

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**



**“Evaluación Físicoquímica de Mutantes  
Termorresistentes de la  $\beta$ -glucosidasa B  
de *Paenibacillus polymyxa*”**

**Tesis que presenta:  
Q. Menandro Camarillo Cadena  
Para obtener el grado académico de  
Doctor en Ciencias (Química)**

**Área de Biofísicoquímica**

**Posgrado en Ciencias (Química)**  
Doctorado Directo.

**Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna.**  
Asesor del Departamento de Química de la UAM-Iztapalapa.

México, D. F., Junio de 2011

*Gracias a los sinodales por sus observaciones y críticas a este trabajo de tesis, lo cual ayudo a su mejora y su presentación.*

*Dr. Andrés Hernández Arana.*

*Dra. Silvia Solís Mendiola.*

*Dr. Alejandro Sosa Peinado.*

*Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros*

*Dr. Edgar Vázquez Contreras.*

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) con la beca de doctorado número 204689 y la concesión 46166.

*Este trabajo se lo dedico a mi mamá Gabriela Cadena, por su inmenso apoyo incondicional, el cual me ha servido para aprender y realizar las cosas que me fascinan como es la investigación, lo cual agradeceré durante toda mi vida.*

*Así mismo a mi hija Andrea Camarillo y su familia (Britany, Luna y Dorian), quienes son una inspiración para mí. También a mis hermanos Beatriz, Sofía, Emilio y Víctor.*

*A mis sobrinos Enrique, Maribel y Esteban.*

*Asimismo a Ángeles Saldaña Martínez por su comprensión y paciencia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Quiero darle las gracias al Dr. Rafael A. Zubillaga Luna, por su paciencia, apoyo personal, académico y en especial por creer en mí, así como esa entereza por enseñarme y aun más por permitirme realizar este trabajo de tesis con su asesoría. Se que me falta mucho por aprender, Pero en esta etapa de mi vida, me cultivé lo cual comparo con un eslabón, el cual me puede ayudar a continuar en el camino de la investigación. Me faltan palabras para decir, mi sentir, muchas gracias y espero continuar con su apoyo y amistad brindada.*

*Agradezco al Dr. Julio Polaina por otorgarnos el gen que expresa la enzima silvestre y sus mutantes de la  $\beta$  glucosidasa B de *Penibacillus polymyxa*, ya que, facilito demasiadas cosas para este trabajo.*

*También quiero darle las gracias a la Dra. Georgina Garza Ramos y Dra. Mariana Peimbert, por su aportación con la expresión y purificación de la enzima  $\beta$  glucosidasa silvestre y sus mutantes. Y por ser una parte fundamental del este proceso de tesis.*

*Asimismo le agradezco al Dr. Andrés Hernández Arana, que durante la realización de este trabajo de tesis, cuantas veces fueron requeridas sus opiniones y recomendaciones para una mejoría del trabajo, el Dr. siempre acepto gustosamente, lo cual mejoro mi aprendizaje y ni que hablar de su apoyo personal y amistad brindada.*

*Así mismo agradezco a la Dra. Teresa Ramírez y Dra. Silvia Solís, también a José Antonio Moreno Razo y Rosendo López, Dr. Humberto González, por mostrarme su amistad y el camino el que me encuentro hoy en día, el cual no es fácil pero tampoco es imposible (la vida).*

*Quiero decirle gracias por todo a la Mtra. Iseo González.*

*Agradezco a Mirna Granado y Miroslava Salgado, por su apoyo incondicional.*

*También quiero agradecer a los doctores de área de biofísicoquímica: Dra. Silvia Solís, Dra. Jacqueline Padilla, Dr. Alfonso Arroyo, Dr. Salvador Tello y Dr. Arturo Rojo. Así como a mis compañeros del laboratorio: Marugenia Cruces, Citlali Toledo, Ariana la Bastida, Viviana C. S., Juan Carlos Martínez, Leonardo Herrera, Francisco Reyes, Arnulfo Vidrio, Ponciano García, David Tovar, Iris Serratos, quienes día con día, convivimos dentro y fuera de la casa llamada laboratorio, que es donde vivimos gran parte de nuestras vidas. Cada uno con su personalidad que es lo que enriquece la vida diaria y espero contar con su amistad, la cual me han brindado.*

*Quiero dar las gracias también a las personas que he conocido durante este camino, las cuales también me han permitido a prender su humanidad y de esté quehacer de investigación y/o trabajo de tesis: Dr. Gerardo Pérez-Hernández, Dr. Edgar Vázquez Contreras, Dra. Nancy Martín, Izlia Arroyo, Reyna Robles y Dra. Edith González, Zayil y Hayde.*

*No quiero olvidarme de toda la gente del departamento de química que me ha mostrado siempre su confianza y han hecho más agradable mi estancia durante todos estos años, así mismo a Silvia Cortes, Febe y Pepé.*

*Y, no me quiero ni olvidar de los compañeros y amistades, quienes enriquecen la vida del día con día en la UAMI: Marialuisa Lozano, Octavio Cienega, Alejandro Pérez, Manuel Islas, Carlos Guzmán, Juan M. Padilla, Roberto López, Enrique Cañeda, Ricardo Colin, Israel Cano, Israel Rangel, Adrián Uribe, Miguel Balderas, Omar, Julio Cortes, Marco Mora, Martha Bautista. No caben todas las personas que conozco y que aun conservo su amistad y queme alentaron a proseguir, a todos muchas gracias.*

*Gracias UAMI, por ser, “el oasis en el desierto de mi ignorancia”.*

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”.

Isaac Newton.

## Abreviaturas

$\text{\AA}$	Amstrongs (unidades de distancia)
$\beta\text{glB}$	$\beta$ -Glucosidasa B
$C_\beta$	Carbonos beta
<i>CME</i>	Centro de masa espectral
DC	Dicroísmo circular
<i>D</i>	Estado desplegado de la proteína
$\Delta\Delta G_{\text{elec}}$	Diferencia de energía libre electrostática
$\Delta G^{N\rightarrow ET}$	Energía libre de activación
$\Delta H^{N\rightarrow ET}$	Entalpía de activación
$\Delta S^{N\rightarrow ET}$	Entropía de activación
Ec	Ecuación
ET	Estado de transición
$f_D$	fracción desnaturalizada
$f_N$	fracción nativa
<i>h</i>	constante de Planck
$IF_i$	intensidad de fluorescencia
$k_B$	constante de Boltzmann
$k_d$	constante de velocidad de desnaturalización térmica
$K_d$	constante de equilibrio de desnaturalización
kDa	kilodaltones
$\text{kJ mol}^{-1}$	kilojulios por mol
$k_{\text{cat}}$	Constante catalítica ó número de recambio
$K_M$	constante de Michaelis
$\lambda_i$	longitud de onda <i>i</i>
mM	milimolar
MDQ	Mutantes de carga
MED	Mutantes por Evolución Dirigida
$\mu\text{g mL}^{-1}$	microgramos por mililitro
<i>N</i>	Estado nativo de la proteína
NaCl	Cloruro de Sodio
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas (Protein Data Bank)
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNPG	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido
<i>S</i>	substrato
$\theta$	elipticidad observada
$\theta_N$	elipticidad de la forma nativa
$\theta_D$	elipticidad de la forma desnaturalizada
$[\theta]$	elipticidad molar por residuo medio
<i>T</i>	temperatura
$T_m$	temperatura media
$T_{\text{max}}$	temperatura de máxima capacidad calorífica
TM	triple mutante
<i>v</i>	velocidad inicial
$V_{\text{máx}}$	velocidad enzimática máxima

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>8</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>9</b>
1.1 Antecedentes	14
1.1.1 Mutantes por evolución dirigida de la $\beta$ glB	17
1.1.2 Mutantes por diseño racional de $\beta$ glB	16
<b>2. Objetivos</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivos particulares	18
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>19</b>
3.1 Expresión de la $\beta$ -glucosa B silvestre y sus mutantes	19
3.2 Purificación de las enzimas	19
3.3 Ensayos de actividad enzimática	20
3.4 Espectroscopía de Dicroísmo Circular	21
3.5 Perfiles de desnaturalización térmica	21
3.6 Cinéticas de desplegamiento térmico	22
3.7 Espectroscopía de Fluorescencia	22
<b>4. Resultados</b>	<b>23</b>
4.1 Ensayos de actividad enzimática	23
4.2 Propiedades Estructurales de las Mutantes de $\beta$ glB	24
4.2.1 Espectros de Dicroísmo Circular de la $\beta$ glB silvestre y sus mutantes.	24
4.2.2 Espectros de Fluorescencia intrínseca de la $\beta$ glB silvestre y sus mutantes	25
4.3 Perfiles de desnaturalización térmica	27
4.4 Mecanismo de desplegamiento térmico de la $\beta$ -glucosidasa B silvestre	29
4.4.1 Desnaturalización térmica	29
4.4.2 Cinéticas de desplegamiento térmico de $\beta$ glB silvestre	32

4.4.3 Inactivación térmica	34
4.5 Cinéticas de desplegamiento	35
4.6 Contribuciones de la entalpía a la barrera de activación Grupo MED	39
<b>5. Discusión</b>	<b>43</b>
5.1 Actividad enzimática	43
5.2 Propiedades Estructurales de las Mutantes (MED y MDQ) de $\beta$ glB	45
5.2.1 Espectros de Dicroísmo Circular de la $\beta$ glB silvestre y sus mutantes	45
5.2.2 Espectros de Fluorescencia intrínseca de la $\beta$ glB silvestre y sus mutantes (MED y MDR)	46
5.3 Perfiles de desnaturalización térmica	47
5.4 Mecanismo de desnaturalización térmica de la $\beta$ -glucosidasa B	47
5.5 Estabilidad cinética de las mutantes MED de $\beta$ glB	51
5.6 Estabilidad cinética del grupo MDQ de $\beta$ glB	54
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	<b>56</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>57</b>
<b>Apéndice</b>	<b>61</b>
A1. Tratamiento de datos de Perfiles térmicos	61
A2. Modelo de Lumry-Eyring	64

