

### III.C.2.- Contribución de los aminoácidos de la posición 58 en la termorresistencia de la proteína

La mayoría de los estudios de mejora de la termorresistencia en glucanasa se habían basado sobre todo en mutantes fruto de enzimas híbridos obtenidos por permutaciones entre diferentes regiones de las  $\alpha$ -glucanasas de *B. amyloliquefaciens* y *B. macerans* (Hahn M. *et al.* 1994) y mutaciones puntuales sobre todo en el lazo entre la beta 1 y 2 sobre estos mismos híbridos (Welfle *et al.*, 1995). La región del lazo con la que el grupo trabaja no se había estudiado. Se planteó como objetivo determinar la contribución de este lazo, y más concretamente de la posición 58 en los mecanismos de termoinactivación. El estudio se realizó midiendo la termorresistencia de los diferentes mutantes de la posición 58 siguiendo el protocolo que se describe en el apartado II.L.1 a 65 ° C con tampón 6.5 mM ácido cítrico, 87 mM fosfato, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.27, 3 mM de sustrato G<sub>4</sub>G<sub>3</sub>G-MU y 1.2 μM enzima. Este procedimiento permite monitorizar el proceso de termoinactivación del enzima en tiempo real, usando el espectrofotómetro para medir la aparición del producto de degradación del sustrato debida a la actividad del enzima activo en cada momento.

El ajuste de la curva que nos permitieran calcular y comparar los diferentes mutantes se hace suponiendo que se trata de un cinética de inactivación de primer orden (Laidler, 1979), siendo:

x = valor de la absorbancia, o lo que es lo mismo producto generado,

a = constante de Actividad del Enzima, dado que la concentración será igual para todos los enzimas y lo que nosotros realmente estamos siguiendo es actividad, indirectamente nos está dando una idea de actividad del enzima a 65 °C,

K = constante de desnaturalización,

t = tiempo.

$$\frac{dx}{dt} = K(a-x)$$

integramos

$$-\ln(a-x) = Kt + C$$

podemos conocer el valor de C si ajustamos a t=0 y x=0

$$C = -\ln(a)$$

reemplazamos su valor en la expresión anterior

$$-\ln(a-x) = Kt - \ln(a)$$

y despejamos la x,

$$x = a*(1-e^{-Kt}) + C$$

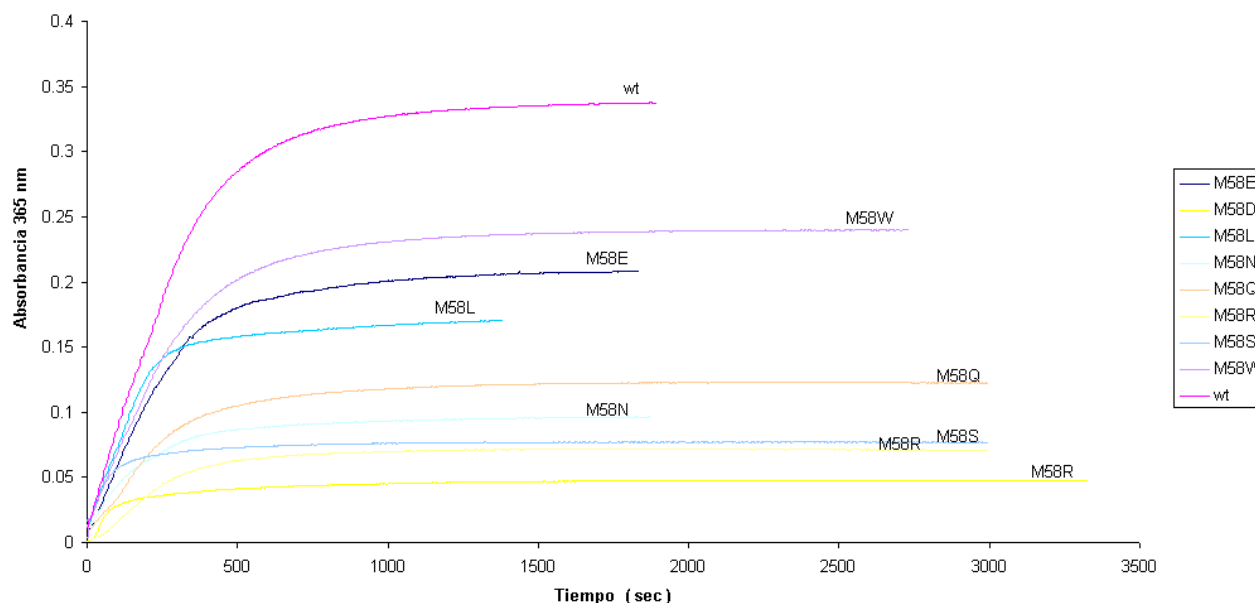
con esta fórmula ajustamos los datos obtenidos de las cinéticas para los diferentes mutates.

También establecemos para las comparaciones entre los diferentes mutantes se calculó el tiempo que tarda en llegar el enzima a la mitad de la actividad inicial, en tanto por ciento respecto al enzima silvestre.

En la tabla III.4 se muestran los resultados, y a modo de resulmen se muestra la figura III.18, en esta gráfica aparecen todos los mutantes que ven disminuida tanto su actividad como su termorresistencia a 65°C respecto al silvestre.

**Tabla III.4.:** Valores de tanto por ciento del tiempo en llegar a la mitad de la actividad inicial y el tanto por ciento de la pendiente de actividad durante el primer minuto de la cinética, estos dos últimos parámetros calculados respecto al enzima silvestre. También se incluye constante de Actividad del Enzima (a) y la constante de desnaturalización (K). El procedimiento seguido se describe en el apartado II.L.1.

Mutante	% Pend. 1 <sup>er</sup> min vs wt	% t <sub>1/2</sub> vs wt	a	K
wt	100	100	0.3501	0.003552
M58P	71	<b>177</b>	0.4472	<b>0.001634</b>
M58K	12	137	0.0817	0.000338
M58H	57	107	0.2305	0.002789
M58F	<b>195</b>	106	<b>0.7650</b>	0.003110
M58E	69	91	0.2122	0.003979
M58Q	33	85	0.1692	0.003749
M58R	21	82	0.0794	0.004210
M58W	74	78	0.2387	0.003572
M58I	141	67	0.3646	0.004492
M58L	79	53	0.1679	0.006650
M58V	159	40	0.2874	0.006386
M58N	43	33	0.0845	0.004816
M58G	117	25	0.1763	0.003451
M58S	54	15	0.059	0.00891
M58D	40	14	0.0387	0.004909



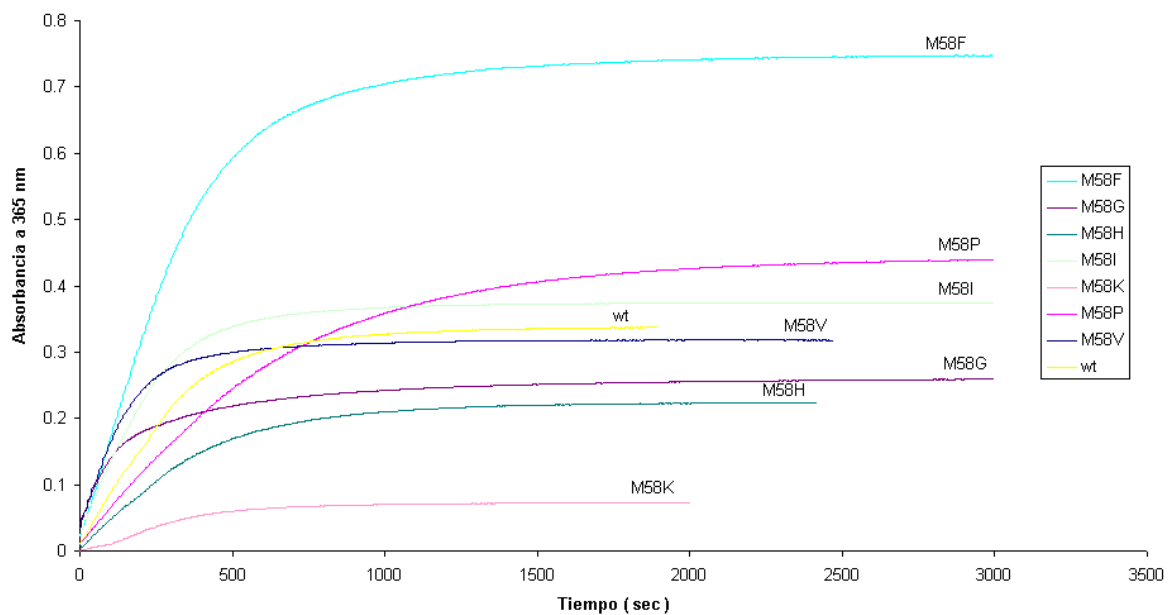
**Figura III.18.:** Mutantes de la posición 58 con menor actividad y termorresistencia, respecto al enzima silvestre. El ensayo se ha realizado a 65 ° C con tampón 6.5 mM ácido cítrico, 87 mM fosfato, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> y pH 7.27 en presencia de 3 mM de sustrato (G<sub>4</sub>G<sub>3</sub>G-MeUmb).

En casi todos estos mutantes en los que se ha sustituido la metionina propia del enzima silvestre por un aminoácido más hidrófilo disminuye la termorresistencia, a excepción del M58W, que aunque presenta ciertas regiones hidrófilas en su estructura podemos considerarlo hidrófobo. La sustitución por este aminoácido tan voluminoso, muy probablemente, ha supuesto cambios conformacionales en la proteína mucho más importantes que los producidos en el resto de mutantes en los que los cambios han quedado parcialmente mitigados por el carácter hidrófilo del aminoácido respectivo. Esto ha hecho que en este último caso la pérdida de actividad y termorresistencia no hayan sido demasiado grandes.

En la figura III.19 incluimos los mutantes que mejoran ya sea en actividad o en termorresistencia, en estas condiciones experimentales.

Este ensayo permitió seleccionar los enzimas cuyas características eran más interesantes. Cabe indicar que los mutantes M58P y M58G pueden estar ligeramente infraestimados por el problema de precipitación que se observó al resustender la proteína.

Los parámetros que se muestran en la tabla III.4, sirvieron para seleccionar el mutante que presenta el más alto valor de actividad a 65 °C, es decir el M58F, y el que presentaba una menor constante de desnaturalización (K), es decir el M58P, con respecto al silvestre.



**Figura III.19.:** Mutantes de la posición 58 con mejor actividad y/o termorresistencia, respecto al enzima silvestre. El ensayo se ha realizado a 65 ° C con tampón 6.5 mM ácido cítrico, 87 mM fosfato, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> y pH 7.27 en presencia de 3 mM de sustrato (G<sub>4</sub>G<sub>3</sub>G-MeUmb).

Hay que tener en cuenta que las condiciones del ensayo son un poco especiales. El valor de pH al que se trabaja es aquel en el que el enzima silvestre es más activo, no el valor en el que el enzima es más estable, y a menudo estos dos factores no coinciden. Este valor de pH permite tener unos valores de actividad más altos, dado que en estas condiciones, el enzima trabaja a gran velocidad. A su vez, al estar “forzando” tanto al enzima, todo el proceso de inactivación del enzima es visible en un corto periodo de tiempo. De hecho cuando repetimos el ensayo pero utilizando un tampón Acetato Sódico 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 6 y 65 °C, las cinéticas evolucionaban sin que se apreciase ninguna pérdida de actividad. Esto contrasta con los resultados del ensayo en tampón citrato fosfato a pH 7.27 en las que a los 50 minutos todos los enzimas eran prácticamente inactivos. Esto nos está indicando que el pH juega un papel importantísimo en todo este proceso. Ante este hecho, nos planteamos a qué podría ser debido ese efecto. Dado que este cambio tan radical se produce en la franja de pH que va desde 6 a 7.27, una posibilidad es la de que una pérdida en una interacción electrostática por una histidina desprotonada fuese la responsable, ya que el valor de pK es algo mayor que 6 a 25 °C. Solamente se encuentran 4 histidinas en la secuencia de la glucanasa y éstas ocupan las posiciones 234, 174, 159 y 195. Tan sólo dos de ellas están cerca de aminoácidos con una carga negativa, la histidina 174 -que interacciona con el aspártico 190-, y la histidina 234 -que interacciona con el glutámico 75-, y pueden estar implicadas en una interacción electrostática. La histidina 174 se encuentra en

una región muy alejada del centro activo y en una zona muy bien estructurada, y la histidina 234 está a 5 Å del glutámico 75, demasiada distancia para que tenga un efecto tan determinante sobre la termorresistencia. La desprotonación de esta histidina podría justificar, al menos en parte, la pérdida de termorresistencia experimentada por el enzima al basicificar el tampón en el que trabajamos. Esta pérdida podría rondar las 13 kcal/mol, 3 kJ/mol (Van der Spoel, 2001).

