

UCH-FC
Biotecnología
M553
C1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Clonamiento, Expresión y Desarrollo de un Sistema de
Screening para el Aumento en la Actividad de una Lipasa
Activa a Bajas Temperaturas Mediante Evolución
Dirigida”**



Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Francesca Mercado Malebrán

2011

Santiago, Chile

Director del Seminario de Título: **Juan Asenjo de Leuze, Ph.D**





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“CLONAMIENTO, EXPRESIÓN Y DESARROLLO DE UN SISTEMA DE SCREENING PARA EL AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE UNA LIPASA ACTIVA A BAJAS TEMPERATURAS MEDIANTE EVOLUCION DIRIGIDA”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

FRANCESCA MERCADO MALEBRÁN

Dr. Juan Asenjo de Leuze
Director Seminario de Título

Juan Asenjo

Dra. Barbara Andrews Farrow
Co-Directora

B. A. Andrews

Dr. Carlos Jerez Guevara
Patrocinante

Carlos Jerez Guevara

Comisión Evaluadora

Dr. Octavio Monasterio Opazo
Presidente Comisión

Octavio Monasterio Opazo

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Evaluador

Ricardo Cabrera Paucar



Santiago de Chile, Marzo de 2011

“Nada es imposible, no si puedes imaginarlo...”
Profesor Hubert J. Farnsworth, Futurama

A mi madre, mi padre y mi abuela...



Nací el 28 de Octubre en Santiago, en la comuna de Providencia, pero viví algunos años en Viña del Mar ya que mi padre falleció cuando yo tenía dos años y mi mamá estaba terminando sus estudios allá. Realicé mis estudios básicos y de enseñanza media en el colegio Carmela Carvajal de Prat y allí conocí a mis grandes amigas con quienes compartimos más de una historia. Grandes profesores contribuyeron en mi formación y me llevo muy lindos recuerdos de mi enseñanza escolar.

En tercero medio decidí hacer un Curso de Verano de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile, el cual me abrió los ojos a la ciencia. Y es así como el 2004 ingresé a estudiar esta carrera. Los primeros dos años no estaba segura si había elegido bien, pero con un poco más de experiencia me di cuenta que ésta es mi pasión, y que los científicos de la Universidad de Chile somos invaluable y que debemos cuidar lo que somos.

Hoy finalmente, ha llegado el día en que doy término a esta etapa universitaria, y después de un gran esfuerzo y dedicación, cierro estos años de estudiante con increíbles recuerdos, pero abriendo una ventana a nuevos desafíos que espero enfrentar con más confianza y conocimientos, esperando seguir haciéndome preguntas y sin perder mi curiosidad ni las ganas de aprender. Eso es lo que me motiva, eso es lo que me hace feliz, y como Einstein dijo una vez “El que no posee el don de maravillarse ni de entusiasmarse más le valdría estar muerto, porque sus ojos están cerrados”.



AGRADECIMIENTOS

Para comenzar me gustaría agradecer a mi director de tesis y profesor guía, el Dr. Juan Asenjo, quien además de darme la oportunidad de trabajar en el CIByB junto a un gran equipo, me apoyó en cada etapa de este proceso. A la Dra. Barbara Andrews quien con paciencia y cariño me enseñó a tener fe en mí y en mis conocimientos.

Quisiera agradecer también a la Dra. Oriana Salazar quien fue un pilar fundamental en mi trabajo. Agradecer al Dr. Osvaldo Monasterio y al Dr. Ricardo Cabrera quienes con mucha dedicación corrigieron mi trabajo.

A Nancy quien estuvo conmigo en cada experimento. A mis grandes amigas Clau y Mary que me acompañaron siempre. A todos mis amigos del lab, quienes contribuyeron con granitos de arena, desde una sonrisa hasta increíbles correcciones. A mis amiguitas Maripi y Dani V., quienes me dieron mil ánimo para terminar mi trabajo. A mi adorada Pati Martinez, a mis amigas y compañeras de oficina Cami, Gabi y Dani S., y a mi hermanito putativo Matías. A mi amiga y mentora Lore Parra, quien se convirtió en una gran compañera de trabajo. A mi amiga Jacqui y a mis rockeras, Jose, Lila, Feña, Dani, Romi y Vale, mis eternas compañeras de penas y alegrías. Amigas sin ustedes nada de lo que he construido en la vida sería lo mismo, las adoro. A mis amigas Tuti, Caro y mis queridos Lucho y Alvarenga, gracias por su increíble amistad.

Quiero agradecer en especial a mi amor, mi amigo, y mi eterno compañero Guille, por darme fuerzas para seguir adelante y apostar por mí, eres el cielo donde siempre encuentro paz. No puedo dejar de agradecer a mi nueva familia, Tía Ivonne y Tío Eduardo quienes se han convertido en parte importante de mi vida, y que me han formado con tanto amor y preocupación como lo ha hecho mi madre.

Finalmente quiero agradecer a mi madre quien siempre estuvo conmigo y me apoyó incondicionalmente, por todo su esfuerzo y su dedicación, por enseñarme con tanto amor y darme las herramientas para llegar al sol. Mi trabajo es por ti. A mi padre que desde el cielo nos cuida y a mi abuela que a su lado lo acompaña.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUCCION	1
1.1 Enzimas Industriales	1
1.2 Condiciones extremas y enzimas adaptadas a bajas temperaturas.....	2
1.3 Lipasas y sus aplicaciones industriales	3
1.4 Estructura y mecanismo de acción de las lipasas.....	7
1.5 Aplicaciones de enzimas adaptadas al frío.....	12
1.6 Optimización de enzimas	13
1.7 Evolución dirigida.....	14
1.8 Elaboración y optimización del proceso de screening	18
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
2 MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1 Materiales:	22
2.1.1 Cepas bacterianas	22
2.1.2 Reactivos.....	22
2.1.3 Vectores de clonamiento y expresión	23
Vector de clonamiento pGEM-T Easy:.....	23
Vector de expresión pMAL-c2E:.....	24
2.1.4 Medios de cultivo líquidos.....	25
Medio Luria-Bertani (LB).....	25
Medio TB	25
Medio rico con Glucosa y Ampicilina	25
2.1.5 Medios de cultivo sólidos	25
2.1.6 Soluciones Stock.....	26
2.2 Métodos:.....	27
• Metodología utilizada para el clonamiento del gen de lipasa	27
2.2.1 Cultivo de microorganismos	27
Crecimiento y mantención de microorganismos en medio sólido	27
Crecimiento de cepas en cultivos líquidos.....	27
2.2.2 Amplificación de ADN a través de PCR mediante Elongasa®	27
2.2.3 Electroforesis de ADN	28
2.2.4 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	29



2.2.5	Ligación de fragmentos de ADN a vectores de clonamiento y expresión	29
	Ligación en el vector de clonamiento pGEM-T Easy	29
	Ligación en el vector de expresión pMAL-c2E	30
2.2.6	Transformación de células electrocompetentes	30
2.2.7	PCR de colonias	31
2.2.8	Minipreparación de ADN plasmidial	32
2.2.9	Digestión de ADN plasmidial	32
	• Metodología utilizada para la expresión del gen de lipasa	33
2.2.10	Obtención del vector de expresión pMALc-2E con el gen de lipasa	33
2.2.11	Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes mediante el sistema de expresión <i>E. coli</i> TB1/pMALc-2E	33
2.2.12	Purificación de la proteína recombinante mediante el sistema de expresión <i>E. coli</i> TB1/pMALc2E	34
2.2.13	Electroforesis de proteína (SDS-PAGE)	36
2.2.14	Determinación del valor de Constante de Michaelis (Km)	36
2.2.15	Medición de la actividad lipolítica de la proteína mediante ensayo en medio líquido	37
2.2.16	Determinación de la concentración de proteína	37
	• Metodología utilizada para la validación del <i>screening</i>	38
2.2.17	Análisis de variabilidad:	38
2.2.18	Ensayos de actividad en medio líquido	39
2.2.19	Colección de datos	39
2.2.20	Cuantificación de variabilidad de <i>screening</i> (CV)	40
2.2.21	Generación de genotecas de variantes del gen de lipasa y condiciones de PCR propenso a error.	40
2.2.22	Análisis de librerías de mutantes.	41
3	RESULTADOS	43
3.1	Clonamiento del gen de lipasa	43
3.2	Expresión del gen de lipasa recombinante en <i>E. coli</i> TB1	47
3.3	Optimización de <i>screening</i> para la lipasa 2-17 activa a bajas temperaturas	52
3.4	Generación de variantes del gen de lipasa 2-17.	55
4	DISCUSION	59
4.1	Clonamiento, expresión y purificación del gen de lipasa	59
4.2	Mejoramiento al azar.	63
4.3	Evaluación y validación del proceso de <i>screening</i>	64
4.4	Cuantificación de la variabilidad en el <i>screening</i>	67
4.5	Lipasa 2-17 adaptada a bajas temperaturas	71
5	CONCLUSIONES	72
6	PROYECCIONES	73



7 BIBLIOGRAFIA.....	75
8 ANEXOS	80
8.1 Secuencia nucleotídica del gen codificantes para la lipasa 2-17.....	80
8.2 Secuencia aminoacídica de la lipasa 2-17.....	81
8.3 Curva de calibración p-nitrofenol	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Cepas bacterianas utilizadas durante el seminario de título.	22
Tabla II: Reactivos utilizados durante el seminario de título.	22
Tabla III: Partidores utilizados para la expresión del gen codificante para lipasa.	28
Tabla IV: Combinaciones de las diferentes condiciones utilizadas en la elaboración del proceso de <i>screening</i>	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Reacción enzimática de una lipasa..	4
Figura 2: Estructura tridimensional de una esterasa con un clásico plegamiento de α/β -hidrolasa.	9
Figura 3: Diagrama del plegamiento α/β -hidrolasa..	10
Figura 4: Vector de clonamiento pGEM-T Easy.	23
Figura 5: Vector de expresión pMAL-c2E.	24
Figura 6: <i>Screening</i> de alto rendimiento.....	41
Figura 7: Electroforesis del producto de amplificación de ADN mediante <i>Elongasa</i>	43
Figura 8: Electroforesis de PCR de colonias.	44
Figura 9: Electroforesis del producto de digestión del vector pGEM-T Easy más el inserto.....	45
Figura 10: Electroforesis de PCR de colonias.	46

Figura 11: Electroforesis de PCR de colonias.	47
Figura 12: Análisis electroforético de la expresión y purificación de la lipasa mediante el sistema pMAL-c2E.	48
Figura 13: Curvas de progreso de la lipasa 2-17 a diferentes concentraciones de sustrato.	49
Figura 14: Gráfica de Lineweaver-Burk de la lipasa 2-17.....	50
Figura 15: Curva de progreso de la lipasa 2-17 a temperatura ambiente.....	51
Figura 16: Variabilidad de ensayo de actividad de la lipasa 2-17	54
Figura 17: Perfil de actividad de mutantes obtenidos a partir de genoteca construida con diferentes concentraciones de ADN molde.....	56
Figura 18: Perfil de actividad de mutantes obtenidos a partir de genoteca construida mediante PCR propenso a error.	57



LISTA DE ABREVIATURAS

1Kpb	Marcador de peso molecular 1Kbp
100bp	Marcador de peso molecular 100bp
Amp	Ampicilina
Aa	Aminoácidos
BSA	Seroalbúmina de bovino
CIBYB	Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología
dNTPs	Deoxiribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Etilendiaminotetraacetato ácido
\bar{g}	Fuerza de gravedad
g	Gramo
Ori	Origen de Replicación
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IPTG	Isopropil tio- β -D-galactósido
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
MBP	Proteína de unión a Maltosa
MCS	Sitio Múltiple de Clonamiento
min	Minutos
mL	Mililitros
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>p</i> -NFC	Para-nitrofenil caprato
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
U	Unidad enzimática
μ F	Microfaradios
UV	Radiación ultravioleta
V	Voltio
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Las nuevas industrias han incorporado el uso de enzimas psicrófilas dentro de sus procesos de producción, lo que les ha permitido reducir tanto el consumo de sustratos como la producción de compuestos tóxicos, además de ahorrar energía, permitiendo una disminución de costos e impacto ambiental y por ello un aumento en la rentabilidad del proceso. Estas enzimas tienen un alto potencial a nivel industrial biotecnológico, y dentro de éstas, las lipasas son foco de atención dada su alta capacidad de sintetizar e hidrolizar enlaces ésteres y su exquisita selectividad de sustratos. Sus aplicaciones involucran la producción de alimentos, detergentes, fármacos, cosméticos, síntesis de compuestos químicos como biopolímeros y agroquímicos y su uso como biosensores, entre otras.

En este trabajo, el gen de la lipasa 2-17 adaptada a bajas temperaturas fue clonado en el vector de clonamiento pGEM-T Easy para luego ser incorporado al vector de expresión pMAL-c2E e integrado exitosamente en las cepas *E. coli* BL21(D3E) y TB1. Se seleccionó un clon que posteriormente fue inducido con IPTG 0,3 mM para expresar la proteína lipasa recombinante, obteniéndose una proteína de fusión soluble de aproximadamente 90 kDa, consistente con la suma de la lipasa de 47 kDa y de MBP de 43 kDa y que presentó actividad lipolítica una vez purificada. Mediante ensayos en medio líquido con el sustrato p-nitrofenil caprato se determinó que el valor de K_m de esta enzima es de 9,75 mM.

Esta lipasa de fusión recombinante se utilizó para desarrollar métodos de evolución dirigida. Para ello fue necesario optimizar el proceso de *screening*, desarrollar un

método para la detección de actividad en medio líquido y adaptar la técnica mutagénica de PCR propenso a error para la lipasa. El protocolo seleccionado fue utilizando medio TB, a una temperatura de incubación de 18 °C durante 16 horas, con una concentración de IPTG de 0,5 mM en volumen de cultivo de 600 µL. El coeficiente de variabilidad obtenido para estas condiciones fue de 7,55 %, considerado adecuado dentro del rango utilizado en la práctica. Se determinó que las condiciones de PCR propenso a error con una concentración de magnesio de 7 mM y una concentración de ADN molde de 0,05 ng/ µL, generaron una tasa mutagénica adecuada, inactivando cerca del 50% de los clones. Se desarrolló una ronda de PCR propenso a error con el fin de obtener clones de la enzima que presenten actividad mejorada. Finalmente, se analizaron 400 clones en el primer ciclo y se obtuvieron 20 posibles clones positivos. Para seleccionar los mejores, se realizó un nuevo *screening* solo con los clones seleccionados y a partir de ellos se escogieron dos variantes. Éstos fueron secuenciados y serán analizados posteriormente. El mejor variante será caracterizado y podría ser seleccionado como molde para las siguientes rondas de mutagénesis.

ABSTRACT

Novel industries have incorporated the use of psychrophilic enzymes within their processes of production, which has allowed reduction in the consumption of substrates and the production of toxic compounds, besides saving energy, allowing a decrease of costs and environmental impact therefore an increase in the process yield. These enzymes have a high potential for the biotechnology industry, and within these, lipases are the center of attention due to their high capacity to synthesize and to hydrolyze esters bonds and their high selectivity for substrates. Their applications involve food production, detergents, drugs, cosmetics, synthesis of chemical compounds such as biopolymers and agro-chemicals, and their use as biosensors, among many others.

In this work, the cold-active lipase 2-17 gene was cloned into the pGEM-T Easy vector system and afterwards incorporated into the pMAL-c2E expression vector and integrated successfully into *E. coli* BL21 (D3E) and TB1 strains. From these, one clone was selected and induced with IPTG 0.3 mM to express the recombinant protein lipase, obtaining a soluble fusion protein of approximately 90 kDa, consistent with the sum of the 47 kDa lipase and 43 kDa MBP which, once purified, presented lipolytic activity. Using tests in liquid medium with the p-nitrophenyl caprate substrate, it was determined that the value of K_m of this enzyme is 9.75 mM.

This recombinant fusion lipase was used to develop methods of directed evolution. To do so, previous work was necessary, during which the screening process was optimized, a method for activity detection in liquid medium was developed and a mutagenic

technique of error-prone PCR for the lipase was adapted. The selected protocol used TB medium, incubation at 18 °C for 16 hours, a concentration of IPTG of 0.5 mM in a culture volume of 600 μ L. The variability coefficient obtained from these conditions was 7.55 %, and it is considered suitable for the rank used in the actually. It was determined that error-prone PCR with a 7 mM magnesium and 0.05 η g/ μ L DNA generated a suitable mutagenic frequency, inactivating near 50% of the clones. One round of error-prone PCR was developed with the purpose of obtaining clones with the gene encoding for the enzyme with improved activity. Finally, 400 clones were analyzed in the first cycle and 20 possible positive clones were obtained. In order to select the best clones, a new screening with only the selected clones was performed, and from these two clones were chosen. Theirs sequences were obtained and will be analyzed in the future. The best clone will be characterized and selected to be used as template in the next generation.

1 INTRODUCCION

1.1 Enzimas Industriales

Las enzimas tienen un papel importante como catalizadores debido a su alto número de recambio y a sus refinados niveles de selectividad, y la utilización de éstas ha llevado a mejorar procesos y productos a nivel industrial. Hasta hace poco tiempo, la biodisponibilidad comercial de muchas enzimas era un factor que limitaba su uso, particularmente fuera de laboratorios especializados, pero hoy en día gracias a la expresión de genes foráneos en organismos como *Escherichia coli*, la manipulación de estos genes ha llegado a ser una técnica rutinaria, que ha asegurado que muchas más enzimas estén realmente disponibles y en cantidades suficientes para su estudio.

Por otra parte un gran número de genomas microbianos han sido secuenciados, lo que ha permitido conocer ciertos genes y con ello, conocer muchas enzimas de interés industrial, y junto con técnicas de mutagénesis que optimizan estas enzimas, ha crecido perceptiblemente la gama de enzimas que pueden ser usadas para aplicaciones industriales. Es así, como enzimas nativas con baja especificidad a un sustrato, pobre estabilidad o insuficiente selectividad para una producción rentable, son actualmente modificadas y utilizadas para la producción en muchas áreas industriales como alimentos, empresas textiles, síntesis de químicos, biosensores y detergentes entre muchas otras.

1.2 Condiciones extremas y enzimas adaptadas a bajas temperaturas

La gran diversidad de condiciones climáticas en conjunto con diversos factores geográficos origina una variedad de ambientes, muchos de los cuales resultan inhóspitos e incluso extremos para los seres humanos y, sin embargo, se encuentran colonizados por un sinnúmero de organismos. La mayor parte de estos organismos son considerados extremófilos, es decir, organismos capaces de habitar ambientes extremos, y corresponden mayoritariamente a procariontes. Los microorganismos extremófilos que habitan lugares de altas temperaturas son llamados termófilos y para los que viven en zonas de bajas temperaturas criófilos o psicrófilos (Jaenicke & Závodszy, 1990; Jaenicke, 1991; Jaenicke, 1998; Hough y col., 1999).

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes para la vida y dentro de las diferentes condiciones de temperatura, los ambientes fríos están ampliamente distribuidos (Russell y col., 1998; Cavicchioli & Thomas, 2000). Se piensa que cerca de un 85% de la biosfera terrestre experimenta temperaturas menores a los 5°C, ocurriendo esto en continentes Ártico y Antártico, regiones montañosas y agua marina que cubre un 70% de la superficie (Gerday y col., 1997; Sellek & Chaudhuri, 1999).

Estos microorganismos que habitan ambientes extremos, deben llevar a cabo procesos celulares que han sido adaptados para su crecimiento y sobrevivencia a estas bajas temperaturas. Todos los componentes de la membrana celular y de sistemas de transporte de solutos intracelulares, ácidos nucleicos y proteínas deben ser adaptados convenientemente. Otros procesos celulares fundamentales como el metabolismo,

replicación, transcripción y traducción de proteínas deben también estar diseñados para soportar el frío. Además, estos microorganismos han desarrollado la capacidad de impedir la formación de estructuras cristalinas de agua intracelular (Cavicchioli y col., 2002).

