

II.J.- CONSERVACIÓN DE LA PROTEÍNA PURIFICADA

II.J.1.- Tercera diálisis

A los 2, 3 ó 4 tubos con proteína pura, según el caso, se le añade CaCl_2 hasta llevarlos a 10mM CaCl_2 , y se introducen en sacos Spectra/Por de tamaño de poro de 6000-8000. Con este CaCl_2 se pretende que haya suficiente calcio como para que el enlace coordinado que establece entre a β -glucanasa y el ión calcio se mantenga lo más estable posible y si existe un equilibrio entre la forma coordinada y la libre de calcio, gracias a la presencia de este calcio extra, ausente en el agua desionizada, este equilibrio se desplace hacia la forma coordinada.

La pérdida del calcio implica la desnaturalización de proteína y se aprecian precipitados en la muestra.

En esta ocasión la diálisis nos servirá para eliminar el tampón acetato, las sales y poner la proteína a pH neutro. Para ello dializamos con MOPS (Sigma) 2mM pH 7.0 en un vaso de precipitados de 2 litros, después de 4-5 horas cambiamos el MOPS por agua destilada y seguimos dializando otras 4 horas.

II.J.2.- Determinación de la concentración de proteínas

Determinamos la Absorbancia a 280 nm, usando con coeficiente de extinción de 0.0145 ml/ μgr para tener una aproximación de la concentración de la proteína.

II.J.3.- Liofilización

Congelamos la proteína a menos 80 °C, y la introducimos en el liofilizador, procurando que los tubos no toquen directamente la pared de vidrio del recipiente del liofilizador, ya que se descongelaría perdiendo eficacia la liofilización, y obteniéndose en lugar de un liofilizado algodonoso uno pastoso.

El liofilizador que he usado ha sido un Cryodos de TELSTAR.

II.J.4.- Conservación de la proteína

Una vez liofilizado lo mantenemos a -20°C hasta el momento de caracterizar el enzima, o realizar cualquier otra medición, momento en el que lo resuspendemos.

II.K.- CARACTERIZACIÓN DE CINÉTICA DE LOS ENZIMAS

Espectrofotómetro de ultravioleta y visible: Para ello se uso un Cary 4.

Las condiciones de reacción fueron: tampón 6.5 mM ácido cítrico, 87 mM fosfato, 0.1 mM CaCl₂ pH 7.25, a 45°C. Las cinéticas se realizó a 365 nm, λ a la que el $\Delta\epsilon$ del producto de la degradación del sustrato es de 5640 M⁻¹·cm⁻¹.

II.L.- MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LA TERMORRESISTENCIA

II.L.1.- Termoinactivación en presencia de sustrato

Se introduce en una cubeta de cuarzo 1ml de tampón 6.5 mM ácido cítrico, 87 mM fosfato pH 7.27, 0.1 mM CaCl₂, 3 mM de sustrato G₄G₃G-MU. Una vez atemperado, 10 minutos a 65 ° C en el espectrofotómetro termoestabilizado, se añade 10 μ l del enzima a analizar en una concentración de 1.2 μ M.

En el caso de la glucanasa, dado que la termorresistencia presenta un alto grado de dependencia respecto a la concentración de proteína y pH, es importante trabajar siempre a una concentración fija de proteína y con el mismo tampón.

II.L.2.- Termoinactivación en ausencia de sustrato

Este método permite estimar la termorresistencia desestimando la acción del sustrato.

Para ello se usa tampón Acetato Sódico 50 mM, CaCl₂ 20 mM pH 6.0 a 65°C. El experimento se realiza en tubos “Eppendorf” de 500 μ L donde se poseen 75 μ L de una disolución de 50 μ g/mL de enzima en dicho tampón. Estos tubos de “Eppendorf” se sumergen totalmente en un baño a 65°C de manera que todo el tubo esté a la misma temperatura y no tengamos evaporación ni condensaciones en los puntos más fríos del tubo; ya que esto haría variar la concentración efectiva de la disolución de enzima. Este valor de la concentración es importante pues se ha observado que un gran efecto sobre la termorresistencia. A diferentes tiempos se van extrayendo los diferentes “Eppendorf” del baño. A continuación los tubos se pasan a un baño de hielo, para parar bruscamente la desnaturalización térmica. Los diferentes tubos se mantienen en la nevera mientras se acaba el experimento y posteriormente, se determina la su actividad a 45°C en tampó Citrato/Fostato pH 7.2, 0.1 mM CaCl₂. Se ha comprobado que no se produce renaturalización enzimática una vez que los tubos están fuera del baño a 65°C, al menos, no se produce la renaturalización suficiente como para que el enzima inactivado recupere su actividad.

II.M.- MÉTODOS COMPUTACIONALES

El análisis de la estructura 3D de la proteína con objeto de diseñar mutantes, proponer hipótesis y explicaciones sobre el efecto de mutaciones en la estructura, estabilidad, actividad o minimizaciones de energía del enzima se realizó en un ordenador Silicon Graphics mediante los programas TurboFrodo y Rasmol, y en PC mediante PdbViwer v3.7b2, Rasmol y MolMol.

III.- Resultados y discusión

III.A.- ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA/ACTIVIDAD DE LA GLUCANASA MEDIANTE MUTAGÉNESIS DE SATURACIÓN EN LA POSICIÓN 58.

La elección de la posición 58 como objetivo de este estudio tuvo su origen en un trabajo previo realizado en el grupo (Pons 1996) que había consistido en hacer un “alanine scanning” sobre el lazo mayor de la β -glucanasa que se sitúa sobre el centro activo. De entre todas las posiciones analizadas la más interesante resultó ser la posición 58, representada por el mutante M58A. Dicho mutante presentaba una actividad cerca de 6 veces superior a la del enzima silvestre. Este hecho abrió la posibilidad de estudiar más detenidamente la implicación de dicha posición en la modulación de la actividad del enzima. El enfoque que se propuso fue estudiar la influencia de los diferentes residuos aminoacídicos en esta posición y su relación con la actividad del enzima.

III.A.1.- Primera serie de mutantes en la posición 58 de la β glucanasa

Se realizó una primera serie de mutantes con objeto de obtener al menos un representante de los diferentes grupos químicos para la cadena lateral. Se decidió hacer los mutantes M58C (grupo tiol), M58D (carga negativa), M58K (carga positiva), M58S (residuo sin carga), M58V (residuo hidrófobo alifático), M58W (residuo hidrófobo aromático).

Los mutantes se obtuvieron por mutagénesis dirigida utilizando una variante desarrollada en el grupo descrita en el apartado II.D.7, usando DeepVent polimerasa. Para ello, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

```
M58C : CGCCACGTACAGTTAAAACAGTTTCCATTTCGAGTA
M58D : CGCCACGTACAGTTAAAATCGTTTCCATTTCGAGTA
M58K : CGCCACGTACAGTTAAACTTGTTTCCATTTCGAGTA
M58S : CGCCACGTACAGTTAAAGCTGTTTCCATTTCGAGTA
M58V : CGCCACGTACAGTTAAACACGTTTCCATTTCGAGTA
M58W : CGCCACGTACAGTTAAACCAGTTTCCATTTCGAGTA
```

Estos oligonucleótidos se utilizaron como cebadores junto a FUP y RUP para mutar y amplificar el fragmento codificante del plásmido pD6-2 que contenía el enzima silvestre. Los mutantes se obtuvieron en serie realizándose el cribado de los mismos por secuenciación manual, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.D.10. La obtención y purificación de las

proteínas se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.I.2., usando una columna de intercambio catiónico.

Un perfil de elución típico es el mostrado en la Figura III.1., donde se observa un pico y un prepico cuando la proteína se eluye de la columna, hacia los 30 minutos de iniciarse el programa. Ahora bien el perfil de elución del mutante M58C, es muy diferente (Figura III.2). Si bien se observa un prepico y pico en la elución que correspondería a la elución de α -glucanasa a los 30 minutos, superpuesta a éste se observa la elución de otra proteína. En un principio se atribuyó a otra proteína contaminante con un perfil de elución muy similar. Ahora bien, dado que la posición 58 se encuentra próxima a la 61, y que esta última está implicada en la formación de un puente disulfuro con la cisteína de la posición 90, no sería de extrañar que se tuviera tanto α -glucanasa con puentes disulfuros entre las posiciones 58-90 como 61-90. Este hecho explicaría la superposición de perfiles de elución. Además, esta hipótesis se vio reforzada cuando en el gel de SDS-PAGE no veíamos esa posible proteína contaminante.

