protein Data Bank) sólo hay reportadas cuatro estructuras cristalográficas (Tabla 5).

Tabla 5. Proteínas de la familia LamB/YcsF reportadas en el PDB.

ID PDB*	Microorganismo	Resolución (Å)	Estequiometría
2XU2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.3	Homotetrámero
2DFA	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	1.9	Homotetrámero
1V6T	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	1.7	Homotetrámero
1XW8	<i>Escherichia coli</i>	2.0	Homodímero

*ID PubMed no disponibles.

De acuerdo al CATH (classification of protein structures downloaded from the Protein Data Bank, Class, Architecture, Topology and Homologous superfamily) esta proteína tiene topología tipo barril TIM. Este plegamiento es muy común, encontrándolo en proteínas de las cinco clases de actividades enzimáticas (oxidoreductasas, liasas, transferasas, isomerasas e hidrolasas), lo que muestra que su versatilidad es muy notable. Las proteínas con este tipo de plegamiento tienen elevado potencial para aplicaciones industriales debido a la amplia gama de sustratos que pueden emplear (Höcker *et al.*, 2001).



A efecto de analizar el contexto genómico del gen *lamb/ycsf* de BQ1 se examinaron los genes aledaños presentes en el contig 75 (Figura 13) pues el genoma aún no está ensamblado, encontrando que el gen *lamb/ycsf* forma parte de un posible operón conformado por 5 genes estructurales y un regulador transcripcional, este arreglo se encuentra también en *A. denitrificans* cepa BC, cuyo genoma ya se encuentra publicado. Además, en este cluster empleando el programa Neural Network Promotor Prediction se detectó un posible promotor de 50 nucleótidos de longitud río arriba del primer gen del posible operón y un probable terminador transcripcional Rho independiente de 26 nucleótidos (FindTerm, Softbery Inc.)

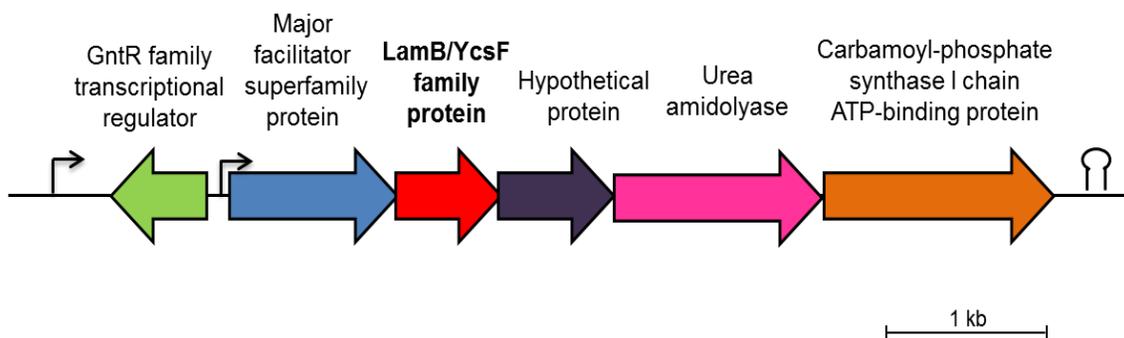


Figura 13. Contexto genómico del gen *lamb/ycsf* de *Alicyclophilus* sp. BQ1. Se emplearon los software ApE-A plasmid Editor v 2.0.45, Neural Network Promotor Prediction y FindTerm, Softbery Inc.

El primer gen de este posible operón codifica un transportador de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily). Este tipo de transportadores pueden ser simportadores, uniportadores o antiportadores que transportan solutos en respuesta a un gradiente quimiosmótico; contienen de 12 a 14 dominios transmembranales, y exhiben especificidades diversas por azúcares, polioles, neurotransmisores, fármacos, metabolitos del ciclo de Krebs, intermediarios glicolíticos fosforilados, aminoácidos, péptidos y aniones orgánicos principalmente (Transporter Classification Database). En vista de lo anterior, sugerimos que el transportador MFS de BQ1 podría tener actividad de permeasa como la sugerida



para el gen *lamA* de *A. nidulans* (Richardson *et al.*, 1992). El segundo gen codifica a LamB/YcsF. Río abajo se encuentra un gen que codifica una urea amidoliasa, esta proteína hidroliza la urea para producir amonio y dióxido de carbono en un proceso de dos pasos en donde interviene el alofanato. La urea amidoliasa está conformada por dos dominios, el llamado dominio alofanato hidrolasa (EC 3.5.1.54) y el dominio urea carboxilasa (EC 6.3.4.6) (Strope *et al.*, 2011). Posteriormente río abajo se encuentra un gen que codifica una carbamoil fosfato sintasa I dependiente de ATP, la cual cataliza la reacción de NH_4 con HCO_3^- para generar carbamoil fosfato el cual participa en el ciclo de la urea (Alcántara *et al.*, 2000). De manera interesante, las actividades de las proteínas codificadas por los genes que conforman al probable operón están relacionadas con el metabolismo de compuestos nitrogenados.

9.4. Dienolactona hidrolasa (DLH)

La otra proteína identificada fue una dienolactona hidrolasa (DLH) (3.1.1.45), ésta pertenece a la clase alfa/beta, su plegamiento es de alfa/beta hidrolasa con un centro de ocho hebras beta paralelas y una antiparalela rodeadas por ocho hélices alfa (SCOP). En el PDB hay reportadas 14 estructuras cristalográficas para esta proteína, en la Tabla 6 se muestra la información de sólo cuatro estructuras, el resto son DLH con mutaciones en el centro activo.

La DLH se encarga de catalizar la conversión de *cis* o *trans*-4-carboximetilen-2-en-4-olida (dienolactona) a maleil acetato (Figura 14). Con base en la especificidad de sustrato las DLHs se han clasificado en aquellas que hidrolizan *trans*-dienolactonas, las que hidrolizan *cis*-dienolactonas y las que emplean tanto *trans* como *cis*-dienolactonas (Park *et al.*, 2010). Se ha reportado que esta enzima participa en la degradación microbiana de compuestos cloroaromáticos provenientes de desechos industriales, es la tercera proteína de la vía de conversión de los cloro-catecoles a β -ceto adipato, este último es un metabolito que se integra al ciclo de Krebs para producir CO_2 y H_2O (Cheah *et al.*, 1993).



Tabla 6. Algunas DLH reportadas en el PDB.

id PDB	Microorganismo	Resolución (Å)	Estequiometría	Bibliografía
4P93	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	1.85	Monómero	Porter <i>et al.</i> , 2014
2O2G	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	1.92	Monómero	ID PubMed no disponible
3F67	<i>Klebsiella pneumoniae</i> MGH 78578	1.74	Monómero	ID PubMed no disponible
1DIN	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	1.80	Monómero	Ollis y Pathak, 1990

En el PDB se le asigna la función de hidrolizar los enlaces tipo éster y amida, este amplio rango de sustratos que puede emplear se debe a que algunas proteínas hidrolíticas exhiben actividad “promiscua” frente a sustratos relacionados estructuralmente, por lo que se propone que podría hidrolizar el enlace de tipo amida presente en la NMP y el enlace éster presente en el MUB.



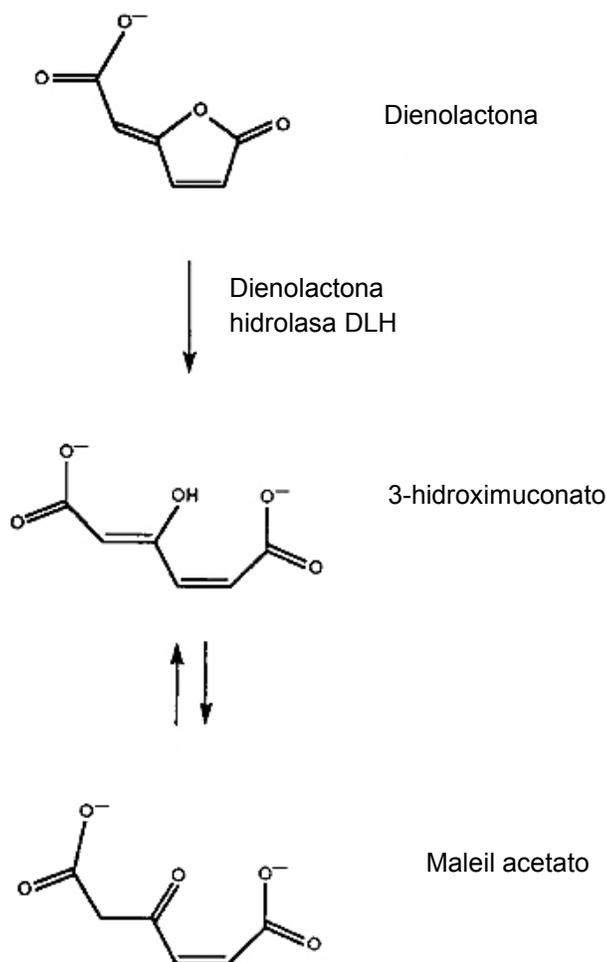


Figura 14. Reacción catalizada por la DLH (Tomado de Cheah *et al.*, 1993).

9.5. Expresión de las proteínas recombinantes Lamb/YcsF y DLH

Debido al alto contenido de GC en el genoma de BQ1 la amplificación mediante PCR de los genes *lamb/ycsf* y *dlh* sólo se logró empleando dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (v/v) en las mezclas de reacción. El tamaño del amplicón de *lamb/ycsf* es de 763 pares de bases (pb) (Figura 15 A) y del gen *dlh* es de 652 pb (Figura 15 B). Las temperaturas de alineamiento con las que se consiguieron



mejores amplificaciones fueron 60 y 55 °C para los amplicones *lamb/ycsf* y *dlh* respectivamente.

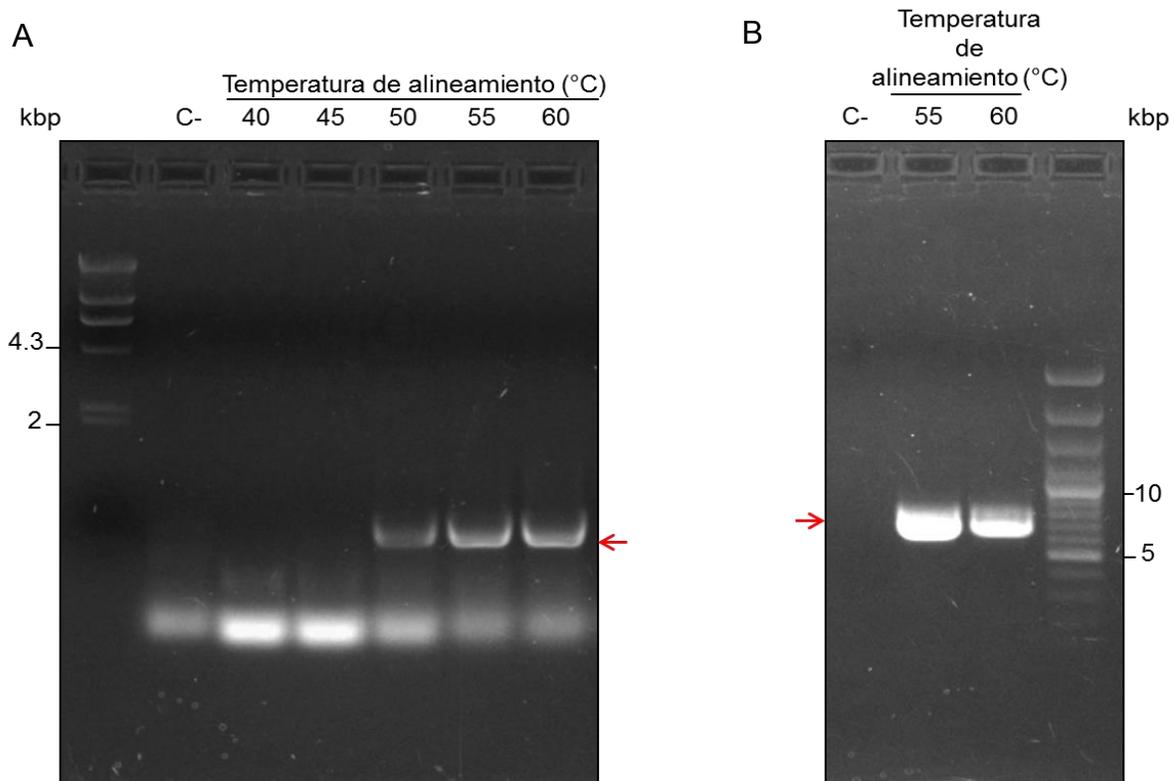


Figura 15. Amplificación de los genes *lamb/ycsf* (A) y *dlh* (B) mediante PCR en gradiente. Electroforesis en geles de agarosa al 1%. Marcador DNA λ digerido con *Hind*III y *Eco*R1 y (MPM) Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder Thermo Scientific.

La inducción de la proteína recombinante LamB/YcsF se realizó a 37 °C con agitación constante de 200 rpm y empleando IPTG a una concentración final de 0.6 mM durante 4 horas de incubación. Se logró inducir la proteína recombinante LamB/YcsF en células de *E. coli* BL21 (Figura 16). En BQ1, LamB/YcsF es una proteína citosólica por lo que se fraccionaron los extractos obtenidos de la cepa transformada para verificar que la proteína recombinante se encontraba en la fracción soluble. Desafortunadamente se obtuvo en la fracción insoluble siguiendo un mal plegamiento, probablemente formando cuerpos de inclusión. Por lo anterior y debido a que se pretendía obtener la proteína recombinante con actividad, se



intentó inducirla tanto a temperatura ambiente como a menor agitación para lograr su plegamiento correcto pero no se tuvo éxito, entonces se siguieron dos protocolos para solubilizar los cuerpos de inclusión en los que se emplearon diferentes concentraciones de urea pero no se pudo recuperar la proteína LamB/YcsF activa.

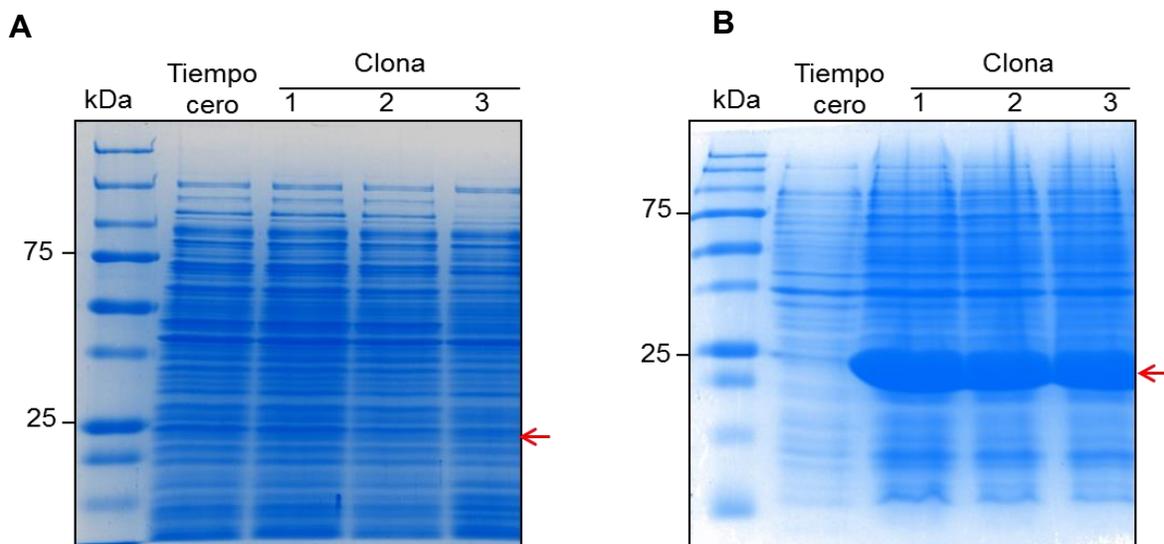


Figura 16. Inducción de la proteína recombinante LamB/YcsF. Los extractos citosólicos se muestran en (A) y los extractos membranales en (B). Se emplearon tres clonas diferentes con el inserto *lamb/ycsf*. Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). SDS-PAGE 15%.