Estas bacterias, acostumbradas a vivir bajo estas condiciones, cuentan con un sistema enzimático que trabaja en frío. Es así como una de las estrategias de tolerancia y adaptación al frío más ampliamente utilizada entre los diferentes organismos, es la modificación de los parámetros cinéticos, principalmente de aquellas enzimas fundamentales en las vías metabólicas. Otro mecanismo de adaptación es la síntesis de nuevas enzimas o isoenzimas que se encuentran activas a bajas temperaturas, la síntesis de enzimas chaperonas que ayudan en el plegamiento de otras enzimas, una disminución en la tasa de degradación de proteínas que participan en las principales rutas metabólicas y en algunos casos un decrecimiento de la tasa metabólica (Arpigny y col., 1997; Feller & Gerday, 1997; Gianese y col., 2001).

Además, las enzimas que se han ido adaptando al frío presentan temperaturas óptimas desplazadas cerca de los 15°C y termolabilidad a temperaturas moderadas, entre 20°C y 60°C (Gerday y col., 1997; Feller & Gerday, 2003; Russel, 2000). Es así como muchos de los organismos adaptados a bajas temperaturas han desarrollado diversos mecanismos para sobrevivir bajo estas condiciones extremas.

1.3 Lipasas y sus aplicaciones industriales

Las enzimas lipolíticas como lipasas, carboxilesterasas, y fosfolipasas participan en la degradación de diferentes tipos de lípidos. Las lipasas en particular catalizan la

hidrólisis de triacilgliceroles de cadena larga (Pleiss y col., 1998; Fojan y col., 2002). Todas estas enzimas son fundamentales para el funcionamiento de los organismos tanto procariontes como eucariontes y su importancia se ve reflejada en las miles de publicaciones que aparecen cada año y en la versatilidad biotecnológica de estas enzimas dado su potencial para catalizar la degradación de lípidos. Dentro de las diferentes enzimas lipolíticas, las lipasas hoy en día, representan una gran parte de las enzimas utilizadas a nivel industrial dadas sus múltiples aplicaciones en diversas áreas.

Una lipasa (triacilglicerol acilhidrolasas, E.C.3.1.1.3) es una enzima que bajo ciertas condiciones acuosas, es capaz de liberar ácidos grasos a partir de triacilgliceroles, diacilgliceroles y monoacilgliceroles (Villeneuve y col., 2000; Jaeger Eggert, 2002). Su mecanismo de lipólisis consiste en la acción sobre los enlaces ésteres que se encuentran presentes en los acilgliceroles liberando ácidos grasos y glicerol (Figura 1).

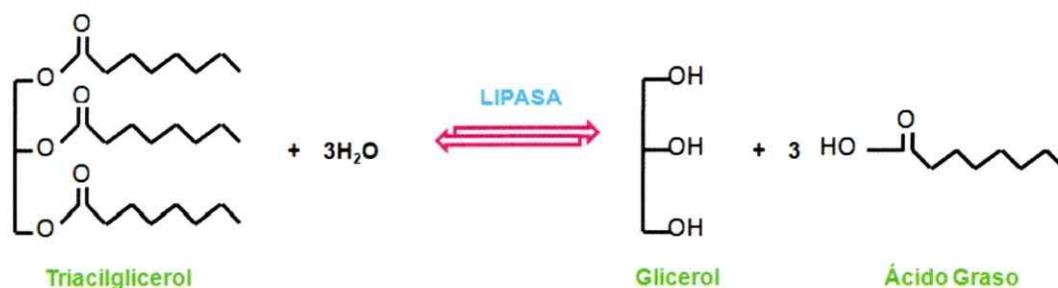


Figura 1 : Reacción enzimática de una lipasa. Hidrólisis de un triacilglicerol catalizada por una lipasa, resultando en la liberación ácidos grasos y glicerol como productos (Modificado de Villeneuve y col., 2000).

Sus principales sustratos son triacilgliceroles de cadena larga que presentan baja solubilidad en agua, por ejemplo, acilgliceroles con cadenas de 10 ó más átomos de carbono (Jaeger y col., 1999; Villeneuve y col., 2000).

Las lipasas están ampliamente distribuidas en diversos animales, plantas y microorganismos, pero las lipasas microbianas son centro de atención debido a su enorme potencial en una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas (Jaeger y col., 1999), y además los microorganismos como bacterias, hongos y levaduras son las principales fuentes de estas enzimas.

La clasificación de lipasas ha sido determinada de muchas maneras, siendo la más utilizada, el alineamiento de secuencias. Las secuencias de lipasas microbianas y de hidrolasas homologas son tomadas desde bases de datos, y para la clasificación a nivel de superfamilias se incluyen todas las secuencias encontradas por iteraciones mediante la herramienta BLAST para una secuencia molde. Luego se subclasifican en familias mediante alineamientos de múltiple secuencias de las familias homólogas. Con ello, se logró establecer la existencia de 6 familias diferentes, entre las cuales, la familia IV, o grupo HSL (Hormone Sensitive Lipase, dada su gran similitud estructural con lipasas sensibles a hormonas de mamíferos), corresponde a las lipasas adaptadas a bajas temperaturas. (Jaeger y col., 1999; Kanaya y col., 1998; Arpigny & Jaeger, 1999).

Adicionalmente, para determinar que una enzima lipolítica corresponda a una lipasa verdadera se consideran dos factores (i) la presencia de una cadena polipeptídica que actúa como tapa bloqueando el sitio activo, y (ii) por la activación e inactivación de la enzima dependiendo del solvente en el que se encuentra. A medida que el sustrato aciltriglicérido forma una emulsión, la enzima sufre un cambio conformacional y la tapa deja expuesto el sitio activo permitiendo el contacto con el sustrato. Cuando la lipasa no se encuentra en un solvente lipídico, esta cadena polipeptídica bloquea el sitio activo dejándolo inaccesible al sustrato (Jaeger y col., 1999; Brzozowski y col., 1990).

A pesar de su complejo mecanismo de acción, la capacidad de ser quimiosselectivas (preferencia por un grupo funcional), regioselectivas (preferencia para romper o crear un enlace determinado) y estereoselectivas (formación de un esteroisómero en particular) (Santaniello y col., 1992, 1993; Schoffers y col., 1996; Jaeger & Eggert, 2002), ha dado pie a que las lipasas sean altamente utilizadas como catalizadores en procesos químicos e industriales y al gran número de aplicaciones industriales con las que hoy se cuenta (Macrae, 1983; Sharma y col., 2001). Dentro de las principales aplicaciones industriales están:

- La industria de detergentes: En la hidrólisis de aceites necesarios para la producción de jabones, mejorando la calidad de éstos. Además muchas lipasas son adicionadas a detergentes junto a otras enzimas que en conjunto catalizan el rompimiento de enlaces químicos con la adición de agua (Jaeger y col., 1999).
- La industria farmacéutica: La esterificación es utilizada en la resolución de mezclas racémicas usadas para la síntesis de productos farmacéuticos, y en la preparación de algunos productos en el área cosmética, además de componentes terapéuticos, agroquímicos y saborizantes (Jaeger & Eggert, 2002).
- La industria de alimentos: La interesterificación es utilizada en el mejoramiento de las propiedades físicas de lácteos como quesos y mantequillas, mejorando el proceso químico tradicional de su elaboración. (Pandey y col., 1999).
- La industria agrícola: Utilizada en la elaboración de pesticidas.

Hoy en día el número de aplicaciones industriales de las lipasas ha ido en aumento, ampliando su utilidad a nuevas áreas como la producción de biodisel, cuero y la elaboración de biosensores (Jaeger & Eggert, 2002).

1.4 Estructura y mecanismo de acción de las lipasas

Los triacilglicerolos son lípidos no cargados formados por una molécula de glicerol, que tiene esterificados sus tres grupos hidroxilo por tres ácidos grasos saturados o insaturados, y aunque los ácidos grasos de cadena corta son levemente solubles en agua, los compuestos con ácidos grasos de cadena larga esterificados a glicerol son insolubles (Gupta y col., 2004).

La actividad de una lipasa depende de la presencia de un solvente lipídico y es por ello que se definió una lipasa como “una carboxilesterasa que actúa en la emulsión de sustratos”. Sarda y Desnuelle (Sarda & Desnuelle, 1958) demostraron cuantitativamente que la lipasa pancreática exhibía muy poca actividad cuando el sustrato, la triacetina (triacilglicerol constituido por ácidos grasos de cadena corta) estaba perfectamente solubilizado. Sin embargo cuando se utilizaban concentraciones de triacetina por encima de su límite de solubilidad, se formaban emulsiones que eran hidrolizadas por la lipasa de una forma más eficiente.

Este fenómeno de catálisis de una reacción heterogénea es único de las lipasas e involucra una activación interfacial, es decir, un incremento en la actividad enzimática cuando la solubilidad del sustrato se excede y aparecen las fases lípido-acuosa. Esta propiedad trató ser explicada cuando fue dilucidada la primera estructura 3D de una lipasa. Se encontró que el sitio activo de la lipasa está cubierto por una cadena

polipeptídica que actúa como tapa, la cual deja inaccesible el sitio activo para moléculas de sustrato (Winkler y col., 1990; Brady y col., 1990). Sin embargo, en la mayoría de los casos, cuando una lipasa se encuentra en las fases lípido-acuosa, un cambio conformacional toma lugar, causando que la tapa sea movida fuera y el sitio activo de la lipasa queda completamente accesible, permitiendo la hidrólisis del sustrato (Van Tilbeurgh y col., 1993; Sarda & Desnuelle, 1958). A comienzos de los años 90, gracias a la elucidación de nuevas estructuras tridimensionales que permitieron obtener numerosos datos bioquímicos y cinéticos de las lipasas, se planteó la hipótesis de que no todas estas enzimas presentaban el fenómeno de activación interfacial, y que la presencia de la tapa polipeptídica no estaba necesariamente correlacionada con dicha activación. Hoy en día esta hipótesis sigue en estudio, pero aun no es claro cual es el real mecanismo que permite la activación de las lipasas.

Estructura de las lipasas:

Las lipasas microbianas son extensamente utilizadas para catalizar reacciones de hidrólisis, alcoholisis, esterificación y transesterificación de triacilgliceroles y de otros ésteres insolubles en agua ya que presentan una amplia especificidad de sustrato.

A pesar de que muchas lipasas catalizan las mismas reacciones, al mirar sus secuencias es posible observar que éstas varían ampliamente, sin embargo, todas conservan un pentapéptido, el motivo GxSxG, donde el nucleófilo es siempre una serina. Este motivo forma un doblez tipo γ entre la lámina β_5 y la α hélice siguiente, lo que forma la estructura más conservada del llamado plegamiento α/β hidrolasa (Figura 2), muy característico de las lipasas (Pleiss y col., 2000). La maquinaria catalítica de las enzimas con este tipo de plegamiento está formado por una triada catalítica, que

corresponde a tres residuos ubicados bajo una geometría muy conservada en los *loops* y en el sitio de la hoja β . Así, un residuo nucleófilo que suele ser una serina, un residuo catalítico comúnmente aspartato o glutamato y finalmente un residuo de histidina forman la triada (Jaeger y col., 1999). La histidina catalítica se ubica en un *loop* (de largo y conformación variable) justo después de la hebra β_8 del plegamiento α/β hidrolasa. (Fischer & Pleiss, 2003).

La estructura α/β hidrolasa está conformada por ocho hebras β centrales entre las cuales siete se encuentran ubicadas de forma paralela, mientras que solo una (β_2), de manera antiparalela. Las hebras β conforman una estructura semicilíndrica (Figura2).

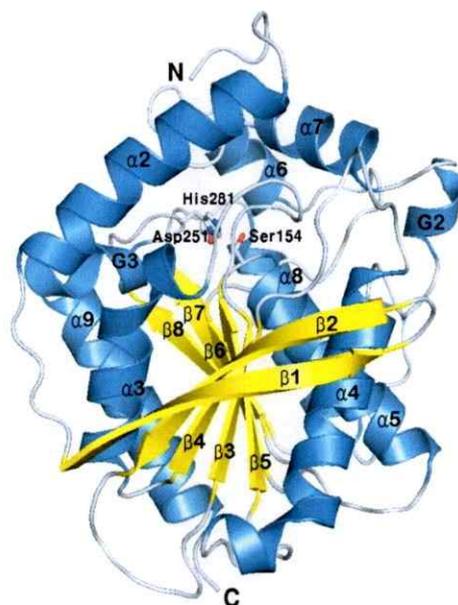


Figura 2: Estructura tridimensional de una esterasa con un clásico plegamiento de α/β -hidrolasa. Las α hélices y las hebras β son mostradas en azul y amarillo, respectivamente. La triada catalítica conformada por serina, aspartato e histidina se exhibe a través de las abreviaciones Ser154, Asp251 e His281. N y C denotan amino y carboxilo terminal, respectivamente (Byun y col., 2007).

Las estructuras β_1 y β_2 se encuentran unidas directamente y de manera continua. La hebra β_2 se une con la β_3 pero de manera interrumpida por la hebra β_4 , que a su vez está conectada con la β_3 mediante una α hélice. La hebra β_4 se conecta a través de una α hélice con la β_5 (Figura 3). Este patrón se repite hasta la última hebra β , y la estructura finaliza con una α hélice que contiene el carboxilo terminal (Gupta y col., 2004).

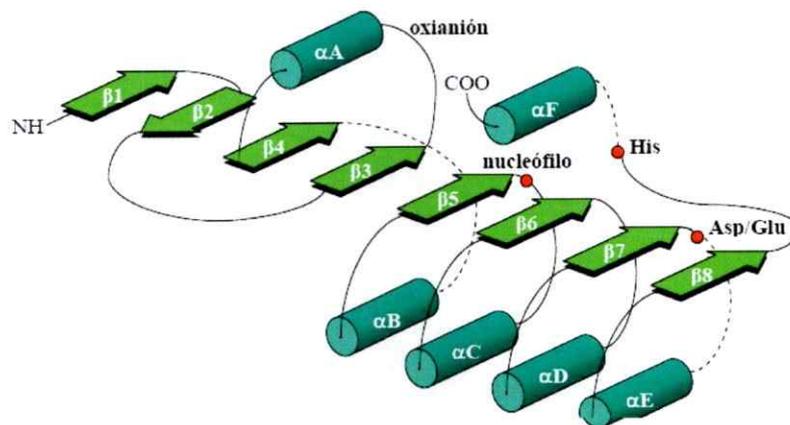


Figura 3: Diagrama del plegamiento α/β -hidrolasa. Las hebras β están representadas por flechas verdes mientras que las α hélices lo están por cilindros de color azul. Las líneas discontinuas indican la localización de posibles inserciones. Los círculos rojos representan la ubicación de los residuos de serina, cisteína o aspartato (nucleófilo) ubicados posterior a la hebra β_5 , el residuo catalítico aspartato o glutamato situado generalmente a continuación de la hebra β_7 y el residuo de histidina altamente conservado ubicado a continuación de la última hebra β . (Jaeger y col., 1999).

Asociado al sitio activo se encuentra la cavidad oxianiónica que está formada por parte de la cadena polipeptídica, específicamente un residuo situado en la región N-terminal y un residuo en la región C-terminal próximo al residuo nucleofílico catalítico (Jaeger y col., 1999; Pleiss y col., 2000). El residuo de la cavidad oxianiónica que se encuentra próximo al nucleófilo es estructuralmente conservado y puede formar parte de dos secuencias consenso (Pleiss y col., 2000). Es importante considerar que las lipasas

se diferencian entre sí en la posición de las α hélice como también de los *loops* que entran en contacto con el sitio activo (Nardini & Dijkstra, 1999).

Por otra parte, el mecanismo catalítico se ve favorecido por la presencia de bolsillos en el sitio activo, que acomodan las cadenas acilo de sus sustratos. Estas hendiduras son denominadas *sn-1*, *sn-2*, *sn-3*. Así, la preferencia por el sustrato está determinada por el carácter hidrofóbico y el tamaño de los bolsillos (Jaeger y col., 1999).

Catálisis y especificidad de la lipasa al sustrato:

El mecanismo de catálisis se inicia en un primer paso, cuando el sustrato interactúa con el residuo nucleofílico del sitio activo, formándose un intermediario tetraédrico transitorio, que es estabilizado por los residuos de la cavidad oxianiónica, la histidina y el residuo ácido del sitio activo. La transferencia de un protón por parte de la histidina produce la liberación del alcohol y la formación de un intermediario covalente. Luego, el ataque de un nucleófilo, como agua en una reacción de hidrólisis, alcohol o éster en reacciones de transesterificación, forma nuevamente un intermediario tetraédrico. Así, la transferencia de un protón lleva a la formación de producto, ácido o éster, y a la regeneración de la lipasa (Jaeger y col., 1999).

Sistemas de ensayos para determinar la actividad lipolítica:

Hoy en día un gran número de ensayos para detectar la actividad lipolítica de las lipasas han sido desarrollados dependiendo de los sustratos que utilicen, existiendo diferentes formas para detectar esta actividad lipolítica, por ejemplo, mediante espectrofotometría, fluorimetría, y colorimetría, entre otros. Además muchas veces es

necesario adaptar estos ensayos a las condiciones y necesidades particulares de la lipasa o enzima lipolítica en cuestión.

Factores que afectan la producción de lipasas recombinantes:

Una enorme variedad de condiciones han sido descritas a la hora de determinar los factores que afectan la productividad de enzimas lipolíticas en diversos sistemas de expresión. Ciertas concentraciones de metales, carbono y fuentes de energía podrían afectar la producción de la enzima. Además, muchas lipasas no son exportadas fuera de la célula, sino que más bien permanecen en el citoplasma, por lo que se dificulta aún más su producción. Es importante considerar que ciertas bacterias cuentan con proteínas chaperonas que están codificadas río abajo de los genes estructurales de la lipasa, y cuya misión es ayudar en el plegamiento apropiado de la enzima para alcanzar su conformación nativa (Hobson y col., 1993).

Es por ello que gran parte de los estudios descritos tratan de establecer cómo definir condiciones óptimas para la producción de lipasas recombinantes.

1.5 Aplicaciones de enzimas adaptadas al frío

Las bacterias criofílicas están acostumbradas a vivir bajo condiciones de muy bajas temperaturas, por lo que cuentan con un sistema enzimático que trabaja en frío el cual es responsable de su adaptación. Así, los genes que codifican estas enzimas, son cada vez más estudiados y más aplicaciones están siendo atribuidas a ellas. Dentro de las principales aplicaciones industriales de las enzimas adaptadas al frío, se encuentran i) la industria textil con procesos como pulido biológico ii) la industria de detergentes en la cual la incorporación de estas enzimas criofílicas podría disminuir el consumo

energético iii) la industria alimenticia, principalmente lácteos, jugos, carnes, cerveza y vinos iv) la industria química, en la cual estas enzimas median procesos que involucran reactivos y productos sensibles a temperaturas v) en biotecnología permitiendo procesos como biorremediación de lugares con condiciones extremas, la inactivación de productos fundamentales en áreas como biología molecular que utilicen otras enzimas, y la elaboración de biosensores vi) y finalmente en la industria farmacéutica para la preparación de productos de cosmetología y medicamentos (Cavicchioli y col., 2002).

1.6 Optimización de enzimas

El interés por modificar la funcionalidad de las proteínas, o incluso crear funciones nuevas en una enzima, ha tomado cada vez más fuerza debido al gran número de aplicaciones industriales que requieren de enzimas como biocatalizadores, y que muchas veces deben presentar condiciones extremas, como eficiencia a muy bajas o muy altas temperaturas y pHs, tolerar agentes denaturantes u otros productos químicos y trabajar en la ausencia de ligandos y proteínas accesorias.

Además estas enzimas deben ser estables y estar adaptadas para las condiciones de trabajo industrial, sin dejar de lado su alta actividad específica y su especificidad por un sustrato dado, además de formar el producto deseado en los más altos niveles posibles, sin producir con ello compuestos tóxicos que pudiesen ser nocivos para la célula. Esto considerando que deben ser fáciles de producir y a bajo costo para que los procesos sean rentables.