El bajo rendimiento de este mutante así como la dificultad de separar las dos poblaciones de α -glucanasa del mutante M58C desaconsejaban seguir con este mutante. Entre otras cosas porque los parámetros cinéticos que de su estudio se derivasen serían de difícil interpretación.

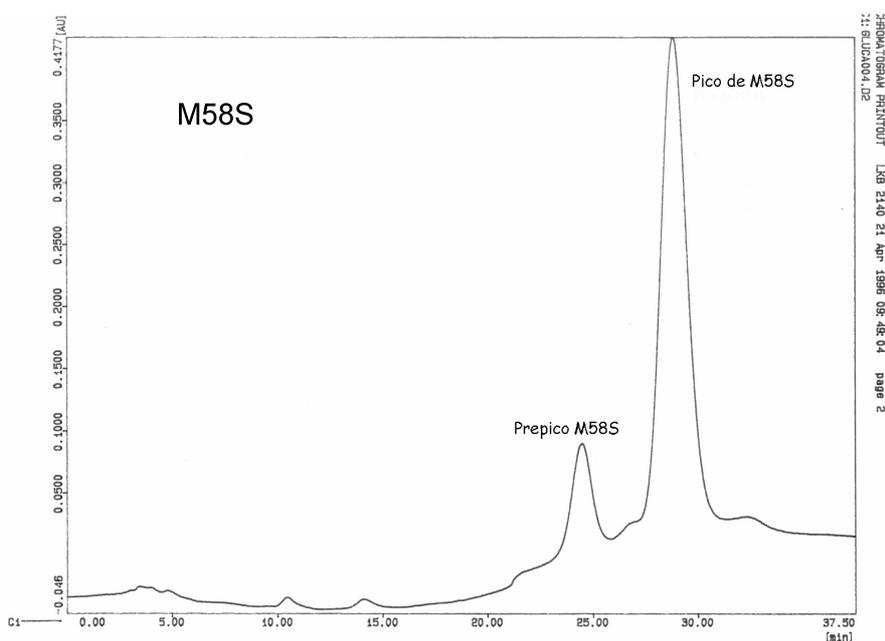


Figura III.1.: Perfil de elución del mutante M58S.

Siguiendo este esquema el valor de v_o , velocidad inicial, para condiciones de estado estacionario es:

$$v_o = \frac{k_{cat} [S][E]_o}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}}$$

Tabla III.1.: Ensayo de la actividad de la α -glucanasa realizado con tampón citrato-fosfato pH 7.02, 0.1 mM CaCl₂, G4G3GMeUmb de 0.2 a 20nM a 45 °C. La concentración de las diferentes proteínas fue M58A 10 nM, M58D 70 nM, M58K 76 nM, M58V 7 nM, M58W 26 nM

Enzima	k_{cat} (s-1)	K_m (mM)	K_i (mM)	k_{cat}/K_m (s-1. mM-1)	% k_{cat} vs wt	% k_{cat}/K_m vs wt
wt	1.8	1.9	30.0	0.95	100	100
M58A	16.66	4	15.0	4.17	926	439
M58D	1.51	4.5	39.0	0.34	84	36
M58K	3.12	6.87	19.2	0.45	173	47
M58S	7.02	5.81	17.3	1.21	390	127
M58V	7.18	2.5	14.1	2.87	399	302
M58W	1.55	1.67	42.0	0.93	86	98
M58C	nd	nd	nd	nd	Nd	Nd

Estos primeros resultados, al comparar la actividad de los distintos mutantes, en términos de tanto por ciento de k_{cat}/K_M respecto al silvestre, muestran ciertas tendencias generales que se resumen en:

1. El aumento del volumen de la cadena lateral, como en el caso del triptófano, siempre tomando como referencia el volumen de la metionina del enzima silvestre, produce una disminución de la actividad enzimática.
2. La reducción de volumen de la cadena lateral aumenta la actividad (M58A, M58V), siempre que estos residuos sean hidrófobos, ya que el caso del mutante M58S, a pesar de su pequeño tamaño se produce una disminución de la actividad.
3. El efecto de residuos hidrófobos es mucho más acusado cuando el residuo presenta una cadena lateral larga y cargada (M58K, M58D).

De acuerdo con estas conclusiones, se podía sugerir que, además de los mutantes M58A y M58V, habría otros aminoácidos hidrófobos de volumen inferior a la metionina que podrían ser más activos que el enzima silvestre. Así pues, en un primer momento, se planteó que la sustitución de la metionina por aminoácidos de pequeño volumen podría facilitar la entrada de moléculas de H₂O al centro activo. Esta hipótesis intenta explicar porqué la contribución del aminoácido de la posición 58 era tan decisiva, a pesar de que no se consideraba que este aminoácido interaccionase directamente con el sustrato. Pero dicha hipótesis no acababa de explicar los resultados experimentales. En el caso del mutante M58S, metionina por serina, se

reemplaza la metionina por un aminoácido de cadena corta e hidrófilo. Este cambio, debería permitir la presencia de aún más moléculas de agua en el centro activo, aumentando su actividad. Sin embargo esto no sucede; no sólo no aumenta la actividad sino que la reduce ligeramente. Por otro lado, no parece que el agua sea el factor limitante de la actividad del enzima ya que estaríamos hablando de un problema de difusión en un enzima con un enorme surco central. El valor de k_{cat}/K_M del mutante M58A se aproxima a $10^1 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ pero, en enzimas como la acetilcolinesterasa, la anhidrasa carbónica o la triosafosfato isomerasa, -en los que considera que su velocidad catalítica está limitada por la difusión de los sustratos- estos valores son del orden de 10^8 y $10^9 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$. Si existiesen problemas de difusión en la glucanasa éstos se deberían más al sustrato que al agua.

Para explicar este aumento de actividad, se propuso otro posible mecanismo, un cambio local del pKa de los aminoácidos catalíticos. Pero aunque se tratase de un cambio en la estructura de las moléculas de agua alrededor de estos enzimas, no se puede olvidar que el residuo ácido/base general catalítico se sitúa en la estructura cristalizada a 7.2 \AA de esta posición. Demasiado lejos para que pueda repercutir tan decisivamente sobre la actividad de los aminoácidos catalíticos.

Con los datos anteriormente expuestos no se podía avanzar más en las conclusiones, por ello se decidió realizar una nueva serie de mutantes para así analizar las restantes posibles sustituciones de aminoácidos en esta posición.

III.A.2.- Segunda serie de mutantes en la posición 58

Con objeto de completar la mutagénesis de saturación en la posición 58, se decidió diseñar un cassette que facilitara la obtención y rastreo los mutantes y de una forma más rápida.

Para buscar el lugar óptimo para generar el cassette y determinar qué enzimas de restricción, a ser posible de corte único, se podía añadir alrededor de la posición en la que se quería introducir la mutación, se implementó un programa en C++ que buscaba todas las posibles dianas de restricción generables pero sin cambiar la proteína transcrita. En otras palabras, generar nuevas dianas usando mutaciones silenciosas.

Original Sequence (Glucanase) :

ATGTCTTACCGTGTAACGAATGTTGATGCTGCTTGTCCTGACTGGATTATTCTTAAGTTTG

Single Letter Code:

R = A or G; Y = C or T; M = A or C; K = G or T
S = C or G; W = A or T; H = A or C or T; B = C or G or T;
V = A or C or G; D = A or C or G; N = A or C or G or T

```

* New Restriction Site
~ Restriction Site

Translation      : M S Y R V K R M L M L L V T G L F L S L
Original Sequence : ATGTCTTACCGTGTA AAAACGAATGTTGATGCTGCTTGTCACTGGATTATTCTTAAGTTTG 60
Afl II c/ttaag      ~ *
Bsm I gaatgc        *
BstE II g/gtnacc    *
Ear I ctcttc
HinD III a/agctt   *
Sal I g/tcgac      *
Spe I a/ctagt      *
Sph I gcatg/c      *
Stu I agg/cct      *

```

Figura III.3: Ejemplo de la salida que se obtiene al ejecutar del programa cuando se introduce la secuencia de los 60 primeros de nucleótidos de la secuencia de DNA de la glucanasa, para dianas de restricción de 6 o más nucleótidos.