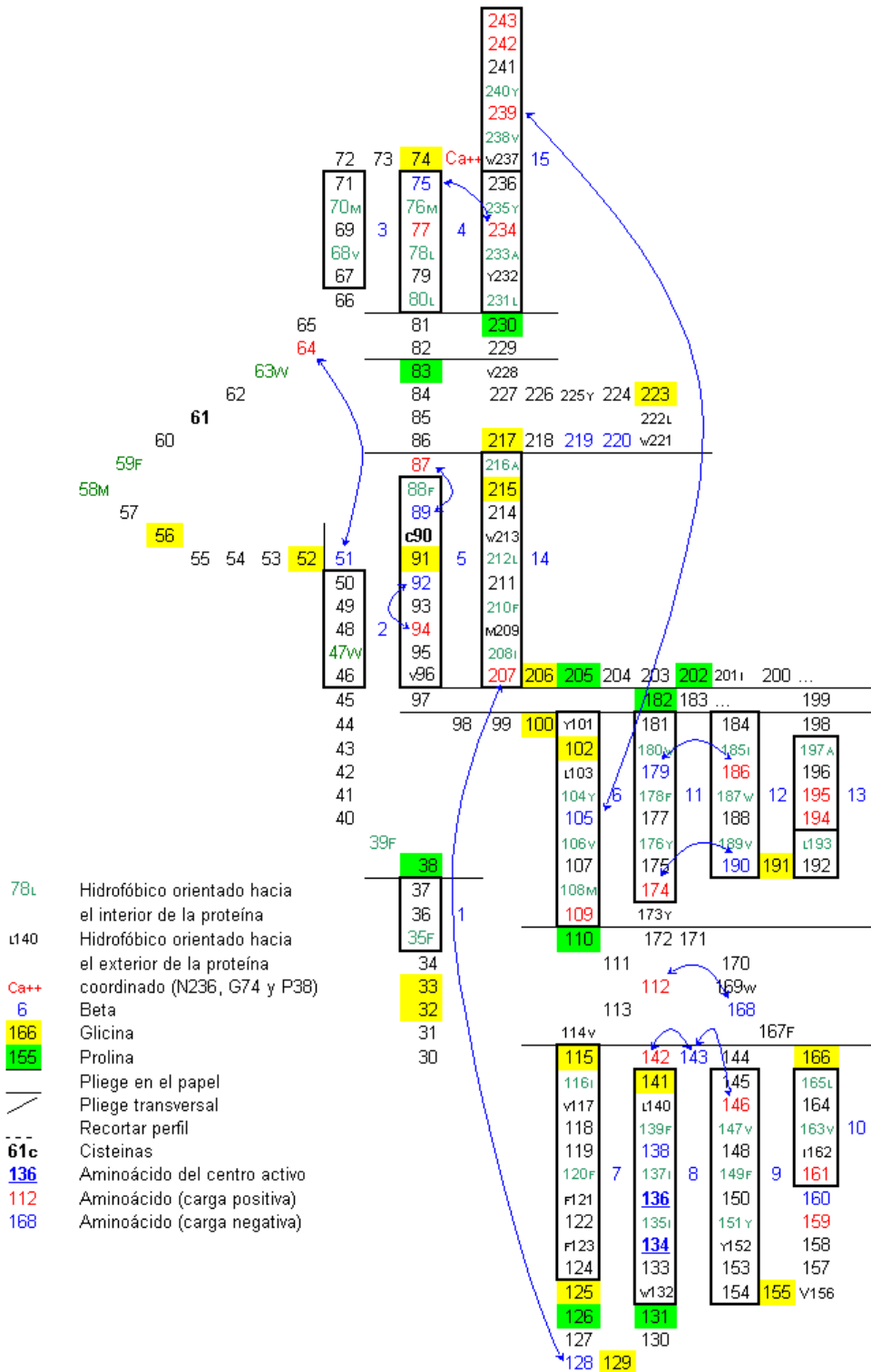


Figura III.20.: Esquema de la estructura de la α-glucanasa.

La contribución de las cargas en la estabilización de las betas 3 y 4 sobre la 15 de la glucanasa de *B. licheniformis*, es relativamente pequeña, en relación con la de otras glucanasas como la del *B. macerans* en el que las cargas realmente contribuyen a cohesionar esta región de la proteína, y de manera indirecta la región que coordina el calcio.

Si bien el pH del medio es muy importante, y determina las interacciones que se forman y se deshacen en cada momento, hay que considerar además que los pKa de los aminoácidos está influido por su entorno, así como de la temperatura. También hay que considerar que el pH no es el único efecto que se deriva de usar un tampón de Acetato sódico 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM con pH 6 a 65 ° C u otro tampón de ácido cítrico 6.5 mM, 87 mM fosfato, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> con pH 7.2 a 65 °C . El citrato quela el calcio con mayor afinidad que el acético y puede acentuar todavía más estos efectos.

Todo esto explicaría porque no se aprecia pérdida de actividad cuando se incubaba el enzima silvestre a AcNa 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM con pH 6 a 65 ° C a diferencia de lo que sucedía con el tampón citrato/fosfato.

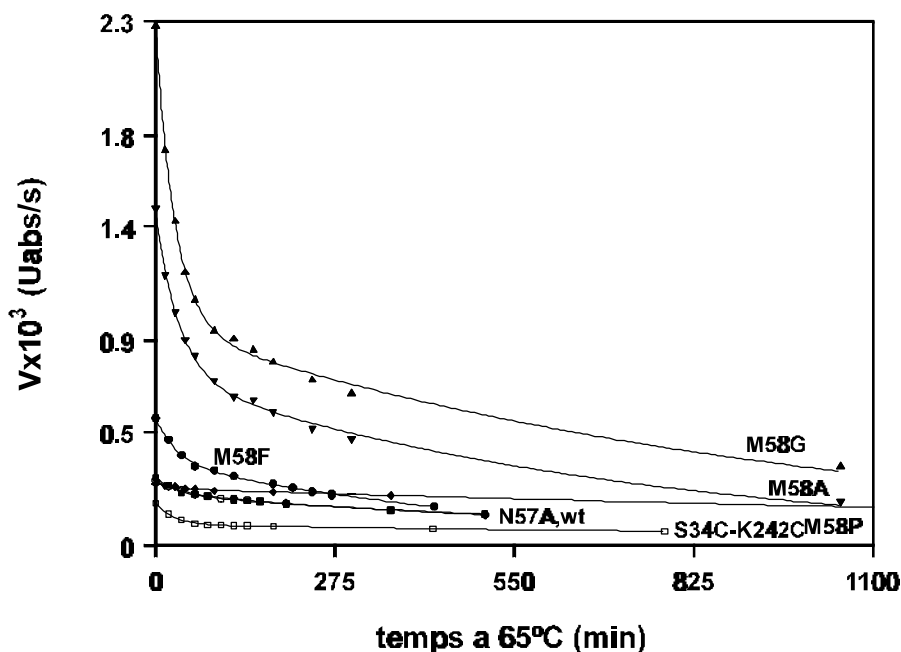
En definitiva y resumiendo, estos pequeños cambios de pH o de concentración de Ca<sup>++</sup> en el tampón pueden repercutir fuertemente en la actividad del enzima y sobre todo en su termorresistencia.

Otra consideración a realizar, en este experimento, es que en realidad no se está midiendo la termorresistencia del enzima por sí sola, ya que al incubarse junto al sustrato se encuentra el enzima tanto solo como unido al sustrato. El sustrato, al llenar el surco del centro activo, hace que en la mayoría de los casos el complejo sea más termoestable, por las interacciones que se establecen en el complejo. Esto significaría que un enzima que compleje bien el sustrato pero tenga una baja tasa actividad, o que tenga dificultades para disociar del producto puede aparecer como termorresistente bajo estas condiciones y sin embargo no serlo cuando el enzima se encuentre por sí sólo. Para expresarlo en otras palabras, los enzimas mutantes con K<sub>m</sub>s bajas, como son M58F, M58W o el enzima silvestre (wt) estarían mostrando, en presencia de sustrato una termorresistencia mayor a la que mostrarían en ausencia de sustrato.

### III.C.3.- Determinación de la termorresistencia en ausencia de sustrato

Se tomaron todos los mutantes preseleccionados, el doble mutante S34C+K242C, el mutante N57A (Pons, 1996) y que mostró una cierta termorresistencia; así como, los mutantes M58P y M58F seleccionados del experimento anterior, más los mutantes hiperactivos M58G y M58A para caracterizar su comportamiento a altas temperaturas y el enzima silvestre que nos serviría de referencia.

La termorresistencia de los diferentes mutantes se determinó usando el protocolo II.L.2., que usa la actividad para determinar la presencia de enzima “nativo”.



**Figura III.21.:** En esta gráfica se muestra la termoinactivación a lo largo del tiempo de cada uno de estos enzimas. En la gráfica se representan velocidades iniciales respecto al tiempo de incubación a 65 °C en ausencia de sustrato.

Los resultados de la determinación de termorresistencia se muestran en la figura III.21. Cabe destacar que, como ya había pasado anteriormente en experimentos de este tipo, en concreto, los realizados (Pons, 1996) sobre otro conjunto de mutantes, la curva no se ajustaba al modelo de desnaturalización de dos estados.

En un principio se utilizó la  $t_{50}$  como parámetro de termorresistencia. La  $t_{50}$  es el tiempo que se tarda, durante la desactivación térmica, en alcanzar la mitad de la actividad inicial. Este parámetro ya se había usado en trabajos anteriores en el grupo (Pons, 1996). Pero al observar que la forma en la que se desviaban todas las curvas con respecto al modelo de desnaturalización en dos estados era similar para todos los mutantes, se decidió probar distintos modelos.

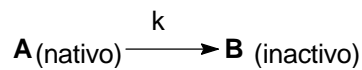
De los diferentes modelos de desnaturalización que se probaron, sólo uno permitió un buen ajuste. Además únicamente ese modelo se ajustaba a todos los mutantes. Se trataba de un modelo de desnaturalización en dos fases con un intermediario semiactivo, necesario para el siguiente paso de la desnaturalización. El esquema que correspondería a esta desnaturalización en dos etapas irreversibles en la que se genera un intermediario de desnaturalización semiactivo sería:



Los parámetros se definen :

- $C_i$ : concentración inicial del enzima por actividad
- $k_s$ : constante de semi-inactivación del enzima nativo
- $k_d$ : constante de inactivación del intermediario
- $a_r$ : tanto por uno de actividad residual
- $v_o$ : velocidad inicial

En el caso que se tratase de una termoinactivación en un solo paso,



la pérdida de actividad debida a la desnaturalización vendría representada por la expresión,

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_s \cdot [A]$$

integramos

$$\ln([A]) = -k_s \cdot t$$

y despejamos la  $[A]$ .

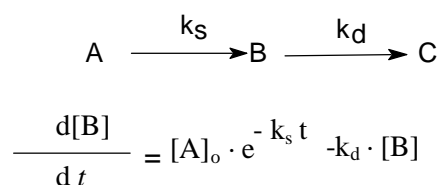
$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-k_s t}$$

La desaparición del enzima nativo se vería reflejado por una progresiva pérdida de la velocidad de reacción. Estas velocidades iniciales se calculan usando el protocolo especificado en el apartado II.L.2, dichas velocidades iniciales son proporcionales a la concentración de enzima nativo por su actividad,

$$v_{o[\text{nativo}]} = C_i \cdot \exp(-k_s \cdot t)$$



Ahora bien, en este caso se trata de dos procesos acoplados,



La aparición y desaparición del intermediario también se vería reflejado con una contribución a velocidad de reacción. En este caso se ha de tener en cuenta que la actividad del intermediario es inferior a la del enzima nativo, por lo que hemos de tener en cuenta su actividad residual  $a_r$ . Por lo tanto la  $v_o$  del intermediario se expresaría como,

$$v_{o[\text{intermediario}]} = C_i \cdot a_r \cdot (k_s/(k_d-k_s)) \cdot (\exp(-k_s \cdot t) - \exp(-k_d \cdot t))$$

La suma de las dos velocidades iniciales nos daría la  $v_o$  observada:

$$v_o = C_i \cdot \exp(-k_s \cdot t) + C_i \cdot a_r \cdot (k_s/(k_d-k_s)) \cdot (\exp(-k_s \cdot t) - \exp(-k_d \cdot t))$$

**Tabla III.5.:** Parámetros calculados según el modelo propuesto.

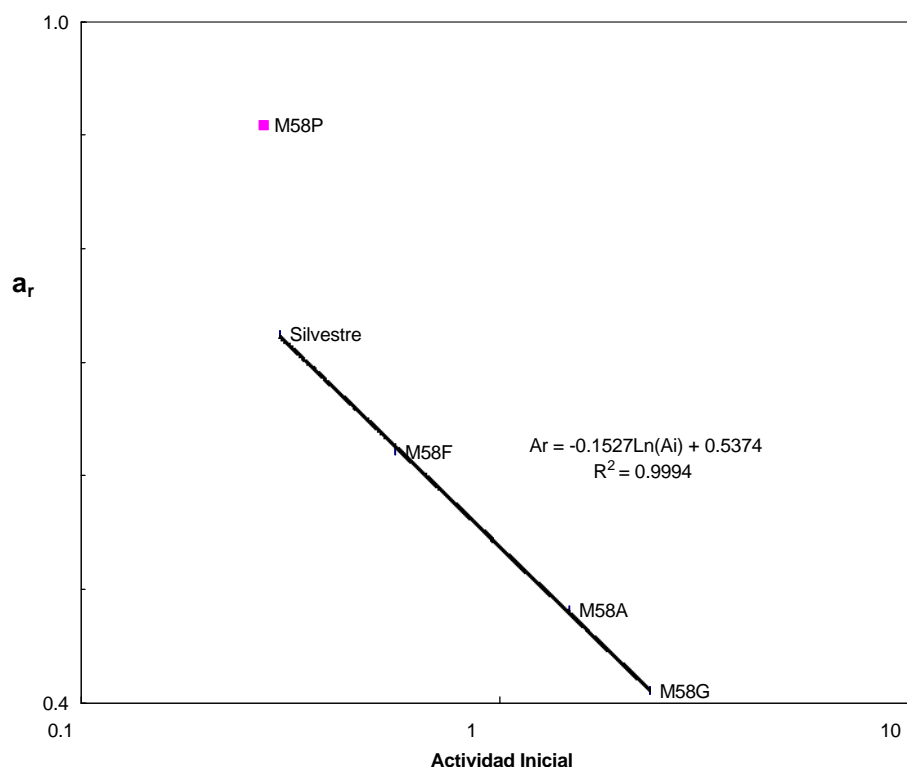
Mutante	$C_i \cdot 10^3$	$k_s$ ( $s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$a_r$
Wt	0.2976	0.02989	$9.651 \cdot 10^{-4}$	0.7247
M58A	1.468	0.02798	$1.370 \cdot 10^{-3}$	0.4818
M58G	2.275	0.03354	$1.034 \cdot 10^{-3}$	0.4107
M58P	0.2728	0.03377	$3.650 \cdot 10^{-4}$	0.9087
M58F	0.5612	0.03169	$1.820 \cdot 10^{-3}$	0.6214
N57A	0.2857	0.02399	$1.028 \cdot 10^{-3}$	0.7581
S34C+K242C	0.1855	0.03507	$4.961 \cdot 10^{-4}$	0.4839

Estos datos permiten tener una idea sobre cómo avanza el proceso de desnaturalización de la proteína.