En cuanto a la proteína recombinante DLH, no se pudo inducir en células de *E. coli* BL21 a pesar de haber sido exitosamente clonada.

9.6. Análisis *in silico* de acoplamientos moleculares de LamB/YcsF y DLH con posibles substratos

Debido a que no fue posible obtener proteína recombinante activa para ninguna de las dos proteínas en estudio, y a efecto de tener un primer acercamiento para



comprobar la hipótesis de que las proteínas LamB/YcsF y/o DLH podrían hidrolizar los enlaces de tipo amida del NMP, de tipo éster para el MUB, así como para explorar la posibilidad de que pudieran también reconocer los enlaces amida presentes en los grupos carbamato del PU, se decidió emplear un abordaje *in silico*, realizando acoplamiento molecular. La simulación del acoplamiento molecular ligando-receptor o “docking” es un conjunto de procedimientos de la química *in silico* utilizado para explorar, modelar y predecir la posible formación de complejos intermoleculares. Desde sus inicios en la década de los 80’s, ha sido ampliamente utilizado para la identificación y diseño de ligandos principalmente con probable actividad farmacológica. La simulación incluye la identificación de un posible sitio de unión en la molécula blanco y la evaluación de los complejos moleculares teóricos que involucran la menor energía de formación (Sousa *et al.*, 2006). Para la realización de un acoplamiento molecular se requiere disponer de un ligando para simular su asociación a la molécula blanco, de una estructura tridimensional sobre la cual deberá identificarse el sitio de unión de la molécula de prueba y de un algoritmo computacional que pueda emplear cada uno de los ligandos para encontrar la mayor cantidad de sus conformaciones de baja energía y colocarlos dentro de los sitios potenciales de unión (Yuriev y Ramsland, 2013). En el presente trabajo se modelaron para ser empleados como ligandos, las moléculas de la Tabla 7 cuyas representaciones estructurales se muestran en las Figuras 17 y 18.



Tabla 7. Ligandos modelados para ser empleados en los acoplamientos moleculares.

Ligando	Tipo de enlace hidrolizable	Descripción
MUB	Éster	Substrato empleado para revelar mediante zimografía la actividad tipo esterasa
NMP	Amida	γ -lactama empleada como fuente de carbono por BQ1. Induce la expresión de la esterasa de 24 kDa
bis (4-nitrofenil) hexano-1,6-diil dicarbamato (NFHDC)*	Carbamato	Dicarbamato en el que la hidrólisis del enlace carbamato produce <i>p</i> -nitrofenol que puede ser cuantificado mediante UV
DEG-ADA-MDI.PU	Carbamato y éster	Poliuretano idealizado conteniendo dietilenglicol, ácido adípico y 4-4'diisocianato de difenil metano
DPG-ADA.TDI.PU	Carbamato y éster	Poliuretano idealizado conteniendo dipropilenglicol, ácido adípico y 2-4'diisocianato de tolueno
benceno y etanol	Ninguno	Controles negativos

* Compuesto diseñado y sintetizado por el Dr. Ignacio Regla, FES-Zaragoza, UNAM.

El tercer ligando es un sustrato diseñado *ex profeso* a efecto de comprobar experimentalmente, en futuros ensayos, la hidrólisis de los enlaces carbamato presentes en su estructura. Las estructuras modeladas de los PU son estructuras idealizadas de un monómero de este polímero cuyos precursores de tipo poliol y diisocianato son diferentes. Los controles negativos son moléculas que no poseen grupos susceptibles a ser hidrolizados.



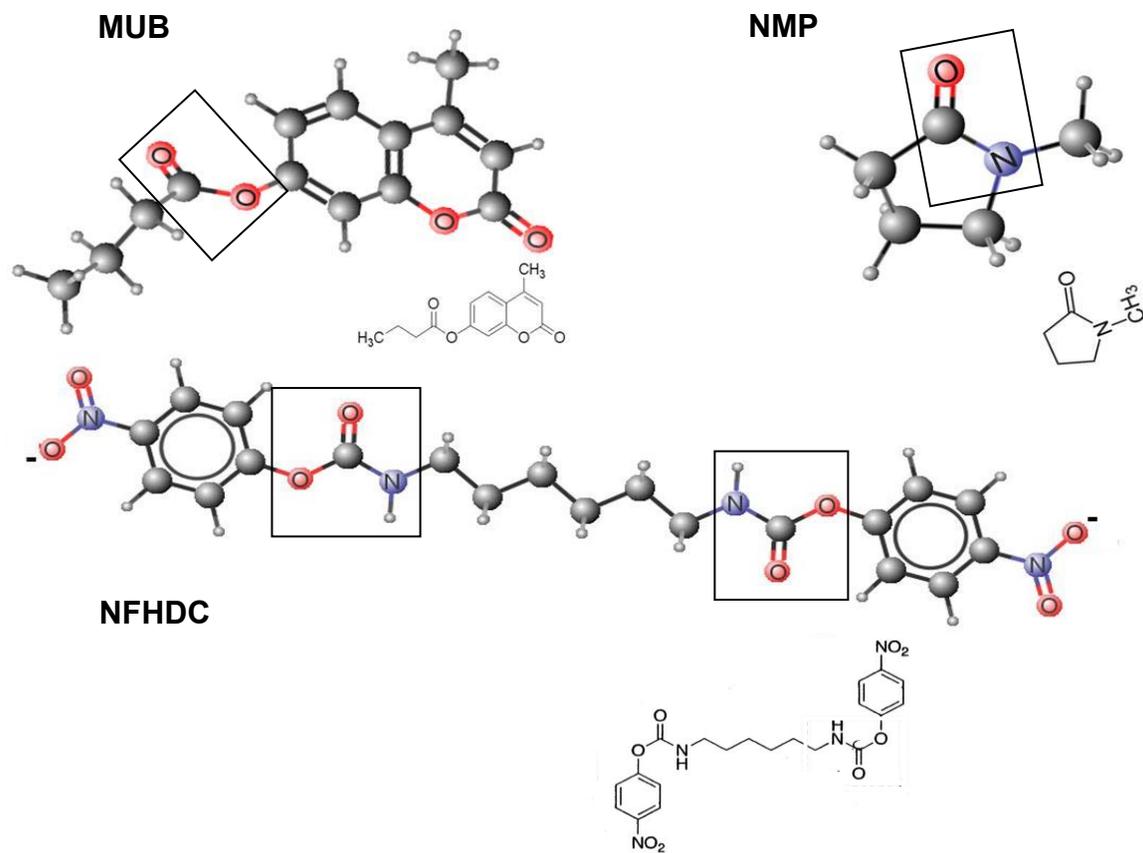
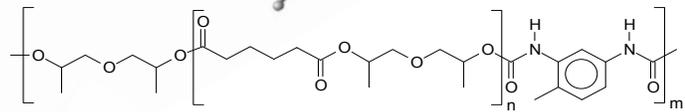
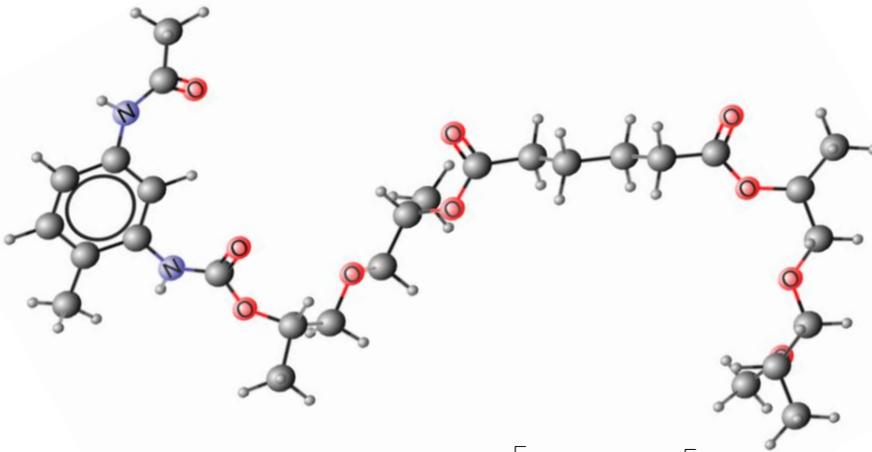


Figura 17. Estructuras modeladas de los ligandos empleados en los acoplamiento moleculares. En la MUB, el recuadro señala el enlace éster; en la NMP, el recuadro señala el enlace amida; en el NFHDC los recuadros señalan los enlaces carbamato.



DPG-ADA-TDI.PU



DEG-ADA-MDI.PU

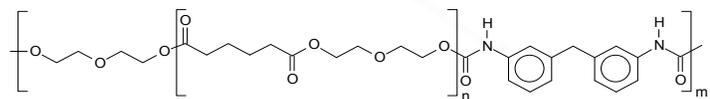
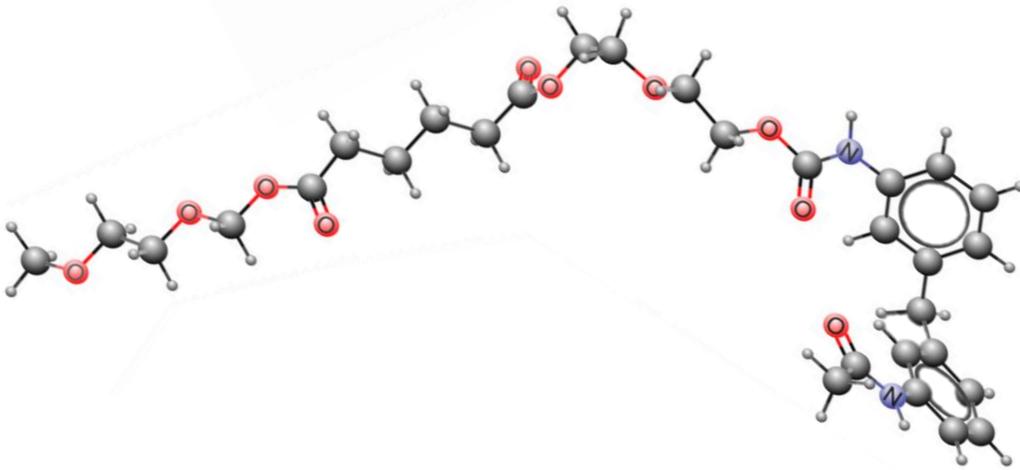
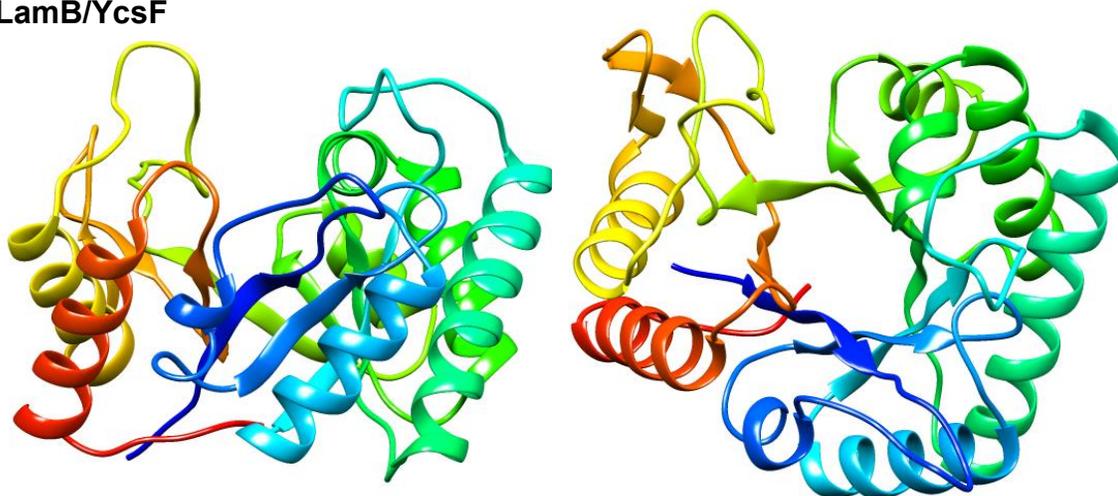


Figura 18. Estructuras idealizadas de los PU's.



Para determinar la estructura tridimensional más factible de las proteínas a analizar, se realizaron modelajes por homología para ambas proteínas, empleando las secuencias aminoacídicas de BQ1. Los modelajes están basados en las estructuras cristalográficas PDB id 2DFA de *Thermus thermophilus* HB8 para LamB/YcsF con 50.4% de identidad en las secuencias, y en la estructura PDB id 2O2G de *Anabaena variabilis* ATCC 29413, para DLH con 54.07% de identidad (Figura 19).

LamB/YcsF



DLH

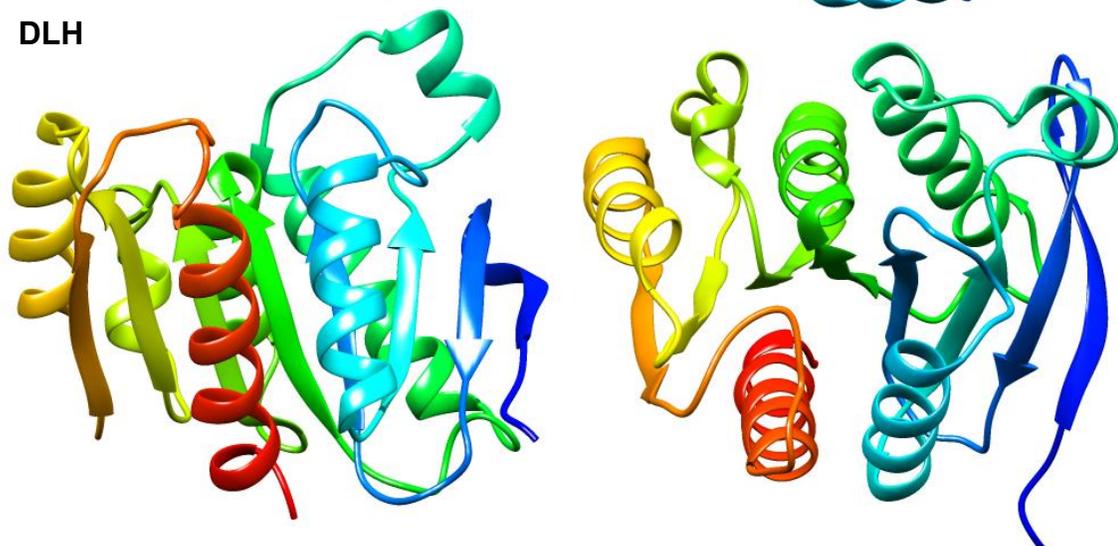


Figura 19. Estructuras terciarias de LamB/YcsF y DLH de *Alicyclophilus* sp. BQ1. En azul se representa el dominio N-terminal y en rojo el dominio C-terminal. A la derecha se muestran las vistas aéreas y a la izquierda las vistas de perfil.



Como se describió anteriormente, hasta el momento no existen pruebas bioquímicas o enzimáticas definitivas que demuestren la función de LamB/YcsF en ningún organismo. Sin embargo, las evidencias genéticas obtenidas en *Aspergillus nidulas* sugieren fuertemente que el gene *lamB* codifica una lactamasa (Richardson *et al.*, 1992; Katz y Hynes 1989). Dado lo anterior, no se han propuesto los residuos que conforman el sitio catalítico de LamB/YcsF, el único acercamiento es para LamB/YcsF de *P. aeruginosa* (2XU2) la cual está cristalizada con el ácido cítrico como ligando, considerando a los aminoácidos Asp14, His68, Lys115, His117, Gly118, Asn122, Phe174, Arg177, Leu185, Arg188 y His232 formando parte del probable sitio activo. Sabiendo esto se realizó un alineamiento (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) de las secuencias de las proteínas de la familia LamB/YcsF cristalizadas y reportadas en el PDB, con la secuencia de BQ1 (Figura 20), encontrando que estos aminoácidos reportados en la estructura 2XU2 de *P. aeruginosa* están altamente conservados en todas las secuencias. Además, se identificaron estos residuos en la estructura tridimensional de LamB/YcsF de BQ1, los cuales son equivalentes a los residuos identificados en la estructura 2XU2 y se observó que forman un posible agujero oxaniónico en el interior del barril (Figura 21), este agujero oxaniónico generado durante el transcurso de la catálisis se forma por puentes de hidrógeno entre grupos NH de residuos proteicos y el sustrato cargado negativamente, estabilizando el estado de transición tetraédrico (Jaeger *et al.*, 1999).