De todo este fichero, es especialmente interesante la región que flanquea a la metionina 58 puesto que en la secuencia original no presenta ninguna diana única (Figura III.4). Analizando las diferentes dianas silenciosas que se podían generar resultaron especialmente interesantes tres enzimas de restricción. En concreto BstB I, Xmn I y BssH II.

```

Traducción      : N Y N T G L W Q K A D G Y S N G N M F N
Secuencia Original : AACTATAATACGGGGTTATGGCAAAAAGCAGATGGGTACTCGAATGGAAACATGTTTAAC 180
BstB I tt/cgaa      *
Xmn I gaann/nnttc  *
Traducción      : C T W R A N N V S M T S L G E M R L S L
Secuencia Original : TGTACGTGGCGTGCAAACAATGTCTCCATGACGTCGTTAGGGGAAATGCGATTATCGCTC 240
BssH II g/cgcg     *

```

Figura III.4: Dianas próximas a la región de la posición 58 elegidas.

Los enzimas BstB I y BssH II permitirían generar el cassette y Xmn I, también conocido como Asp700, permitía jugar con el triplete de la posición 58.

El mutante M58G se diseño y clonó por el método clásico, protocolo II.D.7., generando el cassette con estas tres dianas nuevas mediante el oligonucleótido:

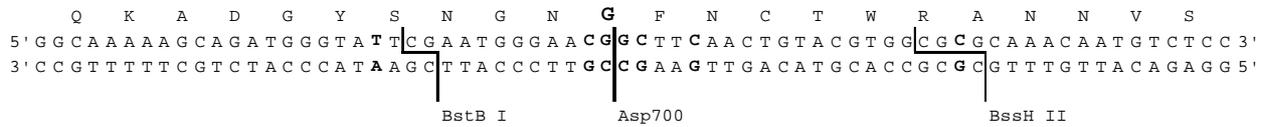
5' GGAGACATTGTTTGCGCGCCACGTACAGTTGAAGCCGTTCCCATTCGAATACCCATCTGCTTTTTGCC 3'

Con este oligonucleótido y el RUP se hizo el primer PCR. Con el fragmento así amplificado y el FUP se obtuvo, por PCR, un segundo fragmento que cortado por EcoR I y HinD III se insertó en un PUC119. Seguidamente se realizó un cribado por digestión con Asp700. Esta estrategia nos permitió generar todas las dianas que necesitábamos para insertar el cassette.

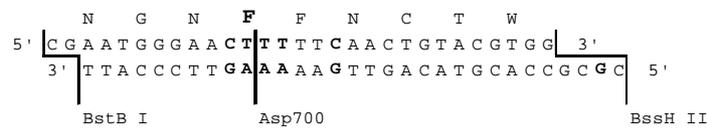
La diana Asp700 está ausente en el constructo pD6-2, por lo que al añadirla se convirtió en diana única. Corta en romo reconociendo seis bases de forma específica, dejando en el centro cuatro bases inespecíficas (**gaann/nnttc**). Esto última característica permite jugar con los

fragmentos para construir el triplete que nos interese. En la Figura III.6, se puede ver las combinaciones de fragmentos que se utilizaron.

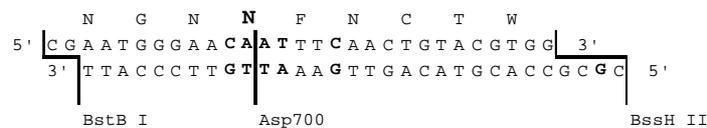
M58G



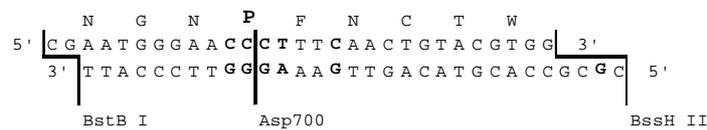
M58F



M58N



M58P



M58Q

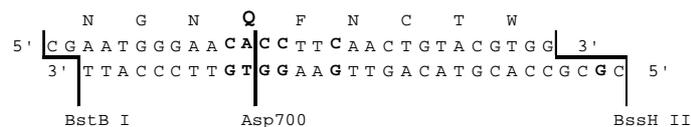


Figura III.5: Esquema general de los mutantes a generar por mutagénesis dirigida e inserción en cassette.

En la Figura III.7, se muestra el gel de una electroforesis en la que se aprecian las digestiones con *Ava*I, *Hind* II y *Asp*700. También se indica el tamaño en pares de bases de los fragmentos que se necesita. Combinando estos fragmentos se pueden generar el resto de mutantes de la posición 58.

El sistema de cassette permitió generar cuatro mutantes (M58F, M58N, M58P y M58Q), como se muestra en la Figura III.6. Para ello se prepararon 8 oligonucleótidos para 4 cassettes. Estos cassettes se insertaron usando las dianas *Bst*B I y *Bss*H II generadas por mutagénesis en M58G.

El resto de mutantes se generarían usando la diana *Asp*700. La diana que corta *Asp*700 o *Xmn* I es **gaann/nnttc**. Este tipo de diana puede ser muy interesante en el caso de querer hacer una mutagénesis de saturación; como en este caso, ya que se quería probar todos los aminoácidos en la posición 58 de la glucanasa.

	G	F	N	P
	G C	T T	A T	C T
G		V	D	
G		G T T	G A T	
F			Y	
T			T A T	
P	R	L	H	
C	C G C	C T T	C A T	
Q		I	N	T
A		A T T	A A T	A C T

Figura III.6: Tripletes generados combinando fragmentos proveniente del mutante M58G o de los mutantes M58F, M58N, M58P y M58Q que generamos usando el cassette y permitieron generar el triplete correspondiente al codón que nos interesaba para cada nuevo mutantes a generar.

Como se aprecia en la Figura III.7, los fragmentos de 561 pb corresponden a la primera base del triplete, los de 1227 a las otras dos bases. Al ser ligados al resto del plásmido de 2539 pb, se obtiene el mutante deseado.

No todos los mutantes que diseñamos se pudieron obtener por resultar inviables. Este fue el caso del mutante M58T o el M58Y.

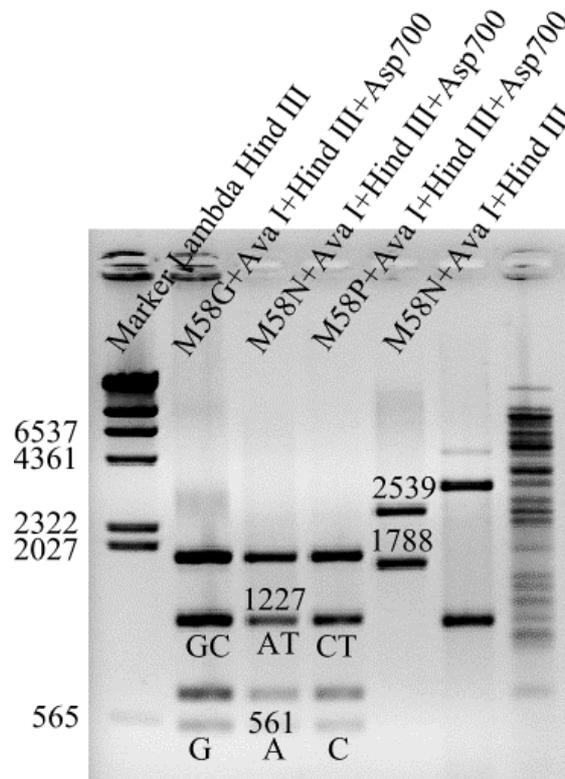


Figura III.7: Fragmentos elegidos para obtener el primer nucleótido del triplete 561 pb, los dos nucleótidos restantes están en el fragmento de 1227 pb.