La constante de de semi-inactivación del enzima nativo ( $k_s$ ) es, como mínimo, de un orden de magnitud mayor que la constante de inactivación del intermediario ( $k_d$ ). Esta diferencia en ordenes de magnitud entre  $k_s$  y  $k_d$  implicaría que el intermediario es unas diez veces más estable que la proteína nativa. En las condiciones del ensayo, se ha producido un cambio configuracional de difícil reversión ya que el equilibrio de dicha reacción está desplazado hacia la inactivación del enzima.

La formación del primer intermediario es imprescindible para que tenga lugar el siguiente paso de desnaturalización. En ambos casos, se trata de un proceso irreversible.

La desnaturalización térmica de los diferentes mutantes de la posición 58 de la **b**-glucanasa así como del enzima silvestre y del mutante S34C+K242C presentan una primera fase muy similar en todos los casos. En esta fase el valor de  $k_s$  se aproxima a  $0.03 \text{ s}^{-1}$ . Estos resultados hacen pensar que, en esta primera fase, no están implicados ni el lazo mayor del surco del centro activo ni los extremos C y N terminales, ya que las diferentes mutaciones se localizan en dichos elementos estructurales.



**Figura III.22.:** Actividad residual del intermediario respecto a su actividad inicial.

Cuando se comparan los diferentes mutantes, figura III.22 se observa una relación lineal, inversamente proporcional, entre la actividad inicial del mutante y la actividad del intermediario ( $a_r$ ) excepto para el mutante M58P. El mutante M58P rigidiza el lazo y fuerza el giro del mismo precisamente por la posición 58, el lugar por el que el lazo gira. En este caso la conservación de la estructura, no depende, de la interacción con su hidrofóbico del grupo lateral en medio de una zona hidrofóbica como sería el caso de la metionina. La conservación de este ángulo de giro estaría garantizada por la mera presencia del aminoácido en dicha posición.

En la segunda fase se aprecian las diferencias más claras, sobre todo en el caso del mutante M58P. Este mutante muestra una termorresistencia excepcional, y además presenta la peculiaridad de que su actividad residual es muy alta, alrededor de un 90 % de la proteína nativa.

Existe una relación inversamente proporcional entre la actividad residual del intermediario y la constante de inactivación del segundo intermediario. Esta proporciona una idea de cuan cercano está este segundo intermediario de la estructura nativa. En principio, cuanto más próximos esten los valores de la actividad residual, más próximo estará el intermediario y la forma nativa. El valor de  $a_r$ , la actividad residual, del mutantes M58P está mucho más cercano a 1 -actividad que correspondería si la actividad del intermediario fuera igual al nativo- que en el valor de  $a$  del mutante M58G.

En el caso del mutante M58G -sin grupo lateral- la modificación de este ángulo en el extremo del lazo está tremendamente facilitado.

En definitiva, y expresando de otra manera, podemos afirmar que cuanto mayor es la actividad inicial más comprometida queda la actividad del intermediario de desactivación.

Intentemos visualizar esto mediante una imagen. El lazo principal está sujeto a la estructura a través de las betas 2 y 3. La cara interna del lazo, desde la posición 58 a la 66, parece ser la encargada de anclar el lazo al resto de la proteína. El lazo interacciona con la estructura ya sea por interacción electrostática -como la arginina de la posición 64 con el glutámico de la posición 89 ubicado en la beta 5-, o por las interacciones hidrofóbicas -en las posiciones 58, 59 y 63 con diferentes aminoácidos de las cadenas betas 14, 7 y lazos adyacentes-. También es determinante el puente disulfuro entre la posición 61 y la 90, que une la beta 3 a la 5.

El lado de la luz del surco -a diferencia de la cara interna del lazo- estaría más implicado en la interacción con el sustrato propiamente dicha y podría modular la actividad del enzima con su movimiento y el de otras zonas de la proteína. Desde esta perspectiva, el aumento de la actividad, que se produce al ir disminuyendo la longitud de la cadena lateral de los aminoácidos hidrofóbicos alifáticos, estaría relacionado con el aumento de movilidad. A su vez este aumento en movilidad se produciría por la reducción de las interacciones de la cadena lateral del aminoácido de la posición 58 en su entorno hidrófobo, dejando más suelta la cara interna del lazo. Pero la tensión producida por este aumento de la movilidad del lazo para algunos mutantes repercutirá de forma directa sobre las zonas de la proteína en las que se asienta el lazo. Concretamente y para simplificar, las cadenas betas más afectadas por el aumento de la movilidad del lazo serían las 3, 2, 14, indirectamente la 4, y ,sobre todo, la 5 debido al puente disulfuro.

La termoestabilización por sustitución de prolinas en los lazos también se da en otras proteínas. A modo de ejemplo, en la oligo-1,6-glucosidasa de *B. thermoglucosidasius*, que presenta un 72 % de homología con la oligo-1,6-glucosidasa de *B. cereus*, se han sustituido 14 de

sus 558 residuos por prolinas. Esto ha dado lugar a un enzima extremadamente termoestable (Watanabe *et al*, 1991).

Para entender mejor los resultados es interesante separar en la representación gráfica la proteína en conformación nativa del intermediario de termoinactivación. Para ello tomamos como A la concentración de enzima nativo y como B la del intermediario de termoinactivación, definimos sus respectivos valores con las fórmulas siguientes:

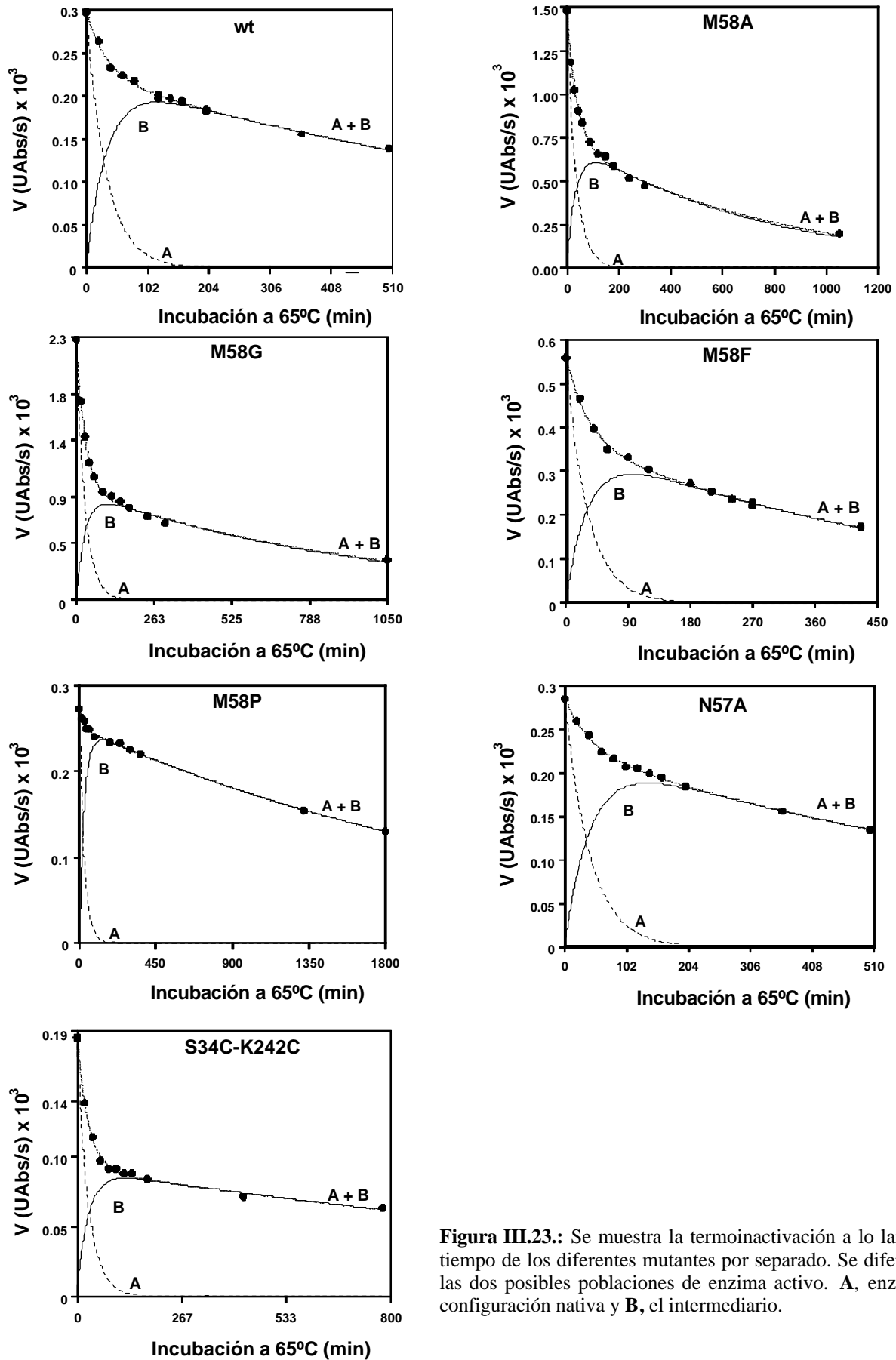
$$v_{o[A]} = C_i \cdot \exp(-k_s \cdot t)$$

$$v_{o[B]} = C_i \cdot a_r \cdot (k_s / (k_d - k_s)) \cdot (\exp(-k_s \cdot t) - \exp(-k_d \cdot t))$$

Estas ecuaciones nos permitirá expresar gráficamente la proporción de proteína nativa, de intermediario y de proteína inactiva durante el proceso de desnaturalización. De esta manera, podemos ver que en todos los mutantes de la posición 58 estudiados, alrededor de los 180 minutos ya ha desaparecido casi toda la proteína nativa y que es el segundo intermediario el que marca las verdaderas diferencias de termoresistencia.

De todos estos mutantes, el que presenta un menor valor de  $k_s$  es el N57A. Además el N57A presenta un valor de  $a_r$  (actividad residual) más alto que la proteína silvestre. Ahora bien, su  $k_d$  es ligeramente inferior que la del silvestre. Los valores de estos parámetros hacen que el mutante N57A parezca ser algo más termorresistente al principio de la termoinactivación. Sin embargo, si observamos cada una de las gráficas en su conjunto considerando tiempos superiores a 300 minutos, estas diferencias van desapareciendo. Se ha descrito que el residuo asparagina sufre desaminación por el incremento de la temperatura y esta característica ha sido utilizada para diseñar mutantes termorresistentes. En este caso no tendría importancia puesto que no tiene un papel relevante ni en la estructura del lazo ni en la interacción con el sustrato.

El doble mutante, S34C+K242C se diseñó con la intención de mejorar la termorresistencia del enzima, puesto que a primera vista las colas eran unas buenas candidatas a ser el lugar por donde se inicia la desnaturalización de la estructura, especialmente por la cola N-terminal, figura III.23. Este intento de aumentar la termorresistencia no dio los resultados esperados. Sin embargo, sí que aporta una idea interesante y es que aunque acelera el tránsito entre la conformación nativa hacia el intermediario, está estabilizando el intermediario.



**Figura III.23.:** Se muestra la termoinactivación a lo largo del tiempo de los diferentes mutantes por separado. Se diferencian las dos posibles poblaciones de enzima activo. **A**, enzima en configuración nativa y **B**, el intermediario.

Utilizar un puente disulfuro para estabilizar una proteína tiene el inconveniente de que sólo se puede inferir que se ha encontrado la zona por la que la proteína comienza a desestructurarse si conseguimos que mejore su termorresistencia. Cualquier otro resultado es difícil de interpretar. En el caso del puente introducido mediante el doble mutante S34C+K242C, y observando la figura III.23, aparentemente no se aprecia una mejora clara en la termorresistencia del enzima. Ahora bien, si se analizan los parámetros más detenidamente se observa que con esta modificación se ha acelerado el proceso de formación del primer intermediario de desnaturalización. Esta aceleración se puede atribuir a una desestabilización de la zona, ya sea simplemente por haber cambiado dos aminoácidos hidrófilos por dos hidrófobos (los puentes S-S tienen esa característica) -favoreciendo la formación de zonas de contacto entre proteínas-, o por someter a cierta tensión estructural la zona de la proteína en la que se localiza el enlace. Pero lo que resulta más interesante de este mutante es que aunque facilita la aparición del primer intermediario también lo estabiliza. Los valores que observamos de  $k_d$  son prácticamente la mitad que en el enzima silvestre. Este dato es un indicio que podría apuntar a que es la cadena beta 1, o una región muy próxima de la proteína, podría estar implicada en la desactivación del primer intermediario, y que de alguna forma el enlace que hemos forzado entre la beta 1 y la 15 está retardando este proceso. En este caso, el gel de SDS-PAGE mostraba que en este mutante el puente disulfuro se había formado, figura III.14..

Estos resultados nos llevan a estudiar la región de las betas 1 a 5. Welfle *et al.* (1996) ya habían hecho otras aproximaciones utilizando híbridos del enzima de *B. macerans* a las que se sustituyó su extremo N-terminal por el de *B. amyloliquefaciens*. De esta forma, se generaron diferentes proteínas híbridas. De entre ellas, el híbrido con los primeros 16 aminoácidos de la región N-terminal correspondientes a la glucanasa de *B. amyloliquefaciens* y los demás a la glucanasa de *B. macerans* mejoró su termorresistencia. Sin embargo, en este caso, esta estrategia no tendría mucho sentido, ya que la glucanasa proveniente de *B. licheniformis*, es tremendamente parecida a la de *B. amyloliquefaciens*.

#### III.C.4.- Intento de estabilización del lazo entre la beta 1 y 2 mediante creación de un puente disulfuro

Con el doble mutante S34C+K242C ya habíamos tratado de fijar la cadena beta 1, extremo N-terminal de la proteína, con la cadena beta 15, extremo C-terminal de la proteína. En este nuevo intento se quiso abordar el problema fijando la beta 2 mediante un puente disulfuro a la beta 5. Aunque la orientación de los grupos laterales de los aminoácidos a mutar, no era la

óptima, siempre cabía la posibilidad de que un pequeño cambio configuracional de la cadena lateral hiciera posible el enlace. Se encontraron dos posibles soluciones, la unión por un puente entre la glicina 45 y la valina 96, o la unión de la asparagina 40 y la glicina 74. La opción de la asparagina 40 y la glicina 74 fue descartada finalmente por que el enlace parecía a priori demasiado forzado.

Se diseñaron los oligos, que se muestran en la figura III.24, para ser usados por el método de mutagénesis descrito en el apartado II.D.7..