Es así como la ingeniería de proteínas hoy en día ha permitido realizar un gran salto en la modificación de enzimas que tienen potencial industrial y, mediante los

procesos de ingeniería racional de proteínas y evolución dirigida, muchas enzimas con potencial industrial han sido optimizadas.

1.7 Evolución dirigida

A menudo las enzimas de uso industrial no presentan la especificidad por el sustrato deseada, exhiben una pobre estabilidad o no son lo suficientemente selectivas para llevar a cabo la producción rentable de algún producto químico en particular o de algún intermediario. En solución a esto, la técnica de evolución dirigida ha emergido como una herramienta de gran alcance para mejorar catalizadores presentes en la naturaleza haciéndolos más convenientes como biocatalizadores industriales.

Nuevos acercamientos en diversas áreas de investigación animaron la amplia aceptación de evolución dirigida como una técnica eficiente para la modificación de enzimas, ya que fue diseñada como una herramienta para generar de manera azarosa nuevas enzimas con características mejoradas para su uso como biocatalizadores, aumentando por ejemplo, la actividad o la termoestabilidad enzimática (Arnold y col., 2001).

Recientes ejemplos de aplicaciones de evolución dirigida para el mejoramiento de lipasas y esterases incluyen la alteración de la especificidad de sustratos de estas enzimas. Bornscheuer y col, (1998) lograron mejorar la especificidad de una esterasa de *Pseudomonas*, aumentando hasta 4 veces sus especificidad. Por otro lado, la técnica de evolución dirigida ha sido una eficiente herramienta para mejorar la actividad de fosfolipasas obtenidas a partir de organismos como *Bacillus thermocatenulatus*

(Kauffmann, & Schmidt-Dannert, 2001) y *Staphylococcus hyicus* (Van Kampen & Egmond, 2000).

La evolución dirigida es una técnica que se basa en la introducción de mutaciones aleatorias y/o recombinaciones en la proteína bajo estudio, produciendo diversidad en un gen, basándose en las propiedades que se desea introducir si es que no se encuentran presentes en la proteína de interés o mejorándolas, si es que lo están. Por lo tanto, se seleccionan los genes codificantes para las proteínas patrones (que serán utilizadas como molde) y tras varias rondas de mutación y selección, se da a lugar finalmente a una colección de proteínas modificadas entre las cuales se espera encontrar alguna que presente las características deseadas, por ejemplo, una enzima que exhiba un incremento en su actividad (Zhao & Arnold, 1999).

Es así como la evolución dirigida combina algunos métodos para la generación al azar de bibliotecas genéticas y estrategias para la selección de variantes de una enzima que posean características específicas, especialmente actividad catalítica creciente, un aumento en la selectividad o una estabilidad mejorada.

Etapas de evolución dirigida:

La evolución dirigida se divide principalmente en 3 etapas, la generación de la diversidad genética, la expresión de las variantes obtenidas y la selección de las proteínas con las características deseadas.

La primera etapa consiste en elaborar una genoteca con variantes del gen inicial, es decir, del gen que se desea mejorar. Una de las formas más utilizadas para la generación de mutantes es mediante PCR propenso a error (Cadwell & Joyce, 1992). Esta técnica introduce errores al azar en el proceso de amplificación, produciendo imperfecciones y

así, mutaciones. Estas mutaciones son provocadas debido a condiciones de reacciones poco apropiadas para el trabajo de amplificación de la enzima *ADN Taq polimerasa*. Dentro de los principales factores que modulan la frecuencia mutagénica se encuentran (i) el uso de análogos de dNTPs como 2-amino purina o 5-bromo uridina, (ii) el desbalance en las concentraciones de dNTPs agregados, ya que al agregar uno en mayor proporción es utilizado en mayor frecuencia por la enzima (iii) la incorporación de Mn^{+2} ya que actúa enmascarando a los nucleótidos provocando errores en la formación de nuevas cadenas (iv) el aumento en la concentración de Mg^{+2} en la mezcla de reacción, lo que permite estabilizar pares de nucleótidos que no son complementarios y (v) el uso de factores que aumenten la amplificación a partir de nuevas hebras, por ejemplo, disminuyendo las concentraciones de ADN molde o aumentando el número de ciclos (Cadwell & Joyce, 1992). Mediante la variación de estas condiciones de reacción, se puede manejar la tasa mutagénica producida en la secuencia blanco, para que no presente muchas mutaciones, lo que provoca la pérdida de la actividad, ni muy pocas, con lo cual muchos clones no serían mutantes, aumentando el número de clones que deben ser analizados.

La segunda etapa consiste en la expresión de los genes codificantes para las proteínas que se desean obtener, para lo cual es fundamental la elección de un sistema de expresión (vector de expresión y hospedero) adecuado a las características de la proteína, teniendo en cuenta la solubilidad, la localización celular de la proteína como también la adquisición de una nueva propiedad (cola de His o formación de proteína de fusión) para su posterior purificación. En esta etapa, los clones son crecidos hasta fase

exponencial y la inducción de la proteína recombinante dependerá del sistema de expresión escogido.

Para proteínas que no son exportadas al medio extracelular, es recomendable idear alguna estrategia para lisar la célula y así poder ver la expresión de la proteína en el medio.

Finalmente en la tercera etapa se realiza una selección de los clones que expresen las proteínas con las características deseadas. Esta tarea puede realizarse mediante selección *in vivo* o detección *in vitro* a través la formación de productos coloreados que pueden ser detectados por fluorescencia o colorimetría (Rellos & Scopes, 1994).

La técnica mutagénica PCR propenso a error ha sido ampliamente utilizada para mejorar actividad y estabilidad enzimática a altas temperaturas. Huimin Zao y Frances H. Arnold (1999), lograron aumentar la termoestabilidad de una subtilisina mediante evolución dirigida. Las mutaciones fueron producidas utilizando PCR propenso a error y el proceso de *screening* requirió de un ensayo de actividad residual, que consistió en calentar la enzima a cierta temperatura por un determinado tiempo, y posteriormente realizar el ensayo de actividad. El cociente entre la actividad de la enzima calentada y la actividad de la enzima sin calentar, correspondió entonces, a la actividad residual. Los variantes con mejores resultados fueron seleccionados obteniendo un aumento en la vida media de la enzima tratada a 65 °C de hasta 200 veces. Por otro lado, Huang (2008) logró aumentar hasta 6 veces la actividad de una lipasa de *Bacillus pumilus* mediante PCR propenso a error, mientras que Ningyan Zhang (2003) aumentó la termoestabilidad de una lipasa de *Candida antártica* utilizando la misma técnica. Ningyan obtuvo

mutantes que presentaron un aumento de hasta 20 veces en la vida media de la enzima expuesta a 70°C.

Actualmente el protocolo de evolución dirigida incorpora el método de *DNA shuffling* como parte del proceso mutagénico principal (Stemmer, 1994). Así, los genes que codifican para enzimas con características mejoradas, son fragmentados al azar y utilizados en un PCR donde actúan como moldes sobre otros fragmentos convirtiéndose en la plantilla para la generación siguiente (Moore y col., 1997). Usualmente se realizan varias rondas de mutaciones mediante PCR propenso a error y una vez seleccionados los mutantes con las características mejoradas se proceden a recombinar los genes nuevamente mediante la técnica de *DNA shuffling* y se seleccionan los mutantes que presentan un resultado aún mejor.

Es claro que la evolución dirigida ha tenido, en un corto período de tiempo, un significativo impacto en el campo de la biocatálisis. La lista de enzimas que están sujetas a su optimización continúa ampliándose y es claramente posible optimizar la actividad y la selectividad de estas enzimas.

1.8 Elaboración y optimización del proceso de *screening*

En general el concepto de evolución dirigida depende de la disponibilidad de sistemas que permitan identificar variantes interesantes de enzimas dentro de toda diversidad genética generada artificialmente. Un prerequisite para realizar evolución dirigida, dado el alto número de variantes que deben ser analizados, es que estos sistemas permitan la detección de características específicas de la enzima, por ejemplo actividad enzimática, en pequeñas escalas de cultivos y en condiciones de procesamiento

de alto rendimiento (Salazar & Sun, 2003). Es por ello, que dentro de las etapas de generación de la diversidad molecular y la selección de las secuencias mutantes que realizan la función deseada en la proteína, el proceso de selección es considerado mucho más desafiante. Sin una efectiva estrategia de *screening*, la habilidad para aislar exitosamente los clones es severamente disminuida. Así, un buen proceso de *screening* debe considerar i) un alto rendimiento en el procesamiento para incrementar la probabilidad de encontrar clones favorables, ii) que sea suficientemente sensible, es decir, que permita la detección de pequeños cambios en la actividad, iii) que sea altamente reproducible, para que la señal de los clones activos no sea dependiente de variantes externas difíciles de controlar, sino que sea dada por la mutación y vi) un rápido método de selección (Salazar & Sun, 2003).

Es así, como muchos autores han definido lo que hoy se conoce como “*First Law of Directed Evolution, you get what you screen for*”, que destaca la importancia de un buen sistema de *screening*. La elección correcta de un análogo de sustrato utilizado para medir la reacción, debe permitir una fácil detección de los productos de reacción pero al mismo tiempo debe entregar resultados confiables. Por ejemplo, para medir actividad y selectividad enzimática, generalmente se utilizan análogos de sustratos que generen un producto coloreado, el cual es medido a través de espectrofotometría (Salazar & Sun, 2003). Por otro lado, la termoestabilidad es medida determinando la vida media de una enzima a cierta temperatura, por lo que la enzima debe ser calentada previa a la reacción.

Otro requisito importante para un buen protocolo de *screening* es la disponibilidad de métodos que permitan automatizar el proceso. Algunos métodos incluyen sistemas de detección de alto rendimiento, basados en análisis de imágenes y softwares que permiten

seleccionar los mejores clones. Además se han desarrollado algunos métodos estadísticos y sistemas para la gestión de datos que permiten evaluar los resultados del proceso de *screening* y manejar el alto número de datos (Salazar & Sun, 2003).

Así, la técnica de evolución dirigida permite analizar muchos datos que están compuestos por una gran cantidad de variantes. Además las copias individuales pueden ser recuperadas y su actividad puede ser medida en formatos de micro placas de 96 pocillos. A pesar que el rendimiento generalmente es reducido, dado el tamaño de cada pocillo, se tiene la ventaja de que esta técnica permite una determinación cuantitativa de la actividad, además de permitir automatizar el procedimiento de *screening* o sondeo de los mutantes.

En base a lo anterior, el desarrollo de un correcto sistema de *screening* que permita seleccionar variantes del gen de una lipasa psicrófila, que presenten un aumento en la actividad lipolítica, y que además este sistema permita a futuro seleccionar otras propiedades enzimáticas como termoestabilidad o selectividad, sería un aporte a la ingeniería de proteínas y para el estudio molecular de estas enzimas.

OBJETIVO GENERAL

Clonar y expresar el gen de la lipasa psicrófila 2-17 ya caracterizada y desarrollar un sistema de *screening* que permita seleccionar clones que presenten un aumento en la actividad, obtenidos mediante evolución dirigida.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Clonar el gen que codifica para la lipasa 2-17, activa a bajas temperaturas.
- Expresar de forma recombinante el gen codificante para la lipasa 2-17 y obtener de forma pura y activa esta enzima psicrófila.
- Determinar el valor de Km de la enzima para desarrollar e implementar un ensayo de actividad en medio líquido que permita el análisis masivo de clones del gen de lipasa.
- Desarrollar y optimizar un protocolo de *screening* que permita discriminar variantes de la lipasa 2-17 que presenten una actividad lipolítica mejorada. Este protocolo debe tener un coeficiente de variabilidad suficientemente bajo, que preferentemente no supere el 10%.
- Determinar las condiciones para comenzar a desarrollar las librerías de mutantes mediante la técnica de PCR propenso a error.
- Obtener mutantes que presenten una actividad lipolítica mejorada.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales:

2.1.1 Cepas bacterianas

Tabla I: Cepas bacterianas utilizadas durante el seminario de título.

TIPO DE BACTERIA	GENOTIPO
<i>E. coli</i> cepa DH5 α	F ⁻ Φ 80dlac Δ M15 Δ (<i>lac</i> aya- <i>arg</i> F) U169 <i>rec</i> A1 <i>end</i> A1 <i>hsd</i> R178r _k ⁻ ,m _k ⁺) <i>pho</i> A <i>sup</i> E44 λ <i>thi</i> -1 <i>gyr</i> A96 <i>rel</i> A1.
<i>E. coli</i> BL21(D3E)	F ⁻ <i>omp</i> T <i>hsd</i> S _B (<i>r</i> _B ⁻ m _B ⁺) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3).
<i>E. coli</i> TB1	F ⁻ <i>ara</i> Δ (<i>lac</i> -proAB)[Φ 80dlac Δ (<i>lac</i> Z)M15] <i>rps</i> L(Str ^R) <i>thi</i> <i>hsd</i> R.

La cepa bacteriana 2-17 que se utilizó para obtener el gen de la lipasa, se aisló de la Antártica chilena en la Isla Rey Jorge, ubicada en la base aérea Frei Montalva (Lat 62° 11'S Long 58° 58'W).

2.1.2 Reactivos

Tabla II: Reactivos utilizados durante el seminario de título.

LABORATORIO	REACTIVOS
Promega (WI-USA)	Enzima de restricción <i>Hind</i> III. ADN <i>Taq</i> polimerasa, pGEM-T Easy.
Invitrogen (CA-USA)	T4 ADN ligasa, estándar de tamaño molecular 100pb y 1Kb, dNTPs, cepa <i>E. coli</i> DH5 α .
Sigma (MO-USA)	X-GAL, IPTG, goma arábica, <i>p</i> -NFC.
Fermentas	Estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas, enzima de restricción <i>Kpn</i> I.
Difco (DT- USA)	Triptona, extracto de levadura, medio LB preparado, agar.
New England Biolabs (MA-USA)	pMAL-c2E, cepa <i>E. coli</i> TB1, resina de amilasa.
Novagen, Madison (WI-USA)	<i>E. coli</i> BL21(D3E).
Qiagen	Los sistemas de purificación de productos de PCR, de ADN plasmidial y de extracción de ADN desde geles de agarosa.
Winkler	Tris, SDS, glicerol.
J.T Backer	Cloruro de sodio.
Fermelo	Agarosa.
Merk	El resto de las sales, ácidos, bases, bromuro de etidio y solventes de grado analítico o de biología molecular.

2.1.3 Vectores de clonamiento y expresión

Vector de clonamiento pGEM-T Easy:

El vector de clonamiento pGEM-T Easy se utilizó para obtener un alto número de copias de fragmentos de ADN que se amplificaron previamente. El vector pGEM-T Easy posee una timina no apareada en el extremo 3' de cada una de las hebras en el sitio de inserción lo que permite la ligación de segmentos de ADN obtenidos por PCR, que tienen una adenina en el extremo 3' de cada hebra, debido a la actividad adenil-transferasa de la ADN *Taq* polimerasa.

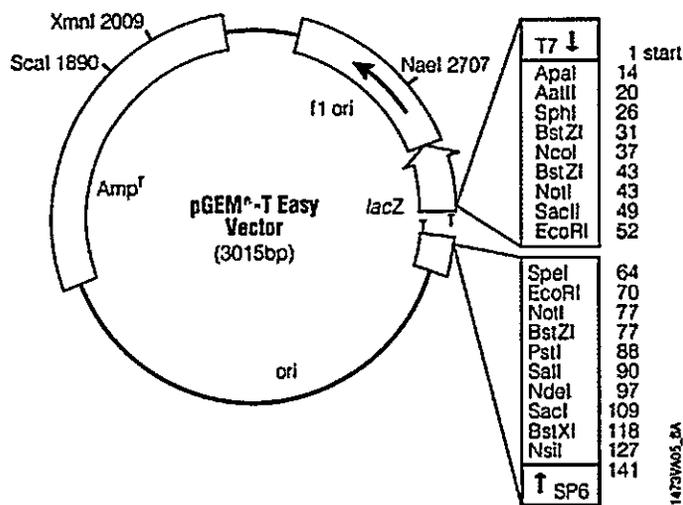


Figura 4: Vector de clonamiento pGEM-T Easy. F1 ori: ori de ADN de hebra simple derivado del bacteriófago F1. Amp^r: gen de resistencia a ampicilina. lacZ: región codificante para la β-galactosidasa interrumpida por el sitio de múltiple clonamiento (Modificado de “Sistema de Vectores pGEM-T y pGEM-T Easy” de Promega, Cat. A1380).

Vector de expresión pMAL-c2E:

Para la expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli* se utilizó el vector pMAL-c2E, en el cual el gen clonado se inserta en el sitio múltiple de clonamiento (MCS) río abajo del gen *malE*, que codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP), resultando en la expresión de una proteína de fusión a MBP. Esto permite la estabilización de la proteína y su purificación mediante cromatografía de afinidad en la cual la proteína de fusión se une a maltosa. El vector pMAL-c2E tiene una delección en la secuencia señal *malE*, lo que resulta en la expresión citoplasmática de la proteína de fusión.

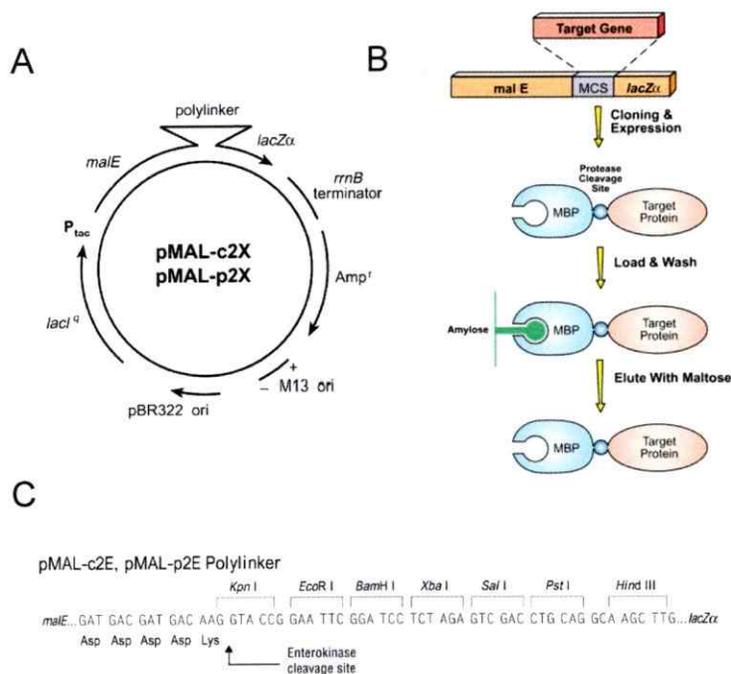


Figura 5: Vector de expresión pMAL-c2E. (A) Mapa del vector pMAL-c2X: **Ori pBR322:** ori bacteriano derivado de pBR322. **M13 ori:** Ori de ADN de hebra simple derivado del bacteriófago M13. **Amp^r:** gen de resistencia a ampicilina. **LacI:** gen que codifica para represor lac. **P_{tac}:** control del promotor híbrido tac. **LacZ:** región codificante para la β-galactosidasa interrumpida por el MCS. **malE:** secuencia codificante para la proteína MBP. (B) Esquema del clonamiento y expresión de la proteína de fusión. **malE:** secuencia codificante para la proteína de unión a maltosa (MBP). (C) Mapa del MCS del vector pMAL-c2E. La flecha indica el sitio de corte para la enzima enterocinasa (Riggs y col., 1985, Manual “Proteína de fusión pMAL y sistema de purificación” de *New England BioLabs*, Cat. WO2007/ 120809).

2.1.4 Medios de cultivo líquidos

Medio Luria-Bertani (LB)

El medio LB contiene por cada 1 L de solución: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio. El volumen se llevó a 1 L con agua Milli-Q y el pH se ajustó a 7. Se esterilizó por autoclave y almacenó a temperatura ambiente.

Medio TB

Este medio contiene por cada 1 L de solución: 12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura y 4 mL de glicerol. El volumen se llevó a 900 mL con agua Milli-Q, se esterilizó por autoclave y se agregó 100 mL de fosfato de potasio estéril 10 % pH 8,6.