Una vez obtenidos los genes mutados, se procedió a expresar y purificar cada una de las proteínas, siguiendo el método descrito en materiales y métodos, apartado II.I.2.

Durante la resuspensión del liofilizado de los diferentes mutantes con tampón citrato/fosfato, dos de ellos, el M58G y el M58P, se volvieron ligeramente turbios. Para intentar no perder la muestra, se disolvieron estos dos mutantes en tampón a una concentración 0.5 mM CaCl_2 . Probablemente se había producido una sustitución del Ca^{++} coordinado de la glucanasa por Na^+ debida a la acción quelante del citrato. Olsen *et al.* 1991 ya habían descrito que una incubación de 1 hora a 5°C con una concentración de 5 mM CaCl_2 bastaba para recuperar glucanasa- Ca^{++} a partir glucanasa- Na^+ que es más inestable. En nuestro caso, se puso menos cantidad de CaCl_2 pero durante más tiempo para evitar que el exceso de calcio no influyera a la hora de determinar los parámetros cinéticos. La turbidez de estas dos muestras se redujo considerablemente.

¿Por qué precipita la proteína en estas circunstancias?. Cuando se cristalizó el híbrido H(A16M)- Na^+ (Keitel T. *et al.*, 1994) se vio que en el cristal, las dos moléculas de aguas que se coordinaban con el Ca^{++} en el híbrido H(A16M)- Ca^{++} habían desaparecido. Pero aparecía un nuevo integrante, un enlace coordinado, en concreto era el grupo OH de la tirosina 56, situada en el lazo entre las hojas betas 2 y 3, de otra molécula de glucanasa, que correspondería a la tirosina 85 de *B. licheniformis* (contando el péptido señal). Es probable que la unión consecutiva de diferentes glucanasas debido a esta interacción pueda facilitar su precipitación.

En nuestro grupo ya desde los primeros momentos (Lloberas, 1992) se vio que añadir CaCl_2 al tampón citrato/fosfato con el que se realizaban las cinéticas mejoraba claramente la actividad del enzima y permitía que los resultados fueran reproducibles, y además, aumentaba la estabilidad térmica (Borris, 1981; Borris *et al.*, 1989; Keitel *et al.*, 1994; Juncosa 1995).

Esta observación que al principio se restringió a ser escrupulosos en la concentración de Ca^{++} que se usaban en los tampones de los estudios cinéticos de termorresistencia, poco a poco, se fue extendiendo a otros pasos de la obtención del enzima, como es la diálisis. Pons (1996), describía que la tercera diálisis, la anterior a la liofilización, se hacía con agua monodestilada debido a que se había observado que el nivel de precipitación de la proteína era menor que usando agua milliQ (ultrapura). Probablemente, la ausencia de iones -entre ellos el calcio- facilitaba la precipitación de la proteína.

A este efecto hay que añadir el posible “estrés” que representa para la proteína la liofilización y que además el tampón que tradicionalmente se usa para resuspender la glucanasa es citrato/fosfato. El citrato es altamente quelante.

Se determinaron los parámetros cinéticos de cada uno de los mutantes con el sustrato cromofórico G4G3G-MU. Las condiciones de reacción fueron: tampón 6.5 mM ácido cítrico, 87 mM fosfato, 0.1 mM CaCl₂ pH 7.25, a 45°C. Las cinéticas se siguieron espectrométicamente a 365 nm, λ a la que el $\Delta\epsilon$ ($=\epsilon_{\text{producto}} - \epsilon_{\text{sustrato}}$) es de 5640 M⁻¹·cm⁻¹.

Tabla III.3: Parámetro cinéticos de los diferentes mutantes de la posición 58. Ensayo realizado con tampón citrato-fosfato pH 7.02, 0.1 mM CaCl₂, G4G3GMeUmb de 0.2 a 20 nM a 45 °C.

Enzima	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	K_i (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·MM ⁻¹)	% k_{cat} vs wt	% k_{cat}/K_m vs wt
wt	1.8	1.9	30.0	0.95	100	100
M58A	16.66	4	15.0	4.17	926	439
M58D	1.51	4.5	39.0	0.34	84	36
M58E	3.15	4.08	24.4	0.77	175	81
M58F	3.73	1	24.0	3.73	207	393
M58G	20.52	3.5	18.0	5.86	1140	617
M58H	2.78	4.91	23.5	0.57	154	60
M58I	4.17	2.53	15.4	1.65	232	174
M58K	3.12	6.87	19.2	0.45	173	47
M58L	16.6	5.16	28.3	3.22	922	339
M58N	6.31	5.2	18.2	1.21	351	127
M58P	1.79	2.1	26.0	0.85	99	89
M58Q	1.66	4.48	20.3	0.37	92	39
M58R	0.35	3.6	45.8	0.1	19	11
M58S	7.02	5.81	17.3	1.21	390	127
M58V	7.18	2.5	14.1	2.87	399	302
M58W	1.55	1.67	42.0	0.93	86	98

Las conclusiones que se deducen de los resultados mostrados en la tabla III.3, van en el mismo sentido que las que ya se apuntaron referidas a la primera serie de mutantes. La reducción de volumen de la cadena lateral aumenta la actividad, como sucede en el caso del mutante M58S. Ahora bien, el hecho de que se trate de un aminoácido hidrófilo reduce parcialmente este efecto, por lo que se obtiene una actividad de sólo un 127% de k_{cat}/K_m respecto al enzima silvestres. El efecto de los residuos hidrófilos en la reducción de la actividad es mucho más acusado cuando el residuo presenta una cadena lateral larga y cargada.

El mutante M58V presenta un 302 % de actividad en términos de k_{cat}/K_m respecto al enzima silvestre. De hecho en esta posición tanto *Bacillus macerans* como *Clostridium thermocellum* presentan una valina en lugar de una metionina, aunque sea la metionina el aminoácido más común, en las diferentes glucanasas bacterianas.

En toda la serie de mutantes alifáticos se ha supuesto que la orientación de las cadenas laterales tendrían la misma disposición que la metionina en el enzima silvestre. La α -glucanasa de *Bacillus macerans* puede servir de referencia para comprobar si un aminoácido alifático distinto de la metionina, tendría una disposición similar a la metionina en esta posición.

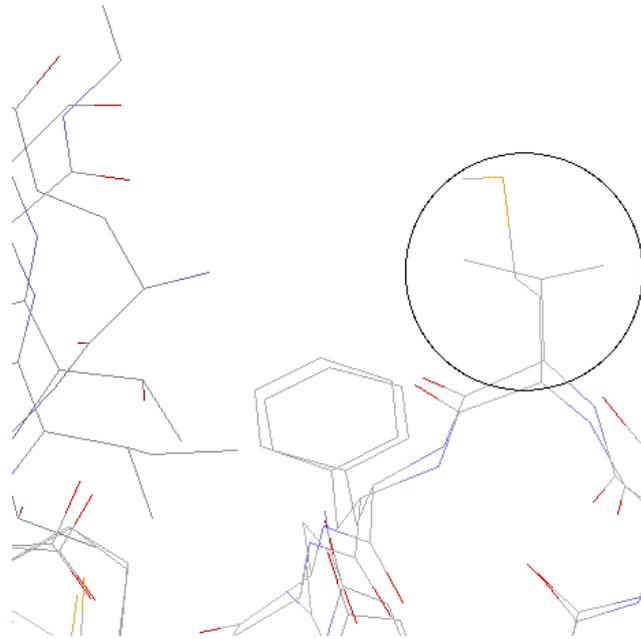


Figura III.8.: Superposición por sus carbonos alfa de los primeros 96 aminoácidos de las glucanasas de *B. licheniformis* con *B. macerans*.

La superposición por sus carbonos alfa de los primeros 96 aminoácidos de las glucanasas de *B. licheniformis* con *B. macerans*, figura III.8 muestra que la disposición de la cadena lateral de estos dos aminoácidos es similar. Esta buena superposición de las cadenas laterales de estos dos aminoácidos apoya las hipótesis anteriores.

El mutante M58G presentaba la mayor actividad, hasta 6 veces más que el enzima silvestre.

Los mutantes con aminoácidos hidrófobos de cadena más corta que la metionina conseguían mejorar la constante catalítica k_{cat} pero, aumentan la K_m .