#### G45C:

```

Translation      : S T F A A S A S A Q T G G S F Y E P F N
Original Sequence : TCCACATTTGCTGCAAGTGCCTCGGCACAAACGGGCGGGTCGTTTTATGAACCGTTCAAC
Ban II grgcy/c   :                               *
Translation      : N Y N T G L W Q K A D G Y S N G N M F N
Original Sequence : AACTATAATACGGGGTTATGGCAAAAAGCAGATGGGTACTCGAATGGAACATGTTTAAC
  
```

\*Añadiendo además una diana de restricción Ban II, para facilitar el cribaje.

Oligo: TGCTTTTTGCCATAAGCACGTATTATTATAGTTGTTGAAGGGCTCATAGTTGTTGAA

#### V96C:

```

Translation      : T S P S Y N K F D C G E N R S V Q T Y G
Original Sequence : ACAAGTCCTTCCTATAATAAGTTTGACTGCGGAGAAAACCGCTCCGTTCAAACGTACGGC
Nde I ca/tatg   :                               *
Translation      : Y G L Y E V N M K P A K N V G I V S S F
Original Sequence : TATGGGCTATATGAAGTCAACATGAAACCAGCCAAAAATGTTGGGATCGTGTCTTCGTTTC
  
```

\* Añadiendo además una diana de restricción Nde I, para facilitar el cribaje.

Oligo: GAAAACCGCTCCTGCCAAACATATGGCTATGGGCTATAT

**Figura III.24.:** Diseño de los oligonucleótidos destinados a generar el doble mutante G45C+V96C.

El cribaje se realizó por análisis de restricción y posteriormente se secuenciaron los mutantes.

Se realizó un estudio de termorresistencia en ausencia de sustrato siguiendo el método descrito en el apartado II.L.2., obteniéndose los parámetros que se muestran en la tabla III.6.

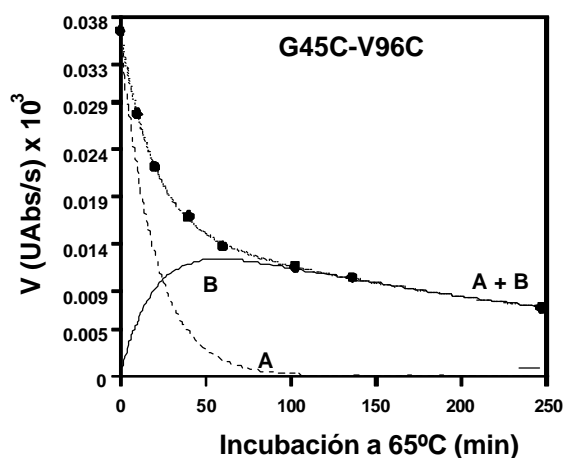
**Tabla III.6.:** Parámetros de calculados según el modelo de termoinactivación en dos fases.

Mutante	$C_i \cdot 10^3$	$k_s (s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$a_r$
G45C-V96C	0.0365	0.05107	$3.127 \cdot 10^{-3}$	0.4055

Se verificó que a los 100 minutos prácticamente el 100 % del enzima en conformación nativa ya había desaparecido. Es decir, habíamos desestabilizado la proteína nativa. También había empeorado la estabilidad del primer intermediario de desnaturalización y su  $k_d$  era tres veces la del enzima silvestre. Estos resultados parecerían indicar que se estaba tocado una región crítica en el proceso de inactivación del enzima, y podría estar indicando que dicha zona es, por

la que comienza el proceso de termoinactivación. Seguían acumulándose evidencias de que la región por la que este proceso comienza se encontraba próxima a las betas 1 y 2. A falta de saber si está formando o no un puente disulfuro, lo que si parecía claro es que este cambio afecta mucho más la termorresistencia del enzima.

En este mutante, tampoco sería de extrañar que el cambio de la glicina 45 por una cisteína, aparte de disminuir la elasticidad de un lazo precisamente por la zona en la que este gira, también exponga regiones hidrófobas en la superficie de la proteína. Dicha exposición potenciaría las posibles interacciones inespecíficas proteína-proteína que podrían comprometer la estabilidad del mismo.



**Figura III.25.:** Termoinactivación a lo largo del tiempo de los diferentes mutantes por separado. Diferenciamos las dos posibles poblaciones de enzima activo. A, sería el enzima en configuración nativa y B el intermediario.

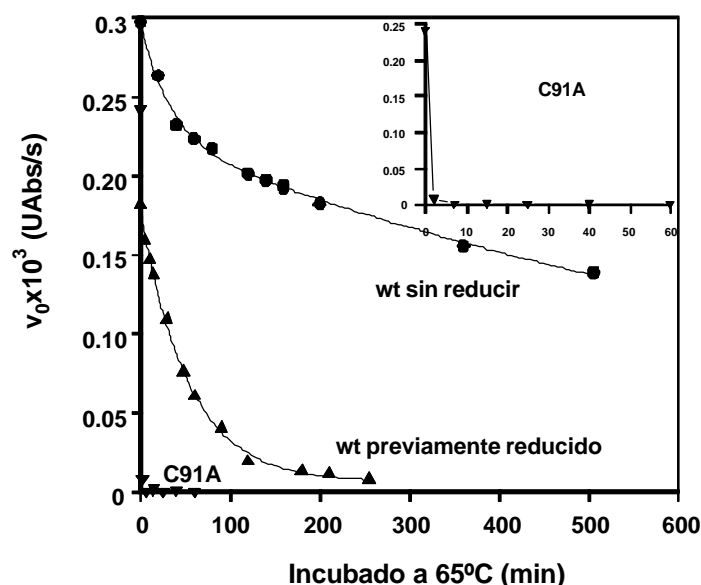
### III.C.5.- Contribución del puente disulfuro en la termorresistencia de la glucanasa

Para analizar el efecto del puente disulfuro del enzima silvestre, sobre la desnaturalización se analizó el mutante C91A, clonado previamente en el equipo (Pons, 1996). Con este mutante ya se habían hecho curvas de desnaturalización con urea. Ahora se estudiaría su termorresistencia. Para producirlo se siguió el mismo protocolo que para producir dobles mutantes de cisteína, III.B.2 . Para este estudio, además del mutante C91A, que no presenta el puente disulfuro por supresión de una cisteína propia de la proteína silvestre, también se utilizó la proteína silvestre nativa y con el puente reducido y sin reducir.

En la figura III.26 se aprecia como la reducción del puente disulfuro del enzima silvestre modifica la forma de la curva de termorresistencia, y como esta termorresistencia se ve fuertemente resentida por la supresión de esta interacción en la proteína. En concreto, la curva pasa de ser de desactivación en dos fases a ser una curva de desactivación en una fase. Esto significaría que el puente disulfuro estaría limitando la propagación de la desnaturalización del



segundo intermediario, haciendo posible la existencia de un intermediario semiactivo. Tampoco sería de extrañar que el camino de desplegamiento fuese diferente para el enzima con y sin puente disulfuro.



**Figura III.26.:** Termoinactivación a lo largo del tiempo del mutante C91A y del silvestre (wt) con su puente disulfuro reducido y no reducido.

En el caso del mutante C91A, además de no tener puente, pueden darse otros efectos propios de la sustitución de una cisteína por un aminoácido menos hidrófobo como alanina. Dicha sustitución puede mermar su termorresistencia. También es posible que, al no haberse formado el puente disulfuro, el plegamiento de la proteína no sea idéntico al de la proteína nativa. En el caso de la proteína silvestre con el puente disulfuro reducido, se parte de la conformación nativa y después se reduce el puente. El mutante C91A no tiene porque haber alcanzado la misma configuración que la proteína silvestre en conformación nativa, por lo que puede partir inicialmente de una conformación más inestable. El orden de los factores, en el plegamiento de las proteínas, sí altera el producto, de tal forma que la desnaturalización del mutante C91A es rapidísima, mucho más veloz que la del enzima silvestre con el puente reducido. Como vemos, pequeños cambios en la zona entre las cadenas beta 1 a 5 tienen como consecuencia grandes repercusiones en la termorresistencia de la proteína.

En definitiva y según lo expuesto hasta ahora sobre el puente disulfuro nativo de la proteína silvestre, todo hace suponer que los primeros pasos en la desactivación de la proteína se dan en algún lugar entre las betas 1 a 5. Concretando un poco más, la reducción de las interacciones hidrófobas introducidas con la mutación C91A podrían comprometer seriamente la estabilidad de la beta 3, convirtiéndose esta vía en camino de desnaturalización alternativo para este mutante.

### III.C.6.- Intento de estabilización mediante la creación de los puentes disulfuro N40C+G74C

Ya se había probado fijar la beta 1 con un puente disulfuro a la 15. También se había probado unir el lazo entre la beta 1 y la 2 a la 5 por otro puente. Tan sólo quedaba fijar la beta 1, por un puente disulfuro a la beta 4, para acabar de probar todas las combinaciones posibles.

Se diseñaron los oligonucleótidos para producir el mutante N40C+G74C, para ello se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida por PCR total descrita en el apartado II.D.8.

#### Mutante N40C:

```
5' TATGAACCGTTCTgCAACTATAATACG 3'
5' CGTATTATAGTTGcaGAAACGGTTCATA 3'
```

Para generar el mutante N40C no se encontró alrededor del codón de este aminoácido ninguna diana poco frecuente que incorporar o suprimir. Por ello, se tuvo que realizar el cribaje por secuenciación.

#### Mutante G74C:

```
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
Aat II gacgt/c      :                               ~
```

En la posición G74C, la mutación suprime la diana Aat II. Esto simplificó mucho en cribaje.

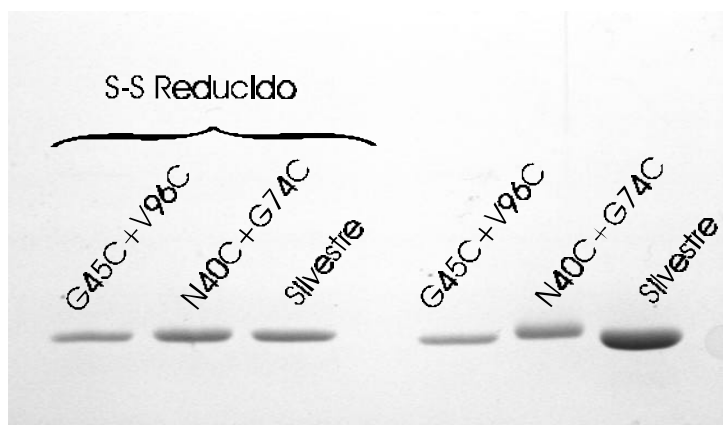
```
5' TCCATGACCTCGTTAtGtGAAATGCGATTA 3'
5' CGCATTTCaCaTAAACGAgGTCATGGACACA 3'
```

Pero este doble mutante implicaba otra dificultad suplementaria, los lazos entre las cadenas beta 1 y 4 que se pretendía unir estaban implicados en una interacción con  $\text{Ca}^{++}$ . Este calcio forma un enlace coordinado con el resto de la proteína. Se sabía que este calcio era determinante para la actividad (Lloberas 1991) y que sin él los resultados de las cinéticas eran poco reproducibles. Asimismo la quelación del calcio en columnas de intercambio catiónico, en el que este  $\text{Ca}^{++}$  era sustituido por  $\text{Na}^+$  rendía un enzima de menor actividad (Olsen *et al.*, 1991).

Aunque se sabía que el calcio era importante en el proceso de desnaturalización térmica (Welfle *et al.*, 1995 y 1996), realmente no se había integrado este calcio en todo este proceso, especialmente en lo que se refiere a las grandes diferencias en termorresistencia que se observan

dependiendo del pH. Una posible explicación es que la complejación del  $\text{Ca}^{++}$  es pH dependiente.

En principio no se albergaban muchas esperanzas de que este mutante mejorase la termorresistencia del enzima, entre otras cosas por que se comprobó que ni el mutante G45C+V96C, ni el mutante N40C+G74C formaban el puente disulfuro extra que se pretendía añadir.



**Figura III.28.:** Gel SDS-PAGE, para comprobar si el puente disulfuro extra que se intentaba añadir en los dobles mutantes G45C-V96C y N40C-G74C, se había formado.

### III.C.7.- Efecto de la interacción del $\text{Ca}^{++}$ sobre la termorresistencia de la proteína

Tras lo visto hasta el momento, lo más probable es que este primer paso de la termoinactivación de la proteína sea debido a la disociación del  $\text{Ca}^{++}$ , que puede ser reemplazado por un  $\text{Na}^+$ , pudiendo además producirse algún que otro cambio configuracional irreversible en este proceso. Según esto, se podría termoestabilizar la proteína mejorando la interacción con estos cationes. Existe la opción de hacerlo por medio de una carga negativa suplementaria, que ayudaría a retener estos cationes por interacción electrostática. Observando la proteína cristalizada se ve que hay una asparagina correspondiente al aminoácido 236 que podría cambiarse por un aspártico para conseguir esa carga negativa extra en la proteína. Además de tratarse de una mutación conservativa, también resulta ser el aminoácido más común en esta posición para las diferentes glucanasas bacterianas conocidas. Para ser más exactos sólo *B. licheniformis* presenta una asparagina en esta posición lo normal es como en el caso de *B. macerans*, *B. brevis*, *B. polymixa*, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* encontrar un aspártico, *C. thermocellum* presenta un ácido glutámico, lo cual permite pronosticar que con el cambio de la asparagina 236 por un aspártico no tendremos problemas para producir el mutante.

A la hora de realizar la sustitución, sería interesante contar con un control negativo en el que incluso la interacción por enlace coordinado del  $\text{Ca}^{++}$  con la beta 15 no estuviera presente. Una posibilidad puede ser cambiar este aminoácido por una alanina. Este cambio si que es más radical y tal vez acarree problemas de producción.

Al introducir el aspártico en la posición 236 era posible incorporar a la vez una diana Asp I que permitirá seleccionar clones por digestión, figura III.29.. Para generar la mutación alanina en la posición 236 se podía introducir a la vez una diana Nsi I que también nos permitirá seleccionar clones por digestión, figura III.29.B.