Medio rico con Glucosa y Ampicilina

Por cada litro de solución el medio contiene: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio y 2 g de glucosa. El volumen se llevó a 1 L con agua Milli-Q. Se esterilizó por autoclave y antes de utilizar se le agregó ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL.

2.1.5 Medios de cultivo sólidos

Para la preparación se agregó agar al 1,5 % p/v a los medios líquidos. Los antibióticos se esterilizaron por filtración antes de ser agregados al medio de cultivo.

2.1.6 Soluciones Stock

IPTG 0,1 M

Se preparó una solución stock de IPTG 0,1 M en agua Milli-Q estéril. Se esterilizó por filtración mediante un filtro con un tamaño de poro de 0,2 μm (Sartorius, Hannover-Alemania). Se almacenó a -20 °C.

XGal 50 mg/mL

Se preparó una solución stock de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactosido (XGal) a una concentración de 50 mg/mL en N,N'- dimetil-formamida. Se almacenó a -20 °C.

Ampicilina 100 mg/mL

Se preparó una solución stock de ampicilina a una concentración de 100 mg/mL en agua Milli-Q estéril. Se esterilizó por filtración utilizando un filtro estéril con un tamaño de poro de 0,2 μm . Se almacenó a -20 °C.

2.2 Métodos:

- **Metodología utilizada para el clonamiento del gen de lipasa**

2.2.1 Cultivo de microorganismos

Crecimiento y mantención de microorganismos en medio sólido

Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3), TB1 y DH5 α stock se crecieron en placas con medio LB-agar a 37 °C durante 16 h y se mantuvieron a 4 °C por períodos menores a 30 días.

Crecimiento de cepas en cultivos líquidos

Las cepas de *E. coli* se inocularon en los medios correspondientes, suplementado con el antibiótico requerido. Se incubaron a 37 °C en un agitador orbital (MaxQ 4000, Barnstead, Lab-Line, Iowa, USA) a 200 rpm, hasta alcanzar la O.D. deseada.

2.2.2 Amplificación de ADN a través de PCR mediante Elongasa®

Para la amplificación del gen de lipasa se utilizó la enzima Elongasa®, ya que comete menos errores durante la amplificación que la ADN Taq polimerasa. Las reacciones de PCR se realizaron en tubos *Eppendorf* de 600 μ L esterilizados por autoclave.

El PCR consistió en 2 mezclas que completaban un volumen final de 50 μ L. La mezcla 1 se preparó de la siguiente forma: los partidores (presentados en la Tabla III) se agregaron en una concentración de 5 pM cada uno, 150 ng de ADN molde, 0,2 mM de cada dNTP y se completó el volumen con agua Milli-Q estéril hasta 20 μ L. La mezcla 2 consistió de: solución amortiguador A 5X y solución amortiguador B 5X para una

concentración final de Tris-SO₄ 60 mM (pH 9,1), (NH₄)₂SO₄ 18 mM y MgSO₄ 1,9 mM, 1 µL de mezcla de enzima Elongasa® y se completó el volumen con agua Milli-Q estéril hasta 30 µL. Se puso la mezcla 1 por 30 segundos a 94°C en un termociclador (termociclador PTC-100 de MJ Research, Inc., MA-USA), luego se agregó la mezcla 2 y se siguió con el programa requerido.

El programa utilizado comprendía una primera parte con 3 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 30 s a 94°C, 30 s a una temperatura de 48 °C (dada la T_m de los partidores utilizados) y una etapa de extensión de un minuto por cada kilobase de ADN que se quiera amplificar, lo que se hace a una temperatura de 68 °C, correspondiente a la temperatura óptima para la función catalítica de la Elongasa®. En una segunda parte, se realizaron 25 ciclos de amplificación, que incluían las mismas tres etapas de los primeros tres ciclos, pero con una temperatura de 59 °C para el segundo ciclo. Finalmente se calentó 5 minutos a 72 °C.

Tabla III: Partidores utilizados para la expresión del gen codificante para lipasa.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	T _m (°C)
pMALLipF	GGTACCTATTTACCAGTGCCA	54,5
pMALLipR	AAGCTTTCAGAGATTTGGCTC	53,2

2.2.3 Electroforesis de ADN

Las electroforesis de ADN se realizaron en una cámara horizontal Horizon-58 (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MA-USA). Cada muestra se mezcló en proporción 5:1 con solución amortiguador de carga 6X (glicerol 30% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v) y luego se cargaron en geles de agarosa de una concentración

ajustada al tamaño del fragmento de ADN. Éstos se hicieron a concentraciones de 1,5 % p/v para fragmentos de 1000 pb. La agarosa se preparó en solución amortiguadora TAE 1X: Tris-Acetato-EDTA (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 µg/mL. Se incluyó estándar de peso molecular de tamaño 1 Kpb y 100 pb. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 100 V (fuente de poder Model 500 de BRL Life Technologies, Inc., MD-USA). Se utilizó como solución amortiguador de corrida TAE 1X. Finalmente se observó el gel sobre un transiluminador UV y se fotografió.

2.2.4 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Con el fin de purificar fragmentos de ADN desde geles de agarosa, se cortó la banda de ADN desde gel, se colocó en un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL esterilizado por autoclave, y luego se utilizó el sistema QIAEX II Gel Extraction, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADN se eluyó en agua Milli-Q estéril a pH 8, previamente calentada a 50 °C.

2.2.5 Ligación de fragmentos de ADN a vectores de clonamiento y expresión

Ligación en el vector de clonamiento pGEM-T Easy

Para la ligación se utilizó como inserto los productos de PCR purificados desde geles de agarosa. La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 10 µL y contenía solución amortiguador de ligación 2X, 50 ng de vector pGEM-T Easy, 3,5 µL de inserto y 1 unidad de enzima T4-ADN ligasa. Se dejó ligando por 16 h a 4 °C. El

producto de ligación se utilizó para transformar células *E. coli* DH5 α electrocompetentes.

Ligación en el vector de expresión pMAL-c2E

La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 10 μ L. Consistió en una mezcla que contenía 100 ng de vector digerido con las enzimas KpnI y HindIII, 300 ng de inserto digerido con las enzimas de restricción KpnI y HindIII, solución amortiguador T4 ADN ligasa 5X (Tris/HCl 250 mM pH 7,6, MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM, polietilenglicol-8000 25 % p/v) y 1 μ L de T4 ADN ligasa. La mezcla de reacción se dejó a 16 °C por 16 h.

2.2.6 Transformación de células electrocompetentes

Para la transformación de células electrocompetentes *E. coli* BL21 (DE3), TB1 ó DH5 α se agregó 1 μ L de mezcla de ligación a 20 μ L de células. La electroporación se realizó en un equipo Cell-Porator® Electroporation System (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MD-USA) en las siguientes condiciones: 420V, 330 μ F, baja impedancia, una tasa de carga rápida y un tiempo máximo de 2,5 mseg. Las células transformadas se mezclaron con 1 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C durante 1 h y con agitación de 200 rpm. Luego se centrifugó a 13.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) durante 1 min y se descartaron 900 μ L del sobrenadante. El precipitado se resuspendió en el sobrenadante remanente (100 μ L) y se plaqueó sobre LB agar estériles que contenían ampicilina 100 μ g/mL, X-gal 50 μ g/mL e

IPTG 1 mM. Las placas de transformación se incubaron a 37°C durante 16 h. Para su mantención se conservaron a 4 °C.

2.2.7 PCR de colonias

El PCR de colonias se realizó para corroborar la presencia de inserto en las colonias blancas seleccionadas como clones positivos. Las colonias blancas seleccionadas se transfirieron mediante una punta estéril desde la placa de transformación a las placas cuadrículadas y numeradas que contenían LB agar suplementado con ampicilina, IPTG y X-gal y a un tubo Eppendorf con 100 µL de agua Milli-Q estéril. La suspensión (tubo Eppendorf) se incubó a 100 °C durante 10 min y se tomaron 5 µL, los que se agregaron sobre 15 µL de mezcla de PCR. La presencia de inserto se confirmó utilizando los partidores pMALLipF y pMALLipR, para el cual se utilizó el protocolo de PCR que se describe a continuación:

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos *Eppendorf* de 600 µL esterilizados por autoclave. Para el PCR se mezclaron los siguientes componentes: solución amortiguador de PCR a una concentración final de 1X (Tris/HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8,4), MgCl₂ 4 mM, dNTPs 10 mM (2,5 mM de cada dNTP), 10 pmoles de cada partidor y 1 unidad de ADN Taq polimerasa. Se completó el volumen a 15 µL con agua Milli-Q estéril. Los tubos se incubaron en un termociclador (modelo PTC-100 de MJ Research, Inc., MA-USA) y se sometieron al programa requerido, que incluía una etapa inicial de denaturación a 94 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 30 s a 94 °C, 30 s a 59 °C dada la T_m de los partidores utilizados y una etapa de extensión de un minuto por cada kilobase de ADN que se quiera amplificar,

lo que se hace a una temperatura de 72 °C, que corresponde a la temperatura óptima para la función catalítica de la Taq ADN polimerasa, que para este caso fue de 30 s. Finalmente se calentó 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR de colonias se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v.

2.2.8 Minipreparación de ADN plasmidial

El ADN plasmidial se extrajo a partir de un cultivo en 4 mL de medio LB incubado por 16 h a 37 °C y 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 13.000 x \bar{g} (Centrífuga *Eppendorf* 5403 de *Eppendorf AG*, Hamburgo, Alemania) por 1 min en un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL previamente esterilizado por autoclave. El proceso se repitió hasta completar los 4 mL necesarios para obtener un precipitado de bacterias. A continuación, se utilizó el sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit*. La extracción se realizó según las instrucciones del fabricante.

2.2.9 Digestión de ADN plasmidial

Las enzimas *KpnI* y *HindIII* se utilizaron para digerir el vector *pGEM T-Easy* con inserto para escindir el gen de lipasa ligado en él y el vector *pMAL-c2E* para su linealización. La reacción de digestión final fue de 20 μ L y contenía 2 μ L de solución amortiguador 5X, 1 μ L de cada enzima y 100 ng de vector para el caso de *pGEM T-Easy* con inserto y 500 ng del vector de expresión *pMAL-c2E* para el caso de la linealización. La mezcla se llevó al volumen final con agua Milli-Q estéril. Para las digestiones dobles se utilizó la solución amortiguador de la enzima *HindIII*, recomendada por *New England*

Biolabs y 1 μ L de cada enzima. Se dejó reaccionando durante 2 h a 37 °C y el resultado se analizó mediante un gel de agarosa.

- **Metodología utilizada para la expresión del gen de lipasa**

2.2.10 Obtención del vector de expresión pMALc-2E con el gen de lipasa

Para expresar el gen de lipasa previamente aislado, se utilizó el vector de expresión pMALc-2E. Para la amplificación del gen completo, se utilizó la enzima *Elongasa*® (Invitrogen). Al comienzo, los fragmentos amplificados fueron ligados al vector de clonamiento pGEM-T Easy para luego ser clonados en *E. coli* DH5 α . Luego se aisló el plasmidio pGEM-T Easy que contenía el gen de lipasa mediante miniprep, y se cortó el inserto con las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII*. Este inserto se ligó al vector pMALc-2E y el producto de ligación se transformó en células de *E. coli* TB1 electrocompetentes.

2.2.11 Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes mediante el sistema de expresión *E. coli* TB1/pMALc-2E

La inducción de la expresión del gen se realizó según lo recomendado por el manual de “Proteína de fusión pMAL y sistema de purificación” de *New England BioLabs* con algunas modificaciones. Se inocularon 20 mL de medio rico con glucosa y ampicilina 100 μ g/mL con una colonia de células TB1 recombinantes con el vector pMALc-2E que tenía incorporado el inserto.

El inóculo se dejó creciendo a 37 °C con agitación de 200 rpm por 16 h. Al día siguiente se midió la densidad óptica a 620 nm (OD_{620}) y se determinó el volumen necesario para

inocular 250 mL de medio rico con glucosa y ampicilina con el cultivo de noche para una OD₆₂₀ inicial de 0,05 nm. El cultivo se creció con agitación de 200 rpm a 37 °C hasta alcanzar una OD₆₂₀ de 0,6 en aproximadamente 2 h, se tomó una muestra de 1 mL, se centrifugó (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y el precipitado se resuspendió en 100 µL de solución amortiguador SDS-PAGE 5X para luego guardarlo a -20 °C (*muestra 1: células sin inducir*). Al resto del cultivo de células se le agregó IPTG para una concentración final de 0,3 mM. Se continuó la incubación a 18 °C con agitación de 200 rpm. Pasadas 4 h se tomó una muestra de 1 mL, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 100 µL de solución amortiguador SDS-PAGE 5X para después guardarlo a -20 °C (*muestra 2: células inducidas*).

2.2.12 Purificación de la proteína recombinante mediante el sistema de expresión *E. coli* TBI/pMALc2E

Las células inducidas previamente se recolectaron mediante centrifugación a 4.000 x \bar{g} por 10 min (Centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, DuPont, CT, USA). El sobrenadante se descartó y el precipitado se suspendió en 30 mL de solución amortiguador de columna (Tris/HCl 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM). Las células se congelaron a -20 °C durante 16 h. Luego se descongelaron en agua fría y se sonicaron con 10 pulsos de 30 s. Se centrifugó a 9.000 x \bar{g} y 4 °C durante 20 min (Centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, DuPont, CT, USA). El precipitado correspondió a material insoluble. Del sobrenadante, que correspondió al extracto crudo, se tomó una muestra de 5 µL y se agregó solución amortiguador SDS-PAGE 5X. Todo esto se guardó a -20 °C (*muestra 3: extracto crudo*). El resto del sobrenadante se diluyó

5 veces en amortiguador de columna y se guardó para ser purificado por cromatografía, pero antes se hizo una prueba a escala piloto. Se agregaron 200 μL de resina de amilasa en un tubo *Eppendorf* y se centrifugó a $13.000 \times \bar{g}$ durante 1 min (Centrífuga *Eppendorf* 5403 de *Eppendorf* AG, Hamburgo, Alemania). Luego se descartó el sobrenadante y la resina se diluyó en 1,5 mL de solución amortiguador de columna. Se centrifugó en las mismas condiciones anteriores 2 veces. Se mezclaron 50 μL de resina con 50 μL de extracto crudo y se incubó en hielo durante 15 min. Se centrifugó a $13.000 \times \bar{g}$ durante 1 min y el precipitado se lavó con 1 mL de solución amortiguador de columna, el que se volvió a centrifugar en iguales condiciones para finalmente suspender la resina en 50 μL de solución amortiguador SDS-PAGE 5X (*muestra 4: Proteína de fusión unida a amilosa*).

Con el objetivo de purificar la lipasa quimérica, se cargó el resto del volumen del extracto crudo en una columna PD10 (Bio-Rad Laboratories, CA-USA) empacada con 2 mL de resina de amilosa. Para esto se lavó dos veces con 5 mL de solución amortiguador de columna. Luego se pasó el extracto completo que correspondía a 150 mL aproximadamente. La columna fue lavada con 5 mL de solución amortiguador de columna. El lavado se repitió dos veces y se procedió a eluir la proteína con 4 mL de solución amortiguador de columna más maltosa 10 mM. La columna de amilosa se regeneró con la siguiente secuencia de lavados: 6 mL de agua destilada, 6 mL de SDS 0,1 % p/v, 2 mL de agua destilada y 6 mL de solución amortiguador de columna. La columna se guardó en etanol 20 % v/v.

2.2.13 Electroforesis de proteína (SDS-PAGE)

Las separaciones electroforéticas en condiciones desnaturalantes se realizaron en una cámara vertical MiniProtean II (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA). Las muestras se mezclaron en proporción 4:1 con solución amortiguador de carga 5X (Tris/HCl 60 mM, glicerol 25 % v/v, SDS 2 % p/v, 2- mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1 % p/v pH 6,8), se denaturaron por ebullición durante 5 min y posteriormente se cargaron en geles de acrilamida. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 200 V (fuentes de poder Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA o Power Supply EPS 3500XL de Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia). Como solución amortiguador de corrida se utilizó Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v) (Bollag y col., 1996).

2.2.14 Determinación del valor de Constante de Michaelis (Km)

Para determinar el valor de Km de la lipasa 2-17 se realizó un ensayo de actividad lipolítica según el protocolo descrito por Parra L.P. y col. (2008). Para ello se preparó como sustrato cuatro soluciones de concentraciones 3,3 mM, 0,01 M, 0,05 M y 0,1 M de p-nitrofenil caprato en isopropanol, y una solución amortiguadora de ensayo Tris/HCl 20 mM pH 8, que contiene Triton X-100 4,4 mg/mL y goma arábica 1,1 mg/mL. La solución sustrato/amortiguador se preparó al momento de realizar el ensayo en una proporción 1:35 (solución stock de sustrato: solución amortiguador de ensayo) para un volumen final de 900 μ L. La solución amortiguadora de ensayo se calentó a 45°C y se agregó el sustrato lentamente bajo agitación continua. Se dejó enfriar 2 min y se utilizó en el ensayo, para lo cual se mezcló esta solución con 100 μ L de enzima. En esta

reacción enzimática, el sustrato p-nitrofenil caprato es hidrolizado por la lipasa formando el producto p-nitrofenol de color amarillo. La reacción se siguió espectrofotométricamente a 410 nm, longitud de onda a la cual se mide la formación de producto. Se usó como referencia la solución amortiguadora de ensayo. El blanco se preparó mezclando la solución sustrato/solución amortiguador con la solución amortiguadora en que se encontraba la proteína, en el mismo volumen que la muestra (hidrólisis no enzimática).

2.2.15 Medición de la actividad lipolítica de la proteína mediante ensayo en medio líquido

Para el ensayo estándar se preparó como sustrato una solución stock de p-nitrofenil caprato 0,1 M en isopropanol (Diez veces el valor de K_m de la lipasa 2-17) y se continuó el protocolo como es descrito en la sección 2.2.14.

2.2.16 Determinación de la concentración de proteína

La determinación de la concentración de proteína total una vez purificada se realizó mediante el método de Bradford. Para ello, se mezcló: 2,4 mL de agua destilada, 1 mL de Coomassie 1 g/L preparado en HCl 2,2% v/v y 100 μ L de muestra o proteína estándar de calibración. Previamente se realizó una curva de calibración con BSA 0,5 mg/mL en concentraciones entre 0,016 y 0,5 mg/mL. Se midió la absorbancia a 465 nm (OD_{465}) y 595 nm (OD_{595}) y se calculó la razón $O.D_{595}/O.D_{465}$. El valor obtenido en ausencia de BSA se utilizó como blanco y se restó a todas razones. Finalmente se graficó en función de la concentración de BSA.

- **Metodología utilizada para la validación del screening**

2.2.17 Análisis de variabilidad:

La variabilidad entre los ensayos individuales debe ser minimizada durante cada paso del proceso para que la interpretación de los datos sea correcta y para reducir la probabilidad de seleccionar falsos positivos. La identificación se validó utilizando el gen de lipasa nativo, sin mutaciones. Para ello se transformaron 20 μL de *E.coli* BL21 (DE3) mediante electroporación, con 1 μL de una mezcla de ligación (gen de lipasa parental en vector pMALc-2E). La electroporación se realizó bajo las mismas condiciones descritas en 2.2.6. Las colonias se crecieron sobre placas LB agar estériles que contenían ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se incubaron a 37 °C durante 16 h. Se picó e inoculó colonias aisladas obtenidas de la transformación anterior, en placas de 96 pocillos de pozo profundo (1 mL) que contenían 600 μL de medios LB, TB y medio rico con glucosa, todos suplementados con antibiótico. Se cultivaron las células durante 24 h a 37 °C. Al cabo de las 24 h, una alícuota de cultivo (20 μL) de cada pocillo se transfirió a una nueva placa suplementada con el medio respectivo más antibiótico.