Asímismo, los resultados obtenidos verificaron que el mutante M58A presentaba más de 4 veces la actividad del silvestre, siempre en términos de k_{cat}/K_m , y que el mutante M58F, aunque presenta algo menos de actividad, ronda estos mismos valores. Ahora bien, la manera en que ambos mutantes alcanzan esta actividad es muy diferente. El M58F muestra unos valores de K_m , más pequeños. Es decir, que en cierta manera aumenta su eficiencia de unión al sustrato a la vez que su actividad catalítica.

Para intentar explicar estos resultados se propone la siguiente hipótesis. Una proteína no es una estructura rígida, es una estructura semifluida y dinámica. Las diferentes estructuras que constituyen la proteína, especialmente los diferentes lazos que rodean al centro activo, facilitan la unión al sustrato e inducen los cambios conformacionales del sustrato que posibilitan su procesado por los aminoácidos del centro activo. Estas mismas estructuras también hacen posible

la disociación del complejo enzima-sustrato, ya sea en forma de producto o de sustrato -en el caso de que este último no se haya procesado-. La frecuencia de “respiración” de la proteína influiría en los parámetros catalíticos del enzima. Aunque la proteína actúa como un todo, cada una de sus estructuras influyen sobre el conjunto. De los diferentes lazos que se encuentran relativamente libre en la α -glucanasa, el que se halla sobre el surco mayor es el más voluminoso, y es precisamente donde se localiza la posición 58. Por su gran volumen se podría suponer que su frecuencia de vibración también sería baja, con respecto a las otras estructuras móviles de la proteína, por lo que podría ser un elemento limitante en la frecuencia de “respiración” del conjunto de la proteína. Aumentar la frecuencia de vibración del elemento más lento redundaría en un aumento de la frecuencia global.

En el caso de los mutantes en los que se realiza la sustitución por aminoácidos alifáticos, se han obtenido mejoras en la actividad cuando disminuía la interacción de la posición 58 a su entorno hidrófobo. Esta disminución de la interacción se debe a la sustitución por aminoácidos de cadena cada vez más corta. Según este supuesto, cuando desestabilizamos esta estructura haciéndola menos fija su actividad aumenta. Tal efecto va en detrimento de su termorresistencia, como ya se ha podido comprobar al analizarla. Estas constataciones indican que la actividad y la termorresistencia están íntimamente correlacionadas con la movilidad del lazo mayor.

En el caso del mutante M58P, a pesar de no presentar ningún grupo lateral que le permita interactuar con el entorno hidrófobo que le rodea, introduce una rigidez tal en el lazo y precisamente en su extremo apical, que le confiere gran estabilidad.

Mención a parte cabe hacer de los aminoácidos cargados. En ellos, la fuerte carga negativa en el interior del surco, alrededor de los aminoácidos del centro activo (E138, D136, E134 y E160), puede influir atrayendo o repeliendo el aminoácido del mutante cargado en la posición 58. Además, este residuo podría tratar de evitar interactuar con el entorno hidrófobo que rodeaba a la metionina en la posición 58, introduciendo una nueva interacción cuyas consecuencias resultan difíciles de evaluar. Aunque es muy probable que la introducción de un aminoácido con carga que se traduzca en una ligera reducción del tamaño del surco que afecte a la unión de sustrato y se traduzca en un aumento de la K_m como se observa en todos los casos.

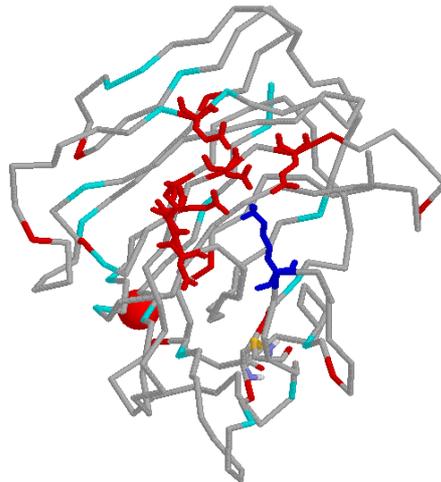


Figura III.9.: Estructura obtenida a partir del cristal del mutante silvestre, en el que se ha sustituido la metionina 58 por la lisina, y posteriormente se ha minimizado su energía. Para todas estos estos cálculos se ha usado el programa pdbviewer v3.7b2. En rojo amoninoácidos con carga negativa, en azul la lisina del mutante M58K.

La figura III.9, puede ayudarnos a entender que sucede. Se trata de una minimización de energía de la estructura cristalina silvestre a la que se ha mutado un aminoácido. La minimización se ha hecho en el vacío, la ausencia de moléculas de agua le resta cierta credibilidad, ya que en principio el medio natural en el que se encuentra la proteína es un medio acuático. Pero a grandes rasgos, el resultado de la minimización resulta bastante obvio y es que el aminoácido lisina de la posición 58 del mutante M58K se oriente hacia una región especialmente poblada de aminoácidos cargados negativamente (E138, D136, E134 y E160). Este cambio en definitiva podría acabar dificultando al sustrato su acceso al surco mayor del centro activo. En otras palabras el aumento de la K_m vendría dada indirectamente por la disminución de la k_1 .

¿Cuál puede ser la posible función del acúmulo de cargas negativas en esta posición?. Estas cargas podrían tener un papel importante en mantener abierto el surco del centro activo, debido a la repulsión experimentadas por las cargas negativas. De esta manera, el centro activo estaría abierto y accesible a la entrada del sustrato. Ahora bien, una vez el sustrato hubiese entrado en esta región, se produciría un cambio en la constante dieléctrica del medio debido al apantallamiento inducido por el sustrato favoreciendo que este surco se cierre sobre el sustrato.

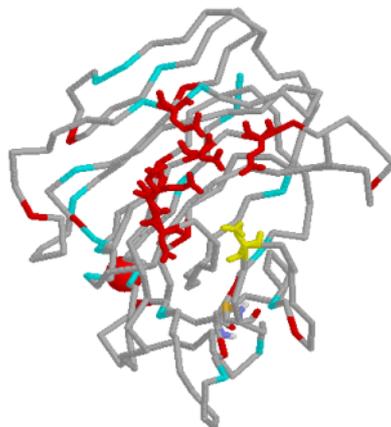


Figura III.10.: Estructura obtenida a partir del cristal del mutante silvestre, en el que se ha sustituido la metionina 58 por un glutámico, y posteriormente se ha minimizado su energía. Para todos estos cálculos se ha usado el programa pdbviewer v3.7b2. En rojo las cargas positivas, en amarillo el glutámico de la posición 58.

En el caso de los aminoácidos cargados positivamente, Figura III.10, el glutámico de la posición 58 del mutante M58E sería repelido. La Figura III.10 también proviene de una sustitución puntual de la metionina 58 por un glutámico, en amarillo, con posterior minimización de energías en un entorno sin aguas después de sustituir. En la imagen se visualiza que el aminoácido al intentar orientarse hacia las cargas negativas se retuerce hacia atrás.

El aumento de la K_m se debería, en este caso, principalmente a que la repulsión de cargas podría mantener el lazo mayor algo más abierto. La k_1 podría aumentar puesto que esta mutación parece no disminuir la luz del surco y, es más, al mantener el lazo mayor algo más abierto facilita la entrada de sustrato. En contrapartida este lazo abierto facilitaría también la salida de sustrato, con el consiguiente incremento de la k_{-1} . Así pues, en el caso de los aminoácidos cargados el aumento de la K_m parece venir por vías muy distintas, ya sea para disminución de k_1 o por el incremento de k_{-1} .

La interpretación de los resultados en los mutantes con aminoácidos hidrófobos aromáticos como el M58F y el M58W, es también compleja. En estos, se observa una mejora en la K_m que no se observa en el resto de los mutantes. Sobre estos mutantes y, particularmente, sobre el mutante M58F, que es el que más interesa por sus parámetros enzimáticos, cabe hacer la hipótesis siguiente. Al describir la serie de mutantes de aminoácidos alifáticos, se hizo referencia a que la metionina invadía ligeramente el surco del centro activo con su metilo terminal. En principio, esta metionina no parecía jugar un papel importante en la interacción con el sustrato, es más, no sería de extrañar que esta metionina se viera ligeramente desplazada, de forma lateral, al interactuar el sustrato. Este desplazamiento facilitaría que el lazo mayor se cerrara algo más, facilitando el procesamiento del sustrato. Podríamos estar hablando, en este

caso, de un “efecto gatillo”. Es decir, de un mecanismo que detecta la entrada del sustrato y facilita que el lazo se cierre sobre él.