1V6T	-----MRVDLNS	DLGESFGRYKLGLDDEEVMKYITSANVACGWHAGDPLVMRKTVRLAKE	54
1XW8	-----MKIDLNA	DLGEGCAS-----DAELLTLVSSANIACGFHAGDAQIMQACVREAIK	49
2DFA	-----MKVDLNA	DAGESYGAFAFYGHDIIFPLVSSANLACGFHGGSPGRILEAVRLAKA	54
BQ1	----MTRHIDLNS	DLGESLGAWRMGDDAAMLDIVSSANVACGFHAGDPAGILATLTKAAQA	56
2XU2	GANDTGRIRILLNC	DMGESFGAWRMGDDVHSMPLVDQANLACGFHAGDPLTMRRAVELAVR	60
		:: **.* ** . . * : : .**:**:**.*.. : : . *	
1V6T	NDVQVGA	HPGYPDLMGFGRRYMKLTPEEARNYILYQVGALYAFKAEGLELQHVKPHGAL	114
1XW8	NGVAIGA	HPSPFDRENFGRSAMQLPETVYAQTLYQIGALATIARAQGGVMRHVKPHGML	109
2DFA	HGVAVGA	HPGFPLVGFGRREMALSPEEVYADVLYQIGALSFLKAEGPLHHVKPHGAL	114
BQ1	RGVAVGA	HVAYPDLVGFGRNMDVASTDLVADVIYQIGALQGLAHAAGTRVTVYKPHGAL	116
2XU2	HGVSIGA	HPAYPDLSGFGRRSLACSAAEVHAMVLYQIGALDAFCRSLGTQVAVYKPHGAL	120
		..* :*** .:** .*** : .. :**:** : : * : :***** *	
1V6T	YNAMVKEEDLARAVIEGILDFDKDLILVTLNSR---	VADIAEEMGLKVAHEVFADRAYN	171
1XW8	YNQAAKEAQLADAIARAVYACDPALILVGLAGSE---	LIRAGKQYGLTTREEVFADRGYQ	166
2DFA	YDKACRDRETARAIALAVKAFDPGLPLVLPPTV---	YEEEARKAGLRVLEAFPERAYL	171
BQ1	YNTIAHDERQARDVIAAIRAVDAGLALVALAGSP---	LVQWAQDAGLRVIAEAFADRAYT	173
2XU2	YNDLVGDDELLRAVLDACAAAYRKGLPLMVLALADN	GRELELADEADVPLLFEAFADRAYL	180
		* : : . * * : * . : . . . : * . * : * *	
1V6T	PDGTLVPR	GRPGAVIEDKEEIAERVISMVKDGGIRAINGEWVDLKVDTICVHGDNPKAVE	231
1XW8	ADGSLVPR	SQSGALIENEEQALAQTLEMVQHGRVKSITGEWATVAAQTVCLHGDGEHALA	226
2DFA	RSQQLAPR	SMPGSWITDPEEAARRALRMVLEGGKVEALDGGEVAVRADTLCIHHGDNPNAPL	231
BQ1	PQGTIVSR	REKGAVLHDSALVAQRMLRLVREGVVEAVDGLARVQAQSIHVHGDSAGAVE	233
2XU2	PDGRLAPR	LGGAVHHPQRIIEQALAIARGEAFPDYDGNPLRLTADSLVHGDNPQSLA	240
		. * * . * * : : : : . * : : : * : * * * . :	
1V6T	ITSYIRKVL	EEEGVKIVPMKEFIR--	255
1XW8	FARRLRSA	FAEKGIVVAALEHHHHHH	252
2DFA	VARAVREA	LEQAGVEVRAF-----	250
BQ1	MARAVRMA	LES DGVVVRPFA-----	253
2XU2	VLRRLRAL	DSL-----	252
		. : * : . .	

Figura 20. Alineamiento de la secuencia LamB/YcsF de BQ1 con las reportadas en el PDB. En color verde se resaltan los residuos del probable agujero oxaniónico y en rojo los aminoácidos catalíticos propuestos en este trabajo. 1V6T *Pyrococcus horikoshii*; 1XW8 *Escherichia coli*; 2DFA *Thermus thermophilus* HB8 y 2XU2 *Pseudomonas aeruginosa*.



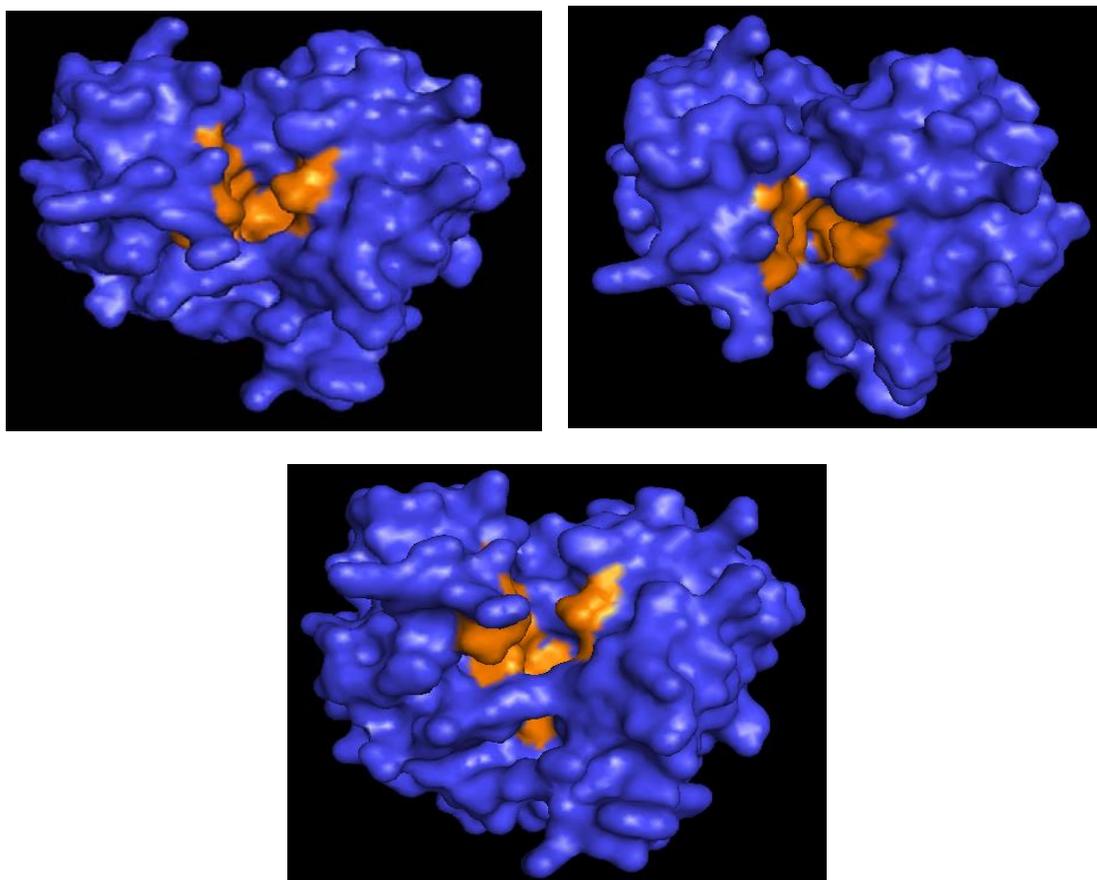


Figura 21. Localización espacial del probable agujero oxaniónico (indicado en color anaranjado) de LamB/YcsF de BQ1. Figuras superiores vista aérea y figura inferior vista lateral.

Por otro lado, a efecto de saber si LamB/YcsF mostraba aminoácidos catalíticos semejantes a los de las proteínas de la familia GH57, se alinearon las proteínas LamB/YcsF cristalizadas con una 4- α -glucanotransferasa de *Thermococcus litoralis* (1K1W) (Imamura *et al.*, 2003) y una α -amilasa de *Bacillus subtilis* (1BAG) (Fujimoto *et al.*, 1998) en las cuales se han identificado los aminoácidos catalíticos, encontrando que ninguna de las proteínas de la familia LamB/YcsF tiene conservados los aminoácidos catalíticos de las dos GH57 analizadas (datos no mostrados). Asimismo, las proteínas LamB/YcsF se alinearon también con dos proteínas de la familia GH38 cuyos residuos catalíticos han sido identificados, una α -manosidasa de *Drosophila melanogaster* (1QWU) y una α -manosidasa de



Streptococcus pyogenes (2WYI), y tampoco se encontraron en LamB/YcsF los aminoácidos catalíticos reportados para estas proteínas (datos no mostrados).

En vista de que en LamB/YcsF de BQ1 no se encontraron los probables residuos catalíticos de las GH57 y GH38, en este trabajo se propone un sitio catalítico para LamB/YcsF. Para ello, se consideraron los sitios catalíticos definidos para las hidrolasas de tipo esterasa y serina proteasa, en cuyos mecanismos catalíticos participan dos componentes, una tríada catalítica y un agujero oxaniónico. Este mecanismo se basa en un sistema de transferencia de carga a través de la tríada catalítica constituida por un residuo nucleofílico de cisteína o serina, una histidina y un residuo de ácido aspártico o glutámico. Conociendo la secuencia y el modelo de la estructura terciaria de LamB/YcsF de BQ1, se buscaron en la proteína todas las posibles combinaciones de aminoácidos que podrían constituir una tríada catalítica conformada por serina o cisteína, aspartato o glutamato e histidina. Se encontró sólo una combinación de tres aminoácidos cuya disposición espacial puede probablemente conformar un potencial sitio de unión para los sustratos. Los residuos identificados espacialmente en la estructura tridimensional fueron D8, C221 y H223, localizados en o cerca de hebras beta, rodeados por dos loops. La distancia entre ellos fue menor de 6 Å (Figura 22), pero no siguen el orden típico nucleófilo-ácido-histidina y tampoco está presente la secuencia consenso G-X-S-X-G, esto último probablemente se deba a que el residuo nucleofílico es una C y no una S (Ollis *et al.*, 1992). Cabe mencionar que cuando se realizó el modelaje por homología de LamB/YcsF de BQ1 con la estructura cristalográfica 2DFA de *Thermus thermophilus* HB8, en la secuencia de BQ1 se eliminaron los dos primeros aminoácidos (M1 y T2) del dominio N-terminal, por lo que en el modelo tridimensional el D10 corresponde al D8, la C223 a C221 y la H225 a H223. Para efectos prácticos en el resto de este trabajo se seguirán manejando los residuos D8, C221 y H223.



El alineamiento con las cuatro secuencias reportadas de LamB/YcsF en el PDB nos permitió confirmar que los aminoácidos propuestos para la tríada catalítica en BQ1, son residuos altamente conservados en las cuatro estructuras, lo cual significa que son importantes para su funcionalidad (Figura 20). De hecho, el D8 y la H223 de BQ1 son los aminoácidos equivalentes al D14 y H232 identificados en el supuesto sitio activo de LamB/YcsF de *P. aeruginosa* cristalizada con ácido cítrico, en la estructura 2XU2 del PDB.

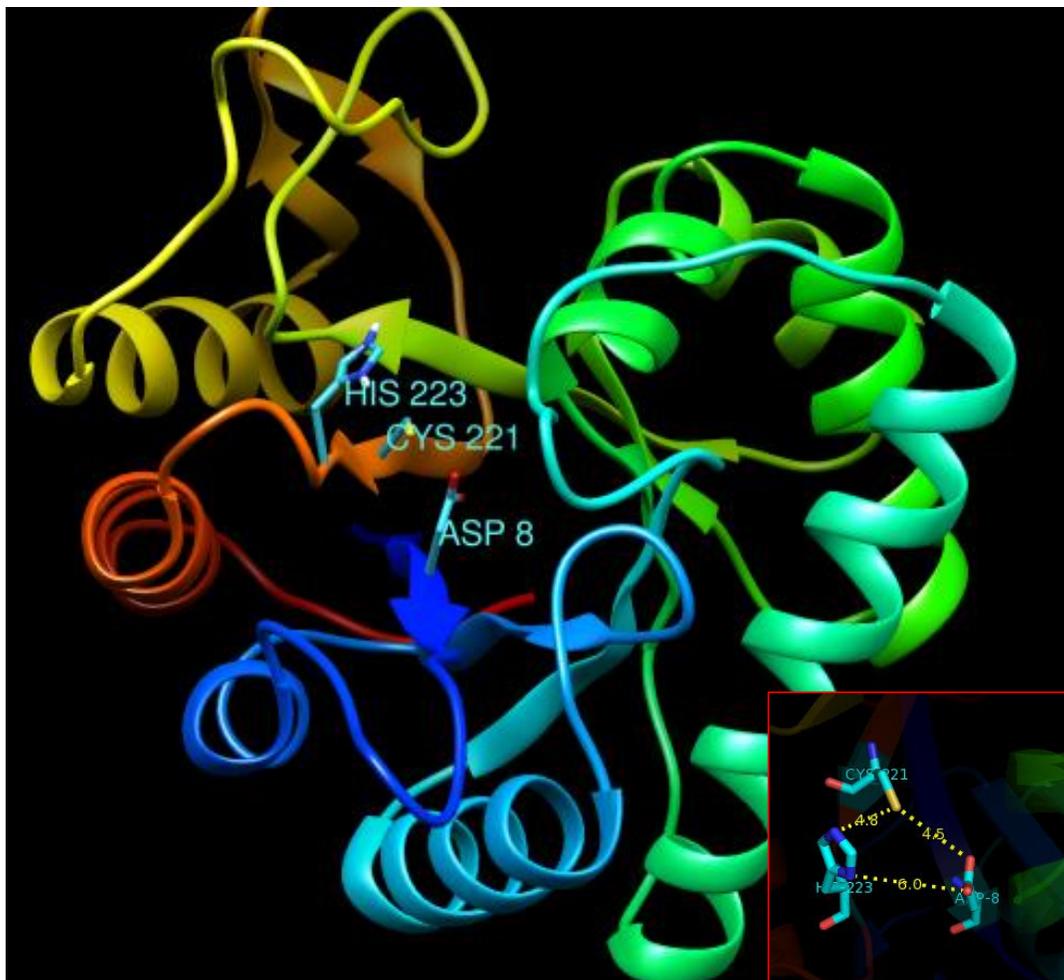


Figura 22. Localización espacial de la probable tríada catalítica de LamB/YcsF de BQ1.



Una vez identificada la probable tríada catalítica de LamB/YcsF de BQ1 se realizaron los acoplamiento moleculares. Uno de los criterios a considerar en estos análisis es la localización espacial y la distancia de los ligandos respecto a los aminoácidos catalíticos de la proteína a estudiar. El análisis *in silico* mostró que todos los ligandos se localizaban cerca de los tres aminoácidos propuestos como residuos catalíticos (Figura 23 y 24). A pesar de que cerca del D8 se encuentra el E11 que por sus propiedades podría funcionar como el D8 en el mecanismo de catálisis y ser parte de la tríada catalítica, este aminoácido se localiza a 9 Å de la H223, una distancia muy grande para que estos aminoácidos interactúen, por lo que se descartó. Por otra parte, el D225 se encuentra a sólo 3.8 Å de la H223, sin embargo los ligandos propuestos se localizaron espacialmente más cerca del D8 que del D225. A pesar de esto, se debe considerar que el presente análisis no es concluyente por lo que puede existir la posibilidad de que el D catalítico sea el 225 y no el D8. Se tendrán que realizar experimentos mutando estos aminoácidos para determinar su participación en la catálisis.