Se cultivaron las células transferidas durante 3 h a 37 °C en agitación de 200 rpm, para luego ser inducidas con tres concentraciones de IPTG diferentes 0,3 mM, 0,5 mM y 0,7 mM. Las tres concentraciones de inductor se probaron en cada medio. Las placas se incubaron a 18 °C por 16 horas, y a 30°C por 3 horas, con agitación de 220 rpm y luego se centrifugó durante 10 min a 4 °C a 4000 rpm (centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor CAT-244 Sorvall®, DuPont, CT, USA). El sobrenadante se eliminó y el precipitado se suspendió en 600 μL de una solución que contenía lisozima (100 mM Tris-HCl pH 8,2,

0,25 mg/mL de lisozima y 1,5 U/mL de DNasa I: Solución amortiguador de lisis) para romper la célula y liberar al sobrenadante la enzima de interés. Luego se incubaron las placas durante 10 min a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó la placa a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para realizar los ensayos de actividad lipolítica.

2.2.18 Ensayos de actividad en medio líquido

Para la cuantificación de la actividad de la lipasa se utilizó el protocolo descrito en la sección 2.2.14, pero a menor escala. Se utilizó como sustrato una solución de 0,78 M (8 veces el valor de K_m) de p-nitrofenil caprato en isopropanol. El ensayo se realizó en una proporción 1:35 (solución stock de sustrato: solución amortiguador de ensayo) para un volumen final de 180 μ L en cada pocillo de una nueva microplaca de 96 pocillos y se mezcló con 20 μ L del sobrenadante. La reacción se siguió espectrofotométricamente a 410 nm. Se usó como referencia la solución amortiguador de ensayo. Nuevamente el blanco se preparó mezclando la solución sustrato/ amortiguador con la solución amortiguadora en que se encontrara la proteína en el mismo volumen que la muestra. Además se crecieron bacterias sin transformar como control para medir la posible actividad lipolítica de la cepa utilizada.

2.2.19 Colección de datos

Para tener una visión completa de los datos, los valores de las absorbancias fueron analizadas mediante el programa Microsoft Office Exel 2007.

2.2.20 Cuantificación de variabilidad de *screening* (CV)

Para estimar la variabilidad o la dispersión de los datos se utilizó el coeficiente de variabilidad dado por la fórmula: $CV = ((\text{desviación estándar} / \text{promedio}) \times 100\%)$. Mediante la herramienta Microsoft Excel se determinó tanto el promedio de los datos como la desviación estándar de ellos. Para ver cómo la actividad y la termoestabilidad variaron entre los diferentes clones, se graficó la posición de los clones en la placa versus la actividad lipolítica. Se realizaron los análisis hasta obtener un coeficiente de variación lo más pequeño posible, preferentemente menor a un 10%.

2.2.21 Generación de genotecas de variantes del gen de lipasa y condiciones de PCR propenso a error.

Una vez que el protocolo de *screening* se validó y optimizó para disminuir el coeficiente de variación, se siguió el procedimiento para las librerías de mutantes (Figura 6). Para ello, primero se determinaron las condiciones para el PCR propenso a error. Las mutaciones fueron provocadas por un aumento en la tasa de error de la enzima *taq polimerasa*. Para obtener una tasa mutagénica aproximada de 1 ó 2 mutaciones por gen, se aumentó la concentración de magnesio a 7 mM y se agregaron diferentes concentraciones de ADN molde: 0,5 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, 0,05 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ y 0,005 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$. Se utilizó el plásmido pMALc-2E que tenía incorporado el gen que codifica para la lipasa 2-17 nativa como ADN molde. Se utilizaron los partidores pMAL_LipEPPCR_F (5'-ACAAGGTACCTATTTTACCAGTGCCA-3') y pMAL_LipEPPCR_R (5'-TGCCAAGCTTTCAGAGATTTGGCTC-3') para la reacción de PCR. Estos partidores poseían los sitios de corte para las enzimas KpnI y HindIII respectivamente. El volumen

de reacción fue 100 μ L con una concentración final de los partidores de 2 μ M cada uno, 7 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 unidades de *ADN Tag Polimerasa* y 1X de solución amortiguadora de *ADN Tag Polimerasa*. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de 94 °C por 5 min; 2 ciclos de 94 °C por 2 min, 48 °C por 30 s y 72 °C por 3 min; 22 ciclos de 94 °C por 1 min, 63 °C por 30 s y 72 °C por 3 min; y finalmente 1 ciclo de extensión de 72 °C por 5 min.

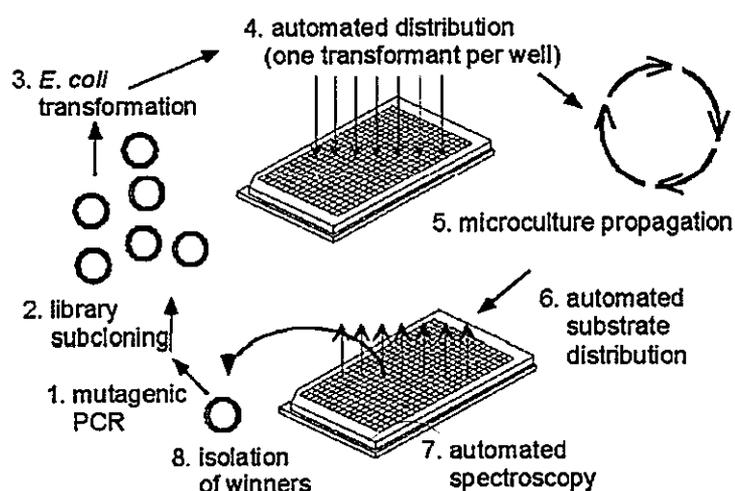


Figura 6: Screening de alto rendimiento. (1) El gen de lipasa se amplificó mediante PCR propenso a error. (2) La librería resultante se ligó al vector de expresión pMALc-2E y (3) la ligación se utilizó para transformar *E.coli* BL21 (DE3) mediante electroporación. (4) Los transformantes se distribuyeron en microplacas de 96 pocillos que contenían medio TB con ampicilina 100 μ g/mL e IPTG 0,5 mM. (5) las microplacas se incubaron y se centrifugaron. (6) El sobrenadante se utilizó para realizar ensayos de actividad y termoestabilidad. (7) La reacción se monitoreó mediante un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 410nm. (8) Los clones que exhiben mayor coloración se aislaron manualmente (Modificado de L.A. Rowe y col., 2003).

2.2.22 Análisis de librerías de mutantes

Una vez amplificados los fragmentos, éstos se cargaron en un gel de agarosa 1%, se purificaron, se digirieron con las enzimas KpnI y HindIII y se ligaron al vector

pMALc-2E para finalmente ser usados en la transformación por electroporación de *E.coli* BL21 (DE3) y plaqueados en LB-agar ampicilina 100 µg/mL. Luego se repitió el protocolo descrito en el proceso de análisis de variabilidad (2.2.17) pero bajo las siguientes condiciones: se picaron 400 colonias en placas contenían 600 µL medio LB con ampicilina 100 µg/mL (como método de selección) para el crecimiento. Se cultivaron las células durante 24 h a 37 °C con agitación de 220 rpm. Una vez incubadas las células, una alícuota de 20 µL de cultivo de cada pocillo se transfirió a una nueva placa de pozo profundo suplementada con medio TB más antibiótico y las placas a partir de las cuales se sacó la alícuota se guardaron a 4 °C para la posterior recuperación de las colonias consideradas como posibles mejores variantes. Se cultivaron las células transferidas durante 2 h a 37 °C, para luego ser inducidas con IPTG 0,5 mM. Se incubó a 18 °C por 16 horas y luego se centrifugó cada placa durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se disolvió en una solución con lisozima. Finalmente se centrifugó la placa durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para realizar los ensayos de actividad en medio líquido. La reacción se siguió espectrofotométricamente a 410nm.

3 RESULTADOS

3.1 Clonamiento del gen de lipasa

En este trabajo, se clonó y expresó el gen de una lipasa activa a bajas temperaturas. Para obtener el gen codificante para la lipasa 2-17 con los sitios de restricción para las enzimas KpnI y HindIII apropiados para su clonamiento, se amplificó mediante PCR el gen de la enzima a partir del ADN genómico de la cepa 2-17 con partidores diseñados previamente (Parra L.P. y col., 2008) que contenían estos sitios de restricción. Para ello se utilizó la enzima Elongasa® que es menos propensa que la ADN Taq Polimerasa a cometer errores en la amplificación, lo que permitió una expresión correcta de los fragmentos amplificados (Figura 7). El control negativo no presentó producto de amplificación (datos no mostrados).

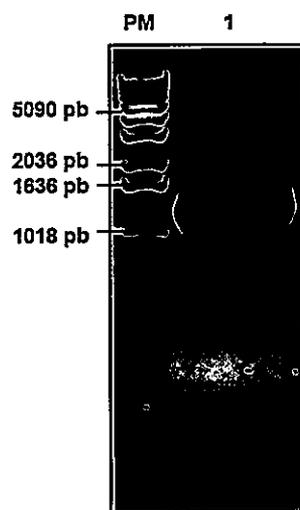


Figura 7: Electroforesis del producto de amplificación de ADN mediante Elongasa®. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 corresponde al producto amplificado del gen de lipasa a partir del ADN genómico de la cepa 2-17, usando los partidores pMALLipF y pMALLipR para insertar sitios de restricción. Carril PM corresponde al estándar de peso molecular 1Kb.

El producto de PCR resultante fue de un tamaño aproximado de 1300 pb, se cortó desde un gel de agarosa 1 %, se purificó y se ligó al vector de clonamiento pGEM-T Easy. El producto de ligación se utilizó para transformar la cepa DH5 α de *E. coli* con lo que se consiguió un alto número de copias del vector con el inserto. Esto se corroboró mediante un PCR de colonias utilizando los partidores pMALLipF y pMALLipR (Figura 8).

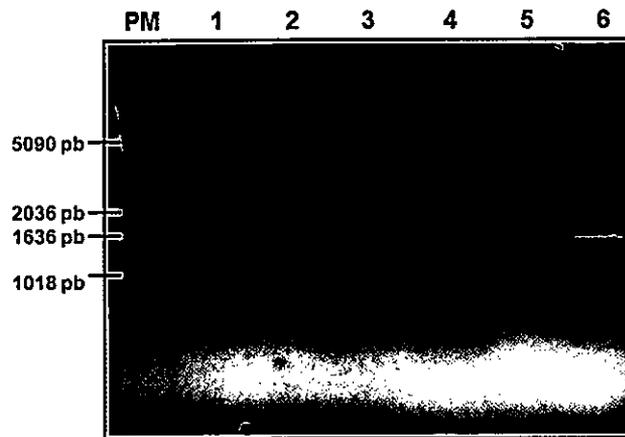


Figura 8: Electroforesis de PCR de colonias. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles desde el 1 al 6 muestran PCR de colonias utilizando los partidores pMALLipF y pMALLipR para corroborar la presencia del inserto en el vector pGEM-T Easy. Carriles 1, 4 y 6 exhiben clones positivos. El carril 2 corresponde al control negativo. Carril PM corresponde al estándar de peso molecular 1Kb.

Se seleccionó la colonia 6 para continuar con el clonamiento y a partir de minipreparaciones de ADN plasmidial se obtuvo el vector pGEM-T Easy ligado al inserto. El gen de interés se extrajo mediante una digestión con las enzimas de restricción KpnI y HindIII, cuyo resultado se analizó en un gel de agarosa 1 % (Figura

9). El fragmento correspondiente al inserto se purificó y se ligó en el vector de expresión pMAL-c2E digerido con las mismas enzimas de restricción.

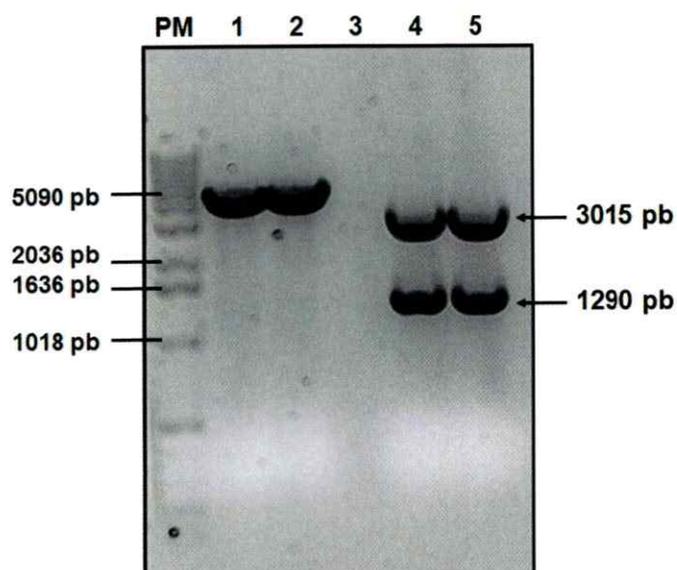


Figura 9: Electroforesis del producto de digestión del vector pGEM-T Easy más el inserto. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 y 2 corresponden al vector pGEM-T Easy más el inserto sin digerir. Carriles 4 y 5 presentan el vector pGEM-T Easy más el inserto digeridos con las enzimas KpnI y HindIII. Flechas indican posición del vector (3015 pb) en la parte superior y del inserto (1290 pb) en la inferior de cada carril. Carril PM corresponde al estándar de peso molecular.

Luego con la ligación se transformó células *E. coli* DH5a electrocompetentes, que se crecieron en placas con medio LB-Agar suplementado con ampicilina 100 µg/mL, y se incubó a 37 °C por 16 h. Se comprobó la presencia de inserto en el vector mediante PCR de las colonias obtenidas, utilizando los partidores pMALLipF y pMALLipR (Figura 10) y se extrajo el ADN plasmidial de la colonia 2 que resultó ser positiva.

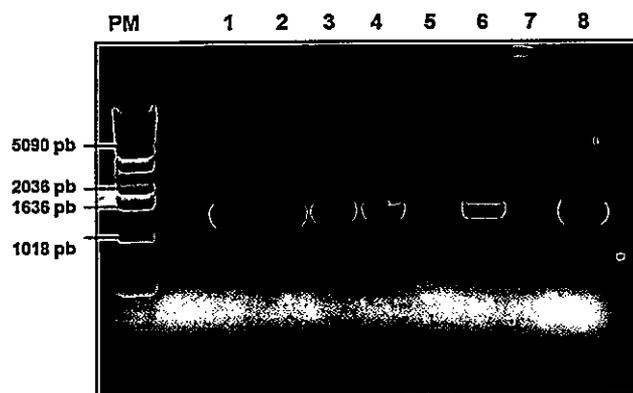


Figura 10: Electroforesis de PCR de colonias. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles desde el 1 al 8 muestran PCR de colonias para corroborar la presencia del inserto en el vector pMAL-c2E. Carriles 1, 2, 3, 4, 6 y 8 corresponden a colonias positivas. Carril 7 corresponde al control negativo. Carril PM corresponde al estándar de peso molecular.

La colonia 2 se creció en medio LB suplementada con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el producto de las minipreparaciones se utilizó para transformar células *E. coli* TB1 electrocompetentes que posteriormente fueron crecidas en placas con medio LB-Agar suplementado con ampicilina, X-Gal e IPTG, y se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 16 h. Nuevamente se realizó PCR de colonias para corroborar la presencia del inserto (Figura 11). Se seleccionaron los clones 2 y 4 los cuales se mandaron a secuenciar (ver secuencia en Anexos) y se utilizó el clon 2 para continuar con la expresión de la lipasa.

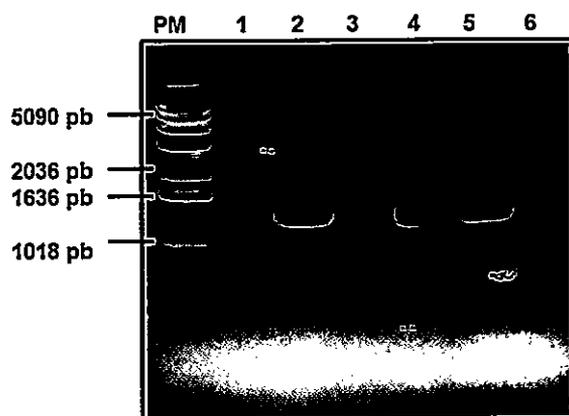


Figura 11: Electroforesis de PCR de colonias. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles desde el 1 al 6 muestran PCR de colonias para corroborar la presencia del inserto en el vector pMAL-c2E en células *E. coli* TB1. Los carriles 2, 4 y 5 exhiben colonias positivas. Carril PM corresponde al estándar de peso molecular.

3.2 Expresión del gen de lipasa recombinante en *E. coli* TB1

Luego de seleccionar el clon 2 de *E. coli* TB1 transformado con el vector pMAL-c2E más el gen de la lipasa 2-17, se indujo la expresión del gen con IPTG 0,3 mM, como está descrito en la sección 2.2.11 de Materiales y Métodos. El sistema de expresión pMAL-c2E genera proteínas quiméricas que contienen un dominio de unión a maltosa (MBP). Esto facilita el proceso de purificación ya que permite la utilización de una columna de afinidad a amilosa y frecuentemente estabiliza la proteína recombinante (Baneyx, 1999). Por otra parte, una vez expresada la proteína se realizó lisis celular mediante sonicación para obtener en el extracto crudo la lipasa de interés, ya que el vector pMAL-c2E tiene una delección en la secuencia señal *male*, lo que resulta en la expresión citoplasmática de la proteína de fusión.

El extracto crudo se purificó mediante una columna de amilosa y finalmente se recolectó una fracción de 4 mL con la proteína eluída. La fracción citoplásmica y el extracto crudo obtenidos se analizaron en geles de poliacrilamida, donde se observó una alta expresión de la proteína de fusión. La lipasa quimérica presentó un tamaño de 90

kDa, lo que es consistente con la suma de la lipasa de 47 kDa y de la MBP de 43 kDa.

Se logró obtener la proteína de fusión pura (Figura 12).

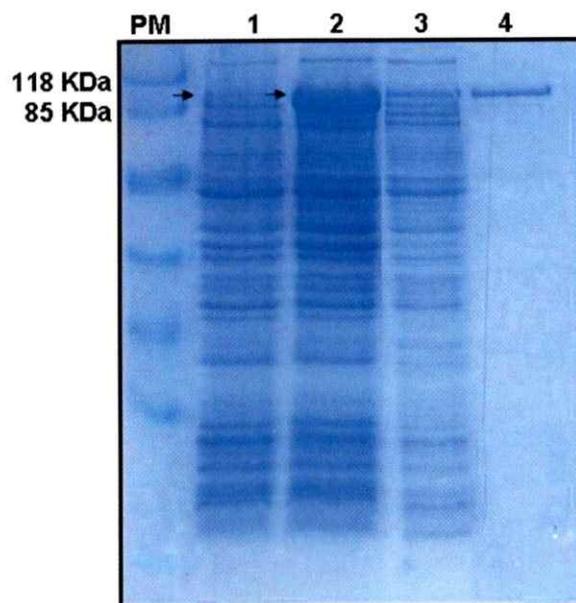


Figura 12: Análisis electroforético de la expresión y purificación de la lipasa mediante el sistema pMAL-c2E. Carril: (1) Células sin inducir, (2) células inducidas con 0,3 mM IPTG, (3) sobrenadante celular una vez sonicadas, (4) purificación de la proteína con resina de amilasa. Las flechas indican la banda correspondiente a la lipasa quimérica. Carril PM corresponde al estándar de peso molecular.

Con el fin de determinar si la lipasa se encontraba activa una vez purificada se realizaron ensayos de actividad lipolítica en medio líquido usando la proteína de fusión.

Determinación de la Constante de Michaelis- Menten (Km) de la lipasa 2-17.

Para determinar los valores de Km de la enzima, se realizaron cuatro ensayos a concentraciones de 3,3 mM, 0,01 M, 0,05 M y 0,1 M de p-nitrofenil caprato en

isopropanol. La reacción se realizó a 20°C y se siguió durante 3 minutos, midiendo a 410 nm (Figura 13).