Siguiendo con este razonamiento a continuación se comentarán los resultados referidos a la serie de mutantes en los que hemos ido acortamos la longitud cadenas alifáticas. Se han descrito previamente efectos similares en glucohidrolasas (Pujadas y Palau, 2001). La que la frecuencia de vibración del lazo determina la velocidad de procesamiento del sustrato.

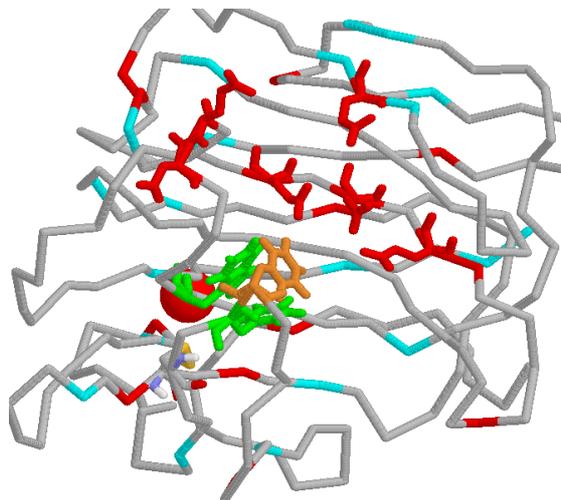


Figura III.11.: Estructura obtenida a partir del cristal del mutante silvestre, en el que se ha sustituido la metionina 58 por una fenilalanina, y posteriormente se ha minimizado su energía. Para todas estos estos calculos se ha usado el programa pdbviwer v3.7b2. En naranja la fenilalanina 58 del mutante M58F.

En el mutante M58F, como vemos en esta Figura III.A.11, la fenilalanina 58, coloreada en marrón, se sitúa sobre dos residuos aromáticos, coloreados en verde. Si miramos los ángulos que forma la fenilalanina 58 con estos dos residuos, adoptan una orientación que concuerda con una orientación de repulsión (Hunter C. A., 1991). Es decir, que este aminoácido tendería a mantener abierto el lazo principal del surco del centro activo. Al entrar el sustrato en el centro activo que esta fenilalanina 58 podría también actuar a modo de “gatillo”, dado que se trata de un residuo mucho más voluminoso que la metionina, el efecto sería mayor. Tal vez por eso, se observa una mejora tan evidente en la K_m de este mutante. Ahora bien, si esta fenilalanina se encuentra realmente en orientación de repulsión, al tender a alejarse ligeramente, el lazo estará algo más abierto, dejando más luz en el surco mayor que en el enzima silvestre. La abertura del lazo podría facilitar, ligeramente, la entrada del sustrato. Además al estar en repulsión, tras el procesamiento podría darse un cierto “efecto expulsor” por parte de la fenilalanina 58. Todos estos cambios respecto al enzima silvestre, aunque mejorarían su actividad enzimática irían en contra de su termorresistencia, pues dejarían el lazo más expuesto y alejado del núcleo de la

proteína. Esta pérdida de termorresistencia, en el caso de desnaturalizar el enzima en presencia del sustrato no se vería muy claro, debido al posible efecto protector del sustrato.

Si esta fenilalanina estuviera en orientación de atracción, sucedería todo lo contrario, ya que rigidizaría el lazo al inmovilizar la fenilalanina reduciendo la actividad del enzima y mejorando su termorresistencia.

III.A.3.- Conclusiones parciales

1. La reducción de volumen de la cadena lateral aumenta la actividad, la constante catalítica k_{cat} , y la K_m . El mutante M58G presenta la actividad más alta, hasta 6 veces más que el silvestre y el mutante M58A presenta más de 4 veces la actividad del silvestre, ambos, en términos de k_{cat}/K_m .
2. Los residuos hidrófilos disminuyen la actividad del enzima en términos de k_{cat}/K_m .
3. Únicamente en mutantes aromáticos como M58F y M58W, se aprecia una disminución de valores de K_m , respecto al enzima silvestre.
4. Según la hipótesis estructural propuesta, las diferencias en actividad observada en los distintos mutantes se deberían a cambios en la movilidad del lazo mayor, debidas a pérdidas de las interacciones en el extremo del lazo, donde se localiza la posición 58.

III.B.- PROBLEMAS DE EXPRESIÓN Y OBTENCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN ALGUNOS MUTANTES

Durante las producciones de enzima en los estudios de actividad se observó que los rendimientos eran muy desiguales, y que existía una cierta relación entre la productividad y el mutante que se estaba produciendo. A grande rasgos, los mutantes con más actividad rendían, al final del proceso de producción y purificación, menor cantidad de proteína.

También se había constatado, como en el caso del mutante M58C, que la producción final en los mutantes en los que se añadía o eliminaba alguna cisteína repercutía muy negativamente en la producción final del enzima. Dado que uno de los objetivos de la tesis, es estudiar el efecto sobre la termorresistencia de la fijación de algunos lazos de la estructura de la α -glucanasa, y para ellos se había previsto unir dichos lazos mediante puente disulfuro, era prioritario conseguir mejorar la productividad de los mutantes cisteína.

III.B.1.- Menor productividad de los mutantes hiperactivos

Para descartar la posibilidad que estos enzimas hiperactivos pudieran tener algún tipo de actividad sobre el enlace $\alpha(1,4)$ entre la N-acetilglucosamina y la N-Acilmureina de la mureina de la pared celular de *E.coli* y por tanto su expresión ser tóxica, se comparó su efecto sobre el crecimiento del cultivo y la producción de mutantes a lo largo del tiempo. Se usó como mutante hiperactivo M58G, los mutantes inactivos E138A y E138Q (Juncosa 1994b), en los que se había mutado uno de sus residuos catalíticos, y finalmente como control el enzima silvestre (wt).

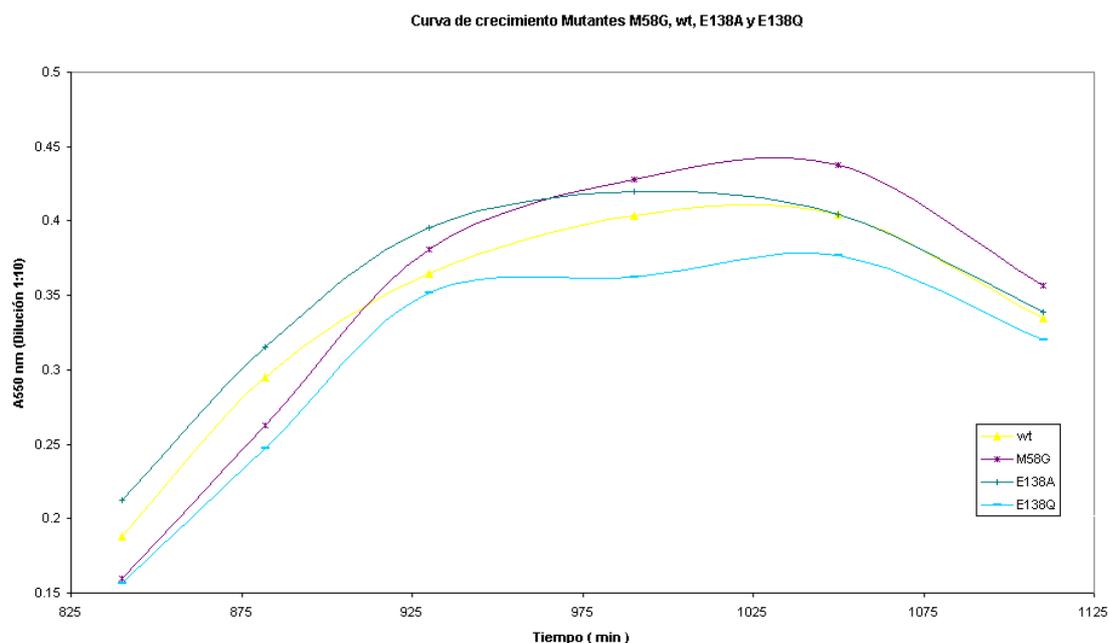


Figura III.12.: Curvas de crecimiento, respecto al tiempo, del enzima silvestre y algunos mutantes de interés.