El acoplamiento con la MUB reveló su enlace éster hidrolizable a 6.9 Å de la C221, mientras que el grupo carbonilo de la NMP se localizó a 3.9 Å (Figura 23 A, B). Esta orientación es favorable ya que la cisteína puede entonces realizar el ataque nucleofílico sobre el grupo éster o carbonilo del sustrato y formar el estado de transición tetraédrico (Cheah *et al.*, 1993). En el acoplamiento con el NFHDC, el grupo carbamato se posicionó también cerca de la tríada propuesta, a 8.6 Å de distancia entre la C221 y el grupo carbamato (Figura 23 C). En cuanto a los acoplamiento con los monómeros de PU idealizados, en el caso del DPG-ADA-TDI.PU el grupo carbamato se posicionó cerca de la tríada catalítica con 8.2 Å de distancia hacia la C221; en tanto que el DEG-ADA-MDI.PU se localizó a 8.9 Å de la C221, en ambos casos el tamaño de los polímeros no representó un impedimento para que se posicionaran cerca de la tríada (Figura 24). Los controles negativos que se emplearon no poseen enlaces susceptibles a hidrólisis y no se localizaron en el sitio catalítico propuesto.



Se ha propuesto que para que haya interacción proteína-ligando debe existir en promedio una distancia de 5 Å entre estas moléculas. En estos acoplamientos sólo el ligando NMP se localizó a una distancia menor de 5 Å con respecto a la C221 catalítica.



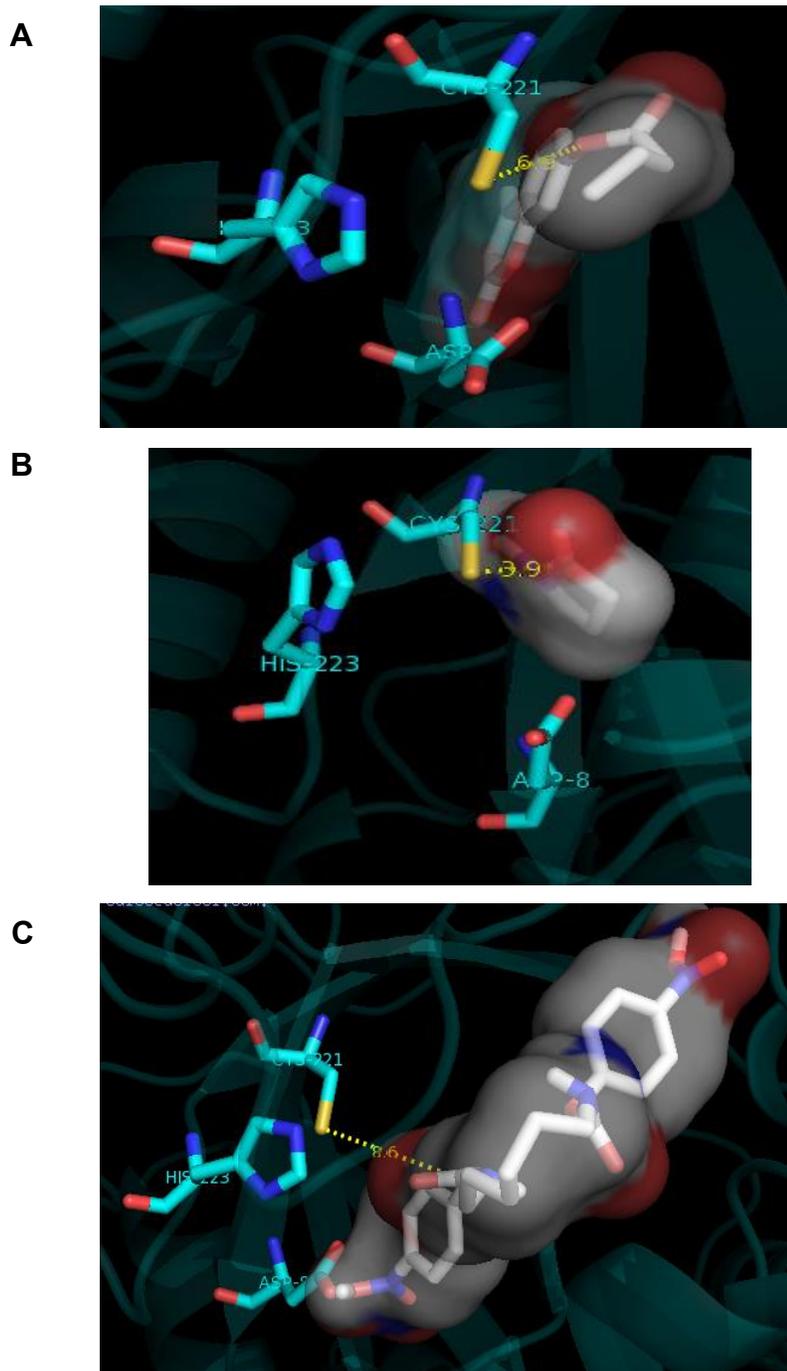
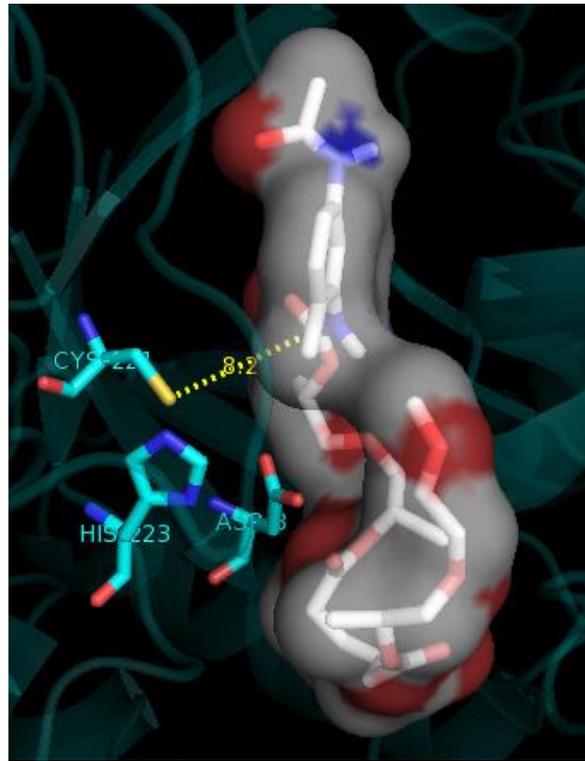


Figura 23. Acoplamiento molecular de LamB/YcsF con los ligandos A) MUB, B) NMP y C) NFHDC. El probable sitio catalítico está etiquetado con los nombres de los aminoácidos. En los ligandos los átomos de carbono se representan en color blanco, los de oxígeno en rojo y los de nitrógeno en azul. En la macromolécula los átomos de carbono se representan en color turquesa, los de nitrógeno en azul, los de oxígeno en rojo y los de azufre en amarillo.



A



B

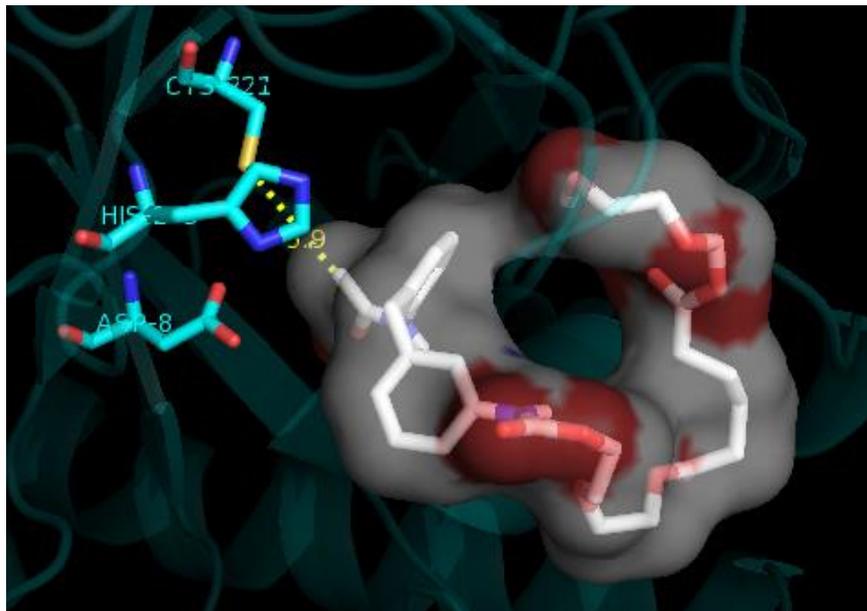


Figura 24. Acoplamiento molecular de LamB/YcsF con los ligandos tipo poliuretano A) DPG-ADA-TDI.PU y B) DEG-ADA-MDI.PU. En el probable sitio catalítico se señalan los aminoácidos propuestos para la tríada catalítica. En los ligandos los átomos de carbono se representan en color blanco, los de oxígeno en rojo y los de nitrógeno en azul. En la macromolécula los átomos de carbono se representan en color turquesa, los de nitrógeno en azul, los de oxígeno en rojo y los de azufre en amarillo.



El análisis por acoplamiento molecular de las interacciones proteína-ligando también genera un valor de energía de afinidad (kcal/mol) para cada complejo formado, el cual se calcula con el campo de fuerza AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement). Entre más negativo sea este valor más posibilidad habrá de que el complejo ligando-proteína se acople *in vivo* (Sousa *et al.*, 2006), de manera general, un valor menor a -7 kcal/mol se considera como interacción exitosa (Velásquez *et al.*, 2013). A pesar de que todos los ligandos empleados se acercaron al probable sitio catalítico, el complejo formado con el dicarbamato (NFHDC) tuvo la menor energía de afinidad (-7.7 kcal/mol), seguido por el MUB, sustrato utilizado en la zimografía para demostrar la actividad tipo esterasa (-7.2 kcal/mol) (Figura 25). A pesar de que en la literatura LamB/YcsF está asociada con la degradación de lactamas, la energía de afinidad del complejo formado con la NMP presentó un valor de -4.4 kcal/mol, aunque el grupo carbonilo se localizó cerca del residuo de cisteína, lo cual es favorable para la hidrólisis de esta γ -lactama. En cuanto a los monómeros del PU, tanto el DEG-ADA-MDI como el DPG-ADA-TDI presentaron energías de afinidad cercanas a -7 kcal/mol. Los controles negativos tuvieron energías de afinidad mayores a -4 kcal/mol y no se acercaron espacialmente al probable sitio catalítico.

El tercer parámetro empleado para predecir el acoplamiento de un ligando es el RMSD (Root Mean Square Deviation), este valor da una idea de la diferencia estructural entre dos conformaciones, por lo que entre menor sea, más favorable es el acoplamiento. Se considera que el valor límite de tolerancia es de 2 Å. (Velásquez *et al.*, 2013). En los acoplamientos realizados para LamB/YcsF el valor más elevado fue de 1.9 Å (Tabla 8). Aunque los controles negativos presentan los menores valores de RMSD, lo que indica que tienen baja diferencia estructural entre sus distintas conformaciones, no se acercaron al probable sitio catalítico y también presentan mayores energías de afinidad.



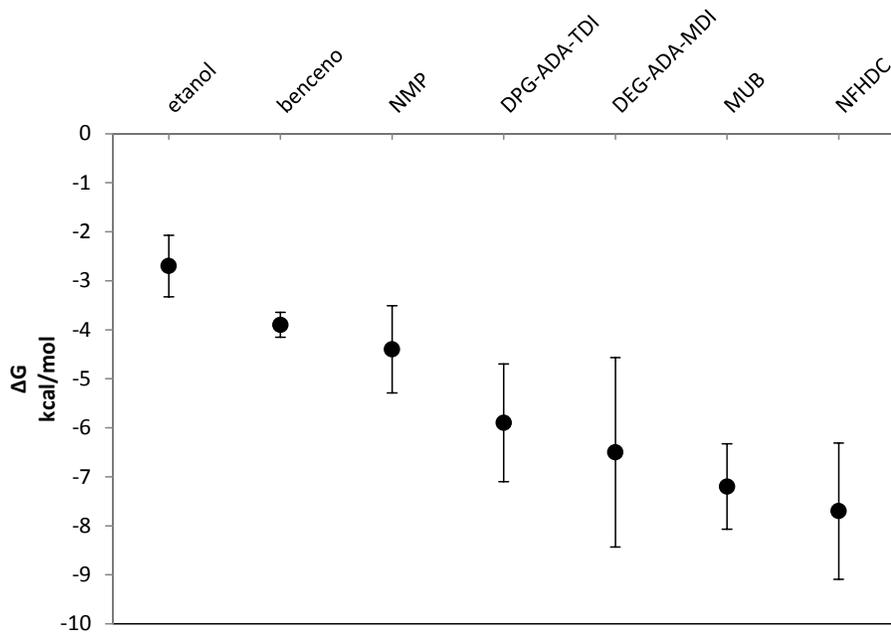


Figura 25. Energías de afinidad de los acoplamientos formados por diversos ligandos con LamB/YcsF de BQ1.

Tabla 8. Valores de RMSD (Root Mean Square Deviation) de los ligandos respecto a LamB/YcsF.

Ligando	RMSD (Å)
Etanol	0.63
Benceno	0.25
NMP	0.89
DPG-ADA-TDI.PU	1.20
DEG-ADA-MDI.PU	1.93
MUB	0.87
NFHDC	1.39



De acuerdo al posicionamiento de los ligandos cerca del probable sitio catalítico de LamB/YcsF, a las energías de afinidad y a los valores de RMSD determinados por el acoplamiento *in silico*, es probable que los complejos formados con el MUB, con el dicarbamato (NFHDC) y con los dos PUs idealizados sean susceptibles a hidrólisis en sus enlaces de tipo éster y amida respectivamente por acción de LamB/YcsF. Sin embargo esta es una propuesta basada en el modelaje molecular y es necesario demostrarlo experimentalmente.

Las proteínas con actividad hidrolítica hacia enlaces de tipo carbamato no son raras, en la literatura hay reportadas algunas cepas bacterianas capaces de asimilar compuestos de tipo carbamato contenidos en herbicidas, pero muy poco se sabe acerca de los sistemas bioquímicos y genéticos asociados con este proceso (Mulbry y Kearney, 1991). Marty y Vouges (1987) identificaron una amidasa citoplasmática de una cepa de *Pseudomonas alcaligenes* aislada de suelo, capaz de hidrolizar el isopropil N-3-clorofenilcarbamato, el cual es un herbicida de tipo fenil carbamato, sin embargo no profundizaron en la caracterización de esta proteína.

En cuanto al análisis de la DLH, en la literatura está reportada la tríada catalítica de una DLH de *Pseudomonas* sp. B13, la cual está conformada por D171, H202 y C123 (Walker *et al.*, 2012). A efecto de localizar estos residuos en la secuencia de la DLH de BQ1, se realizó un alineamiento empleando ClustalW con las secuencias de *Pseudomonas* sp. B13 y *Anabaena variabilis*, correspondientes a las estructuras reportadas en el PDB, encontrando en la secuencia de BQ1 los aminoácidos equivalentes en las posiciones D162, H190 y S112 (Figura 26 y 27). En BQ1, una serina está en lugar de la cisteína, lo cual no es extraño pues tanto la serina como la cisteína pueden realizar el ataque nucleofílico de acuerdo al mecanismo de reacción. Analizando la conformación de la estructura terciaria no se encontró otra probable tríada catalítica conformada por D, H y S o C en ningún otro sitio de la proteína, la distancia entre el grupo imidazol de la histidina 190 y el hidroxilo de la serina 112, la cual realiza el ataque nucleofílico al carbono acilo del



sustrato es de 3.5 Å, mientras que la distancia entre el D162 y la H190 es de 5.7 Å y la distancia entre la S112 y el D162 es de 7.6 Å. (Figura 27).

```

dlh_BQ1      -----MTSPHEQLVRI PVDQAHVEGLLALPAAPIGVVLFAHGS GSS 41
202G        ---GMDRTLTHQPQEYAVSVSVGVEVKLKGNLVIPNGATGIVLFAHGS GSS 47
POA115      MLTEGISIQSYDGHTFGALVGS PAKAPAPVIVIAQEIFGVNAFMRET VSW 50
              . : . : : : : * : * : : *

dlh_BQ1      RHSPRNNYVAGV LHAHGVGTLLLDLLTPEED----RDYRARFDIAL L TQR 87
202G        RYSPRNR YVAEVLQQAGLATLLIDLLTQEEEEIDL RTRHLRFDIGLLAS R 97
POA115      LVDQGYAAVCPDLYARQAPGTALDPQDERQRE-QAYKLWQAFDMEAGVGD 99
              . * . * : * . : : * : .

dlh_BQ1      LRAAARWLGRQPLTRALPMGYFGASTGAAAAALMAAAAQGS DIRAVVSRGG 137
202G        LVGATDWLTHNPD TQHLKVG YFGASTGGGAALVAAAERPE TVQAVVSRGG 147
POA115      LEAIRYARHQPY SNG-KVGLVGYCLGGALAF LVAAKG--YVDRAVGY YG 146
              * . * : : * : . : * . * . * . * : : * * : . * . *

dlh_BQ1      RPDLAGPEALARVACPTLLLVGGRDEEVLELN RQAASLMRCPHRLSVVPG 187
202G        RPDLA-PSALPHVKAPTLLIVGGYDLPVIAMNEDALEQLQTSKRLV IIPR 196
POA115      VGLEKQLKKVPEVKHPALFHMGGQDHFVPAPSRQLITEGFGANPLLQVHW 196
              . : . * * : * : * * * * . . : : * :

dlh_BQ1      ---ATHLFE---EPG TLEAAARQAADWFEKYL PRA----- 216
202G        ---ASHLFE---EPGALTAVAQLASEWFMHYLR----- 223
POA115      YEEAGHSFARTSSSSGYVASAAA LANERRLD FLAPLQSKKP 236
              * * * . . * : : * * : : *
    
```

Figura 26. Alineamientos de las secuencias de la DLH de BQ1, *Pseudomonas* sp. B13 (POA115) y *Anabaena variabilis* (202G). Resaltados se indican los residuos catalíticos.