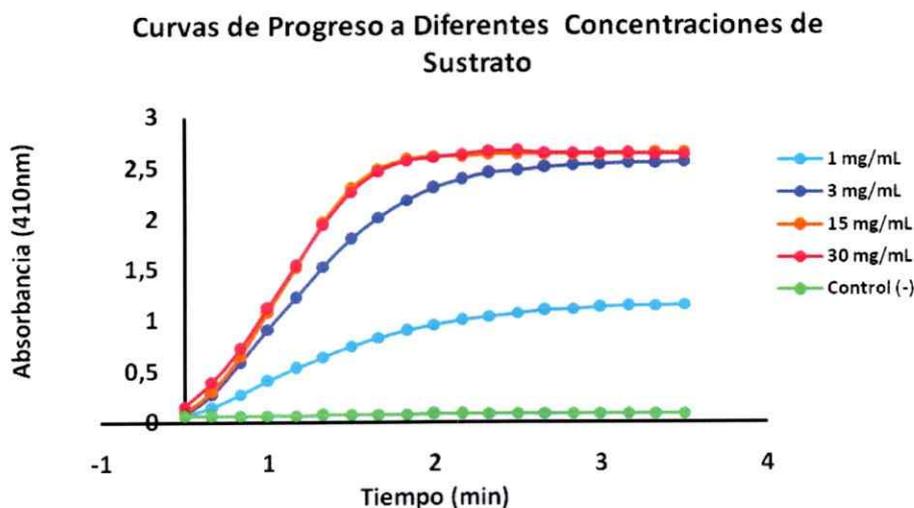


Figura 13: Curvas de progreso de la lipasa 2-17 a diferentes concentraciones de sustrato. Los ensayos de actividad lipolítica se realizaron con el sustrato p-nitrofenil caprato a las concentraciones de 3,3 mM, 0,01 M, 0,05 M y 0,1 M representadas por las líneas azul, morada, anaranjada y rosa, respectivamente. El ensayo en la ausencia de enzima se encuentra representado por la línea de color verde (control negativo).

Así, para calcular el valor de K_m de la lipasa 2-17 se graficaron los recíprocos de las velocidades iniciales (pendientes de la primera fracción de cada curva de progreso) versus los recíprocos de cada concentración de sustrato. Esta representación también es conocida como gráfica de Lineweaver-Burk (Figura 14). El resultado de este tipo de representación es una línea recta cuya ecuación es $y = mx + n$, siendo $1/V_{max}$ el punto de corte entre la recta y el eje de ordenadas, y $-1/K_m$ el punto de corte entre la recta y el eje de abscisas.

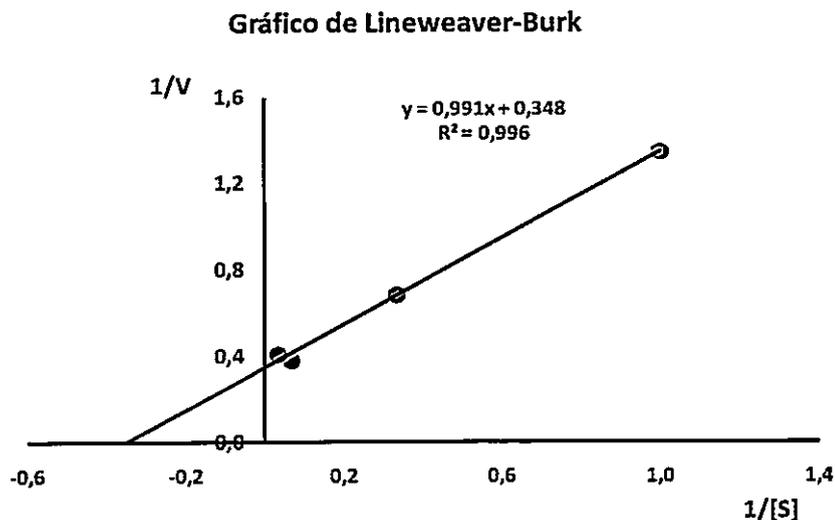


Figura 14: Gráfica de Lineweaver-Burk de la lipasa 2-17. Representación de los dobles recíprocos correspondientes a las concentraciones de 3,3 mM, 0,01 M, 0,05 M y 0,1 M representadas por las líneas azul, morada, anaranjada y rosa, respectivamente. El punto de corte entre la recta y el eje de las abscisas permite determinar el valor de K_m .

Con la ecuación de la recta se logró establecer que el valor de K_m de la lipasa 2-17 es de 9,75 mM. Con ello, se estableció una concentración de 0,1 M del sustrato p-nitrofenil caprato para realizar los ensayos de actividad, lo que corresponde a un valor de 10 veces K_m , asegurando que los ensayos se encuentren a concentración de sustrato saturante.

- **Determinación de la curva de progreso de la lipasa 2-17**

Finalmente la cinética de reacción se estableció mediante una curva de progreso a 20°C, utilizando una concentración de sustrato de 0,1M. El aumento de la absorbancia a 410 nm en el tiempo demostró que la enzima recombinante se encontraba activa (Figura 15).

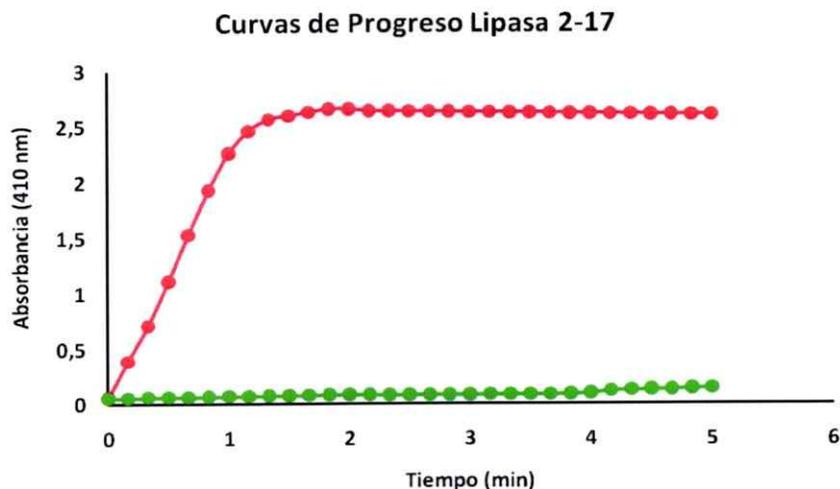


Figura 15: Curva de progreso de la lipasa 2-17 a temperatura ambiente. Los ensayos de actividad lipolítica se realizaron con el sustrato *p*-nitrofenil caprato como fue descrito en la sección 2.2.15, durante un tiempo de incubación de 5 minutos. Las líneas rosa y verde corresponden al ensayo realizado con y sin la enzima, respectivamente.

Finalmente mediante el método de Bradford se determinó la concentración de proteína total obtenida, siendo de 2,105 mg/mL. Para determinar aproximadamente cuál era la concentración de lipasa una vez purificada la proteína de fusión, se estableció una relación porcentual entre los pesos moleculares de las dos proteínas, la lipasa 2-17 de 47 KDa y la MBP de 43 KDa. Debido a que el porcentaje de la lipasa es de un 52,22% con respecto a la proteína total, la concentración de lipasa obtenida fue de aproximadamente 1,1 mg/mL.

Se definió una unidad de actividad lipolítica (U) como $\mu\text{moles } p\text{-nitrofenol}/\text{min}$ formados. Para ello, se realizó una curva de calibración para diferentes concentraciones del producto *p*-nitrofenol a 20°C y se midió la absorbancia a 410 nm (ver anexo 8.3). En la curva de calibración se observó una pendiente de 0,153 unidades de absorbancia * L/ mmol de *p*-nitrofenol en un volumen final de reacción de 1 mL, y se dividió por las

unidades de absorbancia/min calculadas en la primera parte (lineal) de la curva de progreso de la lipasa 2-17. Se obtuvieron 15,88 μ moles/min de *p*-nitrofenol (U). Finalmente para tener una aproximación de la actividad específica de la lipasa, se dividió este valor por la cantidad de enzima agregada en la reacción y se obtuvo que 1 mg de enzima produce 144,36 μ moles de *p*-nitrofenol/min, asumiendo que toda la enzima se encontraba activa.

3.3 Optimización de *screening* para la lipasa 2-17 activa a bajas temperaturas

Finalmente en este trabajo, se probaron algunas técnicas de ingeniería de proteínas para así optimizar las propiedades enzimáticas y bioquímicas de la lipasa 2-17. Se utilizó evolución dirigida por medio de mutaciones al azar, como principal técnica mutagénica, que tuvo como objetivo aumentar la eficiencia catalítica de la lipasa 2-17.

Para comenzar a trabajar en el mejoramiento de esta lipasa, se determinó un protocolo que permitiera expresar la enzima y seleccionar correctamente aquellos mutantes que exhibieran un incremento en la actividad. Para ello se determinó el coeficiente de variabilidad de cada ensayo realizado con la enzima nativa (sin mutaciones). Este coeficiente corresponde a la desviación estándar asociada al ensayo expresada como porcentaje ($[(\text{desviación estándar}/\text{promedio}) * 100\%]$). Para obtener un coeficiente de variación menor a un 10% y elaborar un correcto ensayo de actividad en medio líquido, se realizaron pruebas con diferentes temperaturas y tiempos de inducción, diferentes concentraciones de inductor (IPTG), medios de crecimiento y volúmenes de cultivo.

Así, para comenzar a optimizar el proceso *screening*, se probaron medios de crecimiento LB, TB y medio rico más glucosa y ampicilina; temperaturas de incubación de 18°C por 16 horas y de 30°C por 3 horas; concentraciones de IPTG de 0,3, 0,5 y 0,7 mM y diferentes volúmenes de medio de cultivo en cada etapa. Se realizaron combinaciones de cada variable (ver tabla IV) y se seleccionó la combinación de variables que entregara un menor coeficiente de variabilidad y los más altos valores de absorbancia (datos no mostrados).

Tabla IV: Combinaciones de las diferentes condiciones utilizadas en la elaboración del proceso de *screening*.

Medio Crecimiento	Medio Inducción	IPTG [mM]	Tiempo y T° de incubación	CV
LB	LB	0,3	18°C por 16 h	22,76
			30°C por 3 h	23,89
		0,5	18°C por 16 h	18,12
			30°C por 3 h	18,54
		0,7	18°C por 16 h	18,92
			30°C por 3 h	20,04
	TB	0,3	18°C por 16 h	10,98
			30°C por 3 h	11,43
		0,5	18°C por 16 h	9,23
			30°C por 3 h	9,87
		0,7	18°C por 16 h	10,05
			30°C por 3 h	10,51
	Rico	0,3	18°C por 16 h	15,01
			30°C por 3 h	18,13
		0,5	18°C por 16 h	12,44
			30°C por 3 h	12,4
		0,7	18°C por 16 h	13,79
			30°C por 3 h	13,11

Finalmente se seleccionó el protocolo que utilizaba medio TB para la inducción, una temperatura de incubación de 18°C durante 16 horas, una concentración de IPTG de 0,5 mM y se probaron volúmenes de cultivo de 300 µL y de 600 µL. Se analizaron 94 clones en cada caso y para estas condiciones se obtuvo un coeficiente de variabilidad de 8,7% y 8,1% respectivamente (datos no mostrados). Se seleccionó un volumen de 600 µL y se repitió el protocolo de *screening* completo para un total de 182 clones de la enzima nativa (Figura 16). Como control negativo se midió la actividad lipolítica propia de la cepa *E.coli* BL21 (DE3) transformada con el vector sin el inserto. No se observó actividad en estos controles.

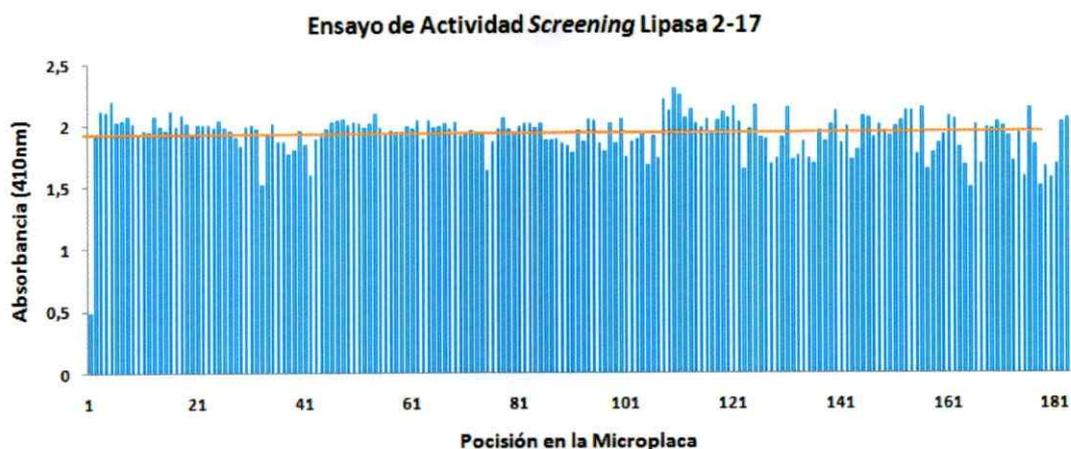


Figura 16: Variabilidad de ensayo de actividad de la lipasa 2-17. Ensayo realizado a 20°C utilizando p-nitrofenil caprato como sustrato. Se obtuvo un promedio de absorbancia de 1,93 (indicado con una línea horizontal anaranjada) con una desviación estándar de 0,146. Este ensayo presentó un coeficiente de variabilidad de 7,55%. La posición 1 corresponde al control negativo.

3.4 Generación de variantes del gen de lipasa 2-17.

Una vez determinado el coeficiente de variabilidad, se construyeron librerías genómicas de mutantes usando el método de PCR propenso a error, utilizando como molde el gen de la lipasa 2-17 en el vector pMAL-c2E. Durante el proceso de amplificación del gen de la lipasa, se utilizaron como principales factores mutagénicos el aumento en la concentración de $MgCl_2$ que acelera el proceso de amplificación permitiendo disminuir la fidelidad de la enzima *Tag Polimerasa* y la baja concentración de ADN molde que permite el aumento en la amplificación a partir de hebras nuevas posiblemente ya mutadas.

Una vez generada la amplificación, los fragmentos se digirieron con las enzimas de restricción HindIII y KpnI, y se ligaron al vector de expresión pMAL-c2E. La expresión de los vectores recombinantes obtenidos se realizó en células de *E.coli* BL21 (DE3).

Se utilizó una concentración de $MgCl_2$ 7 mM según lo recomendado por Cirilo P. y col (2003) y concentraciones de ADN molde de 0,5 $\eta g/ \mu L$, 0,05 $\eta g/ \mu L$ y 0,005 $\eta g/ \mu L$, para luego hacer una selección de la genoteca que posea una frecuencia mutagénica considerada apropiada para los experimentos de evolución dirigida. En algunos trabajos previos (Cirino P y col., 2003), se ha estimado que para una frecuencia mutagénica de 1 a 2 aminoácidos por gen, se obtiene un 50% de los clones de forma inactiva, lo que permite manejar de manera adecuada el proceso de evolución dirigida ya que no exige un análisis excesivo de clones y por otro lado no se obtienen tantos mutantes deletéreos en la actividad.

Los clones a analizar se transfirieron picando cada colonia desde una placa de LB-agar ampicilina a una placa de 96 pocillos de pozo profundo con medio LB más

ampicilina. Luego de crecer e inducir la expresión de la enzima según el protocolo seleccionado anteriormente, las células se precipitaron y el *pellet* se resuspendió en una solución amortiguadora de lisis que contenía lisozima para romper la célula y liberar la proteína de interés. Una vez centrifugado, el sobrenadante se utilizó como fuente de la enzima para los ensayos de actividad. Se consideró como clones inactivos a aquellos clones que presentaran menos del 50% de la actividad determinada para la enzima sin modificar.

De los coeficientes de variabilidad medidos para los clones generados con las diferentes condiciones mutagénicas, se escogió una concentración de ADN molde de 0,05 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 17) que fue la que presentó una tasa mutagénica apropiada.

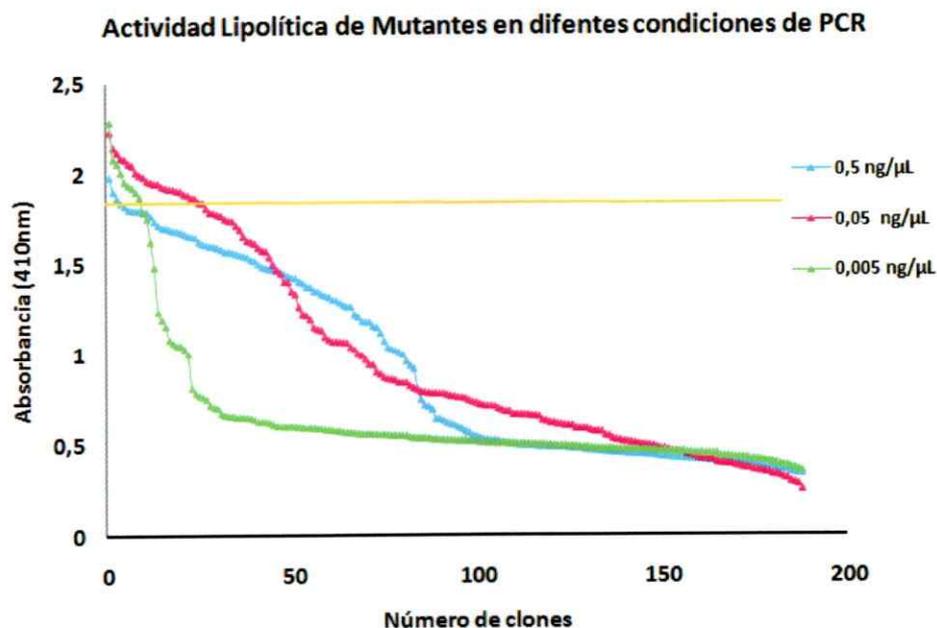


Figura 17: Perfil de actividad de mutantes obtenidos a partir de genoteca construida con diferentes concentraciones de ADN molde. Se midió la actividad lipolítica del sobrenadante de los cultivos de 188 clones en cada caso. Las líneas celeste rosa y verde corresponden a las actividades obtenidas a partir de una concentración de ADN molde de 0,5 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, 0,05 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ y 0,005 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente. La línea anaranjada indica promedio de absorbancia de la enzima nativa.

Una vez seleccionadas las condiciones mutagénicas para la generación de los mutantes de la lipasa, se efectuó un pequeño experimento piloto. Para ello, se realizó un nuevo PCR propenso a error con una concentración de MgCl_2 7 mM y una concentración de ADN molde de $0,05 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Se analizaron 380 clones y se observó que cerca del 8% de los clones resultaron con incrementos en la actividad, lo que aparentemente representa una muy buena cifra considerando el bajo número de clones estudiados.

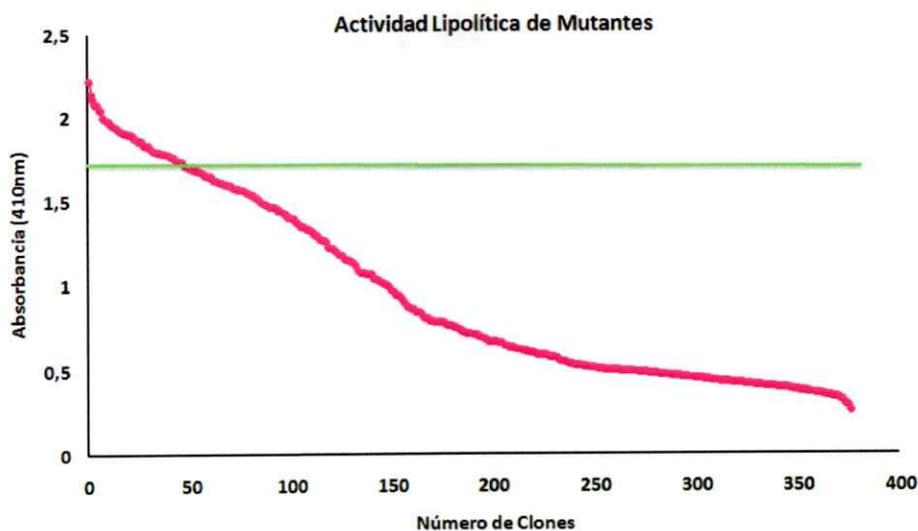


Figura 18: Perfil de actividad de mutantes obtenidos a partir de genoteca construida mediante PCR propenso a error. Se midió la actividad lipolítica del sobrenadante de los cultivos de 380 clones. La línea rosa indica la actividad de los mutantes mientras que la línea verde indica el promedio de absorbancia de la enzima nativa.