### A

Opción Asp I:

```
Translation      : S Y N G V T P L Y A H Y D W V R Y T K R
Modified Sequence : TCCTACAACGGTGTACTCCACTTTACGCTCATTACgAcTGGGTcCGTTACACAAAAGA 60
Asp I gacn/nngtc          *
```

```
5' TACGCTCATTACgAcTGGGTcCGTTACACAAAAGA 3'
5' TTTTGTGTACGGACCCAGTCGTAATGAGCGTA 3'
```

### B

Opción Nsi I:

```
Translation      : S Y N G V T P L Y A H Y A W V R Y T K R
Modified Sequence : TCCTACAACGGTGTACTCCACTTTACGCTCATTAtgcaTGGGTGCGTTACACAAAAGA 60
Nsi I atgca/t          *
```

```
5' TTTACGCTCATTAtgcaTGGGTGCGTTACA 3'
5' TGTAACGCACCCAtgcaTAATGAGCGTAAA 3'
```

**Figura III.29.:** Diseño de los oligos para generar el mutante N236D (A) y N236A (B), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.D.8.

Estas sustituciones permitirán verificar el papel central del  $\text{Ca}^{++}$  en la inactivación de la glucanasa. También parece contribuir a mantener ergido el lazo mayor sobre el surco del centro activo. Este  $\text{Ca}^{++}$  forma un enlace coordinado lo suficientemente deslocalizado como para unir los lazos entre las betas 1 y 4 con la beta 15, confiriendo a la vez la elasticidad que la proteína requiere para su actividad en esta posición. Por todo ello, al introducir una carga negativa extra en esta posición podría hacer más rígida esta región de la proteína y acabaría por traducirse en una cierta reducción de la actividad del enzima a la vez que produciría un aumento de la termorresistencia. También, al menos a priori, retendría mejor el  $\text{Ca}^{++}$  y el  $\text{Na}^+$ , por el que probablemente se intercambie durante el proceso de inactivación.

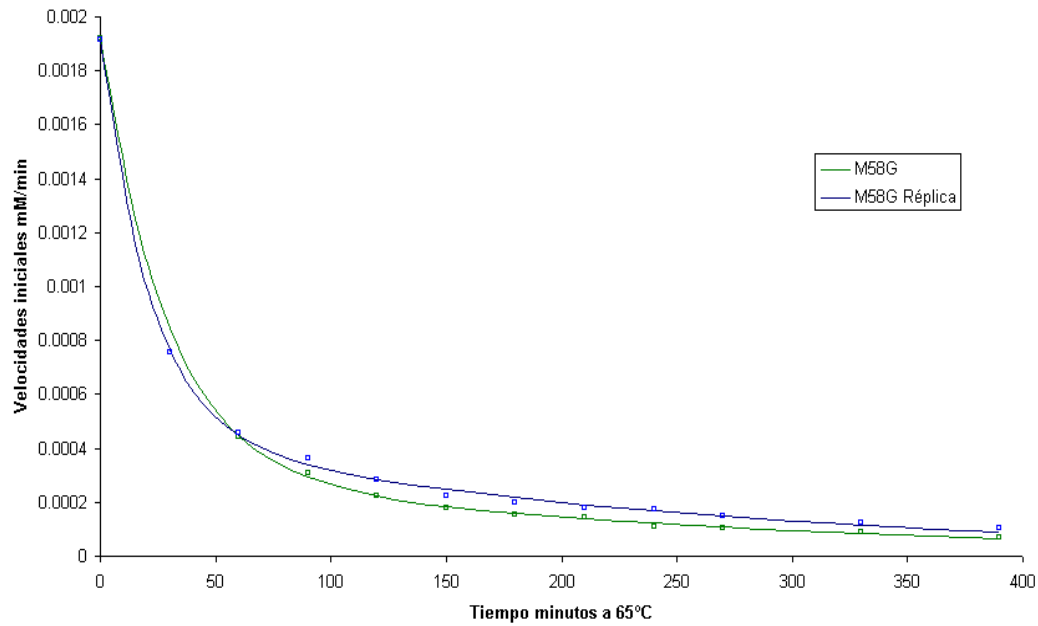
De todas formas, si el  $\text{Ca}^{++}$  es realmente tan determinante, deberíamos ver más claramente su efecto sobre la actividad y la termorresistencia del mutante N236A. Con esta mutación, deberíamos dejar el  $\text{Ca}^{++}$  prácticamente libre a las temperaturas de desnaturalización empleadas. Además, si todas estas suposiciones son ciertas, la actividad del enzima se verá

bastante comprometida. Asimismo resultaría interesante comprobar si este efecto “termoestabilizador” es aditivo respecto al que ya encontramos en mutantes como el M58P. En principio, se asume que los efectos en dominios diferentes pueden ser aditivos, en cambio dentro del mismo dominio o muy próximos no tienen porque serlo. A no ser que se den en posiciones muy alejadas de la proteína.

Para este estudio se realizó la producción del enzima silvestre, y los mutantes M58P, termorresistente, y M58G, termolábil. Estos tres mutantes servirán de referencia. Además, y dado que la producción de los diferentes mutantes seleccionados para este estudio iba a dilatarse en el tiempo, se decidió usar como control de la producción el mutante M58G ya que es el enzima más activo y a la vez el más sensible a la desnaturalización y a posibles cambios, por ejemplo, en los parámetros físico químicos del agua utilizada durante la purificación. Este mutante se produciría dos veces, al principio y al final de esta serie de mutantes y permitiría comprobar si las condiciones de purificación habían variado entre los primeros y los últimos mutantes purificados. También se incluiría en el estudio los mutantes N236D, M58P, M58P+N236D, N236A, y finalmente el mutante N40C+G75C. La producción de los mutantes N236A y N40C+G75C se realizó siguiendo el protocolo descrito en III.B.2..

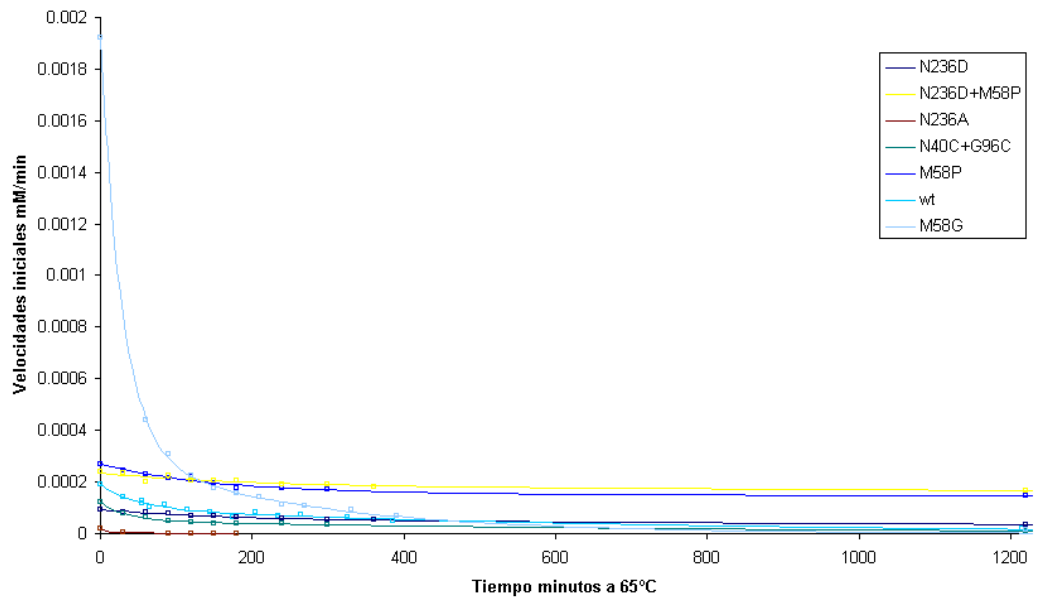
La termorresistencia se midió siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.L.2. La muestra de proteína se introduce en un Eppendorf y se somete a inmersión total en un baño termoestabilizado a 65°C. Después de someter los enzimas a desnaturalización se determinó su actividad a 3 mM de sustrato G<sub>4</sub>G<sub>3</sub>G-MeUmb 45°C en tampón C/F pH 7.2, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>.

El resultado de la termoinactivación de la proteína del mutante M58G y su réplica proveniente de dos purificaciones diferentes se muestran en la figura III.30. Aunque se observa una cierta diferencia entre M58G y su réplica, estas son mínimas. Este resultado estaría indicando que aunque el proceso de purificación cuenta con numerosos pasos, los controles que hemos introducido en cada uno de ellos permiten obtener proteína que garantizan unos resultados reproducibles.

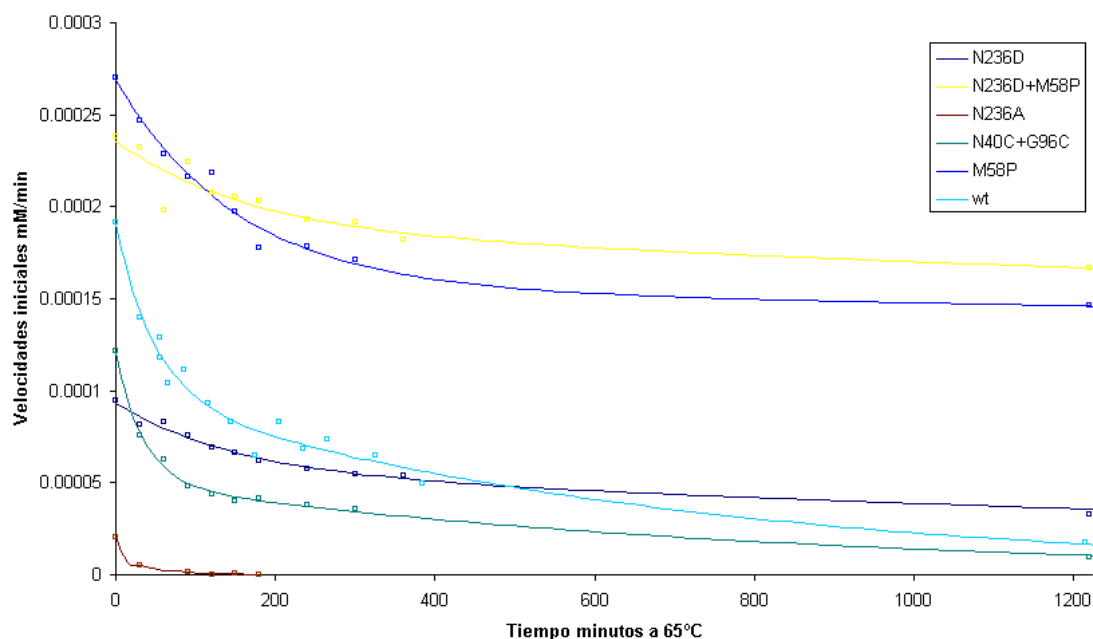


**Figura III.30.:** Comparación de la termoinactivación del mutante M58G proveniente de diferentes purificaciones.

El resultado de este experimento de termoinactivación con todos los mutantes seleccionados para esta serie se muestran en la figura III.31.



**Figura III.31.:** Curvas de termoinactivación de todos los mutantes de esta serie.



**Figura III.32.:** Ampliación las curvas de termoinactivación de todos los mutantes de esta serie, a excepción del mutante M58G.

Observando la figura III.32 se pueden realizar una serie de comentarios. El primero es que al inestabilizar la unión del  $\text{Ca}^{++}$ , con el mutante N236A, se compromete seriamente la termorresistencia del enzima, el cual no tarda mucho en inactivarse. Este resultado confirma nuestras hipótesis.

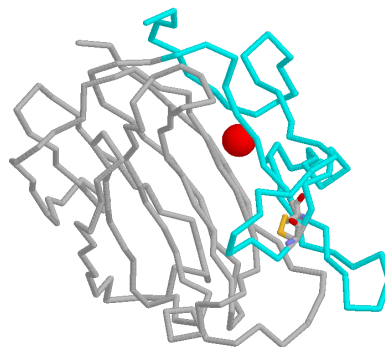
Otro efecto que esperábamos observar, si realmente el  $\text{Ca}^{++}$  participa en modular la movilidad del lazo mayor entre las betas 2 y 3, es una cierta pérdida de actividad de los dobles mutantes a los que se añade la mutación N236D, como puede observarse tanto en el mutante N236D como en el doble mutante M58P+N236D. Esta pérdida de actividad se traduce en una ganancia de termorresistencia. Además, en el caso de doble mutante M58P+N236D, parecería que el efecto termoestabilizador de ambas mutaciones fuera aditivo.

Otro hecho que sorprende es que la velocidad de reacción -a tiempo cero de incubación a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -, tanto del mutante M58P como del M58P+N236D, es superior a la del enzima silvestre.

El papel crítico del pH en la termorresistencia podría estar relacionado con el aumento de la concentración de iones hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) cuando el medio se basifica, al margen de la mayor o menor capacidad quelante de los componentes del tampón utilizado. Estos iones hidroxilo, por su pequeño tamaño, accederían fácilmente al catión coordinado de la glucanasa, desestabilizando la zona y facilitando la salida del mismo. Los experimentos realizados han demostrado que la

asparagina 236, como cabía esperar, juega un papel importante en el proceso de estabilización de la proteína. El catión, en el caso de la sustitución N236D, no sólo es retenido por el enlace coordinado -como en el caso de la asparagina- sino también es atraído por una interacción electrostática a la beta 15. La beta 15 es una de las betas más sólidamente construidas de la glucanasa.

Por otro lado, el conjunto de betas de la 1 a la 5, con el lazo mayor incluido, parecen actuar como un “pseudodominio” estructural (Welfle, 1996).



**Figura III.33.:** Estructura de la glucanasa, resaltado en color azul claro las betas de la 1 a la 5.

La estructura de betas antiparalelas que observamos en toda la proteína se interrumpe, figura III.22. La beta 15 no interacciona con una sola beta sino con dos, la 1 y 4. La beta 4 a su vez interactúa con la beta 3. Entre la beta 3 y la 2, se encuentra el lazo mayor y la beta 3 se apoya por medio de un puente disulfuro sobre la beta 5. La beta 2 también interactúa ligeramente con la beta 5. La mayor parte del estrés estructural derivado del movimiento del lazo mayor recaería sobre las betas 2 y 3. El estrés recae mucho más sobre la 2 dado que no cuenta con un puente disulfuro, como le sucede a la beta 3, que le permite descargar parte de la tensión estructural sobre la beta 5.