## Resumen

En el presente trabajo se realizó una caracterización funcional, estructural y energética de diversas mutantes de la enzima  $\beta$ -glucosidasa B ( $\beta$ glB) proveniente de la bacteria *Paenibacillus polymyxa*. Como un prerrequisito para los estudios de estabilidad, se determinó que la enzima silvestre se desnaturaliza térmicamente a través del denominado mecanismo de Lumry-Eyring ( $N \leftrightarrow D \rightarrow I$ ) y que a temperaturas altas, superiores a  $T_m$ , la energía de activación solo involucra la etapa elemental de desnaturalización ( $N \rightarrow D$ ). Las mutantes estudiadas se generaron previamente con la intención de producir variantes termorresistentes de la enzima  $\beta$ glB en dos procesos independientes: I) Mutaciones por evolución dirigida (MED) (tres mutantes puntuales: H62R, N223Y, M319I y una triple, TM, H62R/N223Y/M319I) y II) Mutaciones de carga (MDQ) para minimizar la energía electrostática de la proteína solvatada (A91R, A112R, A238R y V323R). Se determinó la estabilidad térmica de las mutantes a través de cinéticas de desnaturalización a diferentes temperaturas. Todas las mutantes de  $\beta$ glB mostraron ser activas y con una eficiencia catalítica semejante y en algunos casos inclusive mayor a la enzima silvestre. Ninguna de las mutantes mostró diferencias significativas en sus espectros de fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular en el UV lejano en relación a los de la enzima silvestre, por lo que las mutaciones analizadas no generaron cambios estructurales importantes. Se cuantificaron los cambios energéticos en la barrera de activación (energía libre de Gibbs,  $\Delta G^{N \rightarrow ET}$ ), mediante la determinación de las constantes de desnaturalización térmica,  $k_d$ , siguiendo el proceso cinético por dicroísmo circular de todas las mutantes. Los incrementos en la barrera de activación para la desnaturalización de las mutantes sencillas H62R, N223Y y M319I del grupo MED, muestra un efecto aditivo ( $\Delta G_{TM}^{N \rightarrow ET} = \sum \Delta G_{mutante, puntual}^{N \rightarrow ET}$ ) en la TM (H62R/N223Y/M319I). De las cuatro mutantes de carga (MDQ) solo una presentó un aumento en la barrera de activación de alrededor de  $1.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ , dos de ellas mostraron una estabilidad similar a la de la enzima  $\beta$ glB silvestre, mientras que la V323R mostró una disminución de  $4.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

# 1. Introducción

Las proteínas son polímeros de aminoácidos que desempeñan papeles cruciales en prácticamente todos los procesos biológicos. La significación y alcance de sus actuaciones pueden comprenderse mediante los ejemplos de las funciones siguientes: catálisis enzimática, transporte y almacenamiento, movimiento coordinado, soporte mecánico, generación y transmisión de los impulsos nerviosos, control del crecimiento y la diferenciación, entre otros.

Existen veinte tipos de aminoácidos que varían en tamaño, forma, carga, capacidad de enlace de hidrógeno y reactividad química. Todas las proteínas de todas las especies, desde las bacterias al hombre (escala de filogenia), se construyen a partir de la combinación de esos veinte aminoácidos comunes más la selenometionina y la pirrolisina. Una característica llamativa de las proteínas es que tienen una estructura tridimensional bien definida en su ambiente fisiológico normal con pequeñas fluctuaciones conformacionales locales que constituyen el denominado estado nativo, *N*. Una cadena polipeptídica extendida o estructurada al azar carece de actividad biológica, esta conformación extendida o *desnaturalizada* puede favorecerse a través de cambios en su ambiente físico o químico. Al conjunto de estructuras extendidas generado en la desnaturalización se le ha denominado *estado desplegado*, *D*. Los métodos más comunes de desnaturalización son el calentamiento, la adición de algún agente químico como la urea, el cloruro de guanidinio, o solventes orgánicos, el cambio de pH o de fuerza iónica y la aplicación de presiones elevadas (Fersht, A., 1999). La función deriva de la diferencia entre contactos y estructuras, es decir de la organización de los átomos en una estructura tridimensional. La secuencia de los aminoácidos es importante porque determina la conformación de las proteínas.

Al estudiar la arquitectura de las proteínas se encuentran cuatro niveles de estructuración. La estructura primaria se refiere a la secuencia de aminoácidos. La estructura secundaria está relacionada con el ordenamiento local y espacial de los residuos de aminoácidos próximos entre sí. Algunas de estas relaciones estéricas y electrostáticas entre los átomos que componen a los aminoácidos son de naturaleza regular, originando una estructura periódica. La hélice  $\alpha$  y la lámina  $\beta$  son elementos de estructuras secundarias. La estructura terciaria se refiere al ordenamiento espacial de los residuos de aminoácidos alejados en la secuencia lineal, así como al patrón de los enlaces disulfuro formados a partir de enlaces covalentes entre los grupos tiol de las

cisteínas. La línea divisoria entre estructura secundaria y terciaria es asunto de preferencia. Las proteínas que poseen más de una cadena polipeptídica presentan un nuevo nivel de organización estructural. A cada cadena polipeptídica de una proteína así se le denomina subunidad. La estructura cuaternaria se refiere al ordenamiento espacial de tales subunidades y a la naturaleza de sus contactos mutuos (Stryer, L., 1995).

La termodinámica clásica se aplica a procesos reversibles como el implicado en el equilibrio conformacional entre el estado nativo,  $N$ , y el estado desnaturalizado,  $D$ , de algunas proteínas. Para ellas, la estabilidad conformacional se define como la energía libre de Gibbs para el proceso:

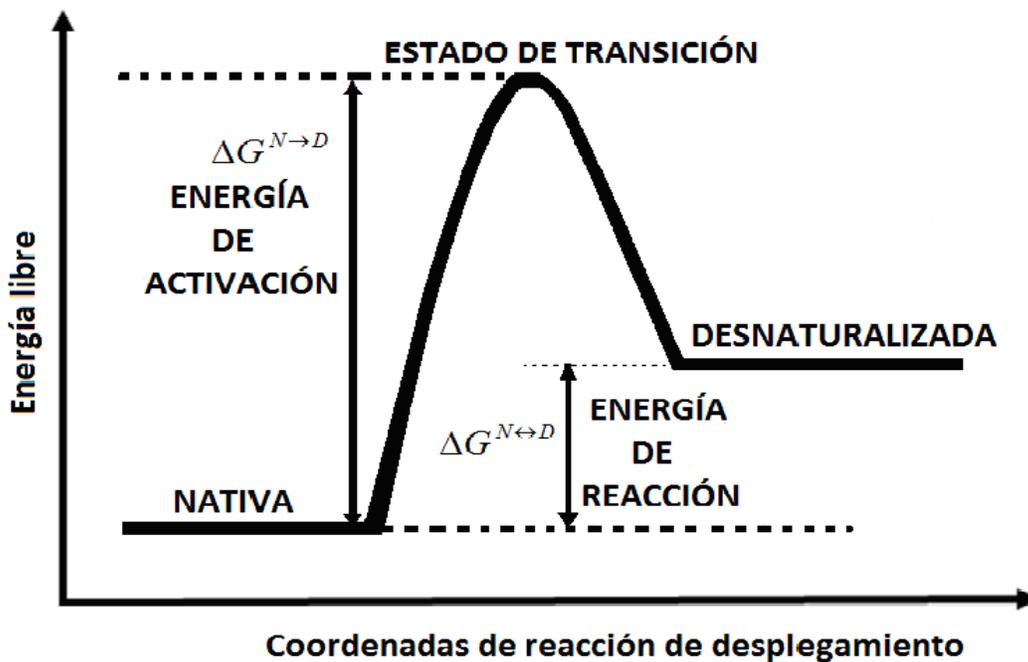


Si  $K_d$  representa la constante de equilibrio de este proceso, debe cumplirse la siguiente relación termodinámica:

$$\Delta G_d = -RT \ln K_d \quad (2)$$

Donde  $\Delta G_d$  es la energía libre de Gibbs de desnaturalización,  $R$  la constante de los gases ideales y  $T$  la temperatura.

Sin embargo, se ha observado que para proteínas, con cientos de residuos en su cadena polipeptídica, el proceso de desnaturalización térmica *in vitro* generalmente es irreversible. En estos casos no es posible aplicar la termodinámica clásica para su estudio. No obstante, se puede analizar el proceso desde el punto de vista cinético y cuantificar la energía requerida para remontar la barrera de activación que separa el estado nativo del desnaturalizado, considerando la teoría del estado de transición (Fersht, A., 1999; Jaswal *et al.*, 2005; Razvi y Scholtz, 2006; Luke *et al.*, 2007). El estado de transición o estado activado, se define como la especie intermedia que posee la energía libre más alta en el proceso de desnaturalización de la proteína (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Se esquematizan los cambios de energía libre de Gibbs ( $\Delta G^{N \rightarrow D}$  y  $\Delta G^{N \leftrightarrow D}$ ), involucrados en la desnaturalización de una proteína.