Se seleccionaron los 30 mejores clones y se les realizó una nueva prueba para determinar cuáles eran los mejores variantes (datos no mostrados). A partir de los resultados, los clones 2F2 y 2A7 presentaron mejoras en la actividad en comparación a los otros mutantes y a los valores obtenidos al medir actividad de la enzima nativa en las

mismas condiciones. Estos clones se mandaron a secuenciar y una vez que se determinen las mutaciones producidas, los clones secuenciados serán comparados y el mejor variante será caracterizado y seleccionado como molde para las siguientes rondas de mutagénesis mediante PCR propenso a error.

4 DISCUSION

4.1 Clonamiento, expresión y purificación del gen de lipasa

En primera instancia, para obtener el gen codificante para la lipasa 2-17 con los sitios de restricción apropiados para el corte con las enzimas KpnI y HindIII, se amplificó mediante PCR el gen de la enzima a partir del ADN genómico de la cepa 2-17 con partidores que presentaban dichos sitios de restricción. Una vez analizado el PCR fue posible observar que el producto de amplificación era del tamaño esperado (aproximadamente de 1300 pb). El producto del PCR se ligó al vector de clonamiento pGEM-T Easy, que fue escogido dado que es un vector que permite obtener un alto número de copias de los fragmentos de ADN amplificados y es de fácil manejo. Con la ligación, se transformaron células *E. coli* DH5a y para seleccionar colonias que efectivamente tuviesen el inserto y descartar colonias que solo hayan incorporado el vector, se realizó PCR de colonias y se seleccionó una colonia que fuese positiva.

El ADN plasmidial se extrajo y el gen de la lipasa se escindió para luego ser ligado al vector de expresión pMAL-c2E. Este vector de expresión se escogió ya que el gen clonado se inserta en el sitio múltiple de clonamiento, que se encuentra río abajo del gen *malE*, gen que codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP). Esto resulta en la expresión de una proteína de fusión a MBP, que permite purificar a la proteína fusionada de manera rápida y fácil.

El proceso de clonamiento resultó ser exitoso y no presentó mayores dificultades. Finalmente una vez obtenido el inserto en el vector de expresión, éste fue mandado a secuenciar. La secuencia entregada por Macrogen (ver Anexos 8.1) resultó ser igual a la

secuencia obtenida por Parra L.P. y col., (2008) por lo que se esperaba que el clon seleccionado presentara actividad lipolítica.

Posteriormente el gen codificante para la lipasa 2-17 se expresó en células *E. coli* TB1, y debido a que este sistema permite la expresión de las proteínas en el citoplasma de la célula, fue necesario realizar lisis celular, y posteriormente centrifugación. Para corroborar la presencia de la lipasa en el citoplasma, se realizó un ensayo de actividad directamente con el sobrenadante y se observó actividad lipolítica (datos no mostrados), confirmando que la enzima se obtuvo de forma soluble (sin la formación cuerpos de inclusión) y activa, condición necesaria para su posterior mejoramiento por evolución dirigida.

Debido a que la lipasa se encontraba en el sobrenadante, éste se purificó mediante cromatografía de afinidad en la cual la proteína de fusión se une a maltosa. El proceso de purificación fue rápido, y como se observa en la figura 12, el carril 4 que corresponde a la purificación de la proteína con resina de amilasa no exhibe otras bandas, por lo que la proteína se obtuvo bastante pura. Una vez purificada, la lipasa se utilizó para realizar un pequeño ensayo de actividad y como era de esperarse, efectivamente la enzima presentó actividad lipolítica (Figura 15). Se sabe que posiblemente MBP promueve el plegamiento correcto de proteínas de fusión a una conformación estructural que es biológicamente activa (Baneyx, 1999). Esto pudo ayudar a la correcta expresión de la lipasa 2-17. Además, la presencia de MBP podría estar también afectando la estabilidad de la enzima, ya que estudios anteriores (Parra L.P. y col., 2008) mostraron que al escindir la lipasa de la MBP, ésta pierde actividad. Para corroborar esta hipótesis una buena alternativa sería expresar la proteína en un nuevo sistema de expresión que no

forme este tipo de proteínas de fusión y posteriormente medir su actividad lipolítica y su termoestabilidad.

Por otro lado, muchas proteínas de fusión mejoran la solubilidad de las proteínas fusionadas y facilitan su purificación debido a que es posible realizar una cromatografía de afinidad a la molécula fusionada a la proteína recombinante de interés (Baneyx, 1999). El plegamiento es mejorado debido a que el compañero de fusión al parecer alcanza rápida y eficientemente una conformación nativa una vez que emerge del ribosoma y promueve la adquisición de una correcta estructura en las unidades de plegamiento río abajo.

Una vez establecido que la proteína se encontraba activa, se procedió a calcular el valor de K_m para la lipasa 2-17. Para ello, se realizaron cuatro ensayos a diferentes concentraciones de p-nitrofenil caprato en isopropanol (Figura 13) y mediante la curva de dobles recíprocos o gráfica de Lineweaver-Burk se determinó un valor aproximado de 9,75 mM. Si bien este valor es aproximado, es útil para asegurar que los ensayos se encuentren a concentración de sustrato saturante (aproximadamente 10 veces el valor de K_m), lo que certifica que la enzima trabaje a su máxima velocidad, así, la velocidad depende solo de la concentración de enzima y no de la concentración de sustrato. Este punto es fundamental para realizar posteriormente la optimización del *screening*, ya que permite minimizar la variabilidad entre los ensayos individuales, es decir en cada pocillo, eliminando el error asociado al ensayo de actividad.

Una vez establecido el valor de K_m se determinó la cinética de reacción mediante una curva de progreso de la lipasa 2-17 medida a 20 °C, utilizando finalmente una concentración de sustrato de 0,1 M (Figura 15) y se determinó la concentración

aproximada de proteína mediante el método de Bradford. La concentración total de proteína que fue de 2,11 mg/mL. Debido a que se forma una proteína de fusión, para establecer la concentración aproximada de la lipasa 2-17 se realizó una relación porcentual entre los pesos moleculares de la lipasa 2-17 y la MBP. Así, dado que la lipasa 2-17 corresponde al 52,22% de la proteína total una vez purificada, se obtuvo una concentración aproximada de 1,1 mg/mL de la lipasa 2-17. Esta concentración de proteína obtenida, si bien no es exacta, es de todas formas bastante alta considerando que la expresión no ha sido optimizada. Esta es una importante razón a la hora de escoger un buen sistema de expresión, ya que el sistema escogido a pesar de expresar las proteínas en el citoplasma, que conlleva a un proceso de lisis celular, permite obtener altas concentraciones de la proteína recombinante además de producirla de forma soluble y activa.

Finalmente se determinó la actividad específica aproximada de la lipasa 2-17, y se encontró que 1 mg de esta enzima psicrófila, bajo las condiciones aquí planteadas, es capaz de producir 144,36 μ moles de *p*-nitrofenol/min. Al hacer una comparación bibliográfica con la actividad específica de otras lipasas fue posible establecer que la lipasa 2-17 tiene una alta actividad específica, más aún en comparación con otras lipasas activas a bajas temperaturas que bajo condiciones similares presentación valores bastante inferiores (Rahim R.A, y col, 2007).

4.2 Mejoramiento al azar

La alteración directa de la secuencia nucleotídica codificante para una proteína es la base sustancial de la ingeniería racional, que posteriormente se vio apoyada con el desarrollo de la técnica de mutagénesis sitio dirigida. Esta técnica se basa en la alteración de las secuencias aminoacídicas de las proteínas, permitiendo crear variantes con características mejoradas. Pero la técnica de mutagénesis sitio dirigida se ve limitada muchas veces porque requiere, por lo general, del conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína y hoy en día, el número de enzimas nuevas aisladas a partir de microorganismos es creciente pero el número de estructuras 3D disponibles es aún muy limitado. Además la calidad de la estructura tridimensional influye en gran medida en el resultado del trabajo de ingeniería racional, y esto depende a su vez de la técnica utilizada para la obtención de la estructura 3D, que puede ser cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y modelamiento por homología.

Para el trabajo con la lipasa 2-17 solo se contó con la secuencia aminoacídica de la proteína, lo que dificultó su mejoramiento, guiando el estudio a técnicas que permitieran realizar este mejoramiento sin la necesidad de conocer su estructura tridimensional y que en su mayoría son procesos más lentos y que implican el análisis de un gran número de variantes. Es por ello, que son necesarios nuevos mecanismos para el mejoramiento y optimización de enzimas, que no requieran de la estructura tridimensional de la proteína, y es aquí donde nace el concepto de evolución dirigida que se basa en la simulación de ciertos procesos que ocurren en la naturaleza y que podrían explicar la evolución natural de las especies. Así, los diferentes análisis de las relaciones entre la secuencia, la

estructura y la función de proteínas homólogas, de organismos adaptados a diversas temperaturas, han permitido indagar en las bases moleculares de la adaptación de estas proteínas y se han propuesto mecanismos que expliquen estas adaptaciones a temperaturas más extremas (Jaenicke & Bühm, 1996). Pero los estudios comparativos de proteínas evolutivamente relacionadas son limitados, y se complican aún más debido al hecho de que no siempre es claro si las características criofílicas de estas enzimas se sustentan directamente dada una presión selectiva (Benner, 1989).

Para poder determinar el tipo de mutaciones que acompañaran a la lipasa 2-17 una vez realizado el proceso de evolución dirigida, los clones seleccionados deberán ser secuenciados y esto permitirá tener una idea más concreta de los cambios realizados en la proteína, la función de ciertos aminoácidos en la estabilidad estructural y la presencia o ausencia de mutaciones. Este tipo de técnicas permite determinar mutaciones que pudiesen ser muy difíciles de definir mediante un análisis racional de la estructura o de la secuencia de la proteína. Y es así, como una de las mayores ventajas de la evolución dirigida es poder identificar residuos aminoacídicos que estructuralmente no parecen ser muy importantes, pero que al ser descubiertos, presentan grandes ventajas en la proteína. Finalmente, con este tipo de técnica es posible obtener mutantes de la lipasa 2-17 con un conjunto de variaciones estructurales a partir de un solo paso mutagénico, sin tener que realizar mutación por mutación.

4.3 Evaluación y validación del proceso de *screening*

La técnica de evolución dirigida es conocida como un mecanismo eficiente para la modificación de enzimas para su uso como biocatalizadores.

El primer paso para la construcción de una librería de mutantes usualmente se realiza mediante mutagénesis al azar con PCR propenso a error (Greener A y col., 1996). El segundo paso, y el más crítico, es encontrar las mutantes deseadas, por *screening* o por otro método de selección de las librerías. La detección de la actividad enzimática, una vez terminado todo el proceso, usualmente opera mediante la detección por fluorescencia o de absorción óptica, que para el caso de este trabajo permitió seleccionar clones con mayor actividad dado una mayor coloración.

La detección de los clones favorables involucra previamente la transferencia de colonias individuales a nuevas microplacas de múltiples pocillos que contienen medios de cultivo, el crecimiento de las células hasta fase exponencial y la inducción de la expresión de proteínas. Por ello, previo a la elaboración de la genoteca de variantes, es necesario optimizar el proceso de selección de mutantes para que los clones posiblemente favorables, hayan sido producidos por la modificación genética y no por una variable externa como variaciones ambientales.

Para comenzar el proceso de evolución dirigida de la lipasa 2-17 fue necesario elaborar un completo ensayo que permitiera la detección directa de los clones positivos. Además, la variabilidad entre los ensayos individuales debió ser minimizada durante cada paso del proceso para una correcta interpretación de los datos y para reducir la probabilidad de seleccionar falsos positivos. Para la validación del *screening*, se realizaron una serie de ensayos previos con la enzima nativa, de la misma forma como serán cultivados los mutantes, de tal manera que la variabilidad en los resultados esté dada preferentemente por las mutaciones ejercidas y no por influencias ambientales, ni variaciones en la manipulación.

Así, antes de analizar las librerías de mutantes, se realizó una validación del todo el proceso. Para esto se probaron diferentes medios de crecimiento (LB, TB y medio rico en glucosa) y sus volúmenes que variaron entre 300 y 600 μL , temperaturas de inducción de 18 y 30°C y tiempos de inducción dependientes de las temperaturas antes mencionadas, y finalmente concentraciones del inductor IPTG de 0,3 mM, 0,5 mM y 0,7 mM. Primero se seleccionó el medio de crecimiento en el cual se obtenía mayor densidad celular, que resultó ser el medio LB. Luego dada una cierta temperatura, se probaron diferentes concentraciones de IPTG y tiempos de inducción. Así, a 30 °C se indujo durante 3 horas y para 18 °C se indujo toda la noche. En cada caso se probaron las tres concentraciones del inductor. Finalmente se determinó el volumen de medio obteniéndose un mejor resultado con 600 μL , el de la solución amortiguadora de lisis que también fue de 600 μL y el de cada alícuota trasferida durante el protocolo, que fue de 20 μL . Al término de cada prueba se repitió el proceso variando un nuevo parámetro hasta establecer el protocolo final. Además se utilizaron colonias que contenían el vector sin inserto, como control de la posible expresión basal de lipasas en cepas de *E.coli* BL21 (DE3). Estas colonias exhibieron una absorbancia menor a 0,2. Esta densidad óptica es tan baja que la actividad lipolítica es despreciable, y por ende no fue considerada.

Por último, fue necesario elaborar un ensayo de actividad que permitiera la detección directa de los clones positivos. Para esto se utilizó el sustrato p-nitrofenil caprato, cuyo producto de hidrólisis p-nitrofenol, presenta coloración amarilla y la actividad enzimática fue determinada con un espectrofotómetro lector de microplacas que permitió tener una amplia visión de los resultados. Una vez que se obtuvieron los

resultados se trabajó con el programa computacional Microsoft Excel que permitió tener una visión completa de los datos y facilitó su manejo.

Así, el aumento en la actividad fue medido a través de los cambios de color en una reacción que es directa, es decir que al agregar una muestra del sobrenadante para la reacción con el sustrato, es posible ver de inmediato el cambio de coloración.

Una gran limitación en la técnica de evolución dirigida es la ubicación de la proteína en la célula, que debe ser considerada al momento de seleccionar el método de *screening*, ya que si la proteína que se desea modificar es intracelular, se debe realizar adicionalmente una etapa de lisis celular, como sucedió en este caso. Pero dentro de las limitaciones de esta técnica, la más importante radica en el número de mutantes que pueden ser seleccionados. El análisis global que capture la esencia de la función química y que pueda ser repetido para millones de mutantes, es la parte más difícil de la técnica de evolución dirigida. Así, para cada generación, se obtienen millones de datos que contienen información de la calidad de las librerías, la capacidad evolutiva de las enzimas parentales, y la precisión del método.

El protocolo de evolución dirigida establecido finalmente en este trabajo, permitió obtener resultados manejables y bastante precisos, con absorbancias adecuadas para posteriores análisis y que permitiera la correcta elección de las lipasas con características mejoradas.

4.4 Cuantificación de la variabilidad en el *screening*

Para obtener buenos resultados es importante cuantificar la reproducibilidad y el desacierto del proceso de *screening*. Para ello, se realizaron repetidas mediciones de

cada clon de la librería elaborada con la secuencia parental. Esto permitió determinar el límite menor sobre el cual se observaron mejoramientos de la actividad y que pudieran ser considerados significativos.

La variabilidad es una influencia directa en la capacidad de identificación real, es decir, de las mutantes que han sido mejoradas. Los errores pueden ser azarosos y pueden ser descritos estadísticamente usando datos obtenidos desde el proceso de *screening*. Una manera para estimar la variabilidad o la dispersión de los datos es mediante el coeficiente de variabilidad (Salazar & Sun, 2003), dado por la fórmula:

$$CV = ((\text{desviación estándar} / \text{promedio}) \times 100\%).$$

Para ver cómo la actividad varía entre los diferentes clones de la enzima nativa, se graficó la posición de los clones versus la actividad medida a 20 °C (Figura 16). De esta manera se ven facilitados, tanto la identificación de cada clon y su posición en la placa, como el mejoramiento futuro del proceso. Además esto permitió detectar variaciones sistemáticas del proceso, los que pueden ser originados por diferencias de oxígeno o temperatura, entre otros factores. En la práctica, el coeficiente de variación debe ser lo más pequeño posible, esto es, menos de un 10% (Salazar & Sun, 2003). Dadas las condiciones de trabajo con las que se realizó la optimización del proceso, se obtuvo un coeficiente de variación de 7,55%. Este valor es bastante bueno considerando que todo el proceso se realizó de forma manual.

Una vez determinada la tasa de error, se comenzaron a determinar las condiciones para la generación de las mutaciones. La técnica escogida fue PCR propenso a error, y para obtener una tasa mutagénica de 1 ó 2 mutaciones por gen, según lo recomendado por Cadwell & Joyce (1992), se probaron dos condiciones mutagénicas. La primera fue

aumentar la concentración de magnesio en todas las reacciones, lo que aumenta la velocidad de amplificación estabilizando pares de nucleótidos que no son complementarios, y la otra consistió en disminuir las concentraciones de ADN molde, lo que permitió aumentar la amplificación a partir de nuevas hebras. Así se probaron tres reacciones de PCR con diferentes concentraciones de ADN molde, 0,5 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, 0,05 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ y 0,005 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, pero todas con una concentración de magnesio de 7 mM. Como era de esperarse, la reacción que presentó la mayor tasa mutagénica, fue la reacción con menor concentración de ADN molde, en la cual la mayoría de los clones fueron inactivos. Por otro lado, la reacción con mayor concentración de ADN molde presentó la menor tasa mutagénica, obteniéndose el mayor número de clones activos, pero sin grandes variaciones con respecto a la enzima nativa. Finalmente la concentración intermedia de ADN molde, 0,05 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, fue la que presentó mejores resultados y la que se escogió para realizar el resto de los ciclos de PCR (Figura 17).

Posteriormente, se realizó un procedimiento de *screening* de un pequeño número de clones primero, para asegurarse que la librería fuese de buena calidad, es decir que presente una tasa de mutación que no sea demasiado alta o baja. Para ello, se analizaron cerca de 400 clones los cuales fueron amplificados mediante la condición de PCR previamente establecida. Se detectaron cerca de 20 posibles clones positivos, lo cuales presentaron valores de absorbancia mayores a las presentadas por la enzima nativa. Estos clones se utilizaron para realizar un nuevo *screening* y a partir de ellos, se escogieron 2 variantes candidatos. Estos clones serán mandados a secuenciar y el análisis de la secuencia permitirá ver si hay mutaciones en cada clon. Si es así, los

clones serán caracterizados y el mejor variante será escogido como molde para la segunda ronda mutagénica.

Por último, es importante disponer de un buen sistema de ensayo de actividad masivo para la utilización y el desarrollo de técnicas de evolución dirigida y para ello, el sistema de expresión seleccionado juega un papel fundamental. La sensibilidad y la precisión de un análisis de alto rendimiento es en gran parte función del sistema de expresión de la proteína. Las proteínas que serán mejoradas por esta técnica mutagénica no deben traer consigo grandes procesamientos y etapas de purificación largas y difíciles de realizar, dada la necesidad de ensayar miles de posibles variantes de la enzima. Para el caso de la lipasa 2-17 solo fue necesario realizar una etapa extra de lisis celular que no dificultó mayoritariamente el trabajo, pero cada etapa extra aumenta la probabilidad de tener errores asociados a la manipulación y no a las mutaciones en particular. Sistemas de expresión que cuentan con señales de exportación son ampliamente utilizados, lo que facilita el trabajo durante el desarrollo del método de selección y de la elaboración de las librerías de mutantes.