Centrémonos sobre la beta 2 y el lazo entre este y la beta 1 que, según los indicios acumulados hasta ahora, parece ser junto con la región ocupada por el  $\text{Ca}^{++}$  los lugares por donde la estructura se comienza a desplegar. Según Keitel *et al.* 1994, la ausencia de un catión, ya sea  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{++}$ , coordinando los lazos conduce probablemente a la completa inactivación del enzima. Es decir, estos cationes sólo se pueden coordinar en enzimas con conformaciones estructurales muy próximas a la nativa. Pero se trata de un proceso de todo o nada. La simple sustitución del  $\text{Ca}^{++}$  por  $\text{Na}^+$  por quelación utilizando una columna Chelex 100 rinde un enzima parcialmente activo. Esta actividad es imposible de recuperar aunque volvamos a reemplazar el  $\text{Na}^+$  por  $\text{Ca}^{++}$  según Keitel *et al.* 1994. Estos resultados estarían indicando que, en todo este proceso, se ha modificado una parte de la estructura de la proteína, al margen del propio enlace de



coordinación. Pero, ¿qué es lo que ha cambiado en la estructura de la glucanasa?, y ¿porqué es prácticamente irreversible el tránsito de proteína nativa al primer intermediario?

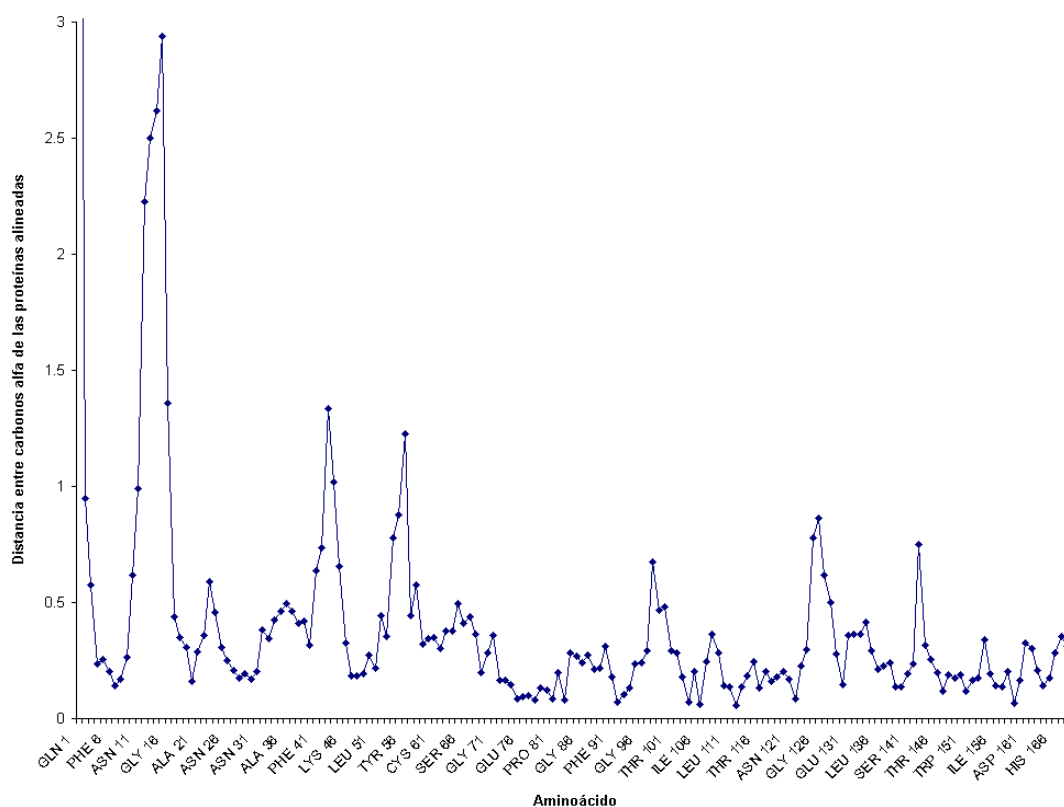
Ya se ha comentado que la glucanasa de *B. licheniformis* es tremendamente parecida a la de *B. amyloliquefanciens* y en cambio la de *B. macerans* es ligeramente diferente, figura III.34. Esto permite utilizar tanto los cristales de *B. macerans*, como el híbrido H(A16-M) de los primeros 16 aminoácidos de *B. amyloliquefanciens* y el resto de la glucanasa de *B. macerans*, en cualquiera de sus dos versiones, ya sea acompañado con  $\text{Ca}^{++}$  o  $\text{Na}^+$ .

B.lichenif.	1	QTGGSFYEPF	NNYN <b>T</b> GLWQK	ADGYSNGNMF	NCTWRANNVS	MTSLGEMRLS
B.amyloliq.	1	QTGGSFFEPF	NSYN <b>S</b> GTWEK	ADGYSNGGVF	NCTWRANNVN	FTNDGKCLKLG
B.macerans	1	GSVFWPEPL	SYFN <b>P</b> STWEK	ADGYSNGGVF	NCTWRANNVN	FTNDGKCLKLG
		* . * ** .	. . * . . * . *	***** . *	***** .	* . * . . *
B.lichenif.	51	LTSPSYNKFD	CGENRSVQTY	GYGLYEVMNK	PAKNVGVSS	FFTYTGPTDG
B.amyloliq.	51	LTSSAYNKFD	CAEYRSTNIY	GYGLYEVSMK	PAKNTGVSS	FFTYTGPAHG
B.macerans	49	LTSSAYNKFD	CAEYRSTNIY	GYGLYEVSMK	PAKNTGVSS	FFTYTGPAHG
		*** . *****	* . * ** *	***** . **	**** *****	***** . *
B.lichenif.	101	TPWDEIDIEF	LGKDTTKVQF	NYYTNGVGNH	EKIVNLGFDA	ANSYHTYAFD
B.amyloliq.	101	TQWDEIDIEF	LGKDTTKVQF	NYYTNGVGGH	EKVISLGFDA	SKGFHTYAFD
B.macerans	99	TQWDEIDIEF	LGKDTTKVQF	NYYTNGVGGH	EKVISLGFDA	SKGFHTYAFD
		* *****	*****	***** *	* . . . *****	. . . . *****
B.lichenif.	151	WQPNSIKWYV	DGQLKHTATT	QIPQTPGKIM	MNLWNGAGVD	EWLGSYNGVT
B.amyloliq.	151	WQPGYIKWYV	DGVLKHTATA	NIPSTPGKIM	MNLWNGTGVD	DWLGSYNGAN
B.macerans	149	WQPGYIKWYV	DGVLKHTATA	NIPSTPGKIM	MNLWNGTGVD	DWLGSYNGAN
		*** *****	** ***** .	** *****	***** . ***	. *****
B.lichenif.	201	PLYAHYNWVR	YTKR			
B.amyloliq.	201	PLYAEYDWVK	YTSN			
B.macerans	199	PLYAEYDWVK	YTSN			
		**** * . * . *	**			

**Figura III.34.:** Alineamiento de las glucanasas de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefanciens* y de *B. macerans*.

Las curvas de termoinactivación de la glucanasa de *B. licheniformis* son de carácter bifásico. Es muy probable que eso suceda en más enzimas, ya que en la bibliografía se utiliza habitualmente el tiempo que tarda en alcanzar la mitad de la actividad inicial a unas determinadas condiciones de pH y temperatura. Pero normalmente, las referencias bibliográficas no mencionan específicamente esta condición. Este carácter bifásico sí se ha descrito, en algún estudio de termoestabilidad por microcalorimetría de diferentes enzimas (Welfle *et al.* 1996). En este estudio, cuando se desnatura la proteína sin quelar el  $\text{Ca}^{++}$ , la deconvolución de la curva de desnaturación indica un proceso de desplegamiento en dos estados cooperativos. Tanto para el híbrido H(A16-M) como para la glucanasa de *B. amyloliquefanciens* se apreciaban dos estados, no así para la glucanasa de *B. macerans*.

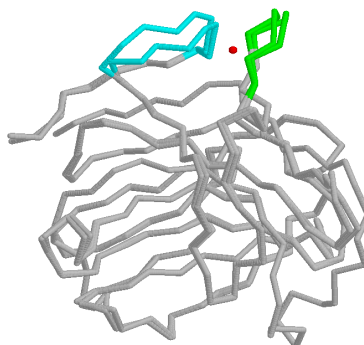
Dado que el híbrido está constituido por los 16 aminoácidos N-terminales de la glucanasa de *B. amyloliquefaciens* y con los 198 C-terminales de *B. macerans*, no sería de extrañar que las diferencias entre el estado nativo y el intermediario estuvieran en esa región, constituida por los primero 16 aminoácidos. Además, ha de ser un cambio que se produzca en el proceso de sustitución del  $\text{Ca}^{++}$  por el  $\text{Na}^+$ . Estas premisas limitan bastante la búsqueda y facilitan la tarea de localizar dicha estructura. Además, este cambio estructural debería ser “irreversible”. Uno de los mecanismos más comunes en estos procesos es el cambio de configuración de *cis* a *trans* en el enlace peptídico X-Pro. La configuración más común es la *trans* ya que es la que supone menos colisiones estéricas y en general se considera 1000 veces más estable que la *cis*. Así pues, un tránsito de *cis* a *trans* sería relativamente fácil que se produjera en la proteína y su reversión sería muy complicada. En el caso de la prolina se considera que tan sólo es 4 veces más estable la configuración *trans* que la *cis* (Braden C. *et al.*). Ahora bien, la energía para retornar al estado *trans* es tan alta que se considera prácticamente irreversible, a no ser claro está si en el proceso median enzimas como las peptidilprolil *cis*, *trans* isomerasas.



**Figura III.35.:** Distancia en amstrongs (Å) entre los carbonos alfa de la glucanasa hibrida H(16-M), acomplejada con  $\text{Na}^+$  (1glh) y con  $\text{Ca}^{++}$ (2agh). La superposición se realizó usando el programa Swiss-pdbviewer v2.7b2.

Una vez acotada la región potencialmente implicada en el proceso de inactivación con un intermediario semiactivo, se ha de buscar si realmente se produce un tránsito *cis-trans* en esta región de la proteína. Para ello se cuenta con los dos mutantes del híbrido de la glucanasa de *B. amyloliquefaciens* y la de *B. macerans*, uno complejado con  $\text{Ca}^{++}$  y otro con  $\text{Na}^+$ . En la figura III.35 se muestran los cambios relativos que se han producido entre la estructura del mutante H(A16-M) complejado con  $\text{Ca}^{++}$  (su código PDB es 2ayh; Hahn *et al.* 1995) y complejado con  $\text{Na}^+$  (su código PDB es 1glh; Keitel *et al.* 1995). Efectivamente, dejando de lado la cola N-terminal, la zona que más cambia de un cristal al otro corresponde al lazo entre la beta 1 y 2. En la figura III.35 esto correspondería al aminoácido de posición número 15.

Efectivamente, aparte de la región N-terminal de la cola, la zona que más ha cambiado es el lazo entre la beta 1 y la 2. También, como cabría esperar, los extremos de los lazos se encuentran en posiciones diferentes en las dos estructuras. Además, la sustitución del  $\text{Ca}^{++}$  por el  $\text{Na}^+$  produce cambios relativamente pequeños en la región en la que se encuentra el  $\text{Na}^+$  pero, estos cambios repercuten claramente en las betas adyacentes. En la figura III.36 se ha coloreado en azul el lazo entre la beta 1 y 2 y en verde a las regiones terminales entre las betas 3 y 4.



**Figura III.36.:** La superposición por los carbonos alfa de la glucanasa híbrida H(16-M), complejada con  $\text{Na}^+$  y con  $\text{Ca}^{++}$ . La superposición se realizó usando el programa Swiss-pdbviewer v2.7b2. Coloreadas azul y verde las estructuras que más varían entre ambas estructuras, en rojo el calcio.

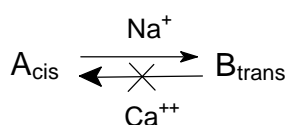
El  $\text{Ca}^{++}$ , además de ser un catión más grande y rellenar mejor el “hueco”, permite formar un enlace coordinado implicando al menos seis ligandos, sin embargo que el  $\text{Na}^+$  coordina un máximo de cuatro o cinco ligandos (Glusker, 1991). Aunque esta sustitución puede parecer que no compromete especialmente la estructura de la proteína, en el cristal (2ayh) sí existe una reducción en el número de posibles configuraciones de esta coordinación. Esta característica limita la capacidad de coordinación reduciendo los límites estereoquímicos -en los que esta

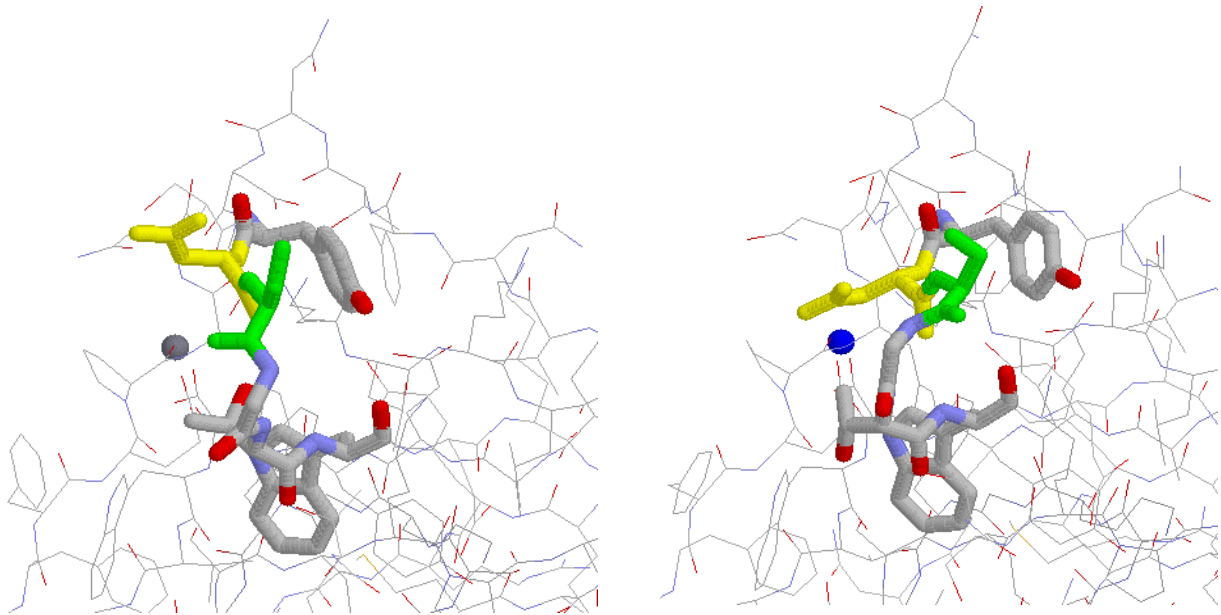
coordinación es posible-, a unos márgenes mucho más estrechos en el caso del  $\text{Na}^+$  que en del  $\text{Ca}^{++}$  (Lehn y Sauvage, 1975).