Existen organismos que se han adaptado a vivir en condiciones extremas como por ejemplo a altas concentraciones de sal (Müller y Oren, 2003), pH (Ikeda y Clark, 1998), presión elevadas (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2002; Marchal *et al.*, 2005), así como a diferentes temperaturas. Los organismos que viven en condiciones extremas de temperatura, se clasifican como psicrófilos y termófilos. Esta clasificación, esta basada con respecto a los organismos mesófilos, los cuales realizan sus funciones óptimas en un intervalo de temperatura de 25 a 45 °C. Los psicrófilos se localizan en ambientes de baja temperatura (0 a 20 °C). Estos organismos son numerosos en la tierra y pueden ser utilizados como productores de proteínas estables a bajas temperaturas para la producción de compuestos inestables, así como para la biorremediación de suelos contaminados y aguas residuales en frío. Además, sus biomoléculas, principalmente enzimas, se caracterizan por una alta actividad catalítica a bajas temperaturas y su inestabilidad pronunciada al calor, ya se utilizan en diversos ámbitos como la biología molecular, la investigación médica, en alimentos o piensos, tecnologías industriales, detergentes o cosméticos (Siddiqui y Cavicchioli, 2006).

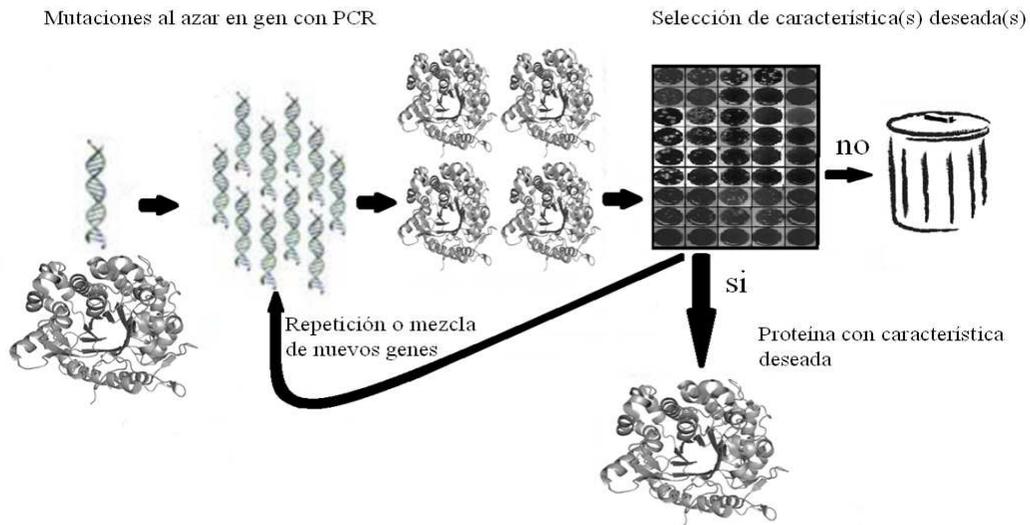
En contraparte se encuentran los organismos que se han adaptado a altas temperaturas (de 45 °C a mayores de 85 °C), los cuales se localizan en volcanes o ventanas hidrotermales. Estos organismos hoy en día son empleados en distintos procesos industriales.

Las enzimas de los organismos termofílicos han sido del interés de diferentes investigadores, quienes han buscado explicar el origen de la mayor estabilidad estructural a altas o bajas temperaturas. Se han encontrado discrepancias estructurales en las enzimas de psicrófilos y termófilos, respecto a sus homólogas de mesófilos. Una de las diferencias es el tamaño de sus estructuras irregulares llamadas asas, que son de mayor tamaño en las enzimas de psicrófilos, mientras que en las de termófilos son más cortas. Esta diferencia ejemplifica como las enzimas termoestables mantienen su estructura tridimensional a temperaturas elevadas mediante la pérdida de flexibilidad o rigidización (Fields, P., 2001). Otros factores que se han detectado que aumentan la termoestabilidad de las proteínas de estos organismos son: la optimización de las interacciones electrostáticas carga-carga en la superficie de las proteínas, el incremento de dipolos en las hélices, las interacciones entre Lys (catión) y anillos aromáticos (Tyr, Phe y Trp) (Chakravarty y Varadarajan, 2002). Se ha observado un incremento de residuos aromáticos y una menor presencia de residuos lábiles como: cisteínas, asparaginas y glutaminas, así como un aumento de argininas (Yano y Poulos, 2003). Mediante cálculos teóricos Elcock (1998) mostró que los puentes salinos favorecen substancialmente la resistencia térmica debido a un costo menor de desolvatación en la formación de los pares iónicos a temperaturas elevadas.

El uso industrial de enzimas está frecuentemente limitado por la falta de estabilidad en condiciones diferentes a su ambiente natural. Esto ha llevado a buscar nuevas estrategias de estabilización de proteínas, teniendo como uno de los resultados el incremento de termoestabilidad. La estabilización de enzimas de organismos mesófilos se ha logrado utilizando dos metodologías distintas: conocidas como “diseño racional” y la evolución dirigida. (Lehmann y Wyss, 2001; van den Burg y Eijsink, 2002)

En el diseño racional se parte de un conocimiento detallado de la estructura de la proteína a nivel de la cadena polipeptídica y de principios generales que se sabe afectan la estabilidad de las proteínas, con lo que se introducen cambios que se presume aumentarán la termorresistencia de la proteína (mutaciones puntuales y/o múltiples) (Eijsink *et al.*, 2004; Choudhury *et al.*, 2010) Un ejemplo de estrategia de diseño racional es el cambio de uno o varios residuos de aminoácido en la superficie de una enzima con el propósito de minimizar su energía electrostática (Karshikoff y Landestein, 2001; Loladze *et al.*, 1999).

El proceso de evolución dirigida se realiza mediante herramientas de biología molecular con las que se generan mutaciones aleatorias en el gen que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína bajo estudio. Posteriormente, del conjunto total de proteínas expresadas se seleccionan aquellas que presentan las características deseadas, como una mayor termorresistencia, mejor o diferente actividad enzimática. (Ver Figura 1.2), (Stemmer, W., 1994, Arnold *et al.*, 2001; Bloom y Arnold, 2009; Dougherty y Arnold, 2009).



**Figura 1.2. Proceso típico de evolución dirigida.** A partir del gen que codifica para la proteína que se quiere modificar y empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) propensa a errores u otra técnica similar, se crea una biblioteca de genes mutantes con los que se producen las proteínas mutantes respectivas. Posteriormente se seleccionan aquellas que tienen la propiedad buscada, por ejemplo, una mejor actividad enzimática o una mayor estabilidad. Las mutantes que no muestran mejoras en la selección son generalmente descartadas, mientras que los genes de las proteínas que si muestran la mejora son utilizados nuevamente para una próxima ronda de mutagénesis y selección. Este procedimiento se repite hasta que la proteína exhiba el nivel requerido de la propiedad buscada (Bloom y Arnold, 2009).