Se hicieron 4 cultivos con 100 ml de medio 2SB Broth y 175 μ g/ml de ampicilina, que se inocularon con una colonia única del mutante correspondiente. A partir de la tercera hora se tomaron muestras del cultivo y se midió la absorbancia a 550 nm. Con los valores de absorbancia obtenidos a 550 nm, se calculó el factor de dilución a aplicar a las muestras del cultivo para que la concentración de células estimada fuera la misma en todas las muestras.

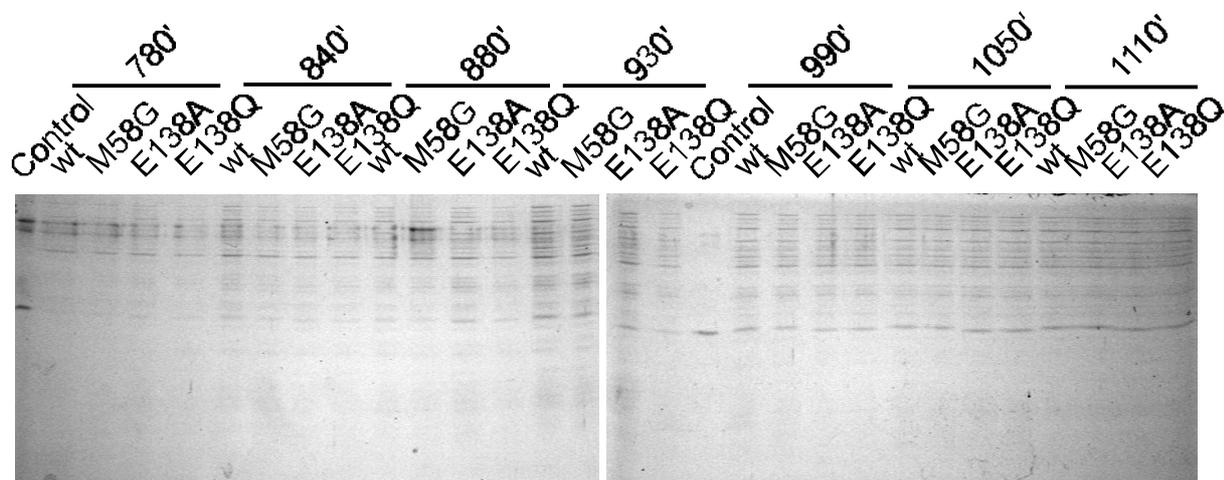


Figura III.13.: Geles de SDS-PAGE, que muestran la producción de proteína a lo largo del tiempo.

Las diferencias que observamos en el crecimiento de los cultivos eran mínimas y, en ningún caso, podrían explicar las diferencias observadas en la producción de los diferentes mutantes. Los diferentes niveles de actividad de los enzimas producidos no parecían influir en absoluto, ni en la tasa de expresión ni en la de crecimiento de los cultivos, tampoco podía atribuirse a los diferentes niveles de expresión. Lo que sí mostraba claramente este experimento es que para obtener buenos niveles de expresión del enzima hay que esperar a que el cultivo alcance la fase estacionaria. La expresión es escasa durante la fase exponencial. Si las diferencias de producción final no se podían atribuir al nivel de expresión ni la actividad de los mutantes, esto quería decir que durante la purificación se perdía parte del enzima.

III.B.2.- Dobles mutantes de cisteína

Es conocido que *E.coli* presenta en sus proteínas citoplasmáticas un menor número de residuos cisteína y de puentes disulfuro. *E.coli* forma los puentes disulfuro principalmente en el periplasma donde se encuentra las proteínas DscA, DscB y DscC encargadas de catalizar su formación (Rietsch, 1996). Cuando se expresa proteína con un plásmido multicopia, como el pUC119, la gran cantidad de proteína que se acumula en el citoplasma puede inducir la formación de enlaces intercadena no dirigidos por las proteínas Dsc, dando lugar a agregados.

Se tomó a modo de control positivo, como doble mutante al que se le había añadido dos cisteínas, el mutante S34C+K242C. Producir este mutante resultaba interesante ya que posteriormente sería usado para los estudios de termorresistencia. Como control negativo, sin cisteínas extras, se volvería a producir el mutante N57A (Pons 1996).

Como se vió en el apartado anterior III.B.1, la proteína producida en fase exponencial es escasa y hemos de esperar al final de la fase exponencial y principio de la estacionaria para observar un pico de producción. Por este motivo se cambió el protocolo de purificación con el mutante S34C+K242C, a fin de conseguir alargar el final de la fase exponencial y la estacionaria. Para ello se preparó un cultivo en fase estacionaria de 400 ml, se centrifugó y se volvió a inocular el "pellet" completo en otros 400 ml de medio de cultivo nuevo para intentar obtener el máximo número de células en la fase estacionaria, fase en que es mayor la concentración de glucanasa en el cultivo. Si como todo parecía indicar, el enzima se perdía durante proceso de purificación, habíamos de partir de la mayor cantidad de enzima posible. Sólo así se llegaría al último paso de purificación con una cantidad suficiente de enzima que nos permita realizar todas las pruebas que queremos hacer con el enzima. También parece tener importancia en el proceso la presencia de oxígeno. En el caso del plegamiento de la ribonucleasa la formación de los puentes disulfuro puede darse espontáneamente en presencia de oxígeno (Anfisen, 1973) . La enorme cantidad de inóculo hace que la concentración de oxígeno en el medio de cultivo sea menor, y minimiza la formación de enlaces intercadenas.

Una de las precauciones que se ha de tener a la hora de producir la glucanasa es no dejar esperar a que se agote totalmente la fase estacionaria y a que en ese momento se expresan otras proteínas que se copurifican con la glucanasa en columnas de intercambio catiónico. En el caso de la producción de S34C+K242C en la que el cultivo estaba en fase estacionaria tardía, para poder obtener más proteína observamos las bandas señaladas como **a** y **b** en el gel de la figura III.14.A., que obligaron a hacer otra tanda de purificación desechando las fracciones menos puras.

Una vez obtenida la cantidad necesaria de proteína razonablemente pura del mutante S34C+K242C, se comprobó por movilidad electroforética, en el gel de la figura III.14.B., que el puente disulfuro realmente se hubiera formado entre los extremos N y C-terminal. Usando como control el mutante N57A con un solo puente disulfuro, se comprobó que la movilidad electroforética del mutante S34C+K242C, en condiciones no reductoras, era mayor que la del N57A, lo cual se correspondía con un enzima cuyas las colas estaban unidas. Estas diferencias de movilidad desaparecen cuando se emplea tampón reductor. Estos resultados confirman que el puente se ha formado.