Si, como se ha dicho, el primer intermediario ha de ser más estable, ¿cómo es posible que sea así, teniendo en cuenta que el  $\text{Ca}^{++}$  es sustituido por  $\text{Na}^+$  perdiendo parte de la flexibilidad que la coordinación con el  $\text{Ca}^{++}$  proporcionaba a esta región de la proteína?. Esto indica, indirectamente, que aunque la salida del  $\text{Ca}^{++}$  pudiera ser el desencadenante de todo este proceso, la razón por la cual el proceso no es reversible hay que buscarla en otro sitio. La sustitución del  $\text{Ca}^{++}$  por el  $\text{Na}^+$  colapsa parcialmente esta región entre otras cosas por el menor radio del  $\text{Na}^+$ , implicando un cambio local en los aminoácidos que rodean al catión, y induciendo otros cambios en los aminoácidos vecinos. Los más importantes los vemos, coloreados de azul en la figura III.36, en el lazo entre la beta 1 y 2. Una imagen más detallada del lazo ayudará entender mejor el proceso. En la figura III.37 se observa una transición del cristal que contiene  $\text{Ca}^{++}$ , representado como una bola de color gris, al cristal que contiene  $\text{Na}^+$ , representado como una bola de color azul. En la proteína nativa los dos grupos laterales representados en amarillo (asparagina) y verde (serina) están en configuración *cis*. Sin embargo en la proteína en la que el  $\text{Ca}^{++}$  ha sido sustituido por  $\text{Na}^+$ -estos mismos aminoácidos están en configuración *trans*-, supuestamente 1000 veces más estable.

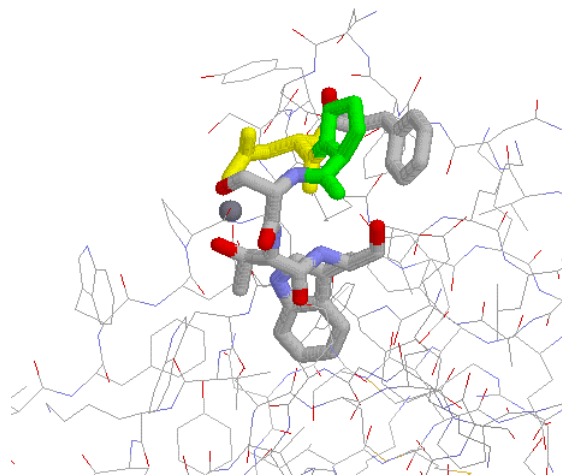
Este cambio configuracional podría explicar por qué la formación de este intermediario es irreversible, y por qué aunque se vuelva a intercambiar el  $\text{Na}^+$  por  $\text{Ca}^{++}$  la actividad no se vuelve a recuperar, ya que el giro que se ha producido en dicha cadena es, a efectos prácticos, irreversible. Se pasa de una configuración en *cis* más activa pero menos estable a una configuración en *trans*, más estable pero menos activa.

En el caso del enzima de *B. macerans* este cambio es mucho más difícil que se produzca, ya que, como se observa en la figura III.37, en esta posición presenta una prolina y ya está en posición *trans*. Esta prolina hace que sea prácticamente imposible que se produzca una transición entre las dos isoformas *cis trans*. En otras palabras, esta configuración ya sería igual a la del “intermediario” del mutante H(A16-M), y no habría posibilidad de que se produjera una transición *cis trans*.





**Figura III.37.:** Detalle del lazo entre la beta 1 y 2, de los dos cristales del mutante H(16-M). En color gris el  $\text{Ca}^{++}$ , en azul el  $\text{Na}^+$ , la serina en verde y en amarillo la asparagina.



**Figura III.38.:** Detalle del lazo entre la beta 1 y 2, del cristales de la glucanasa de *B. macerans*. En color gris el  $\text{Ca}^{++}$ , la prolina en verde y en amarillo la asparagina.

Este transito *cis trans* podría ser un proceso necesario en la aparición del primer intermediario. Expecular que es lo que puede suceder a partir de aquí es muy aventurado. Sin embargo, es posible que se produce la rotura de algunos puentes de hidrógeno entre las betas 2 y 5 acompañada con la salida definitiva del catión coordinado. Entre otras cosas, por lo determinante que resulta, en la estabilidad del intermediario de desplegamiento, el aminoácido por el que sustituimos la metionina 58.

## IV.- Conclusiones generales

### IV.A.- El análisis de los mutantes de saturación en la posición 58 de glucanasa

5. La reducción de volumen de la cadena lateral aumenta la actividad catalítica  $k_{cat}$ , si bien disminuye 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  $k_{cat}/K_m$ .
6. Los residuos hidrófilos disminuyen la actividad.
7. Únicamente en mutantes aromáticos como M58F y M58W, se aprecia una disminución de valores de  $K_m$ , respecto al enzima silvestre.

### IV.B.- Expresión y producción

1. En cuanto al rendimiento en la obtención de proteína recombinante cabe concluir que la mayor diferencia de producción entre los diferentes mutantes se debe a pérdidas durante la purificación y que añadir  $CaCl_2$  durante el proceso de purificación mejora el rendimiento de la producción de enzima.

### IV.C.- Termorresistencia

El análisis de la termorresistencia de diversos mutantes de la glucanasa y diversas condiciones permite llegar a las siguientes conclusiones:

1. Con respecto al medio, serían claves el pH (por pérdida de interacciones pH dependientes), el tampón (por su posible papel quelante), la presencia de sustrato (estabilizaría).
2. Con respecto a la estructura serían claves los aminoácidos del lazo y la coordinación del  $Ca^{++}$ . La coordinación del  $Ca^{++}$  puede ser mejorada introduciendo una nueva interacción entre el catión y la beta 15, como en el caso del mutante N236D.
3. Finalmente la termoinactivación de la glucanasa de *Bacillus licheniformis*, en todos los mutantes estudiados, siguen un patrón bifásico cuyo análisis cinético permite justificar el efecto de diversos mutantes y el comportamiento del enzima frente a la temperatura.

## V.- Referencias

- Andrews, A. T. (1986). "Electrophoresis". Clarendon Press. Oxford.
- Bamforth, C. W. (1982). "Barley  $\beta$ -glucans: their role in malting and brewing". *Brewers digest*, **6**:22-35.
- Barik, S. (1993). "Site-directed mutagenesis by double polymerase chain reaction. Megaprimer method". *Methods. Mol. Biol.*, **15**:277-286.
- Beguin, P. (1983) "Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using congo-red stained agar replicas". *Anal. Biochem.*, **131**:333-336.
- Bielecki, S. y Galas, E. (1991). "Microbial  $\beta$ -glucanases different from cellulases". *Crit. Rev. Biotechnol.*, **10**:275-304.
- Borriss, R., Manteuffel, R. y Hofemeister, J. (1988). "Molecular cloning of a gene coding for thermostable  $\beta$ -glucanase from *Bacillus macerans*". *J. Basic. Microbiol.*, **28**:1-10.
- Borriss, R., Olsen, O., Thomsen, K. K. y von Wettstein, D. (1989). "Hybrid *Bacillus endo*-(1,3-1,4)- $\beta$ -glucanases: construction of recombinant genes and molecular properties for the gene products". *Carlsberg Res. Commun.*, **54**:41-54.
- Borriss, R., Buettner, K. y Maentsaelae, P. (1990). "Structure of the  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*: homologies to other  $\beta$ -glucanases". *Mol. Gen. Genet.*, **222**, 278-283.
- Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.*, **72**:248-254.
- Catálogo "Biochemicals for Molecular Biology". (1997). Boehringer Mannheim.
- Catálogo New England Biolabs (NEB). (2001).
- Catálogo Stratagene (2000).
- Chen, L., Fincher, G. B. y Høj, P. B. (1993). "Evaluation of polysaccharide hydrolase substrate specificity". *J. Biol. Chem.*, **268**:13318-13326.
- Cook, G. M. W. (1995), "Molecular Biology and Biotechnology. A Comprehensive Desk Reference". (ed. R. A. Meyers), 153-158, VCH Publishers Inc., New York.
- Cunningham, B.C. y Wells, J. A., "High-Resolution Epitope Mapping of hGH-Receptor Interactions by Alanine-Scanning Mutagenesis", *Science*, **244**:1081-1085.
- Duboë, P. y Berger, L. C. (1988). "El libro del amante de la cerveza". Ed. J. J. de la Olañeta.
- Esau, K. (1985). "Anatomía vegetal". Ed. Omega.
- Flint, H. J., Martin, J., McPherson, C. A., Daniel, A. S. y Zhang, J-X.(1993). "A bifunctional enzyme, with separate xylanase and ((1,3-1,4)glucanase domains, encoded by the xyn D gene of *Ruminococcus flavefaciens*". *J. Bacteriol.*, **175**:2943-2951.
- Freifelder, D. (1981). "Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular". Ed. Reverté, S.A.
- Gelfand, D. H. y Sninsky, J. J. (1993). "Fidelity questions and answers". *Amplifications*, **11**:16-19.
- Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Miller, J. C. y Warren, R. A. J. (1989). "Structural and functional analysis of a bacterial cellulase by proteolysis". *J. Biol. Chem.*, **264**:17802-17808.
- Gilkes(a), N. R., Kilburn, D. G., Miller, J. C. y Warren, R. A. J. (1991). "Bacterial cellulases". *Bioresource technol.*, **36**:21-35.
- Gilkes(b), N. R., Henrissat, B., Kilburn, O. G., Miller, R. O. y Warren, R. A. J. (1991). "Domains in microbial  $\beta$ -1,4-glycanases: sequence conservation, function and enzyme families". *Microbiol. Rev.*, **55**:303-315.
- Gilkes(c), N. R., Meinke, A., Coutinho, J. B., Ong, E., Greenwood, J. M., Miller Jr, R. C., Kilburn, D. G. y Warren, R. A. J. (1991). "*Cellulomonas fimi*  $\beta$ -1,4-glucanases". ACS Symposium series No. 460. Enzymes in Biomass Conversion. Capítol **26**:349-360.
- Glusker, J. P. (1991) "Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins" *Anal. Chem.* **42**:1-76.
- Gosalbes, M. J., Pérez-González, J. A., González, R. y Navarro, A.(1991). "Two  $\beta$ -glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: molecular cloning, expression and sequence

- analysis of genes encoding a xylanase and an endo- $\beta$ -(1,3)-(1,4)-glucanase". *J. Bacteriol.*, **173**:7705-7710.
- Hahn, M., Keitel, T. y Heinemann U. (1995) "2AYH crystal and molecular structure at 1.6 angstroms resolution of the hybrid *Bacillus* endo-1,3-1,4-beta-d-glucan 4-glucanohydrolase H(A16-M)"
- Hansen, H., Lemke, H. y Bodner, U. (1993). "Rapid and simple purification of PCR products by direct band elution during agarose gel electrophoresis" *Biotechniques*, **14**:28-30.
- Henrissat, B. (1991). "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities". *Biochem. J.*, **280**:309-316.
- Hinchliffe, E. (1984). "Cloning and expression of a *Bacillus subtilis* endo 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase gene in *Escherichia coli* K12". *J. Gen. Microbiol.*, **130**:1285-1291.
- Hofemeister, J., Kurtz, A., Borriss, R. y Knowles, J. (1986). *Gene*, **49**:177-187.
- Høj, P. B., Condrón, R., Traeger, J. C., McAuliffe, J. C. y Stone, B. A. (1992). "Identification of glutamic acid 105 at the active site of *Bacillus amyloliquefaciens* 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase using epoxide based inhibitors". *J. Biol. Chem.*, **267**:25059-25066.
- Hrmova, M. y Fincher, G. B. (1993). "Purification and properties of three (1-3)- $\beta$ -D-glucanase isoenzymes from young leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. J.*, **289**:453-461.
- Hunter, C. A. (1991) "?? Interactions: the Geometry and Energetics of Phenylalanine-Phenylalanine Interactions in Proteins" *J. Mol. Biol.* **218**:837-846.
- Juncosa, M., Pons, J., Planas, A. y Querol, E. (1994a). "Improved accuracy in site-directed mutagenesis by PCR, using a *Pyrococcus* species GB-D polymerase". *Biotechniques*, **16**:820-824.
- Juncosa, M., Pons, J., Dot, T., Heinemann, U., Querol, E. y Planas, A. (1994b). "Identification of active site carboxylic residues in *Bacillus licheniformis* endo-1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase by site-directed mutagenesis". *J. Biol. Chem.*, **269**:14530-14535.
- Keitel, T., Simon, O., Borriss, R. y Heinemann, U. (1993). "Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4- $\beta$ -glucanase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:5287-5291.
- Keitel, T., Meldgaard, M. y Heinemann, U. (1994) "Cation binding to a *Bacillus* (1,3-1,4)-beta-glucanase. geometry, affinity and effect on protein stability" *Eur. J. Biochem.*
- Kuipers, O. P., Boot, H. J. y de Vos, W. M. (1991). "Improved sitedirected mutagenesis method using PCR". *Nucl. Acid Res.*, **19**:4558.
- Lai, D., Zhu, X. y Pestka, S. (1993). "A simple and efficient method for site-directed mutagenesis with double-stranded DNA". *Nucl. Acid Res.*, **21**:3977-3980.
- Laidler, K. J. (1979). "Cinética de reacciones". Ed. Alhambra.
- Landt, O., Grunnert, H-P. y Hahn, U. (1990). "A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction". *Gene*, **96**:125-128.
- Lehninger, A.L. (1982). "Bioquímica". Ed. Omega.
- Lloberas, J., Querol, E. y Bernués, J. (1988). "Purification and characterization of endo- $\beta$ -1,3-1,4-D-glucanase activity from *Bacillus licheniformis*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**:32-38.
- Lloberas Cavero, J. (1991). Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Lloberas, J., Pérez-Pons, J. A. y Querol, E. (1991). "Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the endo- $\beta$ -1,3-1,4-D-glucanase gene from *Bacillus licheniformis*". *Eur. J. Biochem.* **197**:337-343.
- Louw, M. E. y Watson, S. J. R. (1993). "Characterization, cloning, and sequencing of a thermostable endo-(1,3-1,4) $\beta$ -glucanase-encoding gene from an alkalophilic *Bacillus brevis*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**:507-513.
- Malet, C., Jiménez-Barbero, J., Bernabé, M., Brosa, C. y Planas, A. (1993). "Stereochemical course and structure of the products of the enzymic action of endo-1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*" *Biochem. J.*, **296**:753-758.