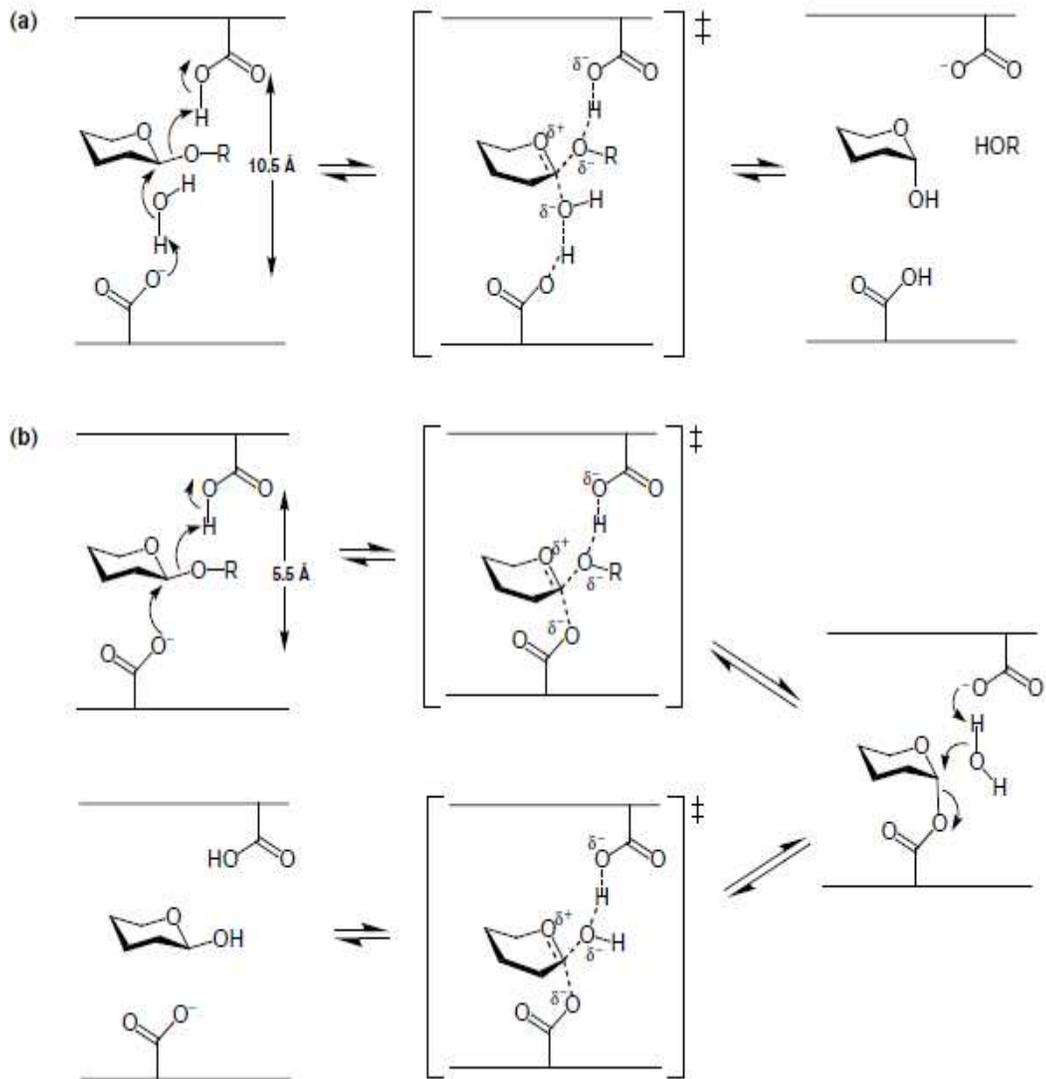
## 1.1 Antecedentes

*Paenibacillus polymyxa* es una rizobacteria mesofílica considerada como un facilitador biológico que al asociarse con plantas permite el crecimiento y desarrollo de estas, protegiéndolas de organismos del suelo que provocan enfermedades (Timmusk *et al.*, 2005). La  $\beta$ -glucosidasa B,  $\beta$ glB, de *Paenibacillus polymyxa* es una enzima monomérica, periplásmica (González *et al.*, 1989), cuya estructura primaria tiene 448 residuos de aminoácido con una masa de 52.5 kDa y cataliza la hidrólisis de la celobiosa y otros glicósidos relacionados. Pertenece a la familia 1 de las glicosil hidrolasas (Henrissat y Bairoch, 1996). Los residuos catalíticos de  $\beta$ glB son E<sup>167</sup> y E<sup>356</sup>, y actúan como donador de protones y nucleófilo / base receptor, respectivamente. La estructura atómica de  $\beta$ glB ha sido determinada por difracción de rayos X con una resolución de 2.10 Å (Isorna *et al.*, 2007), presentando una estructura de barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> con algunas estructuras secundarias periféricas adicionales. (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Representación estructural de la  $\beta$ -glucosidasa B de *Paenibacillus polymyxa*, se muestran en color gris claro las hélices  $\alpha$  y en gris oscuro las hojas  $\beta$ . Se resaltan los residuos catalíticos Glu167, Glu356. Código PDB: 2O9P

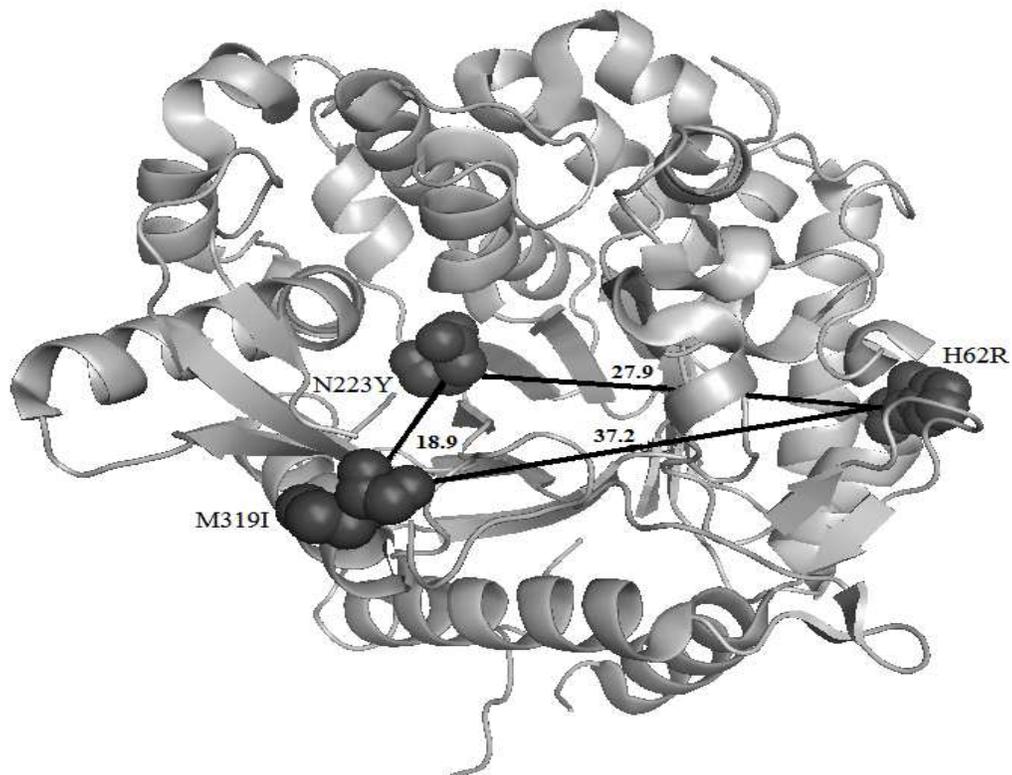
La hidrólisis que realiza la enzima  $\beta$ glB, es hecha por los dos residuos carboxílicos ubicados en el sitio activo. El enlace glicosídico puede hidrolizarse de dos formas distintas, atendiendo a cual sea la configuración del carbono anomérico resultante de la hidrólisis. Una primera posibilidad es que la configuración anomérica cambie; a esta reacción hidrolítica que se desarrolla de esta forma se le designa como mecanismo de inversión (Figura 1.4a). La posibilidad alternativa es que la configuración anomérica se mantenga, lo que se denomina mecanismo de retención (Figura 1.4b). En las glicosidasas que operan mediante inversión, la distancia de separación de los dos carboxilos catalíticos es de aproximadamente 10 Å, mientras que en las enzimas que retienen la configuración del enlace, la separación es alrededor de 5 Å. El mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido-base. Uno de los dos residuos catalíticos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico (Ver Fig. 1.4). El otro residuo actúa como ácido, asistiendo la separación del oxígeno. El mecanismo de retención tiene lugar mediante un doble desplazamiento. En este proceso tiene lugar el ataque del residuo nucleófilo al carbono anomérico. Como resultado tiene lugar la formación transitoria de un enlace covalente entre la enzima y el glicósido. Este enlace es lo suficientemente estable como para permitir la separación del centro activo de la parte liberada y su reemplazamiento por una molécula de agua, con asistencia de un segundo residuo catalítico ácido/base que actúa en la primera etapa como ácido, protonando el oxígeno glicosídico, y como base en la segunda, sustrayendo un protón de una molécula de agua que deshace el enlace covalente transitorio y regenera a la enzima. (Rye y Withers, 2000).



**Figura 1.4.** Se muestran los dos diferentes mecanismos que realizan las glicosil hidrolasas, así como las distancias a las que se encuentran los residuos catalíticos. a) mecanismo de inversión el cual lleva a cabo la  $\beta$ glB y b) el mecanismo de retención. (Rye y Withers, 2000).

### 1.1.1 Mutantes por evolución dirigida de la $\beta$ glB

Buscando aumentar la termorresistencia de la  $\beta$ glB de *P. polymyxa*, el grupo del Dr. Julio Polaina del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos en Valencia, España, obtuvo mediante un proceso de evolución dirigida un grupo de mutantes con menor velocidad de inactivación térmica, identificándolas mediante el uso del sustrato cromogénico PNPG a 55 °C. Las clonas cuya  $\beta$ glB adquirió termoestabilidad muestran un color amarillo debido a la hidrólisis del sustrato (Arrizubieta y Polaina, 2000). En una primera etapa, a partir de una librería de mas de 10,000 variantes, se identificaron cinco mutaciones puntuales en cuatro posiciones de la secuencia, que aumentaron la termorresistencia de la enzima y son: H62R, N223Y, M319I, M319V, M361I; en la segunda y última etapa de la expresión se recombinaron los genes de estas variantes y se obtuvo una triple mutante, a la cual nombraremos TM, (H62R/N223Y/M319I) resultando la variante que mostró mayor termorresistencia. En la Figura 1.5 se muestran las posiciones en la estructura cristalográfica de  $\beta$ glB que fueron modificadas en la triple mutante.



**Figura 1.5.** Estructura de la  $\beta$ -glucosidasa B de *Paenibacillus polymyxa*. Código PDB: 2O9P. Se muestran los residuos de aminoácidos que fueron modificados durante el proceso de evolución dirigida. Se indican las distancias entre estos residuos, expresadas en Å

Como puede notarse en la Figura 1.5, las posiciones de la cadena que sufrieron cambios estabilizantes durante el proceso de evolución dirigida, se encuentran ubicadas en diferentes regiones de la enzima. La distancia menor entre los  $C_{\beta}$  de los residuos mutados es de 18.9 Å. Este aislamiento entre los residuos que fueron mutados sugiere que la contribución de cada mutación puntual a la estabilidad de la TM (H62R/N223Y/M319I) podría ser aditiva, aunque no se descartó que existiera un efecto cooperativo (Horovitz *et al.*, 1990).

En la siguiente Tabla se muestran las eficiencias catalíticas y los tiempos de vida media de la inactivación térmica de la  $\beta$ glB silvestre, la triple mutante y sus mutantes puntuales a 55°C (Arrizubieta y Polaina, 2000). A este grupo de cuatro mutantes le llamaremos en lo sucesivo “Mutantes por Evolución Dirigida” o MED.

**Tabla 1.** Eficiencias catalíticas ( $k_{cat}/K_M$ ) a 37°C y vidas medias ( $\tau$ ) de la inactivación térmica a 55°C de las distintas mutantes termorresistentes de la  $\beta$ -glucosidasa B obtenidas por evolución dirigida (MED) (Arrizubieta, M. y Polaina, J., 2000).