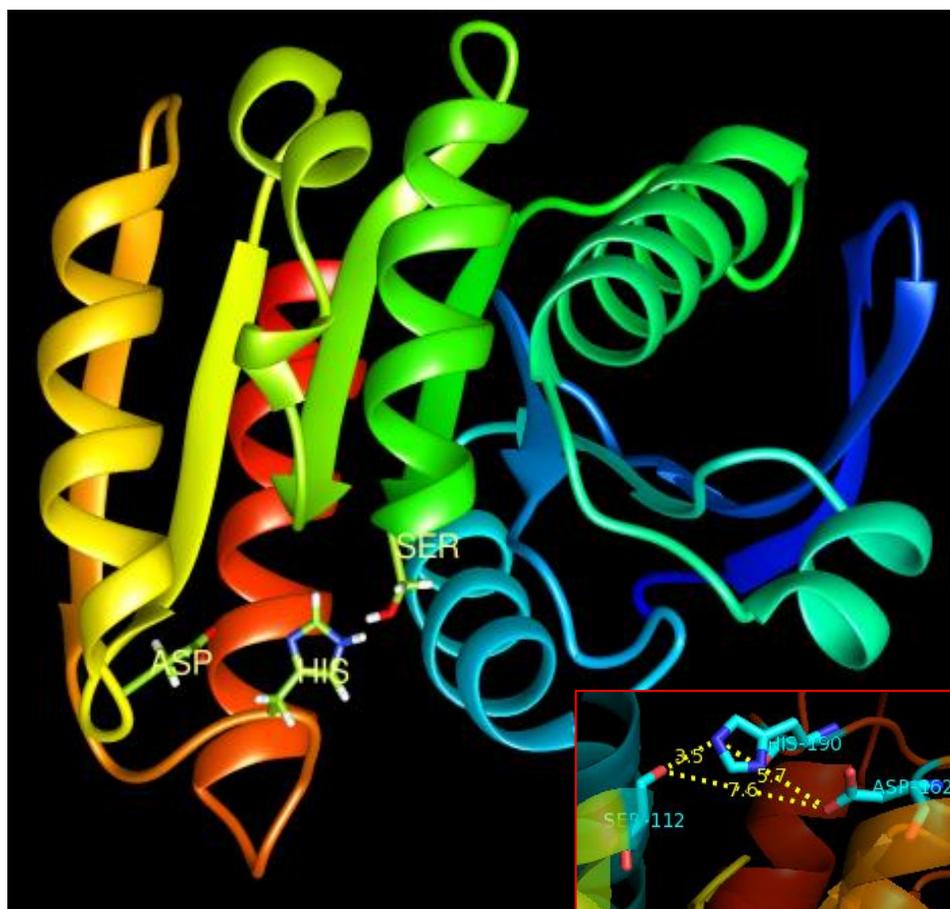


Figura 27. Estructura terciaria de la DLH de BQ1 y localización espacial de la tríada catalítica.

Una vez que se identificó la tríada catalítica en la DLH de BQ1 se procedió a realizar los acoplamientos moleculares con los diferentes ligandos. Desafortunadamente el primer acercamiento realizado el acoplamiento rígido no arrojó ningún ligando que se posicionara cerca de la tríada propuesta, por lo que sabiendo que las proteínas no son entidades rígidas y que en solución se encuentran en contacto frecuente con moléculas de agua (Sousa *et al.*, 2006), se decidió realizar acoplamientos flexibles. Este tipo de acoplamientos son más cercanos a la realidad aunque son más caros computacionalmente hablando. Para tal efecto, se mantuvieron flexibles los aminoácidos D162, H190 y S112 (Figura 28). De ellos, la torsión de la histidina fue la que tuvo mayor impacto para el posicionamiento de los ligandos cerca del sitio catalítico. Con esta variante del



acoplamiento todos los ligandos se acercaron a la tríada propuesta, encontrando que el grupo carbonilo de la NMP se posicionó cerca de la S112 a 5.4 Å, por lo que es probable que la DLH pueda hidrolizar esta γ -lactama. Asimismo, el enlace éster hidrolizable de la MUB se localizó a 3.2 Å y el enlace carbamato del NFHDC a 4.5 Å, por lo que pudieran ser más susceptibles de ser hidrolizados por la DLH. Los acoplamientos flexibles empleando como ligandos los monómeros idealizados del PU también se acercaron al sitio catalítico propuesto, cerca de la S112 se posicionaron a 4.3 Å el grupo éster del DEG-ADA-MDI.PU y a 3.5 Å el grupo amida del DPG-ADA-TDI.PU, ambos provenientes del grupo carbamato (Figura 29), mientras que las moléculas empleadas como controles negativos no se acercaron al probable sitio catalítico.



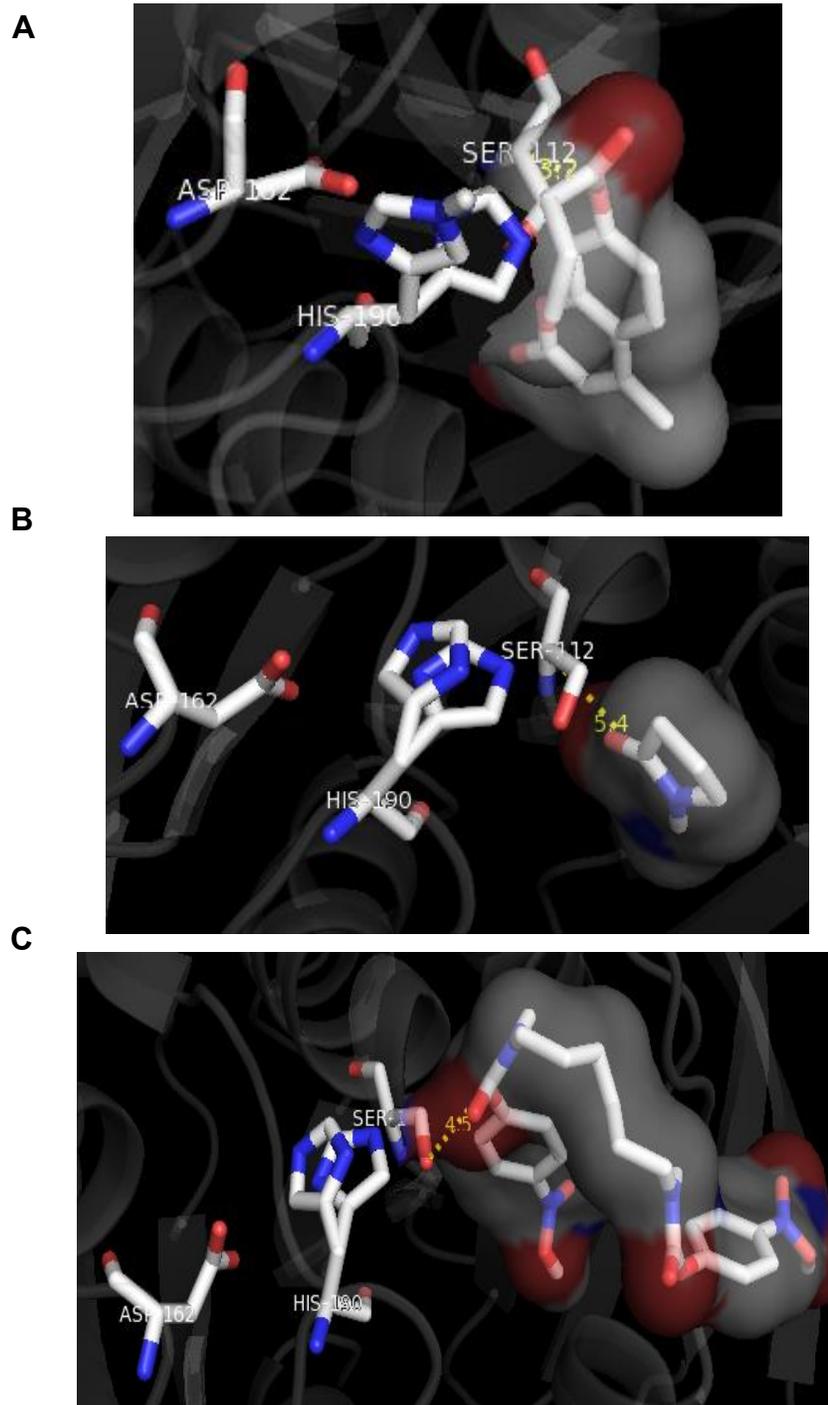


Figura 28. Acoplamiento flexible de la DLH con los ligandos A) MUB, B) NMP y C) NFHDC. La rotación de la H190 se visualiza como dos histidinas superpuestas. Los átomos de carbono se representan en color blanco, los de oxígeno en rojo y los de nitrógeno en azul.



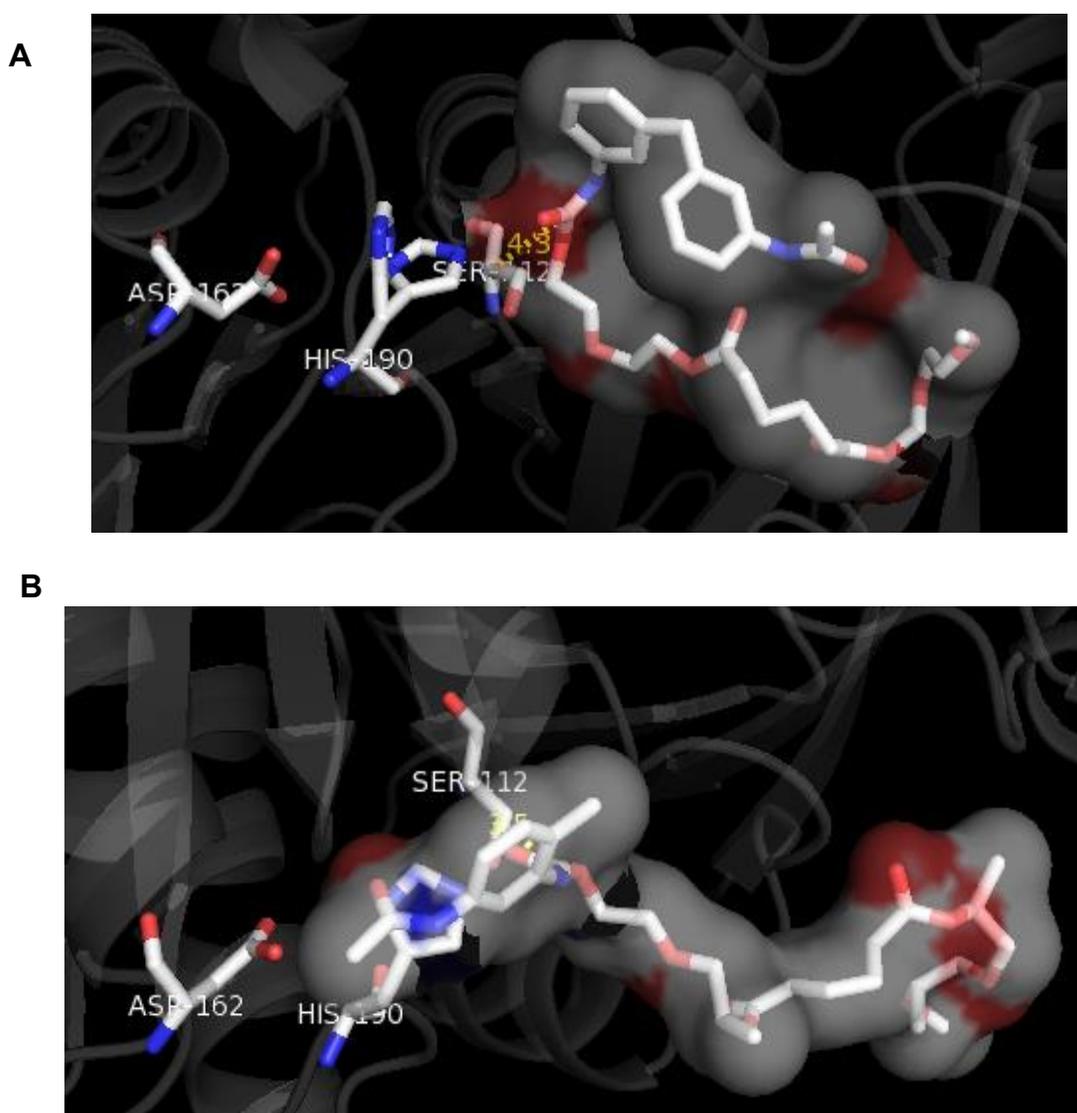


Figura 29. Acoplamiento flexible de la DLH con los ligandos tipo poliuretano A) DEG-ADA-MDI.PU y B) DPG-ADA-TDI.PU. La rotación de la H190 se visualiza como dos histidinas superpuestas. Los átomos de carbono se representan en color blanco, los de oxígeno en rojo y los de nitrógeno en azul.

La mayor energía de afinidad (Figura 30) se observó en el complejo formado con el dicarbamato (-6 kcal/mol) seguido por la MUB (-5.9 kcal/mol), por el DEG-ADA-MDI.PU (-5.2 kcal/mol), por el DPG-ADA-TDI.PU (-5.1 kcal/mol) y por la NMP (-3.5 kcal/mol). En cuanto al RMSD obtenido para la DLH, se encontraron valores de hasta 3.4 Å (Tabla 9) los cuales exceden el límite de 2 Å.



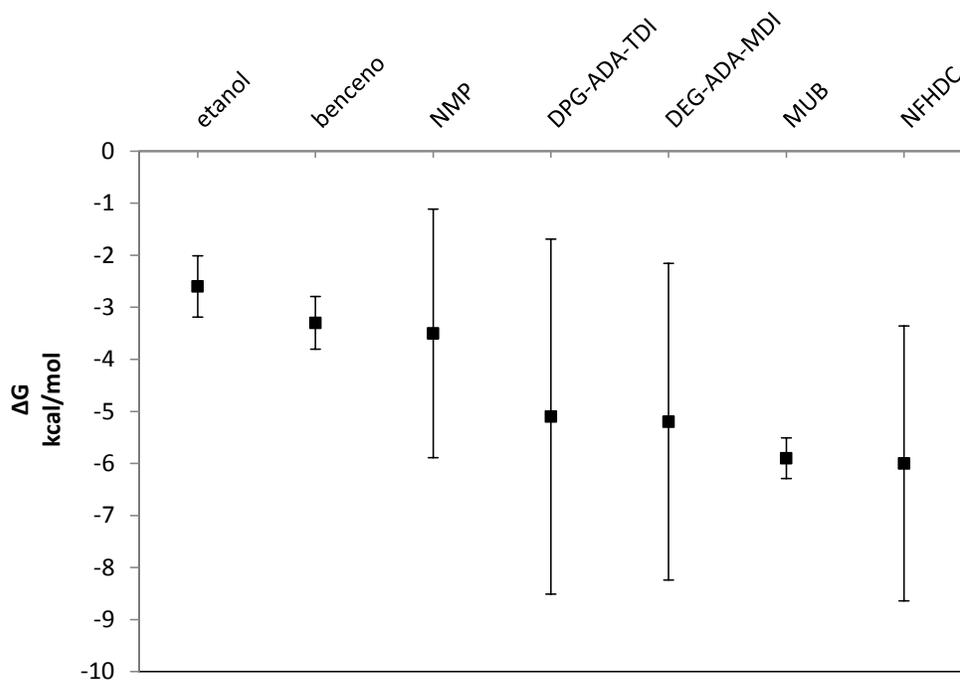


Figura 30. Energías de afinidad de los complejos formados por diversos ligandos con la DLH de BQ1.