- Malet., C., y Planas., A. (1997), *Biochem.* **36**, 13838-13848.
- Marini M. F., Naeem, A. y Lapeyre, J. N. (1993). "An efficient 1-tube PCR method for internal site-directed mutagenesis of large amplified molecules". *Nucl. Acid. Res.*, **21**:2277-2278.
- Maureen, E. L., Reid, S. J. y Watson, T. G. (1993). "Characterization cloning and sequencing of a thermostable endo-(1,3-1,4)- $\beta$ -glucanase encoding gene from an alkalophilic *Bacillus brevis*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**:507-513.
- Moscatelli, E. A., Ham, E. A. y Rickes, E. L. (1961). "Enzymatic properties of a  $\beta$ -glucanase from *Bacillus subtilis*". *J. Biol. Chem.*, **236**:2858-2862.
- Murphy, N., McConell, D. J. y Cantwell, B. A. (1984). "The DNA sequence of the gene and genetic control sites for the excreted *B.subtilis* enzyme  $\beta$ -glucanase". *Nucl. Acid. Res.*, **12**:5355-5367.
- Nölting, B. y Andert K. (2000). *Proteins*, **41**:288-298.
- Lehn, J. M. y Sauvage, J. P.(1975). "(2)-Crytates: stability and selectivity of alkali and alkaline-earth macrobicyclic complexes", *J. Am. Chem. Soc.* **97**:6700-6707.
- Olsen, D.B., Sayers, J.R. y Eckstein, F. (1993). "Site-directed mutagenesis of single stranded and double stranded DNA by phosphonothioate approach". *Methods Enzymol.*, **217**:189-217.
- Olsen, O., Borriss, R., Simon, O. y Thomsen, K. K. (1991). "Hybrid *Bacillus* (1-3,1-4)- $\beta$ -glucanases: engineering thermostable enzymes by construction of hybrid genes". *Mol. Gen. Genet.*, **225**:177-185.
- Olsen, O. y Thomsen, K. K. (1991). "Improvement of bacterial  $\beta$ -glucanase thermostability by glycosilation". *J. Gen. Microbiol.*, **137**:579-585.
- Pérez-Pons, J.A. (1991). Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Pérez-Vendrell, A. M. y Francesch, M. (1991). "Analytical methods to evaluate barley quality for monogastric nutrition". *Options méditerranéennes, série séminaires*, **20**:75-85.
- Perrin, D.O. y Dempsey, B. (1979). "Buffers for pH and metal ion control". Science Paperbacks. Ed. Chapman and Hall. Londres.
- Pitson, S. M., Seviour, R. J. y McDougall, B. M. (1993). "Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation". *Enzyme. Microb. Technol.*, **15**:178-192.
- Planas, A., Juncosa, M., Cayetano, A. y Querol, E. (1992 a). "Studies on *Bacillus licheniformis* endo- $\beta$ -1,3-1,4-D-glucanase: characterization and kinetic analysis". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**:583-589.
- Planas, A., Juncosa, M., Lloberas, J. y Querol, E. (1992 b). "Essential catalytic role of Glu134 in endo- $\beta$ -1,3-1,4-D-glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis* as determined by site-directed mutagenesis". *FEBS.Letters.*, **308**:141-145.
- Politz, O., Simon, O., Olsen, O. y Borriss, R. (1993). "Determinants for the enhanced thermostability of hybrid (1-3,1-4)- $\beta$ -glucanases". *Eur. J. Biochem.*, **216**:829-834.
- Pons, J. (1993). Trabajo de master. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Pons, J. (1996). Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Pujades, G. y Palau, J. (2001). "Evolution of  $\alpha$ -amylases: architectural features and key residues in the stabilization of the (beta/alpha) (8) scaffold". *Mol. Bio. Evol.*, **18**:38-54.
- Querol, E., Padrós, E., Juncosa, M., Planas, A. y Lloberas, J. (1992). "Prediction and Fourier transform infrared spectroscopy estimation of the secondary structure of a *Bacillus licheniformis* endo- $\beta$ -1,3-1,4-D glucanase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**:612-617.
- Querol, E., Pons, J., Cedano, J., Vallmitjana, M., García, F., Bonet, C., Pérez-Pons, J.A., Planas, A. Y Mozo-Villarias, A. (1998). "Protein engineering for thermostabilisation of proteins: some theoretical rules and application to a  $\beta$ .glucanase" in "Stability and Biocatalysts". Ballesteros, A., Plou, F.J., Iborra, J.L. y Halling, P., eds. Elsevier, Amsterdam.
- Rietsch, A., Belin, D., Martin, N., y Beckwith, J. (1996). "An *in vivo* pathway for disulfide bond isomerization in *Escheriachia coli*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:13048-13053.

- Ring, M., Bader, D.E. y Huber, R.E. (1988). "Site-directed mutagenesis of  $\beta$ -galactosidase (*E.coli*) reveals that Tyr-503 is essential for activity". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**:1050-1055.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, D.F. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Schimming, S., Schwarz, W. H. y Staudenbauer, W. L. (1991). "Properties of a thermoactive  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from *Clostridium thermocellum* expressed in *Escherichia coli*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**: 447-452.
- Schimming, S., Schwarz, W. H. y Staudenbauer, W. L. (1992). "Structure of the *Clostridium thermocellum* gene lic B and the encoded  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase". *Eur. J. Biochem.*, **204**:13-19.
- Sharrocks, A. y Shaw, P. E. (1992). "Improved primer design for PCR-based, site-directed mutagenesis". *Nucl. Acid Res.*, **20**: 1147.
- Sinnott, M. L. (1990). "Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer". *Chem. Rev.*, **90**:1171-1202.
- Teather, R. M. y Erfle, J. D. (1990). "DNA sequence of a *Fibrobacter succinogenes* mixed-linkage 1,3-glucanase (1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanhydrolase) gene". *J. Bacteriol.*, **172**: 3837-3841.
- Van Der Spoel, D. et al., "Gromacs User Manual Version 3.0", Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands. Internet: [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org).
- Viladot, J. L., (1999a) Tesis Doctoral. "Especificitat i mecanisme d' (1,3-1,4)- $\beta$ -glucanases de *Bacillus*: mutagènesi, enzimologia i aplicació en síntesi enzimàtica".
- Viladot, J. L., Ramon, E., Durany, O. y Planas, A. (1999b). "Probing Mechanism of *Bacillus* 1,3-1,4- $\beta$ -glucan 4-Gluconahydrolases by Chemical Rescue of Inactive Mutants at Catalytically Essential Residues" *Biochemistry*, **37**:11332-11342.
- Warren, R. A. J. (1993). " $\beta$ -1,4-glycanases and  $\beta$ -glycosidases". *Current Opinion Biotechnol.*, **4**, 469-473.
- Welfle, K., Misselwitz, R., Welfle, H., Politz, O. y Borris, R. (1995) "Influence of  $\text{Ca}^{2+}$  on conformation and stability of three bacterial hybrid glucanases". *Eur. J. Biochem.* **229**: 726-735.
- Welfle, K., Misselwitz, R., Welfle, H., Politz, O. y Borris, R. (1996) "Individual amino acids in the N-terminal loop region determine the thermostability and unfolding characteristics of bacterial glucanases". *Protein Science*, **5**: 2255-2265.
- Watanabe, K., Chishiro, K., Kitamura, K. Y Suzuki, Y. (1991). "Proline Residue Responsible for Thermostability Occur with High Frequency in Loop Regions of an Extremely Thermostable Oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006\*" *J. Biol. Chem.*, **266**: 24287-24294.

Código de letras:

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

\* Nueva diana insertable  
~ Diana de restricción

```
Traducción      : M S Y R V K R M L M L L V T G L F L S L
Secuencia Original : ATGTCTTACCGTGTA AACGAATGTTGATGCTGCTTGTCACTGGATTATCTTAAGTTTG 60
Afl II c/taaag           ~
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            *
Traducción      : S T F A A S A S A Q T G G S F Y E P F N
Secuencia Original : TCCACATTTGCTGCAAGTGCCTCGGCACAAACGGGCGGTCTGTTTTATGAACCGTTCAAC 120
AlwN I cagnnn/ctg        *
BamH I g/gatcc           *
Bgl I gccnnnn/nggc      *
BstX I ccannnnn/ntgg    *
Drd I gacnnnn/nngtc     *
Eco47 III agc/gct       *
Eco57 I2 cttcag         *
Fsp I tgc/gca           *
Gsu I ctggag            *
Hind III a/agctt         *
Nhe I g/ctagc           *
PpuM I rg/gwccy         *
Sca I agt/act           *
Traducción      : N Y N T G L W Q K A D G Y S N G N M F N
Secuencia Original : AACTATAATACGGGTTTATGGCAAAAAGCAGATGGGTACTCGAATGGAACATGTTTAAAC 180
BstB I tt/cgaa          *
Stu I agg/cct           *
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
Aat II gacgt/c          ~
Avr II c/ctagg          *
BssH II g/cgcg         *
Bsu36 I cc/tnagg       *
Cla I at/cgat           *
Dra III cacnnn/gtg     *
Drd I gacnnnn/nngtc    *
Esp I gc/tnagc         *
HgiE II accnnnnnnggt   *
Hind III a/agctt       *
Hpa I gtt/aac          *
Pml I cac/gtg          *
Spe I a/ctagt           *
Tthlll I gacn/nngtc    *
Xcm I ccannnnn/nnntgg  *
Traducción      : T S P S Y N K F D C G E N R S V Q T Y G
Secuencia Original : ACAAGTCCTTCCTATAATAAGTTTGACTGCGGAGAAAACCGCTCCGTTCAAACGTACGGC 300
Bgl II a/gatct         *
BstX I ccannnnn/ntgg   *
Cla I at/cgat          *
Nde I ca/tatg          *
Pvu I cgat/cg          *
Rsr II cg/gwccg        *
Spe I a/ctagt          *
Spl I c/gtacg          ~
Traducción      : Y G L Y E V N M K P A K N V G I V S S F
Secuencia Original : TATGGGCTATATGAAGTCAACATGAAACCAGCCAAAAATGTTGGGATCGTGTCTTCGTTTC 360
BspM I acctgc          *
BstX I ccannnnn/ntgg   *
Ear I ctcttc           *
EcoN I cctnn/nnnagg    *
Hind III a/agctt       *
Hpa I gtt/aac          *
```

```

Nae I gcc/ggc
Sac I gagct/c
Xmn I gaann/nnttc
Traducción : F T Y T G P T D G T P W D E I D I E F L
Secuencia Original : TTACTTATACGGGACCGACTGATGGTACGCCTTGGGATGAAATCGACATCGAATTTCTA 420
Apa I gggcc/c
Asp718 g/gtacc
Avr II c/ctagg
Cla I at/cgat
Dra III cacnnn/gtg
EcoN I cctnn/mnagg
EcoR I g/aattc
EcoR V gat/atc
HgiE II accnnnnnggt
Kpn I ggtac/c
Nco I c/catgg
PflM I ccannnn/ntgg
PpuM I rg/gwccy
Rsr II cg/gwccg
SnaB I tac/gta
Xca I gta/tac
Traducción : G K D T T K V Q F N Y Y T N G V G N H E
Secuencia Original : GGAAAAGATACGACAAAGTTTCAGTTTAAATTATATACCAATGGTGTGCGAAATCATGAA 480
BspH I t/catga
BstE II g/gtnacc
BstX I ccannnnn/ntgg
Traducción : K I V N L G F D A A N S Y H T Y A F D W
Secuencia Original : AAAATCGTCAACCTTGGTTTTGATGCAGCAAACCTTATCACACATATGCGTTCGACTGG 540
Avr II c/ctagg
EcoR I g/aattc
Hpa I gtt/aac
Mlu I a/cgcgt
Nde I ca/tatg
Nsi I atgca/t
SnaB I tac/gta
Spl I c/gtacg
Traducción : Q P N S I K W Y V D G Q L K H T A T T Q
Secuencia Original : CAGCCTAACTCAATTAATGGTATGTGGACGGTCAATTAACATACGGCTACTACTCAA 600
Afl II c/ttaag
Eco57 I ctgaag
EcoR I g/aattc
Msc I tgg/cca
PflM I ccannnn/ntgg
Pvu II cag/ctg
Sal I g/tcgac
SnaB I tac/gta
Traducción : I P Q T P G K I M M N L W N G A G V D E
Secuencia Original : ATCCCTCAAACACCGGAAAGATTATGATGAACCTTATGGAATGGTGCAGGTGTCGATGAA 660
Bbe I ggcgc/c
BspH I t/catga
BstX I ccannnnn/ntgg
Gsu I ctggag
Nae I gcc/ggc
Nar I gg/cgcc
Sal I g/tcgac
Sma I ccc/ggg
Xma I c/ccggg
Traducción : W L G S Y N G V T P L Y A H Y N W V R Y
Secuencia Original : TGGCTCGGCTCCTACAACGGTGTACTCCACTTACGCTCATTACAATGGGTGCGTTAC 720
BamH I g/gatcc
BstE II g/gtnacc
Fsp I tgc/gca
PpuM I rg/gwccy
Xca I gta/tac
Traducción : T K R Z
Secuencia Original : ACAAAAAGATAA 733
Eco47 III agc/gct

```