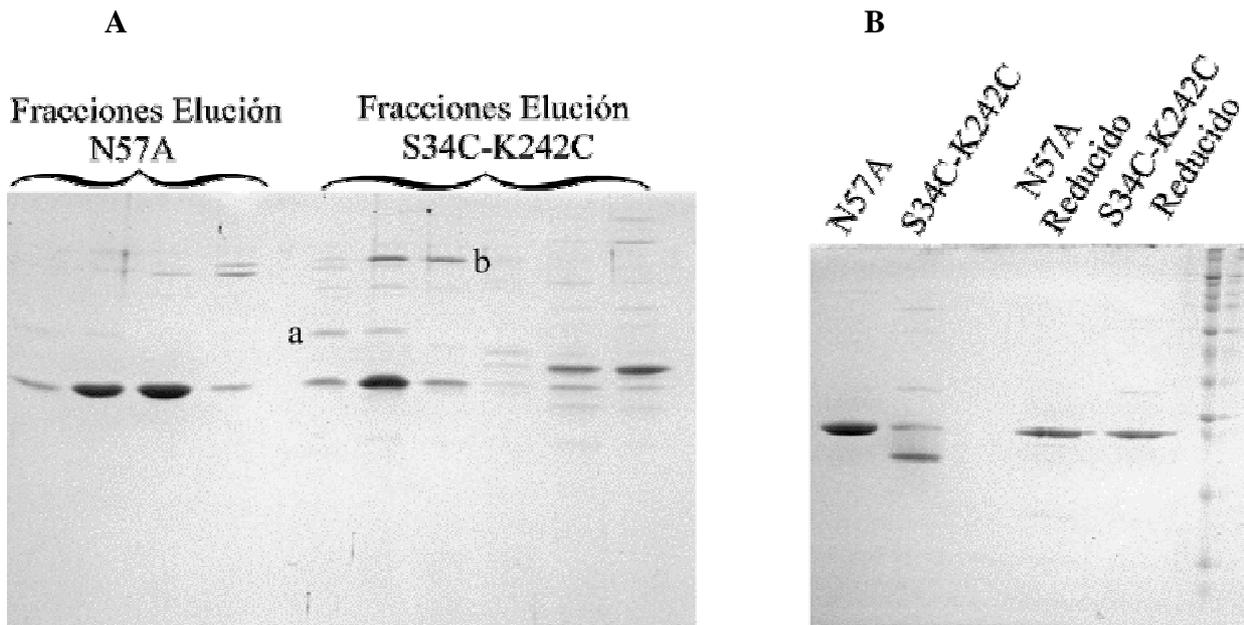


Figura III.14.: Geles de SDS mostrados: **A)** fracciones tal como salen de la columna después de la segunda cromatografía. **B)** una vez recolectadas las fracciones puras de los dos mutantes, los mutanes N57A y S34C+K242C en condiciones no reductoras y reductoras.

En la figura Figura III.14.B. se observa que aunque la mayor parte de la proteína S34C+K242C estaba formando el puente disulfuro, aparecía una banda destacable correspondiente al puente reducido. Dado que el proceso de preparado de muestra con desnaturalización térmica con SDS había durado más de lo habitual, se quiso comprobar si la temperatura podía haber roto alguno de los puentes o se trataba de una población heterogénea de proteínas. Para tal comprobación, se cargó en el gel la proteína del mutante S34C+K242C sometida a diferentes tiempo de calefacción a 100 ° C, de 0 a 10 minutos.

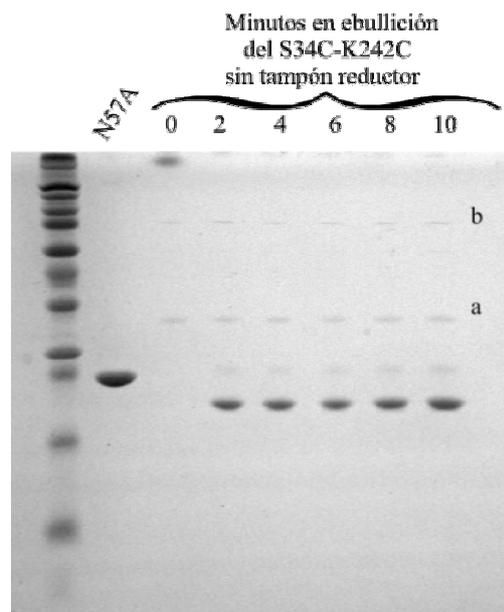


Figura III.15.: Gel de SDS-PAGE con el mutante S34C+K242C sometido a diferentes tiempos de ebullición.

Lo más curioso de la Figura III.15. es que las proteínas contaminantes **a** y **b** entran perfectamente en el gel sin necesidad de calentar la muestra, en el minuto 0, mientras que la glucanasa se resiste a entrar en el gel. Esto muy probablemente se debe a que la glucanasa no se ha desplegado totalmente en presencia de SDS y necesita un mayor aporte térmico para desnaturalizarse, formar el complejos con SDS y entrar en el gel. Esto nos indicaba que el núcleo que forman las hojas betas de la glucanasa es muy consistente y que los puentes de hidrógeno entre ellas consiguen formar una estructura muy compacta.

Los mutantes a los que se añaden puentes disulfuros suplementarios son difíciles de producir, si bien, con pequeñas variaciones en el protocolo, como el que hemos descrito en el mutante S34C+K242C, pueden rendir una cantidad suficientes de enzima. En este se ha comprobado que el estado de oxidación-reducción de las cisteínas añadidas al enzima se puede conocer mediante una simple electroforesis SDS-PAGE. Es decir, se comparan los resultados obtenidos para mutaciones con puentes disulfuro añadidos con respecto a los obtenidos para una proteína control sometida a condiciones no reductoras.

El núcleo de la proteína es compacto y no basta con usar SDS para desnaturalizarlo. Aun en presencia de SDS existe al menos un gran bloque de la proteína que no se despliega. Esto nos indica que los puentes de hidrógeno entre cadenas adyacentes antiparalelas, que encontramos en la glucanasa, son muy estables. Este hecho tiene implicaciones en el modelo de plegamiento de la proteína.

III.C.- ANÁLISIS DE LA TERMORRESISTENCIA: EFECTO DE LA POSICIÓN 58 Y DEL CENTRO DE UNIÓN AL CALCIO.

Obtener enzimas más estables frente a diversos aspectos tales como temperatura, oxidación, desnaturalización y degradación, de gran interés desde el punto de vista de una aplicación industrial en biocatálisis. Nuestro grupo viene desarrollando estudios teóricos sobre la termoestabilidad de proteínas (Querol *et al.* 1998), y este trabajo es una continuación en esta línea de investigación.

Paralelamente al análisis de la relación del lazo mayor de la glucanasa con la actividad del enzima, se iniciaron los estudios de cómo podía mejorarse la termorresistencia del enzima (Pons 1996). No existen todavía criterios o reglas demasiado precisas para predecir mutaciones que llevan a termoestabilizar una proteína. Un procedimiento que ha dado lugar a bastantes

éxitos es la estabilización de hélices á, pero esto no es aplicable a una proteína compuesta fundamentalmente por hojas beta como la α -glucanasa.

Se disponía de la estructura tridimensional del cristal, se asumió como regla tratar de estabilizar las regiones que inician la desnaturalización.

III.C.1.- Estabilización de las colas N y C-terminales

Como se observa en la Figura III.17 el extremo N-terminal presenta una cola que queda bastante libre y a la que sigue una hoja beta corta. Se pensó que, tal vez, podría ser el lugar por donde se iniciaba la desnaturalización de la proteína. Además comparando la estructura de la glucanasa de *B. licheniformis* con de *B. macerans* el extremo N-terminal era la región que peor se superpone.

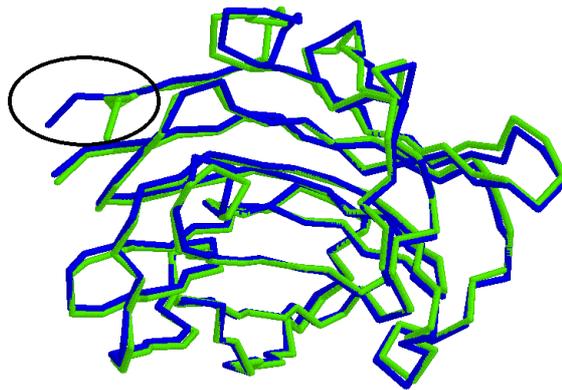


Figura III.17.: Superposición por los carbonos alfa de la glucanasa de *Bacillus macerans* con la de *Bacillus licheniformis*. La cola es la región se ha resaltado con un círculo negro.

Para estabilizar la cola se decidió unirla por medio de un puente disulfuro entre los residuos serina 34 y lisina 42, ya que estos aminoácidos quedaban a una distancia de 5.2 Å, apropiada para la formación de puentes disulfuro. Se introdujeron las mutaciones en el gel usando el protocolo II.D.7., usando los siguientes oligonucleótidos:

S34C: 5' CACAAACGGGCGGGTGTGTTTTATGAACCGT 3'
K242C: 5' TGTGAATTTCGTTATCTACATGTGTAACGCACCC 3'

El proceso de producción de este mutante se describe detalladamente en el apartado III.B.2.