Tabla 9. Valores de RMSD (Root Mean Square Deviation) de los ligandos respecto a DLH.

Ligando	RMSD (Å)
Etanol	0.59
Benceno	0.51
NMP	2.39
DPG-ADA-TDI.PU	3.41
DEG-ADA-MDI.PU	3.04
MUB	0.39
NFHDC	2.64



De acuerdo al valor de acercamiento de los ligandos al sitio activo, a las energías de afinidad y a las RMSD, el acoplamiento que tiene más probabilidad de éxito sería el complejo formado por la MUB, seguido por el dicarbamato (NFHDC) y por los polímeros idealizados. Además, partiendo del supuesto de que la DLH hidroliza el MUB, por lo cual fue posible identificarla en este estudio, suponemos que si los demás complejos presentan valores de afinidad cercanas al valor del complejo DLH-MUB, entonces quizá fuera posible que la DLH hidrolizara también esos enlaces. Sin embargo, esto es menos probable ya que se tuvo que recurrir al docking flexible para lograr que los diferentes ligandos se acercaran a la tríada catalítica.

Recapitulando, de acuerdo a que el porcentaje de cobertura obtenido en la espectrometría de masas para LamB/YcsF fue mayor (59%) que el obtenido para la DLH (10%), además de que los valores de afinidad y RMSD fueron menores para LamB/YcsF que para DLH y considerando que se tuvo que realizar un acoplamiento flexible para lograr que la DLH se acoplara a los sustratos probados, mientras que para LamB/YcsF el análisis rígido permitió el acoplamiento de los mismos, consideramos que la proteína con actividad esterasa, expresada de manera diferencial en el medio mínimo adicionado con NMP, y aislada e identificada mediante espectrometría de masas tiene mayor probabilidad de corresponder a LamB/YcsF que a DLH. Son necesarios experimentos para confirmar esta propuesta, tales como purificar la proteína u obtener proteína recombinante activa para realizar ensayos de actividad empleando el MUB y la NMP como sustratos y rastrear los productos de hidrólisis producidos ya sea por cromatografía en capa fina o por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Por otro lado con base en este análisis *in silico* y si se considerara que la esterasa de 24 kDa es la misma que se expresa en PU y NMP, quizá fuera posible que esta esterasa tuviera un papel en la biodegradación del poliéster-PU. Se ha propuesto que en la biodegradación del PU participan enzimas extracelulares de tipo esterasa cuya función es depolimerizar el polímero a moléculas de tamaño más reducido, las cuales pueden posteriormente ser asimiladas por la célula. Estas moléculas de



menor tamaño, que pueden incluir en su estructura enlaces de tipo carbamato, deben ser transportadas al interior celular donde podrían ser entonces hidrolizadas por proteínas como LamB/YcsF. Esta propuesta está basada en el mecanismo de degradación para el polietilenglicol (PEG) que llevan a cabo *Sphingopyxis macrogoltabida* y *Sphingopyxis terrae*, en el cual se comprobó que la degradación de este polímero no es exclusivamente extracelular, sino que las macromoléculas son incorporadas en la célula en tamaños de hasta 20,000 daltones, degradándose a moléculas más pequeñas en el periplasma mediante pasos sucesivos de oxidación y entrando posteriormente al citosol (Kawai, 2010).



10. Conclusiones

Existe una expresión diferencial de una esterasa de 24 kDa en medio mínimo con NMP que no se presenta en medio LB.

Se realizó una purificación parcial de la esterasa de 24 kDa empleando electroelución y geles de doble dimensión.

La esterasa expresada diferencialmente en NMP podría ser una hidrolasa de la familia LamB/YcsF con una actividad propuesta de lactamasa o una dieno lactona hidrolasa ya que ambas se identificaron mediante nano-LC-ESI-MS/MS.

Se clonó el gen que codifica a LamB/YcsF de BQ1 y se obtuvo proteína recombinante pero no fue activa. El gen de la DLH se clonó, pero no se logró producir proteína recombinante.

Se modelaron por homología las estructuras terciarias de LamB/YcsF y DLH.

Empleando análisis *in silico* se identificó un probable sitio catalítico para LamB/YcsF (D10, C223 y H225) y se localizó para la DLH (S112, D162 y H190) los cuales están conformados por las tríadas comunes que comparten las esterases y serina proteasas.

Con base en los porcentajes de cobertura de la espectrometría de masas, las energías de afinidad en la unión de ligandos y las RMSDs obtenidas en los acoplamientos moleculares, es más probable que la proteína con actividad esterasa inducible con NMP sea LamB/YcsF.

Con base en los acoplamientos *in silico*, es posible que LamB/YcsF participe en la hidrólisis del enlace éster del MUB, del enlace amida de la NMP y posiblemente también de los grupos carbamato del NFHCD y de los PUs idealizados.



Apéndice 1. Medios de cultivo, soluciones y protocolos generales

Medio Luria-Bertani (LB)

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	16 g
Agua c. b. p.	1 L

1. Disolver en 800 mL de agua desionizada la peptona.
2. Agregar el extracto de levadura y el NaCl, agitar hasta disolver completamente.
3. Ajustar el pH a 7 y aforar a 1000 mL con agua desionizada.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
5. Si se desea LB sólido, agregar 4 g de agar por cada 250 mL de medio y se procede a esterilizar.

Medio mineral de NK (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995)

Solución A (10X) para 1L

KH ₂ PO ₄	20 g
K ₂ HPO ₄	70 g

Solución B (100X) para 1L

NH ₄ NO ₃	100 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1 g

Solución C (1000 X) para 1 L

ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	1 g
CuSO ₄ • 7 H ₂ O	10 mg
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	10 g
MnSO ₄ • 6 H ₂ O	10 g

1. Preparar las soluciones A y B, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.



2. Preparar la solución C y esterilizar por filtración utilizando membranas de poro 0.22 μm (Millipore).

Preparación de medio mínimo empleando como fuente de carbono tributirina (1% v/v), aceite de olivo (1% v/v) y NMP (2.5 mg/mL)

1. De acuerdo al volumen de cultivo que se preparará se calculan los mL de cada una de las soluciones del medio mínimo, agregando en el siguiente orden las soluciones: A, B y C.
2. La tributirina y el aceite de olivo se esterilizan en autoclave 121°C durante 15 minutos, la NMP se esteriliza por filtración empleando membranas de poro 0.22
3. La NMP y la tributirina se adiciona a la mezcla de las soluciones A, B y C a temperatura ambiente.
4. Antes de inocular el medio mínimo adicionado con aceite de olivo se debe agitar 15 minutos en vórtex, el aceite de olivo no se incorporará a la mezcla de medio mínimo por lo que permanecerá como emulsión.

Formulación de las soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos 1M, pH 7 (1 L)

K_2HPO_4	136.09 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	240.70 g

1. Disolver el K_2HPO_4 en 300 mL de agua desionizada y en otros 300 mL disolver el $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.
2. Mezclar las dos disoluciones anteriores. Ajustar el pH a 7 y aforar a 1 L.



Solución amortiguadora de fosfatos 200 mM pH 7 (500 mL)

1. Tomar 100 mL de amortiguador de fosfatos 1M pH 7 y aforar a 500 mL.
2. Medir pH y si se requiere ajusta a 7.

Solución de 4-metilumbeliferil butirato (50 mM)

1. Para preparar una solución stock 20 mM, disolver 74 mg de 4-metilumbeliferil butirato (BioChemica No. Cat. 19362) en 6 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).
2. Almacenar a -20°C. Deja de ser estable si se descongela más de 5 veces.
3. Para realizar la dilución a 1.6 mM se utiliza etilenglicol (100 µL de MUF en 3 mL de etilenglicol). Para revelar un gel (mini-PROTEAN[®]) se emplean 3 mL de la dilución.

Geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Acrilamida 30% para 100 mL

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

1. Disolver en 80 mL de agua desionizada en una parrilla con agitación y un poco de calor. Aforar a 100 mL con agua desionizada y filtrar con Whatman No 1 u otro papel de poro grande. Almacenar a 4°C.

Amortiguador separador para 100 mL (25X)

Tris-base	18.17 g
SDS al 20 %	2 mL

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 12 N

1. Disolver el Tris-base en 80 mL de agua desionizada y ajustar el pH. Agregar el SDS y aforar a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente.



Amortiguador apilador para 100 mL (25X)

Tris-base 6.06 g

SDS al 20% 2 mL

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 12 N

1. Disolver el Tris-base en 80 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 6.8.
2. Agregar el SDS y aforar con agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

Amortiguador de carga 5X para 10 mL

Tris 1 M pH 6.8 3.125 mL

Glicerol 5.0 mL

SDS (1% final) 0.5 g

Azul de bromofenol 10% 0.2 mL

β -mercaptoetanol (ver nota)

1. Pesar y medir los componentes y llevarlos a 10 mL con agua desionizada.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

Nota: inmediatamente después de usar agregar 4 mL de β -mercaptoetanol por 20 mL de amortiguador de carga. Se debe usar 1/5 de amortiguador de carga por un volumen de la muestra.

Amortiguador de corrida 10X para 1L

Tris-base 30 g

Glicina 144 g

SDS 10 g

1. Disolver en 800 mL de agua desionizada la glicina, calentar un poco y agitar.



2. Agregar el Tris y esperar a que se solubilice, checar el pH, debe estar entre 8.3 y 8.8. No ajustarlo, si no está a ese pH es que se pesó mal el Tris o se usó el Tris-HCl.
3. Agregar el SDS en polvo, disolverlo y ajustar el volumen a 1000 mL. Almacenar a temperatura ambiente.
4. Antes de usarlo para correr el gel, medir 70 mL de este amortiguador 10X y llevarlo a 700 mL con agua desionizada.

Persulfato de amonio 20% (10 mL)

Persulfato de amonio 2 g

1. Disolver en 10 mL de agua desionizada.
2. Hacer alícuotas de 500 μ L en tubos Eppendorf, congelarlas a -20°C .

Nota: este reactivo es higroscópico y puede deteriorarse creando problemas de gelificación. Se recomienda mantenerlo guardado en un desecador a temperatura ambiente.

Preparación del gel separador al 15%

1. Armar el equipo de BIO-RAD para preparación de geles, utilizar los vidrios del grosor deseado, limpiarlos perfectamente.
2. Mezclar el agua, el amortiguador separador y la acrilamida (30%) (Tabla i).
3. Agregar inmediatamente el persulfato de amonio y el TEMED, agitar y verter entre los cristales.



Tabla i. Componentes y cantidades para el gel separador.

Componente/ %acrilamida	15%	
	Grosor de pozo en mm	
Agua (mL)	0.75	1
	1	1.25
Amortiguador separador (mL)	0.75	1
	1	1.25
Acrilamida (mL)	0.75	2
	1	2.5
Persulfato de amonio 20% (v/v) (μL)	0.75	25
	1	31
TEMED (μL)	0.75	2.5
	1	3.1

Preparación del gel apilador

1. Se prepara de la misma manera que el gel separador, los componentes se muestran en la Tabla ii.
2. Se vierte encima del gel separador y se coloca inmediatamente el peine separador.
3. Dejar polimerizar para desprender el peine.

Tabla ii. Componentes y cantidades para el gel apilador.

Componente	Grosor de pozo en mm	Volumen
Agua (mL)	0.75	1
	1	1.2
Amortiguador apilador (μL)	0.75	444
	1	522
Acrilamida (μL)	0.75	300
	1	353
Persulfato de amonio 20% (v/v) (μL)	0.75	20
	1	20
TEMED (μL)	0.75	5
	1	5



Azul de Coomassie para teñir geles (100 mL)

Coomassie brilliant blue R250	0.05 g
Metanol QP	50 mL
Agua	45 mL
Ácido acético glacial	10 mL

1. Disolver con metanol en un vaso de precipitados de vidrio el azul de Coomassie, añadir el ácido acético y el agua.

Fijador y desteñidor para 250 mL

Ácido acético glacial	18.75 mL
Metanol QP	50 mL

1. Medir los reactivos y aforar a 250 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Soluciones empleadas en la doble dimensión SDS-PAGE

Amortiguador IEF (10 mL)

Urea	4.8 g
Tiourea	1.5 g
CHAPS	0.4 g
Tritón	200 μ L
DTT	7 mg

1. Se pesan y miden los reactivos, se disuelven en agua desionizada y se filtran a través de una membrana de nylon de 0.22 μ m.
2. Hacer alícuotas de 2 mL en tubos Eppendorf y almacenar a 4 °C.



Solución de reducción

Amortiguador de equilibrio (2 mL)

Tris-HCl pH 8.8 50 mM

Urea 6 M

Glicerol 30%

SDS 4%

1. Al amortiguador de equilibrio se añade DTT 2%.

Solución alquilante

Iodoacetamida 2.5 %

1. Se disuelve la iodoacetamida en amortiguador de equilibrio.



Apéndice 2. Proteínas identificadas mediante nano LC-ESI-MS/MS

Tabla iii. Proteínas identificadas a partir del extracto citosólico total de *Alicyclophilus* sp. BQ1 cultivado en MM-NMP (25 mM).

Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight	# Unique peptides	% peptide coverage
Peroxiredoxin [<i>Alicyclophilus denitrificans</i> BC]	gi 319763487	21 kDa	12	77%
Alkyl hydroperoxide reductase [<i>Acidovorax citrulli</i> AAC00-1]	gi 120610062	21 kDa	2	58%
Imidazole glycerol phosphate synthase, glutamine amidotransferase subunit [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761595	24 kDa	6	40%
Dehydrorhamnose 3,5-epimerase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761364	20 kDa	5	40%
Phasin family protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762243	19 kDa	5	40%
Glutathione S-transferase domain-containing protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764898	23 kDa	5	30%
Superoxide dismutase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763305	21 kDa	5	27%
Two component LuxR family transcriptional regulator [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330826718	23 kDa	4	24%
Response regulator receiver [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762911	23 kDa	4	23%
3-oxoacid CoA-transferase subunit B [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763112	23 kDa	3	23%
Enoyl-CoA hydratase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764459	28 kDa	5	22%
DSBA oxidoreductase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761495	24 kDa	3	22%
Isochorismatase hydrolase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763235	22 kDa	3	21%
Single-strand binding protein [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330827141	19 kDa	2	21%
Heat shock protein GrpE [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762632	21 kDa	3	21%
Cytochrome C class I [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764186	23 kDa	3	21%
Peptidoglycan-associated lipoprotein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762344	19 kDa	2	21%
Thymidylate kinase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762329	23 kDa	3	20%
Alkyl hydroperoxide reductase [<i>Janthinobacterium</i> sp. <i>Marseille</i>]	gi 152981222	21 kDa	2	19%



LamB/YcsF family protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762338	26 kDa	4	18%
Glutathione S-transferase domain-containing protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761024	23 kDa	3	18%
Carbonate dehydratase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764490	25 kDa	3	18%
Transmembrane protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761131	22 kDa	3	18%
3-hydroxydecanoyl-(acyl carrier protein) dehydratase [<i>Acidovorax</i> sp. JS42]	gi 121592955	19 kDa	2	18%
Heat shock protein GrpE [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763797	19 kDa	3	17%
Molybdenum cofactor synthesis domain-containing protein [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330826299	21 kDa	3	17%
Peptidyl-prolyl isomerase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762807	19 kDa	3	17%
3-oxoacyl-ACP reductase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763856	25 kDa	2	16%
Response regulator receiver [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764111	23 kDa	3	15%
Phosphate ABC transporter periplasmic substrate-binding protein PstS [<i>Serratia proteamaculans</i> 568]	gi 157368261	37 kDa	4	15%
Glutathione S-transferase domain-containing protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319760783	22 kDa	2	15%
Molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein B [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763940	20 kDa	2	15%
Probable indole-3-acetaldehyde dehydrogenase [<i>Ustilago hordei</i>]	gi 388853548	54 kDa	5	14%
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [<i>Macalpinomyces ewartii</i>]	gi 307593451	25 kDa	2	14%
30S ribosomal protein S4 [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764615	25 kDa	2	14%
Enoyl-CoA hydratase/isomerase [<i>Acidovorax delafieldii</i> 2AN]	gi 241763890	28 kDa	2	11%
TetR family transcriptional regulator [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330824074	23 kDa	2	11%
Gcn5-like N-acetyltransferase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764188	22 kDa	2	11%
Dienelactone hydrolase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764604	23 kDa	3	10 %
GntR family transcriptional regulator [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764589	25 kDa	2	9.90%
Ketol-acid reductoisomerase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762465	37 kDa	2	8.60%
Pyruvate carboxyltransferase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764455	32 kDa	2	8.20%



Tabla iv. Proteínas identificadas a partir del extracto citosólico purificado por electroelución de *Alicyclophilus* sp BQ1, cultivada en NMP (25 mM).

Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight	# Unique peptides	% peptide coverage
Cluster of 50S ribosomal protein (<i>Acidovorax ebreus</i> TPSY)	RL4_ACIET [3]	23 kDa	13	59%
50S ribosomal protein L4 (<i>A. ebreus</i> TPSY)	RL4_ACIET (+1)	23 kDa	9	59%
50S ribosomal protein L4 (<i>Delftia acidovorans</i> DSM 14801 /SPH-1)	RL4_DELAS	23 kDa	6	37%
30S ribosomal protein S4 (<i>A. ebreus</i> TPSY)	RS4_ACIET (+1)	23 kDa	5	33%
ATP phosphoribosyltransferase (<i>A. ebreus</i> TPSY)	HIS1_ACIET (+1)	23 kDa	3	25%
50S ribosomal protein L2 (<i>Acidovorax citrulli</i> AAC00-1)	RL2_ACIAC (+2)	30 kDa	4	24%
Cluster of 50S ribosomal protein L3 (<i>A. citrulli</i> AAC00-1)	RL3_ACIAC [3]	23 kDa	4	23%
50S ribosomal protein L3 (<i>A. citrulli</i> AAC00-1)	RL3_ACIAC (+2)	23 kDa	4	23%
50S ribosomal protein L3 (<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain Pf-5 / ATCC BAA-477)	RL3_PSEF5 (+4)	23 kDa	3	23%
Uracil phosphoribosyltransferase (<i>A. ebreus</i> TPSY)	UPP_ACIET (+1)	23 kDa	3	22%
Oligoribonuclease (<i>Acidovorax</i> sp. JS42)	ORN_ACISJ	21 kDa	3	19%
Adenine phosphoribosyltransferase (<i>A. ebreus</i> TPSY)	APT_ACIET	20 kDa	2	19%
ATP synthase gamma chain (<i>A. ebreus</i> TPSY)	ATPG_ACIET (+1)	31 kDa	4	19%
Cluster of Adenylate kinase (<i>A. ebreus</i> TPSY)	KAD_ACIET [3]	24 kDa	2	19%
Adenylate kinase (<i>A. ebreus</i> TPSY)	KAD_ACIET (+2)	24 kDa	1	19%
50S ribosomal protein L4 (<i>Methylobium petroleiphilum</i> PM1)	RL4_METPP	23 kDa	2	18%
Elongation factor TS (<i>Acidovorax</i> sp. JS42)	EFTS_ACISJ	31 kDa	4	18%
3-isopropylmalate dehydratase small subunit (<i>A. citrulli</i> AAC00-1)	LEUD_ACIAC (+2)	24 kDa	1	18%
30S ribosomal protein S3 (<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2)	RS3_VEREI	32 kDa	4	15%
Orotidine 5'-phosphate decarboxylase (<i>A. citrulli</i> AAC00-1)	PYRF_ACIAC	29 kDa	2	14%
30S ribosomal protein S4 (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. Phaseolicola 1448A)	RS4_PSE14 (+4)	23 kDa	1	13%
Cluster of imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH (<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134 / LMG 1197)	HIS5_CUPPJ [7]	24 kDa	3	12%



Caracterización de una esterasa de *Alicyclophilus* sp. BQ1 inducida por *N*-metil-2-pirrolidona y análisis *in silico* de su interacción con posibles sustratos

Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH (<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616 / 249)	HIS5_BURM1 (+4)	23 kDa	1	12%
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha (<i>A. citrulli</i> AAC00-1)	RPOA_ACIAC (+5)	36 kDa	4	12%
Peptidyl-tRNA hydrolase (<i>A. citrulli</i> AAC00-1)	PTH_ACIAC	23 kDa	2	12%
LamB/YcsF protein family (<i>A. citrulli</i> AAC00-1)	Y3513_ACIAC	26 kDa	3	11%
Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH (<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134 / LMG 1197)	HIS5_CUPPJ (+1)	24 kDa	1	10%
50S ribosomal protein L25 (<i>A. ebreus</i> TPSY)	RL25_ACIET (+1)	23 kDa	2	8.7%
Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF (<i>A. ebreus</i> TPSY)	HIS6_ACIET (+1)	27 kDa	2	8.5%
Elongation factor TU 1 (<i>Acidovorax</i> sp. JS42)	EFTU1_ACISJ (+2)	43 kDa	1	7.6%
Fructose-1,6-bisphosphatase class 1 (<i>Bordetella avium</i> 197N)	F16PA_BORA1 (+3)	37 kDa	2	6.5%
Transaldolase (<i>A. citrulli</i> AAC00-1)	TAL_ACIAC	35 kDa	1	6%
Transaldolase (<i>Delftia acidovorans</i> DSM 14801 / SPH-1)	TAL_DELAS	35 kDa	1	5.7%
60 kDa chaperonin (<i>A. citrulli</i> AAC00-1)	CH60_ACIAC (+6)	57 kDa	2	5.5%



Tabla v. Proteínas identificadas incluyendo ambos resultados en un sólo archivo Scaffold.

Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight	Percent Coverage
50S ribosomal protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761139	23 kDa	79%
Glutathione S-transferase domain-containing protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761622	24 kDa	73%
Carbonate dehydratase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764490	25 kDa	69%
Peroxiredoxin [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763487	21 kDa	64%
Acetoacetyl-CoA reductase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762949	26 kDa	64%
Alkyl hydroperoxide reductase [<i>Acidovorax</i> sp. KKS102]	gi 407938339	21 kDa	61%
LamB/YcsF family protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762338	26 kDa	59%
DSBA oxidoreductase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761495	24 kDa	58%
Response regulator receiver [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764111	23 kDa	57%
Alkyl hydroperoxide reductase [<i>Acidovorax citrulli</i> AAC00-1]	gi 120610062	21 kDa	54%
Adenine phosphoribosyltransferase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319765048	20 kDa	52%
Imidazole glycerol phosphate synthase, glutamine amidotransferase subunit [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761595	24 kDa	51%
3-oxoacyl-ACP reductase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763856	25 kDa	51%
50S ribosomal protein L4 [<i>A. citrulli</i> AAC00-1]	gi 120609042	23 kDa	51%
Exonuclease RNase and DNA polymerase III [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761926	23 kDa	50%
30S ribosomal protein S4 [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764615	25 kDa	45%
30S ribosomal protein S4 [<i>Acidovorax</i> sp. JS42]	gi 121592837	23 kDa	45%
Response regulator receiver [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762911	23 kDa	44%
Translation initiation factor IF-3 [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330825390	23 kDa	43%
NADH dehydrogenase, subunit C [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761764	23 kDa	39%
Molybdenum cofactor synthesis domain-containing protein [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330826299	21 kDa	38%
Osmolarity response regulator [<i>Acidovorax</i> sp. JS42]	gi 121595458	27 kDa	38%
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762226	26 kDa	37%
50S ribosomal protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761138	23 kDa	37%
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763364	28 kDa	34%
TetR family transcriptional regulator [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330824074	23 kDa	33%
50S ribosomal protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761141	30 kDa	33%
Phosphoadenylyl-sulfate reductase (thioredoxin) [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330825654	23 kDa	32%
3-hydroxybutyrate dehydrogenase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762027	27 kDa	32%
Response regulator receiver [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764891	24 kDa	31%
30S ribosomal protein S4 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25]	gi 229592879	23 kDa	30%



Caracterización de una esterasa de *Alicyclophilus* sp. BQ1 inducida por *N*-metil-2-pirrolidona y análisis *in silico* de su interacción con posibles substratos

Adenylate kinase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763312	24 kDa	30%
Orotidine 5'-phosphate decarboxylase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764930	29 kDa	30%
Transcription termination/antitermination factor NUSG [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761181	22 kDa	29%
3-isopropylmalate dehydratase small subunit [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763813	24 kDa	28%
ABC transporter [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762057	26 kDa	28%
Carboxymethylenebutenolidase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761120	25 kDa	28%
Cyclic nucleotide-binding protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762072	23 kDa	28%
Thymidylate kinase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762329	23 kDa	27%
Adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330823754	21 kDa	26%
2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyltransferase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762958	29 kDa	26%
Peptidyl-prolyl isomerase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762807	19 kDa	25%
Glutathione S-transferase domain-containing protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761024	23 kDa	25%
Succinyl-CoA synthetase subunit alpha [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764916	31 kDa	25%
Phosphoglycerate mutase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761309	24 kDa	25%
Hypothetical protein Alide_1314 [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762026	25 kDa	24%
ATP synthase F1 subunit gamma [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761165	31 kDa	24%
Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761594	23 kDa	23%
50S ribosomal protein L3 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25]	gi 229592903	23 kDa	23%
Nitroreductase [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330826301	24 kDa	22%
Pyruvate carboxyltransferase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764455	32 kDa	22%
Recombination protein RecR [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763143	21 kDa	22%
Pyrroline-5-carboxylate reductase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764633	29 kDa	22%
Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761669	27 kDa	22%
Peptidase m22 glycoprotease [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764799	25 kDa	22%
Ribulose-phosphate 3-epimerase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764710	24 kDa	21%
Response regulator receiver [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764977	25 kDa	21%
3-oxoacid CoA-transferase subunit A [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330826201	24 kDa	21%
Barstar (barnase inhibitor) [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319765024	16 kDa	21%
DSBA oxidoreductase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764452	24 kDa	20%
3-oxoacid CoA-transferase subunit A [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763113	25 kDa	20%
Glutathione S-transferase domain-containing protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761328	26 kDa	19%
Hypothetical protein Alide_3189 [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763861	20 kDa	19%
Transmembrane protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761131	22 kDa	18%



Caracterización de una esterasa de *Alicyclophilus* sp. BQ1 inducida por *N*-metil-2-pirrolidona y análisis *in silico* de su interacción con posibles sustratos

Uracil phosphoribosyltransferase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762827	23 kDa	18%
Regulatory protein ICLR [<i>A.s denitrificans</i> BC]	gi 319760882	29 kDa	17%
Phosphoadenylylsulfate reductase (thioredoxin) [<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT]	gi 91776032	23 kDa	16%
Porphobilinogen deaminase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763492	33 kDa	16%
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764487	23 kDa	16%
Enoyl-CoA hydratase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764459	28 kDa	15%
S-formylglutathione hydrolase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763037	31 kDa	15%
30S ribosomal protein S3 [<i>A. citrulli</i> AAC00-1]	gi 120609047	32 kDa	15%
Translation elongation factor ts [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762176	31 kDa	15%
Transaldolase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761532	35 kDa	15%
Beta-lactamase domain-containing protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761071	23 kDa	15%
Anthranilate phosphoribosyltransferase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764648	36 kDa	15%
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762583	28 kDa	15%
Glutathione S-transferase domain-containing protein [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319760783	22 kDa	14%
Aldehyde dehydrogenase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761825	51 kDa	14%
Acyl-CoA dehydrogenase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764491	43 kDa	14%
Regulatory protein iclr [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762317	25 kDa	14%
NAD(P)H dehydrogenase (quinone) [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763137	23 kDa	14%
Phosphoglycolate phosphatase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762555	24 kDa	14%
Inositol phosphatase/fructose-16-bisphosphatase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762194	37 kDa	13%
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763242	30 kDa	13%
30S ribosomal protein S2 [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762175	28 kDa	13%
Uridylate kinase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762177	26 kDa	13%
3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762698	40 kDa	13%
NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764862	38 kDa	13%
Ribosome recycling factor [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762178	21 kDa	13%
Two component LuxR family transcriptional regulator [<i>A. denitrificans</i> K601]	gi 330826718	23 kDa	12%
Carboxymethylenebutenolidase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762015	31 kDa	12%
Cysteinyl-tRNA synthetase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762811	50 kDa	12%
Translation elongation factor Tu [<i>Acidovorax</i> sp. KKS102]	gi 407937091	43 kDa	12%
3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [<i>Acidovorax</i> sp. JS42]	gi 121596008	30 kDa	12%
GntR family transcriptional regulator [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763778	25 kDa	12%
Alkyl hydroperoxide reductase [<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille]	gi 152981222	21 kDa	12%



Caracterización de una esterasa de *Alicyclophilus* sp. BQ1 inducida por *N*-metil-2-pirrolidona y análisis *in silico* de su interacción con posibles sustratos

Imidazole glycerol phosphate synthase cyclase subunit [<i>Alicyclophilus denitrificans</i> BC]	gi 319761606	27 kDa	11%
Transcriptional regulator ICLR [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762475	30 kDa	11%
Regulatory protein TETR [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761392	23 kDa	11%
Dephospho-CoA kinase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761631	21 kDa	11%
Ribonuclease III [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319763845	25 kDa	11%
3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase [<i>Acidovorax</i> sp. JS42]	gi 121596263	27 kDa	11%
Hypothetical protein Veis_3923 [<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2]	gi 121610841	28 kDa	11%
Aldehyde dehydrogenase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762449	51 kDa	10%
Peptidyl-tRNA hydrolase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319761696	23 kDa	10%
TetR family transcriptional regulator [<i>Acidovorax</i> sp. JS42]	gi 121592508	23 kDa	10%
Outer membrane protein OprG [<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506]	gi 387895883	25 kDa	10%
Phosphoserine phosphatase SerB [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319762018	26 kDa	10%
Dienelactone hydrolase [<i>A. denitrificans</i> BC]	gi 319764604	23 kDa	10%
tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase [<i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601]	gi 330825458	28 kDa	10%



Péptidos identificados (amarillo) en la espectrometría de masas nano-LC-MS/MS de LamB/YcsF.

Porcentaje cubierto 59%

M	TRHIDLNSD	LGESLGAWRM	GDDDAMLDIV	SSANVACGFH
A	GDPAGILGT	LKAAHARGVA	VGAHVAYPDL	VGFGRRNMDV
A	SSDLVADVI	YQIGALQGLA	HAAGTRVTYV	KPHGALYNTI
A	HDERQARDV	IAAIRAVDGS	LALVALAGSP	LVQWAQDAGL
R	VIAEAFADR	AYTPQGTLVS	RREKGAVLHD	SALVAQRMLR
L	VREGVVEAV	DGSLARVQAQ	SICVHGDSAG	AVEMARAVRM
A	LES DGVVVR	PFA		

En verde se señalan los residuos modificados por oxidación durante la identificación.

Secuencia de aminoácidos de la proteína LamB/YcsF de BQ1

>contig75

MTRHIDLNSDLGESLGAWRMGDDAAMLDIVSSANVACGFHAGDPAGILATLKAAQARGVAV
GAHVAYPDLVGFGRNMDVASTDLVADVIYQIGALQGLAHAAGTRVTYVKPHGALYNTIAH
DERQARDVIAAIRAVDAGLALVALAGSPLVQWAQDAGLRVIAEAFADRAYTPQGTLVSRRE
KGAVLHDSALVAQRMLRLVREGVVEAVDGS LARVQAQSICVHGDSAGAVEMARAVRMALES
DGVVVRPFA

Péptidos identificados (amarillo) en la espectrometría de masas nano-LC-MS/MS de la DLH.