Enzima	$\tau_{55^{\circ}\text{C}}$ (min.)	$k_{cat}/K_M \times 10^3$ ( $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ )
$\beta$ glB silvestre	2.7	6.08
H62R	10.9	6.42
N223Y	2.8	22.02
M319I	7.4	5.25
H62R/N223Y/M319I	53.9	53.86

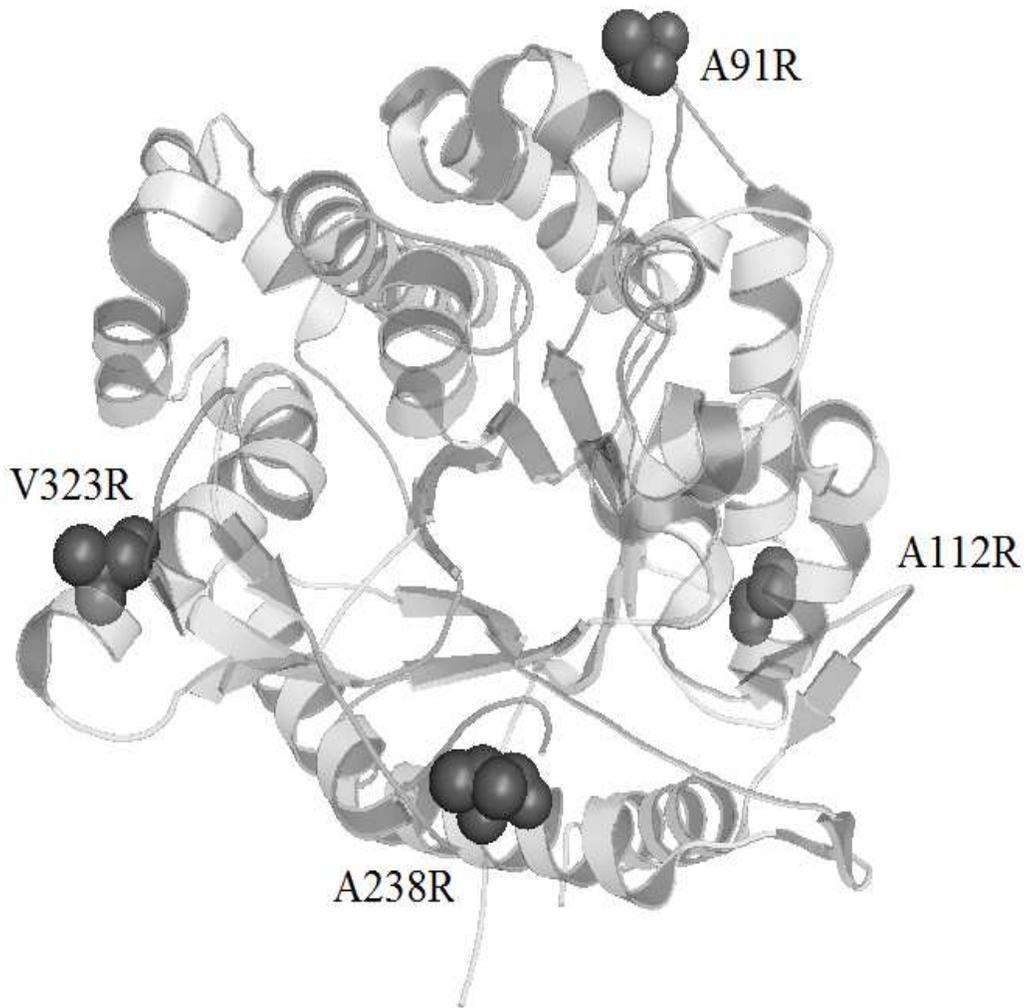
## 1.1.2 Mutantes por diseño racional de $\beta$ glB

Una estrategia de diseño racional que ha mostrado buenos resultados en la búsqueda de termorresistencia, es la optimización de la energía electrostática superficial de las proteínas (Gilson y Honig, 1988), ya que es una de las modificaciones más frecuentemente encontrada al comparar estructuras de enzimas homólogas provenientes de mesófilos y termófilos (Torrez *et al.*, 2003). Para aplicar esta estrategia es necesario modificar la distribución de cargas eléctricas en la superficie de la proteína y evaluar qué variantes provocan una disminución de la energía electrostática total de la macromolécula. En nuestro grupo de investigación se construyeron y evaluaron *in silico* 64 mutantes de carga de  $\beta$ glB, seleccionando las cuatro con menor energía electrostática (A91R, A112R, A238R y V323R) (Zubillaga y Pérez, 2008). Posteriormente, se construyeron sus genes *in vitro* y se expresaron y purificaron a homogeneidad. A este conjunto de mutantes de  $\beta$ glB las denominaremos “Mutantes de Carga” o MDQ.

En la Tabla 2, se muestra el cambio de energía electrostática calculado para todas las mutantes de carga de donde, se seleccionó el grupo MDQ. En la Figura 1.6 se muestran las posiciones en la estructura de  $\beta$ glB que fueron modificadas en estas mutantes.

**Tabla 2.** Valores comparativos de la energía libre electrostática de las MDQ de  $\beta$ glB, respecto a la enzima silvestre.

Variante de $\beta$ glB	$\Delta\Delta G_{elec}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	Variante de $\beta$ glB	$\Delta\Delta G_{elec}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	Variante de $\beta$ glB	$\Delta\Delta G_{elec}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	Variante de $\beta$ glB	$\Delta\Delta G_{elec}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
<b>Silvestre</b>	0	<b>G74D</b>	-360	<b>I112K</b>	-173	<b>E97K</b>	-31
<b>A112R</b>	-996	<b>A238E</b>	-354	<b>Q68D</b>	-172	<b>Q72E</b>	-17
<b>A91R</b>	-918	<b>P234E</b>	-305	<b>K64E</b>	-171	<b>Q313E</b>	-16
<b>V323R</b>	-894	<b>N224D</b>	-263	<b>W412E</b>	-155	<b>N273K</b>	16
<b>V238R</b>	-852	<b>N254K</b>	-262	<b>T270D</b>	-142	<b>Q142K</b>	20
<b>V237R</b>	-812	<b>S149E</b>	-260	<b>T146D</b>	-132	<b>E343K</b>	67
<b>Q366R</b>	-793	<b>G49D</b>	-244	<b>T146E</b>	-127	<b>N160K</b>	79
<b>N254R</b>	-776	<b>G30D</b>	-243	<b>K384E</b>	-126	<b>Q42H</b>	95
<b>I93R</b>	-698	<b>A10E</b>	-235	<b>T11D</b>	-117	<b>E343H</b>	103
<b>T136R</b>	-698	<b>Q334D</b>	-234	<b>I247H</b>	-112	<b>E364K</b>	144
<b>I7R</b>	-676	<b>I238D</b>	-231	<b>T5D</b>	-109	<b>R154E</b>	416
<b>Q288R</b>	-612	<b>A91K</b>	-223	<b>A10K</b>	-109	<b>R189E</b>	418
<b>T193R</b>	-588	<b>Q366E</b>	-211	<b>N367D</b>	-106	<b>H62R</b>	-610
<b>I48R</b>	-577	<b>V323K</b>	-201	<b>Q395D</b>	-102		
<b>D153R</b>	-569	<b>T306D</b>	-190	<b>T340K</b>	-94		
<b>L111E</b>	-477	<b>I112E</b>	-180	<b>N273E</b>	-58		
<b>L100D</b>	-366	<b>L76K</b>	-178	<b>Q441E</b>	-34		



**Figura 1.6.** Se muestran las posiciones de los residuos que fueron mutados en la  $\beta$ galB para la obtención de las mutantes de carga. Se resaltan los residuos de aminoácido involucrados en esferas.

## 2. Objetivos

- 2.1 Cuantificar los incrementos de estabilidad conferidos a la  $\beta$ glB por evolución dirigida y explicarlos con base en las nuevas interacciones generadas por los cambios de las cadenas laterales.
- 2.2 Cuantificar la estabilidad de las mutantes de carga de  $\beta$ glB *in vitro*, seleccionadas por su menor energía electrostática *in silico*.
- 2.3 Comparar la estabilidad de las mutantes de  $\beta$ glB obtenidas por evolución dirigida y por diseño racional.

### 2.1 Objetivos particulares

- 2.1.1 Determinar el mecanismo de desplegamiento de la  $\beta$ glB silvestre.
- 2.1.2 Evaluar si las enzimas mutantes sufrieron algún cambio estructural importante respecto a la enzima silvestre.
- 2.1.3 Determinar los parámetros enzimáticos de cada una de las mutantes analizadas.
- 2.1.4 Determinar los cambios en la barrera de activación,  $\Delta\Delta G^{N\rightarrow ET}$ , para la desnaturalización térmica de las mutantes respecto a la enzima silvestre.
- 2.1.5. Evaluar si en la triple mutante de  $\beta$ glB existe aditividad en la estabilidad conferida con cada mutación puntual o bien algún tipo de cooperatividad.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1 Expresión de la $\beta$ -glucosidasa B silvestre y sus mutantes**

Se utilizó la cepa BL21(DE3) *pLys* de *E. coli* como hospedero, misma que se transformó con los genes de la  $\beta$ glB silvestre y sus mutantes H62R, N223Y, M319I, H62R/N223Y/M319I, A91R, A112R, A238R y V323R, clonados en el vector de expresión pET24a (Novagen). La expresión de  $\beta$ glB se realizó en medio de cultivo Luria Bertani (LB) suplementando con 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina, induciendo al promotor de lacZ con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG 0.4 mM). La ruptura celular de la bacteria *E.coli* se realizó por sonicación en amortiguador de Tris 10 mM pH 8.0, en presencia de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.2 mM, eliminando los restos celulares mediante ultracentrifugación (15000 revoluciones por minuto durante 20 min).