Además es importante considerar que existen muchas discrepancias sobre el método más eficaz para generar la diversidad genética. Los procesos de *screening* y los análisis de alto rendimiento son reinventados para cada caso particular de proteína utilizada, ya que los cambios en los parámetros como tasas de mutación, selección y tamaño de la población pueden alterar potencialmente el resultado.

4.5 Lipasa 2-17 adaptada a bajas temperaturas

Las lipasas han atraído mucha atención estos últimos años, en parte debido al interés en determinar cómo catalizan reacciones en una interfase aceite-agua, e igualmente debido a que las lipasas proveen herramientas valiosas para la hidrólisis estereoespecífica y la síntesis de una amplia variedad de ésteres con gran potencial biotecnológico. Por otra parte, las lipasas activas a bajas temperaturas exhiben una menor rigidez facilitando la hidrólisis del sustrato y así, estas adaptaciones al frío, han desarrollado la necesidad de nuevas herramientas bioquímicas y bioinformáticas para su análisis y caracterización (Jaenicke R, 1991).

La lipasa 2-17 estudiada presenta ciertas propiedades que le permiten estar adaptada al frío catalizando sus reacciones a muy bajas temperaturas. Se piensa que una característica involucrada en la adaptación a estas bajas temperaturas es la presencia de residuos de glicina en las secuencias conservadas que contienen serina e histidina en el sitio catalítico, lo que podría permitir la flexibilidad de la enzima (Parra L.P. y col., 2008). Pero debido al bajo número de secuencias y estructuras conocidas de lipasas adaptadas al frío, es difícil aún estimar todas las características que hace de esta enzima tan particular, ser capaz de trabajar a muy bajas temperaturas. Es por ello que es necesario el desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de enzimas adaptadas al frío, y la evaluación del comportamiento, el análisis, y mejoramiento de sus propiedades, fortalece la búsqueda de potenciales aplicaciones biotecnológicas.

5 CONCLUSIONES

- Se logró clonar el gen de la lipasa 2-17 en el vector pGEM-T Easy y expresarla de forma recombinante en el sistema de expresión *E.coli* TB1/ pMAL-c2E. La secuencia del gen resultó ser idéntica a la obtenida por Parra L.P. y col., 2008.
- La lipasa expresada se obtuvo de forma pura y activa cuando se encontraba unida a la MBP como lipasa quimérica. Si bien el protocolo de expresión no ha sido optimizado, esta enzima se obtuvo en alto rendimiento en comparación a la obtención de otras lipasas.
- La determinación del valor aproximado de K_m de la lipasa 2-17 permitió implementar un apropiado ensayo de actividad lipolítica en medio líquido.
- El protocolo final que permitió optimizar el proceso de *screening* consistió en la inducción de los clones en medio TB, con una concentración de 0,5 mM de IPTG durante 16 horas a 18°C.
- Estas condiciones permitieron obtener un coeficiente de variabilidad de un 7,55%, encontrándose dentro de valor aceptado en la práctica.
- Las condiciones de PCR propenso a error con una concentración de magnesio de 7 mM y una concentración de ADN molde de 0,05 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, permitieron obtener una tasa mutagénica adecuada, inactivando cerca del 50% de los clones.
- Las condiciones establecidas para el PCR propenso a error permitieron generar dos clones con aumentos en la actividad de un total de un 400 variantes analizados, confirmando que las estrategias escogidas eran favorables para obtener mutantes con actividad lipolítica mejorada.

6 PROYECCIONES

Como continuación de este seminario de título se espera realizar rondas de PCR propenso a error con las condiciones mutagénicas ya determinadas, para generar variantes de gen de lipasa que presenten actividad mejorada. Esto se realizará mediante el análisis de más de 1000 clones por ciclo, siguiendo el mismo protocolo descrito durante la optimización del proceso de *screening*.

A pesar de que los procesos de evolución dirigida se basaban en la selección por amplificación, actualmente este protocolo incorpora el método de *DNA shuffling* como parte del proceso mutagénico principal. Por lo tanto, se propone realizar varias rondas de mutaciones mediante PCR propenso a error y una vez seleccionados los mutantes con las características mejoradas se procederán a recombinar nuevamente mediante la técnica de *DNA shuffling* y se seleccionarán los mutantes que presenten un mejor resultado. La biblioteca de mutantes se definirá dada la actividad y la proteína más apta o la mejor recombinación de varios mutantes se convertirá en el templado para la generación siguiente. Así, es posible elaborar una genoteca de genes quiméricos con alta diversidad y por lo tanto con una alta probabilidad de obtener nuevos genes que codifiquen para nuevas proteínas.

Finalmente una de las mayores limitaciones de este trabajo fue no disponer de la estructura tridimensional de la lipasa 2-17, es por ello, que se propone como una alternativa en el trabajo de caracterización y conocimiento esta enzima, utilizar la técnica de modelamiento por homología, que además sería de gran ayuda para el mejoramiento genético de la lipasa a través de nuevas estrategias de mutagénesis.

El modelamiento por homología es una metodología que permite construir un modelo útil de la estructura tridimensional de una proteína cuya estructura real es desconocida. Se necesita conocer su secuencia aminoacídica y la estructura tridimensional de una proteína homóloga, evolutivamente relacionada, obtenida por difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear (NMR). Así, esto permitiría optimizar el proceso e implicaría un análisis de un menor número de variantes, favoreciendo enormemente el trabajo.

Una vez obtenida la estructura tridimensional de la lipasa, es posible estudiar el cambio de algunos aminoácidos que permitan aumentar la termoestabilidad enzimática de la lipasa 2-17. Estas mutaciones pueden ser realizadas ya sea a través de mutagénesis por saturación o mediante mutagénesis sitio dirigida.

7 BIBLIOGRAFIA

1. **Arnold F.H., Wintrode P., Miyazaki K., and Gershenson A.** (2001) How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem. Sci* 26: 100-106.
2. **Arpigny J.L., Lamotte J., and Gerday C.** (1997) Molecular adaptation to cold of an antarctic bacterial lipase *J. Mol. Catal. B Enzym.* 3: 29-35.
3. **Arpigny J.L., and Jaeger K.E.** (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343:177-183.
4. **Baneyx F.** (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:411-421.
5. **Benner S.A.** (1989). Enzyme kinetics and molecular evolution. *Chem. Rev.* 89: 789-806.
6. **Bornscheuer, U.T., Krebsfänger, N., Zocher, F., Altenbuchner, J.** (1998), Characterization, and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*, *Enzyme Microb. Technol.* 21: 641-646.
7. **Brady K., Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson G., Tolley S., Turkcuburg J.P., Christiansen I., Høge-Jensen B., Nørskov L., Thim K., and Menge J.** (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343: 767-770.
8. **Brzozowski A.M., Derewenda U., and Derewenda Z.S.** (1990). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 351: 491-494.
9. **Byun J-S., Rhee J.K., Kim N.D., Yoon J.H., Kim D-H, Koh E., Oh J-W and Cho H-S.** (2007). Crystal structure of hyperthermophilic esterase EstE1 and the relationship between its dimerization and thermostability properties. *BMC Structural Biology* doi:10.1186/1472-6807-7-47.
10. **Cadwell, R., and Joyce, G.,** (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Meth. Appl.* 2: 28-33.
11. **Cavicchioli R., Thomas T.:** Extremophiles. In *Encyclopedia of Microbiology*, edn 2. Edited by Lederberg J., Alexander M., Bloom B.R., Hopwood D., Hull R., Iglewski B.H., Laskin A.I., Oliver S.G., Schaechter M., and Summers W.C.. (2000) San Diego: Academic Press Inc; 317-337. Broad coverage of extremophiles including sections on habitats and microorganisms. The biochemistry and physiology of adaptation of psychrophiles are also covered.
12. **Cavicchioli R., Saunders N., and Thomas T.** (2002), Cold shock response in microorganisms. In *Extremophiles for the UNESCO Encyclopedia of Life Support Systems*. in press. Chapter within a broad compilation on extremophiles, specifically covering coldshock adaptation of all cellular components of Bacteria, Archaea and Eucarya.
13. **Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D., and Sowers K.R.** (2002). Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:253-261.

14. **Cirino P., Mayer K., and Umoeno D.** (2003) Generating mutant libraries using error-prone PCR; Arnold F. and Georgiou G. Directed evolution screening and selection methods, vol 2, 1^oed.
15. **Feller G., and Gerday C.** (1997) Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life Sci.*, 53: 830-841.
16. **Feller G., and Gerday C.** (2003) Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation *Nat. Rev. Microbiol.*, 1(3):200-208.
17. **Fields P.A.** (2001) Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 129: 417-431.
18. **Fischer M, and Pleiss J.** (2003). The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res.* 31:319-321.
19. **Fojan P., Jonson P.H., Petersen M.T.N., and Petersen S.B.** (2000) What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* 82: 1033-1041.
20. **Gerday C., Aittaleb M., Arpigny J.L., Baise E., Chessa J-P., Garsoux G., Petrescu I., and Feller G.** (1997) Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim. Biophys. Acta* 1342: 119-131
21. **Gerday C., Aittaleb M., Bentahir M., Chessa, J. P., Claverie P., Collins T., D'Amico S., Dumont J., Garsoux G., Georlette D., Hoyoux A., Lonhienne T., Meuwis M. A., and Feller G** (2000). Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* 18:103-107.
22. **Gianese G., Argos P., and Pascarella S.** (2001) Structural adaptation of enzymes to low temperatures.. *Protein Eng.*, 14(3): 141-148.
23. **Gomes J., and Steiner W.** (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* 42:223-235.
24. **Greener A., Callahan M., and Jerpseth B.** (1996) An efficient random mutagenesis technique using an E.coli mutator strain. *Methods Mol. Biol.*, 57: 375-385.
25. **Grochulski P., Li Y., and Schrag, J.D.,** (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* 268: 12843-12847.
26. **Grochulski P., Li Y., Scharg Y., and Cygler M.,** (1994) Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Acta Biotechnol.* 11: 159-167.
27. **Gupta R., Gupta N., and Rathi P.** (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:763-781.
28. **Hobson A.H., Buckley C.M., Aamand J.L., Jørgensen S.T., Diderichsen B., and McConnell** (1993) Activation of a bacterial lipase by its chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9(1): 5682-5686.
29. **Hough D.W., and Danson M.J.** (1999) Extremozymes *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3:39- 46.
30. **Huang Y., Cai Y., Yang J., and Yan Y** (2008) Directed evolution of lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by error-prone PCR. *Prot. Eng.* 24:445-51

31. **Jaeger K.E., Dijkstra B.W., and Reetz M.T.** (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases" *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315-351.
32. **Jaeger K.E., and Eggert T.** (2002). Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:390-397.
33. **Jaenicke R.** (1991) Protein stability of preteins in extreme conditions. *Eur. J. Biochem.*, 202: 715- 728.
34. **Jaenicke R., and Bühm G.** (1996). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 738-748.
35. **Jaenicke R., and Závodszky P.** (1990). Proteins under extreme physical conditions. *FEBS Lett.*, 268(2): 344-349.
36. **Jaenicke R.** (1998) The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8:738-748.
37. **Kanaya S., Koyanagi T., and Nanaya E.** (1998). An esterase from *Escherichia coli* with a sequence similarity to hormone-sensitive lipase. *Biochem. J.* 332:75-80.
38. **Kauffmann I. and Schmidt-Dannert, C.** (2001). Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design. *Protein Eng.* 14: 919-928.
39. **Macrae A.R.** (1983) Extracellular microbial lipases. En *Microbial enzymes and biotechnology*. Editado por Fogarty W.M., Applied Science Publishers, pp.225-250.
40. **Marshall C.J.** (1997). Cold-Adapted enzymes. *Trends Biotechnol.* 15:359-364.
41. **Moore J., Jin H., Kuchner O., and Arnold F.H.** (1997) Strategies for the in vitro evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *J. Mol. Biol.* 272: 336-347.
42. **Nardini M., and Dijkstra B.W.** (1999). α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 9:732-737.
43. **Pandey A., Benjamin S., Socol C.R., Nigam P., Krieger N., and Socol V.T.** (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29:119-131.
44. **Parra L.P., Reyes F., Acevedo J.P., Salazar O., Andrews B.A., and Asenjo J.A.** (2008) Cloning and fusion expression of a cold-active lipase from marine Antarctic origin. *Enzyme and Microbial Technology* 42: 371-377
45. **Pleiss J., Fischer M., and Schmid R.D.** (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding sites. *Chem. Phys. Lipids* 93(1-2):67- 80.
46. **Pleiss J., Fischer M., Peiker M., Thiele C., and Schmid R.D.** (2000). Lipase engineering database. Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10:491-508.
47. **Rahim R.A., Rashidah A. R., Sabrina S., Ainihayati A. R., Shanmugapriya. P., Nazalan N and Razip S.** (2007). Psychrophilic Enzymes from the Antarctic Isolates. School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia.
48. **Rellos P., and Scopes R.K.** (1994) Polymerase chain reaction-based random mutagenesis: production and characterization of thermostable mutants of

- Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase-2. *Protein Expr. Purif.* 5: 270-277.
49. **Riggs P., and Ausebel F.M.** (1985), *Current Protocols in Molecular Biology* Greene Associates/Wiley Interscience, New York pp. 16.6.1–16.6.10.
 50. **Rowe L.A. Geddie M.L. Alexander O.B. Matsumura I.** (2003) A comparison of directed evolution approaches using the β -Glucuronidase model system. *J. Mol. Biol.* 332: 851–860.
 51. **Russell N.J., and Hamamoto T.** (1998) Psychrophiles. In *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. Edited by Horikoshi K, Grant WD. New York: Wiley-Liss; 25-45.
 52. **Russel N.J.** (2000) Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles* 4:83-90.
 53. **Salazar O., and Sun., L.** (2003). Evaluating a screen and analysis of mutant libraries in *Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods*, voll., Human Press
 54. **Santaniello E., Ferraboschi P., Grisenti P., and Manzocchi A.,** (1992). The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chemical building blocks. *Chem. Rev.* 92: 1071–1140.
 55. **Santaniello E., Ferraboschi P., and Grisenti P.,** (1993). Lipase catalysed transesterification in organic solvents: applications to the preparation of enantiomerically pure compounds. *Enzyme Microb. Technol.* 15:367–382.
 56. **Sarda H., and Desnuelle P.** (1958) Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta* 30: 513-521.
 57. **Sellek G.A., and Chaudhuri J.B.** (1999). Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzym. Microb. Tech.* 25:471–482.
 58. **Sharma R., Chisti Y., and Banerjee U.C.** (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, 19: 627-662.
 59. **Stemmer W.P.** (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-391.
 60. **Van Kampen M.D. and Egmond M.R.** (2000) Directed evolution: From a staphylococcal lipase to a phospholipase. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 717–726.
 61. **Van Tilbeurgh H., Egloff M.P., Martinez Rugani N., Verger R., and Cambillau C.** (1993) Interfacial activation of the lipase procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 362: 814-820.
 62. **Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., and Haas M.** (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Molec. Catalysis B: Enzymatic* 9:113-148.
 63. **Winkler F.K., D'Arcy A., and Hunziker W.** (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343: 771-774.
 64. **Zhang J.H., Dawes G., and Stemmer W.P.** (1997). Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94: 4504-4509.
 65. **Zhang N., Suen W.H., Windsor W., Xiao L., Madison V., and Zaks A.,** (2003) Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Prot. Eng.* 16: 599-605.

66. **Zhao H. and F.H. Arnold** (1999). Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Prot. Eng*, 12: 47-53.

8 ANEXOS

8.1 Secuencia nucleotídica del gen codificantes para la lipasa 2-17.

ATGCCTATTT	TACCAGTGCC	ATCGCTCAAT	GCTTTATTGA	CAAAAACGCT	50
TAAGACCGTA	AAAAAGACAG	CCGCTAAAAA	TGTGCACCAG	CATCATATTT	100
TGCACCATAC	GCTAAAAGGG	TTGGATAATC	TGCCAACGCC	GCTACTCGAA	150
CGAGTTAATC	ACCAATTAAA	AGCGTCTACA	GCGGAGCAAT	ATCCCCTTGC	200
TGACGCCCAT	CTGCGCCTGA	TACTTGCGGT	CAGTAATAAG	CTCAAGCGCC	250
CGTTAGCACT	GGATAAGCTA	CCCAACCTAC	GGCAGAAATT	TGGTACAGAT	300
GCGGTGTCGT	TGCAAGCACC	TAGCGTTTGG	CAACAAAATG	CTGAGGCCTC	350
AGGAAATTCA	GAGAATGCCG	TCAGCTGGCA	AGATAAGACC	ATTGCCAATG	400
CGGATGGTGG	TGATATGACC	GTGCGCTGCT	ACCAGCAGTC	GAAGCAGAAAT	450
AACGAGGGAA	AAAGTACGGA	TGAAGTCGCC	ATGCTGTTTT	TTCATGGGGG	500
CGGGTTTTGT	ATTGGCGATA	TCGACACGCA	TCATGAGTTT	TGTCATACGG	550
TCTGTGCCCA	AACTGGCTGG	GCAGTCGFGA	GTGTCGACTA	TCGCATGGCT	600
CCTGAATATC	CAGCGCCAAC	AGCTCTTAAA	GACTGTCTGT	CGGCTTACGC	650
TTGGCTGACT	GAACATTCTC	AGTCACTTGG	TGCATTGCCA	TCGCGCATCG	700
TATTGTCTGG	TGATAGTGCA	GGTGGTTGCT	TGGCAGCACT	GGTGGCGCAG	750
CAGGTTATCA	AGCCTATCGA	TGCATTATGG	CAAGATAATA	ATCAAGCTAC	800
TGAGACTGAT	AAAAAAGCCA	ATGACACCTT	TAAAAAATCA	CTGGCTGATT	850
TGCCGCGACC	TTTAGCACAA	TTGCCGCTCT	ACCCTGTCAC	TGATTATGAG	900
GCTGAATATC	CAAGTTGGGA	GCTTTATGGT	GAAGGCTTGC	TGCTCGATCA	950
CAACGATGCA	AATGTCTTTA	ATACTGCCTA	CACTCAGCAC	AGTGGTCTAA	1000
TGCAGTCCCA	CCCCTTATC	TCAGTCATGC	ACGGTGACAA	TGCGCACCTG	1050
TGTCCAAGCT	ATGTCGTCGT	TGCGGAATTA	GATATCTTGC	GAGATGAAGG	1100
ACTGGCTTAT	GCCGAGCTTT	TGCAAAAAGA	AGGCGTTAAG	GTAGAAACTT	1150
ATACAGTGCT	AGGCGCACCG	CATGGTTTTA	TTAACTTGAT	GAGTGTCAT	1200
CAAGGTCTTG	GCAATCAGAC	AAACTATATT	ATCAAGTCGT	TTGCTTGTTT	1250
TGTGCAAAAC	CTACTGACCA	GTGAGGGTGA	TGAGCCAAAT	CTC	1300

8.2 Secuencia aminoacídica de la lipasa 2-17.

MPILPVPSLNALLTKTLKTVKKTAAKNVHQHHILHHTLKGLDNLPTPLLERVNHQLKASTAEQY
PLADAHRLRLILAVSNKLRPLALDKLPNLRQKFGTDAVSLQAPSVWQQNAEASGNSENAVSWQD
KTIANADGGDMTVRCYQQSKQNNKSTDEVAMLFFHGGGFCIGDIDTHHEFCHTVCAQTGWAV
VSVDYRMAPEYPAPTALKDCLSAYAWLTEHSQSLGALPSRIVLSGDSAGGCLAALVAQQVIKPI
DALWQDNNQATETDKKANDTFKKSLADLPRPLAQLPLYPVTDYEAEPYPSWELYGEGLLLDHND
NVFNTAYTQHSGLMQSHPLISVMHGDNAHLCPYVVVAELDILRDEGLAYAELLQKEGVKVETY
TVLGAPHGFINLMSVHQGLGNQTNYYIKSFACFVQNLLETSEGDEPNL

8.3 Curva de calibración p-nitrofenol