Porcentaje cubierto 10%

M	ASPHEQLVR	IPVDQAHVEG	LLALPAAPIG	VVLF AHGSGS
S	RHSPRNNYV	ARVLHARGVG	TLLLDLLTPE	EDRDYRTRFD
I	ALLTQRLRA	AARWLGRQQL	TRSLPMGYFG	ASTGAAAALM
A	AAAQGRDIR	AVVSRGGRPD	LAGPEALARV	ACPTLLLVGS
R	DDEVLELNR	QAASLMRCPH	RLSVVPGATH	LFEEPGTLEA
A	ARQAADWFE	KYLQPA		

Secuencia de aminoácidos de la proteína DLH de BQ1

>contig5

MTSPHEQLVRI PVDQAHVEGLLALPAAPIGVVLF AHGSGSSRHSPRNNYVAGVLHAHGVGT
LLLDLLTPEEDRDYRARFDIALLTQRLRAAARWLGRQPLTRALPMGYFGASTGAAAALMAA
AAQGS DIRAVVSRGGRPDLAGPEALARVACPTLLLVGGRDEEVLELNRQAASLMRCPHRLS
VVPGATHLFEEPGTLEAAARQAADWFEKYL PRA



Apéndice 3. Clonación de los genes *lamb* y *dlh*.

Vector empleado para la inducción de las proteínas recombinantes.

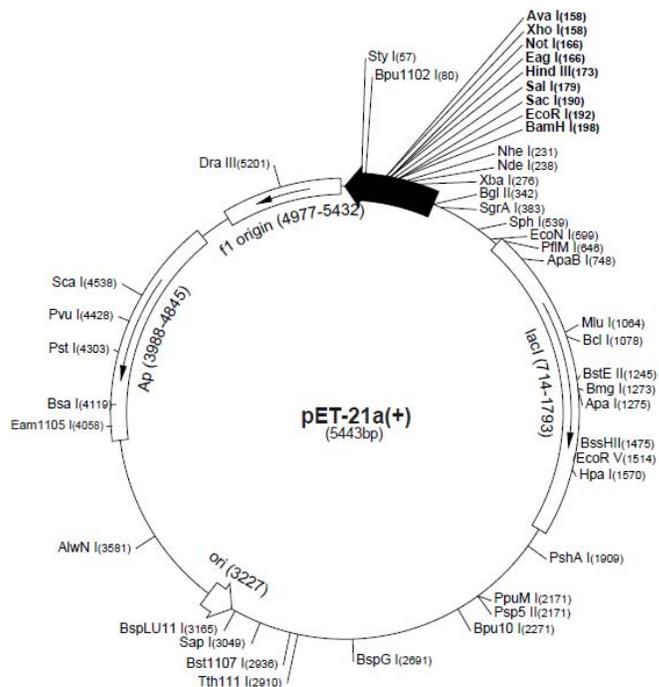


Tabla v. Oligonucleótidos diseñados para la clonación de *lamb* y *dlh*.

En negritas se indica el sitio de reconocimiento para las respectivas enzimas de restricción.

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de corte	%GC	Tm (°C)
Forward LamB/YcsF	CGC CAT ATG ACG AGG CAC ATC GAT CTG AAC AGC	<i>NdeI</i>	52	61
Reverse LamB/YcsF	ATA AAG CTT GGC GAA CGG GCG CAC GAC GAC	<i>HindIII</i>	81	60.9
Forward DLH	CTA CAT ATG ACA TCG CCG CAC GAA CAG CTG G	<i>NdeI</i>	58	59.5
Reverse DLH	C GTA CTC GAG AGC CCT AGG CAA ATA TTT TTC GAA CCA GTC GG	<i>XhoI</i>	40	62



Tabla vi. Condiciones para la amplificación de *lamb/ycsf* por PCR punto final.

Número de ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94	2 min
30	Desnaturalización	94	1 min
	Alineamiento	40, 45, 50, 55 y 60	30 s
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	10 min

Tabla vii. Condiciones para la amplificación de *dlh* por PCR punto final.

Número de ciclos	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94	2 min
30	Desnaturalización	94	1 min
	Alineamiento	55 y 60	30 s
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	10 min



11. Bibliografía

- Akoh C, Lee G-C, Liaw Y-C, Huang T-H, Shaw J-F. 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res.* 43:534-552.
- Akutsu-Shigeno Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T. 1998. Purification and properties of a polyester polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *Appl Environ Microbiol.* 64:62-67.
- Akutsu-Shigeno Y, Adachi Y, Yamada C, Toyoshima K, Nomura N, Uchiyama H Nakajima-Kambe T. 2006. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70:422-429.
- Alcántara C, Cervera J, Rubio V. 2000. Carbamate kinase can replace in vivo carbamoyl phosphate synthetase. Implications for the evolution of carbamoyl phosphate biosynthesis. *FEBS Letters.* 484:261-264.
- Allen A, Hilliard N, Howard G. 1999. Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans*. *Int Biodeterior Biodegrad.* 43:37-41.
- Andersen P, Heron I. 1993. Simultaneous electroelution of whole SDS-polyacrylamide gels for the direct cellular analysis of complex protein mixtures. *Journal Immunol Met.* 161:29.
- Andrianopoulos A, Hynes M-J. 1988. Cloning and analysis of the positively acting regulatory gene *amdR* from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol.* 8:3532-3541.
- Arst H-N, Penfold H-A, Bailey C-R. 1978. Lactam utilisation in *Aspergillus nidulans*: evidence for a fourth gene under the control of the integrator gene *intA*. *Mol Gen Genet.* 166:321-327.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Carrillo García A. 2004. Identificación de una esterasa extracelular cuya actividad está relacionada con el crecimiento de *Acinetobacter* sp. en poliuretano. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de química. UNAM.



- Cheah E, Austin C, Ashley G, Ollis D. 1993. Substrate-induced activation of diene lactone hydrolase: an enzyme with a naturally occurring Cys-His-Asp triad. *Prot Engineering*. 6:575-583.
- Chow S, Ng T. 1983. The biodegradation of N-methyl-2-pyrrolidone in water by sewage bacteria. *Wat Res*. 17:117-118.
- Cregut M, Bedas M, Durand M-J, Thouand G. 2013. New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotech Adv*. 31:1634-1697.
- Cygler M, Grochulski P, Kazlauskas R-J, Schrag J-D, Bouthillier F. 1994. A structural basis for the chiral preferences of lipases. *J Am Chem Soc*. 116:3180-86.
- DeLano W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- Díaz P, Prim N, Pastor F. 1999. Direct fluorescent-based lipase activity assay. *Biotechnology*. 27:697-70.
- Domínguez Cardenas M. 2012. Clonación del gen de una porina/esterasa de membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1 en un vector de expresión para la producción de proteína recombinante. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- EPA. 2012. TSCA Workplan chemical risk assessment. N-methyl-2-pyrrolidone: paint stripping use. Office of chemical safety and pollution prevention.
- Ferrato F, Carriere F, Sarda L, Verger R. 1997. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods Enzymol*. 122:327-47.
- Flick B, Talsness C, Jäckh R, Buesen R, Klug S. 2009. Embryotoxic potential of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and three of its metabolites using the rat whole embryo culture system. *Toxicol Appl Pharmacol*. 273:154-167.
- Fujimoto Z, Takase K, Doui N, Momma M, Matsumoto T, Mizuno H. 1998. Crystal structure of a catalytic-site mutant alpha-amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentose. *J Mol Biol*. 277:393-407.



- Gautam R, Bassi A, Yanful E. 2007. A review of biodegradation of synthetic plastic and foams. *Appl Biochem Biotechnol.* 141:85-105.
- Gu J-D, Ford T-E, Mitton D-B, Mitchell R. 2000. Microbial degradation and deterioration of polymeric materials. *In: The Uhlig's Corrosion Handbook.* Ed. Review W. 2nd Edition. New York. Wiley and Sons. pp. 439–460.
- Heikinheimo P, Goldman A, Jeffries C, Ollis D-L. 1999. Of barn owls and bankers: A lush variety of α/β hydrolases. *Structure.* 7:141-146.
- Höcker B, Jürgens C, Wilmanns M, Sterner R. 2001. Stability, catalytic versatility and evolution of the $(\beta\alpha)_8$ -barrel fold. *Cur Op Biotechnol.* 12:376-381.
- Howard G, Blake R. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. *Int Biodet Biodeg.* 42:213-220.
- Howard G, Ruiz C, Hilliard N. 1999. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *Int Biodet Biodeg.* 43: 7-12.
- Howard G. 2012. Chapter 14. Polyurethane biodegradation. *Microbial degradation of xenobiotics, environmental science and engineering.* S. N. Singh ed. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. 371-394.
- Ignatyev I, Thielemans W, Vander Beke B. 2014. Recycling of polymers: a review. *Chem Pub Soc Europe.* 7:1579-1593.
- Imamura H, Fushinobu S, Yamamoto M, Kumasaka T, Jeon B-S, Wakagi T, Matsuzawa H. 2003. Crystal structure of 4- α -glucanotransferase from *Thermococcus litoralis* and its complex with an inhibitor. *Journal Biol Chem.* 278:19378-19386.
- Jaeger K-E, Dijkstra B-W, Reetz M-T. 1999. Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Bacterial biocatalysts.* 53:315-351.
- Jouyban A, Fakhree M, Shayanfar A. 2010. Review of pharmaceutical applications of *N*-methyl-2-pyrrolidone. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 13:524-535.



- Katz M-E, Hynes M-J. 1989. Characterization of the *amdR*-controlled *lamA* and *lamB* genes of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 122:331-339.
- Kawai F. 2010. The biochemistry and molecular biology of xenobiotic polymer degradation by microorganisms. *Biosci Biotechnol Biochem*. 74:1743-1759.
- Kay M, McAcabe R, Morton L. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *Int Biodet Biodeg*. 31:209-225.
- Kermasha S, Bisakowski B, Morin A. 2000. The effect of physical and chemical treatments on the esterase activity from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. *Food Res Int*. 33:767-774.
- Kroschwitz J, Howe-Grant M. Othmer encyclopedia of chemical technology. 24. John Wiley & Sons, New York, 1997.
- Lan C-H, Peng C-Y, Lin T-S. 2004. Acute aquatic toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone to *Daphnia magna*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 73:392-397.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Loredo-Treviño A, Gutiérrez-Sánchez G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar C. 2012. Microbial enzymes involved in polyurethane biodegradation: a review. *J Polym Environ*. 20:258-265.
- Marty J-L y Vouges J. 1987. Purification and properties of a phenylcarbamate herbicide degrading enzyme of *Pseudomonas alcaligenes* isolated from soil. *Agric Biol Chem*. 51:3287-3294.
- Mechichi T, Stackebrandt E, Fuchs G. 2003. *Alicyclophilus denitrificans* gen. nov., sp. nov., a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing β -proteobacterium. *Int J System Evol Microbiol*. 53:147-152.
- Moreno González LE 2012. Comparación de la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T con las cepas de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ5 capaces de crecer en poliuretano como única fuente de carbono. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.



- Morris G-M, Huey R, Lindstrom W, Sanner M-F, Belew R-K, Goodsell D-S, Olson A-J. 2009. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 16:2785-91.
- Mulbry W, Kearney P-C. 1991. Degradation of pesticides by micro-organisms and the potencial for genetic manipulation. *Pest Degr.* 10:334-346.
- Nair S, Kumar P. 2007. Molecular characterization of a lipase-producing *Bacillus pumilus* strain (NMSN-1d) utilizing colloidal water-dispersible polyurethane. *World J Microbiol Biotechnol.* 23:1441-1449.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Akutsu Y, Nakahara T. 1997. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. *J Ferment Bioeng.* 83:456–460.
- Nakajima K, Shigeno A, Nomura N, Onuma F, Nakahara T. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51:134–140.
- Nardini M, Dijkstra B. 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Cur Op in Struc Biol.* 9:732–737.
- Nawani N, Khurana J, Kaur J. (2006). A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization. *Mol Cell Biochem.* 290:17-22.
- Noe F, Nickerson W. 1958. Metabolism of 2-pyrrolidone and γ -aminobutyric acid by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bact.* 75:674-681.
- Oceguera-Cervantes A, Carrillo A, López N, Bolaños S, Cruz M. J, Wachter C, Loza-Tavera H. 2007. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl Environ Microbiol.* 73:6214-6223.
- Ollis D-L, Shea E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F. 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5:197-211.
- Oosterkamp M, Veuskens T, Saia F, Weelink S, Goodwin L, Daligault H, Bruce D, Detter J, Tapia R, Han C, Land M, Hauser L, Lanhenhoff A, Gerritse J, Van



- Berkel W, Pieper D, Junca H, Smidt H, Schraa G, Davids M, Schaap P, Plugge C, Stams A. 2013. Genome analysis and physiological comparison of *Alicyclophilus denitrificans* strains BC and K601^T. PLoS ONE. 8 (6): e66971. doi:10.1371/journal.pone.0066971.
- Park Y-J, Yoon S-J, Lee H-B. 2010. A novel diene lactone hydrolase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1: purification, characterization and expression. Bioch Bioph Acta. 1800:1164-1171.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, *et al.* 2004. UCSF Chimera visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem. 25:1605-1612. doi:10.1101/gr.849004.
- Payan JP, Boudry I, Beydon D, Fabry JP, Grandclaude MC, Ferrari E, Andre JC. 2003. Toxicokinetics and metabolism of N-[(14)C]N-methyl-2- pyrrolidone in male Sprague-Dawley rats: in vivo and in vitro percutaneous absorption. Drug Metab Dispos. 31, 659-669.
- Richardsdon I, Katz M, Hynes M. 1992. Molecular characterization of the *lam* Locus and sequences involved in regulation by the *AmdR* protein of *Aspergillus nidulans*. Mol Cell Biol. 12:337-346
- Rowe L. Howard T. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. Int Biodet Biodeg. 50:33-40.
- Ruiz C, Hilliard N, Howard G. 1999. Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. Int Biodet Biodeg. 43:43-47.
- Russell R, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval G, Dantzler W, Hickman D, Jee J, Marks D, Mittermiller P, Nuñez S, Santiago M, Townes M, Williams N, Nuñez V, Boulanger L, Bascom S, Strobel S. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. Appl Environ Microbiol. 77:6076-6084.
- Seo J, Keum Y, Li Q. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. Int J Environ Res. 6:278-279.



- Singh A, Upadhyay V, Panda AK. 2015. Solubilization and refolding of inclusion body proteins en Insoluble Proteins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Elena García-Fruitós (ed.), Springer Science Business Media New York. 283-291.
- Solís-González CJ. 2008. Caracterización del crecimiento de *Alicyclophilus* sp. BQ5 en poliuretano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Sousa S-F, Fernandes P-A, Ramos M-J. 2006. Protein-ligand docking: current status and future challenges. Prot: Struct, Funct and Bioinform. 65:15-26.
- Strope P-K, Nickerson K-W, Harris S-D, Moriyama E-N. 2011. Molecular evolution of urea amidolyase and urea carboxylase in fungi. Evol Biol. 11:1-15.
- Trott O, Olson A-J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem. 31:455-461. doi: 10.1002/jcc.21334.
- Vega R, Main T, Howard T. 1999. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*. Int Biodet Biodeg. 43:49-55.
- Velásquez M, Drosos J, Gueto C, Márquez J, Vivas-Reyes R. 2013. Coupled Autodock-PM6 method to select the best pose in molecular docking studies. Rev Colomb Quim. 42:51-58.
- Walker I, Hennessy J-E, Ollis D-L, Easton C-J. 2012. Substrate-induced conformational change and isomerase activity of dienelactone hydrolase and its site-specific mutants. Chem Bio Chem. 13:1645-1651.
- Yuriev E, Ramsland P-A. 2013. Latest development in molecular docking: 2010-2011 in review. J Mol Recog. 26:215-239.