#### **3.2 Purificación de las enzimas**

Partiendo del sobrenadante del lisado celular, se hizo un fraccionamiento de la  $\beta$ glB silvestre por precipitación con sulfato de amonio en un intervalo de 40 a 80% de saturación. Se resuspendió el último precipitado en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 y se dializó contra el mismo regulador. Posteriormente se eluyó a través de una columna de filtración molecular (Sephacryl-300, límite de exclusión: 100 kDa) equilibrada en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. Por último, se realizó una cromatografía de intercambio iónico a través de una columna MonoQ equilibrada en el mismo regulador de fosfatos, aplicando un gradiente lineal de NaCl (0-1M). Todas las variantes de  $\beta$ glB eluyeron cerca de 200 mM de NaCl. Este mismo protocolo de purificación se aplicó para las enzimas mutantes.

Tanto la construcción de los genes mutantes, como la expresión y purificación de las diversas variantes de la  $\beta$ glB fueron realizadas por la Dra. Georgina Garza Ramos en el Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la UNAM. y la Dra. Mariana Peimbert Torres del Departamento de Ciencias Naturales de la UAM Cuajimalpa.

### 3.3 Ensayos de actividad enzimática

Se determinaron las velocidades iniciales, ( $v$ ), de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa usando como sustrato el p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, PNPG, cuya hidrólisis libera nitrofenilo de color amarillo que se sigue a través del aumento de su absorbancia a 400 nm ( $\epsilon_{400} = 7.46 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a pH 7.0) (John R. A., 1992). Se empleó un intervalo de concentraciones de PNPG de 0.05 a 40 mM en regulador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. Los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible (Hewlett Packard 8453), que cuenta con un controlador de temperatura (HP 89090A).

La actividad enzimática se midió incubando previamente el sustrato PNPG en el amortiguador a 25 °C en una celda de 1.0 cm de paso óptico. Una vez equilibrado el sistema, se adicionó el volumen necesario de enzima concentrada (típicamente 20  $\mu\text{l}$ ), para tener una concentración final de 2.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de enzima, en un volumen de reacción final de 1.0 mL. Después de mezclar por inversión el contenido de la celda, se empezó el registro de absorbancia en función del tiempo. Durante los ensayos, la enzima concentrada se mantuvo en un baño de hielo para evitar alguna afectación por la temperatura ambiente.

La actividad enzimática se expresó en micromoles de sustrato transformado por minuto por miligramo de enzima ( $\mu\text{moles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). La ecuación de Michaelis Menten (Ec. 3) se ajustó a los valores de actividad específica medidos a diferentes concentraciones de sustrato PNPG:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

Donde  $v$  es la velocidad inicial,  $V_{m\acute{a}x}$  la velocidad máxima,  $K_M$  la constante de Michaelis y  $[S]$  la concentración de sustrato. A partir del valor de  $V_{m\acute{a}x}$  se calculó el número de recambio,  $k_{cat}$ , y posteriormente la eficiencia catalítica,  $k_{cat} K_M^{-1}$ , de la enzima. Los ensayos se realizaron por triplicado. Este procedimiento se realizó para la enzima  $\beta\text{glB}$  silvestre y sus mutantes (MED y MDQ).

### 3.4 Espectroscopía de Dicroísmo Circular

Se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular, DC, a 25 °C y 80 °C en la región de UV-lejano de 200 a 250 nm, utilizando una celda de 0.10 cm de paso óptico. Los espectros se corrigieron restando la señal del amortiguador de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 50 mM, pH 7.0. Se reporta el promedio de tres espectros obtenidos para cada variante. Se utilizó un espectropolarímetro JASCO J-715 (Jasco Inc., Easton, MD) que cuenta con un controlador de temperatura tipo peltier PTC- 348WI. Los espectros de las diferentes variantes, se expresaron en elipticidad molar  $[\theta]$  por residuo medio, empleando una masa de 117.2 gramos por mol de residuo de aminoácido.

### 3.5 Perfiles de desnaturalización térmica

Se obtuvieron los perfiles de desnaturalización térmica para la  $\beta$ glB silvestre y cada una de las variantes siguiendo su señal de dicroísmo circular. Los datos de elipticidad se colectaron a 220 nm con una velocidad de barrido de 2 °C  $\text{min}^{-1}$  en un intervalo de temperaturas de 25 °C a 80 °C y con agitación constante. Las soluciones se prepararon en una celda de paso óptico de 1.0 cm, con una concentración de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de enzima en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0, mismo que se desgasificó previamente en todos los ensayos. En el caso de la enzima silvestre, los perfiles térmicos se realizaron a diferentes velocidades de barrido (de 0.20 a 4.0 °C  $\text{min}^{-1}$ ) con una concentración 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de enzima, y a diferentes concentraciones de proteína (de 10 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a 2 °C  $\text{min}^{-1}$  de calentamiento. Todos los ensayos se realizaron con agitación continua.

A partir de los valores de elipticidad (miligrados) obtenidos en el barrido, se calculó la fracción desnaturalizada aparente,  $f_D$ , de proteína con la siguiente ecuación:

$$f_D = \frac{(\theta_{obs} - \theta_N)}{(\theta_D - \theta_N)} \quad (4)$$

Donde  $\theta_{obs}$  es la elipticidad medida a cada temperatura,  $\theta_N$  y  $\theta_D$  representan la elipticidad de la forma nativa y desnaturalizada, respectivamente. Se hicieron ajustes lineales de la región previa y posterior a la transición para estimar los valores de  $\theta_N$  y  $\theta_D$  en el intervalo completo de temperaturas experimentado (Ver Apéndice 1).

A partir de los valores de  $f_D$ , a diferentes temperaturas, se determinó la temperatura media de la transición ( $T_m$ ), que corresponde al valor de T cuando  $f_D$  es igual a 0.5.

### 3.6 Cinéticas de desplegamiento térmico

Se realizaron cinéticas de desnaturalización isotérmica de todas las variantes de  $\beta$ glB a distintas temperaturas siguiendo los cambios elipticidad a 220 nm en función del tiempo. El proceso de desnaturalización se inició inyectando una pequeña alícuota de la enzima en la celda del espectropolarímetro que contenía el amortiguador de trabajo (fosfatos 50 mM, pH 7.0), ya equilibrado a la temperatura deseada, y mantenido con agitación constante. La concentración final de enzima fue de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 3.7 Espectroscopía de Fluorescencia

Se determinaron los espectros de fluorescencia de la enzima  $\beta$ glB silvestre y sus mutantes a 25 °C, excitando a 295 nm y colectando los datos de emisión en un intervalo de 310 a 410 nm. Se utilizó una celda de 1.0 cm de paso óptico con agitación continua, con una concentración final de enzima de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los espectros se corrigieron restando la señal del amortiguador de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 50mM, pH 7.0. Se utilizó un espectrofluorómetro ISS K2 (Champaign, IL, USA), el cual cuenta con un controlador de temperatura tipo peltier LFI-375I.

A partir de los valores de intensidad de fluorescencia,  $IF_i$ , obtenidos a su longitud de onda respectiva,  $\lambda_i$ , se calculó el centro de masa espectral ( $CME$ ) con la siguiente relación:

$$CME = \frac{(\sum IF_i \lambda_i)}{(\sum IF_i)} \quad (5)$$

## 4. Resultados

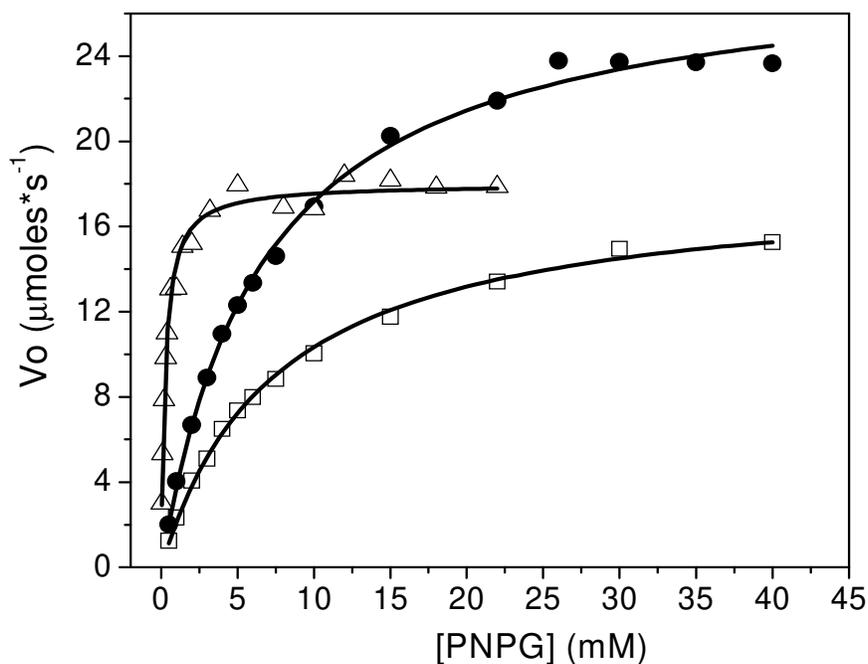
### 4.1 Ensayos de actividad enzimática

En la Tabla 3 se muestran los valores promedio de las constantes de  $K_M$  y  $k_{cat}$ , así como la eficiencia catalítica para la  $\beta$ glB silvestre y los dos grupos de mutantes, MED y MDQ a 25°C. En la Figura 4.1 se muestra una de las tres determinaciones de las constantes catalíticas obtenida para la  $\beta$ -glucosidasa B silvestre, la mutante H62R y la triple mutante. El modelo de Michaelis Menten describe adecuadamente el comportamiento los datos de las velocidades iniciales de todas las variantes.

**Tabla 3.** Constantes catalíticas de la  $\beta$ glB silvestre y sus mutantes a 25 °C.

Enzima	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat} / K_M$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	Eficiencia Catalítica Relativa (mutante/silvestre)
$\beta$ glB silvestre	5.6 ± 0.4	25.0 ± 0.3	4467 ± 414	1.0
H62R	5.7 ± 1.2	23.0 ± 2.3	4142 ± 545	0.9
N223Y	0.3 ± 0.3	11.5 ± 0.3	42307 ± 1914	9.5
M319I	7.3 ± 0.5	25.1 ± 0.7	3437 ± 164	0.8
Triple	0.2 ± 0.0	15.5 ± 0.2	65097 ± 5457	14.6
A91R	6.4 ± 0.4	25.1 ± 0.6	3896 ± 130	0.9
A112R	6.4 ± 1.1	23.5 ± 0.5	3730 ± 615	0.8
A238R	6.8 ± 0.5	26.8 ± 0.4	3956 ± 224	0.9
V323R	6.6 ± 0.9	17.7 ± 0.7	2745 ± 479	0.6

(± DE) Desviación Estándar. Se realizaron tres determinaciones del experimento cinético para cada variante.

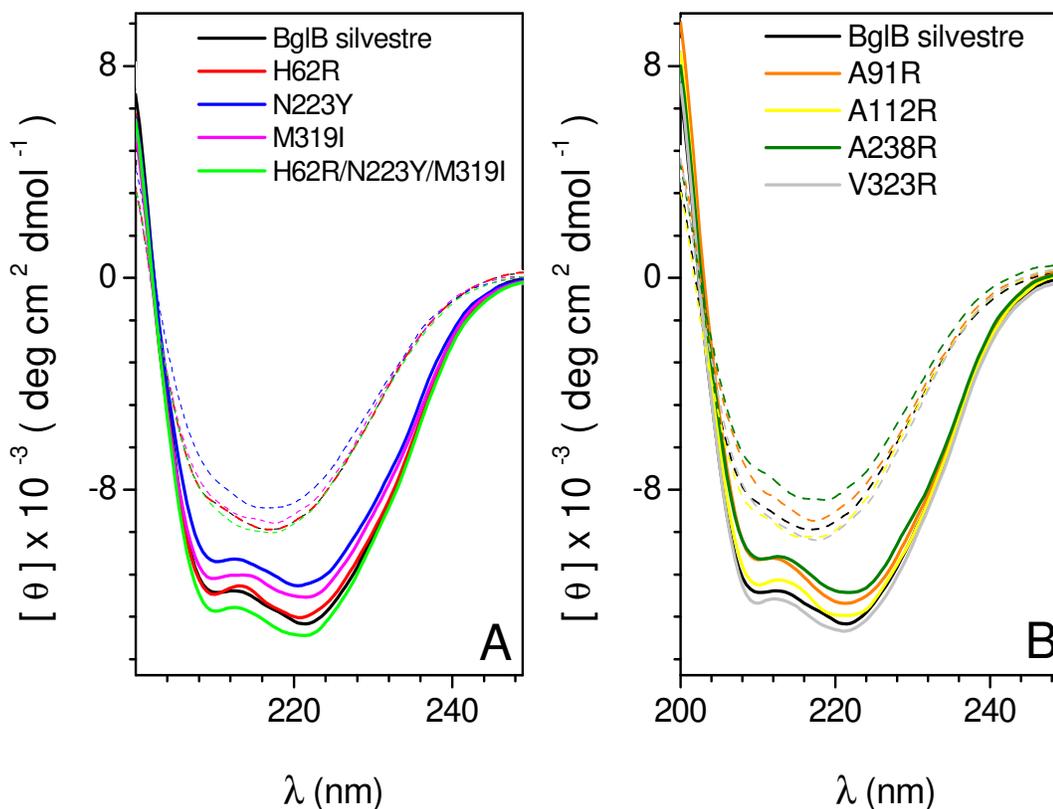


**Figura 4.1.** Velocidades iniciales de la BglB silvestre (□), H62R (●) y TM (Δ), a diferentes concentraciones de sustrato PNPG. Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0,  $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de enzima, en una celda de 1.0 cm de paso óptico a 25 °C. Estas mismas condiciones se emplearon para la  $\beta\text{glB}$  silvestre y ambos grupos de mutantes (MED y MDQ).

## 4.2 Propiedades Estructurales de las Mutantes de $\beta\text{glB}$

### 4.2.1 Espectros de Dicroísmo Circular de la $\beta\text{glB}$ silvestre y sus mutantes

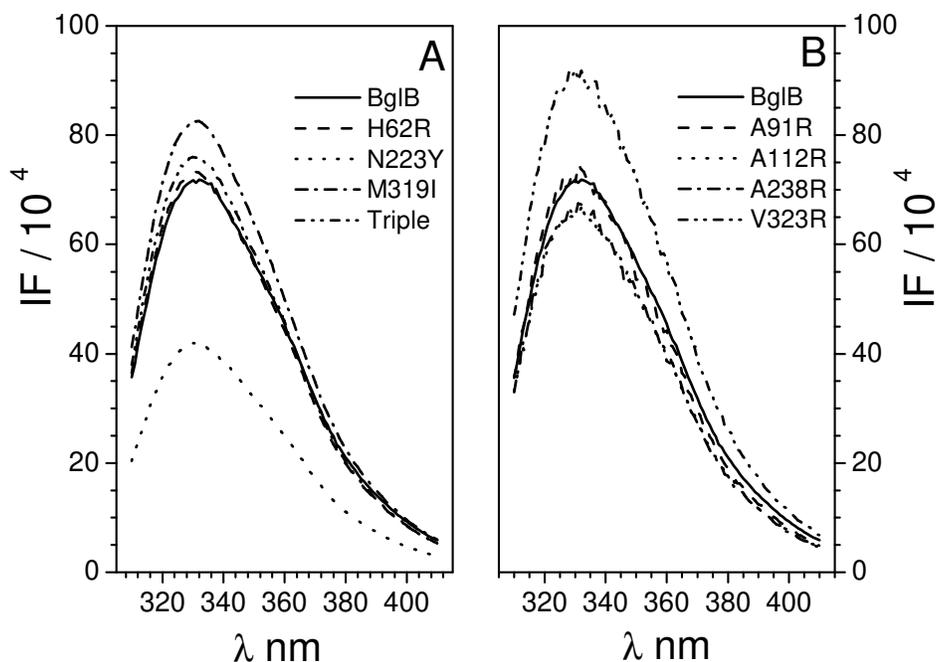
La Figura 4.2, muestra los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de la  $\beta$ -glucosidasa B silvestre y sus dos grupos de mutantes (MED y MDQ) a 25 °C. Todos ellos presentan dos mínimos de elipticidad en la región de 210-225 nm, a pH 7.0, como se ha observado para otras proteínas del tipo barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>. También se presentan los espectros de las enzimas irreversiblemente desnaturadas a 75 °C, una vez que se reenfrieron sus soluciones hasta 25 °C. Estos espectros muestran que al calentar la solución de enzima y reenfriar no recupera su estructura inicial, lo cual indica que el proceso de desnaturación es irreversible.



**Figura 4.2.** **A)** Espectros de DC del grupo MED, obtenidos en la región UV-lejano en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 a 25 °C (línea sólida) y se calentaron a 75 °C enfriando rápidamente la solución de enzima (línea en guiones). La  $\beta$ glB silvestre (— y - - -) y sus mutantes en las mismas condiciones H62R (— y - - -), N223Y (— y - - -), M319I (— y - - -) y H62R/N223Y/M319Y (— y - - -). **B)** Espectros de DC del grupo MDQ, obtenidos en la región UV-lejano. Enzima  $\beta$ glB silvestre (— y - - -) y sus mutantes A91R (— y - - -), A112R (— y - - -), A238R (— y - - -) y V323R (— y - - -).

#### 4.2.2 Espectros de fluorescencia intrínseca de la $\beta$ glB silvestre y sus mutantes

En la Figura 4.3, se muestran los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la enzima  $\beta$ glB silvestre y sus mutantes (MED y MDQ). Donde se monitorizó la señal de fluorescencia de los 16 triptófanos que contienen estas enzimas. En la tabla 4 se muestran los valores del centro de masa espectral, *CME*, de cada una de las variantes. En general, este valor no cambió en más de un 1.0 nm para ninguna de las mutantes, excepto para V323R que aumentó 1.1 nm respecto a la silvestre (344 nm).



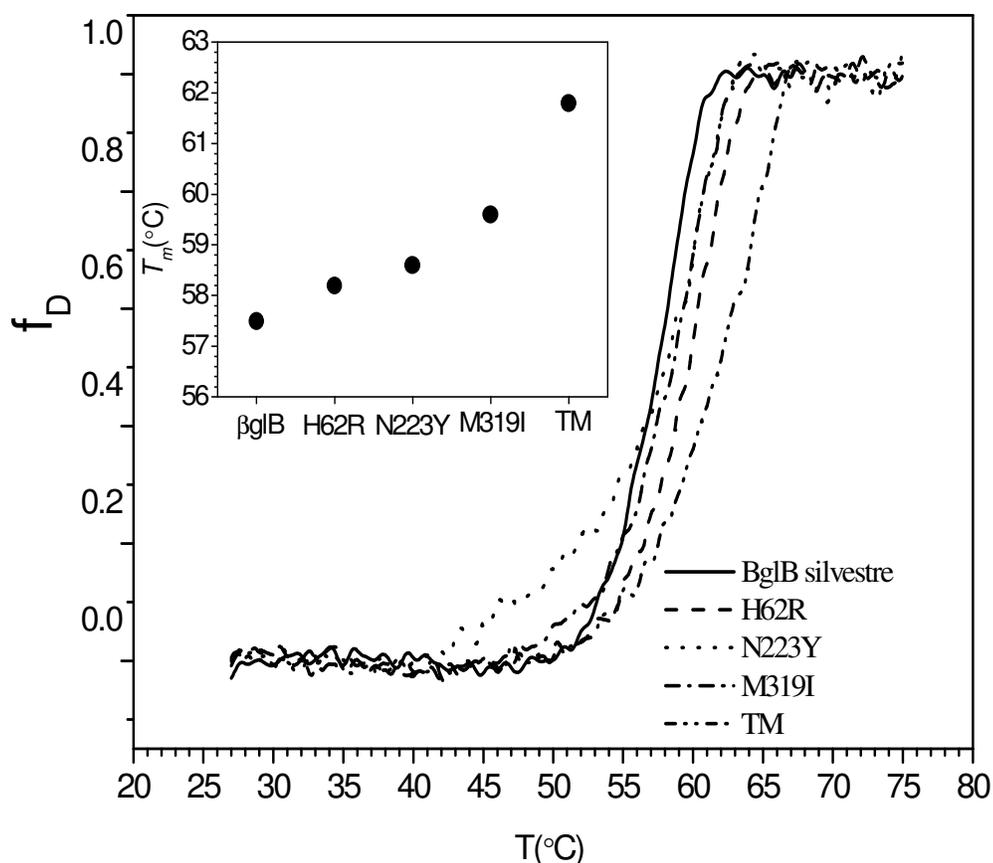
**Figura 4.3.** A) Espectros de fluorescencia intrínseca de la enzima  $\beta$ glB silvestre a 25°C (—) y sus mutantes del grupo MED, H62R (---), N223Y (···), M319I (-----) y H62R/N223Y/M319Y (-----). B) Espectros de fluorescencia intrínseca del grupo MDQ a 25°C, enzima  $\beta$ glB silvestre (—) y sus mutantes A91R (---), A112R (···), A238R (-----) y V323R (-----). Todos los espectros se obtuvieron excitando a 295 nm, y colectando la emisión de 310 a 410 nm, los ensayos se realizaron con una concentración de enzima de 50 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 en agitación continua.

**Tabla 4.** Valores del centro de masa espectral para la  $\beta$ glB silvestre y sus mutantes.

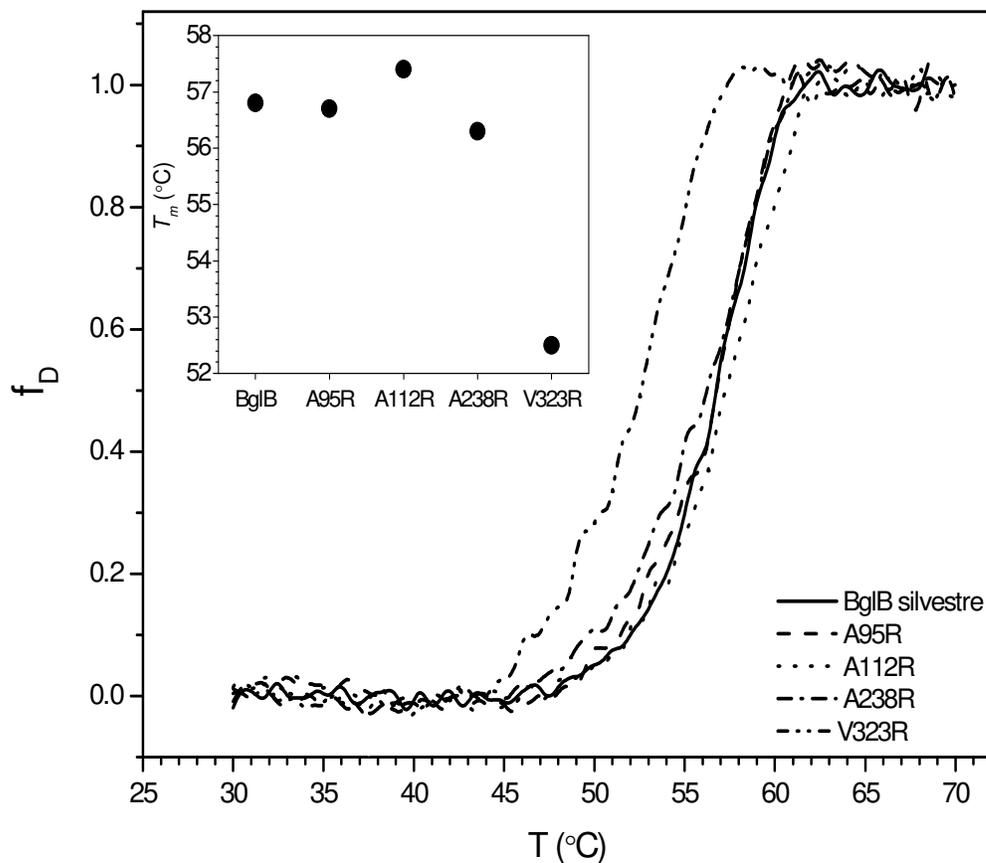
Enzima	Centro de Masa Espectral (nm)
$\beta$ glB silvestre	344.0
H62R	343.1
N223Y	343.1
M319I	343.4
H62R / N223Y / M319I	343.0
A91R	344.6
A112R	344.6
A238R	344.5
V323R	345.1

### 4.3 Perfiles de desnaturalización térmica

Se obtuvieron los perfiles de desnaturalización térmica de la  $\beta$ -glucosidasa B silvestre y sus mutantes (MED y MDQ) a una velocidad de barrido de  $2.0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (Figura 4.4A y B). Se monitorizó la transición de la enzima nativa al estado desnaturalizado por la pérdida de estructura secundaria ( $\Theta_{220}$ ). A partir de los datos de elipticidad se calculó la fracción de proteína desnaturalizada ( $f_D$ ), tal como se indica en la sección 3.5 de Métodos. En el inserto de las Figuras 4.4A y B, se muestran los valores de la temperatura media,  $T_m$ , que es la temperatura a la cual la fracción  $f_D$  alcanza el valor 0.5. (ver apéndice A1)



**Figura 4.4. A** Barridos térmicos de  $\beta$ glB silvestre (—) y sus mutantes del grupo MED (H62R (---), N223Y (···), M319I (----) y TM (H62R/N223Y/M319Y, -·-·-·-)). Se realizaron con una concentración de enzima de  $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  y una velocidad de calentamiento de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , en amortiguador de fosfatos 50mM a pH 7.0, en una celda de 1.0 cm de paso óptico, con agitación continua. La figura inserto muestra la  $T_m$  de transición de cada variante.



**Figura 4.4. B)** Barridos térmicos de  $\beta$ glB silvestre (—) y sus mutantes del grupo MDQ (A91R (---), A112R (···), A238R (-·-·-) y V323R (-·-·-·-·-)). Se realizaron con una concentración de enzima de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  y una velocidad de calentamiento de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.0, en una celda de 1.0 cm de paso óptico con agitación continua. La figura del recuadro muestra la  $T_m$  de transición de cada variante.

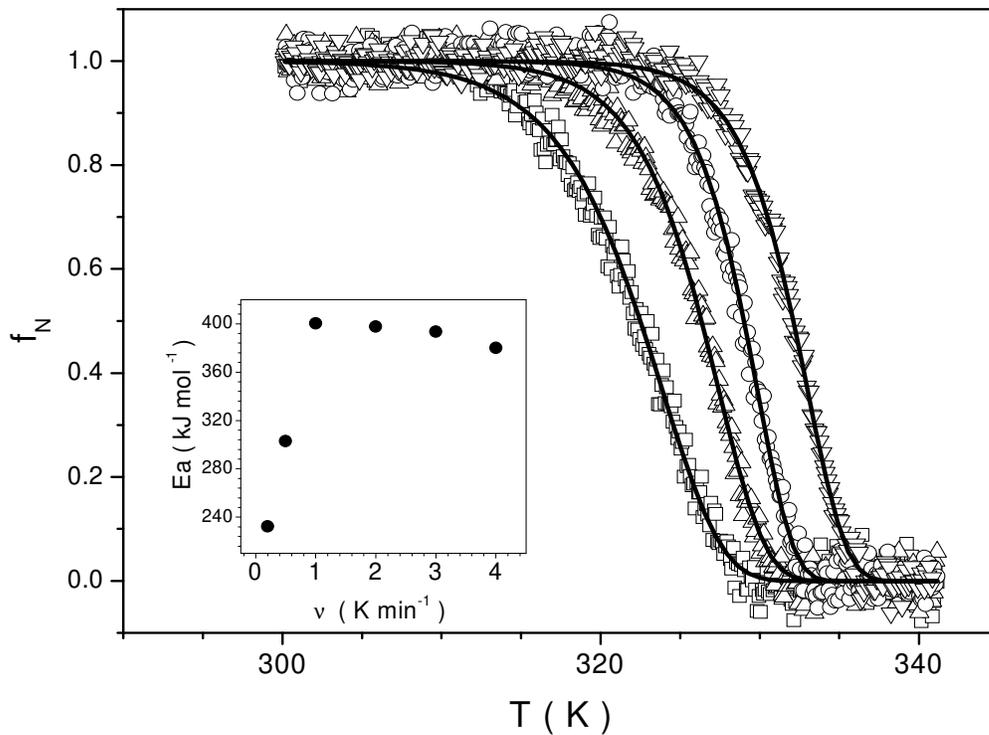
## 4.4 Mecanismo de desplegamiento térmico de la $\beta$ -glucosidasa B silvestre

### 4.4.1 Desnaturalización térmica

Se obtuvieron los perfiles de desnaturalización térmica de la  $\beta$ -glucosidasa B silvestre a distintas velocidades de barrido en un regulador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 (Figura 4.5), seguidos por la pérdida de estructura secundaria ( $\Theta_{220}$ ), calculando la fracción aparente de proteína nativa  $f_N$  con la Ec. 6 (Ver apéndice A1):

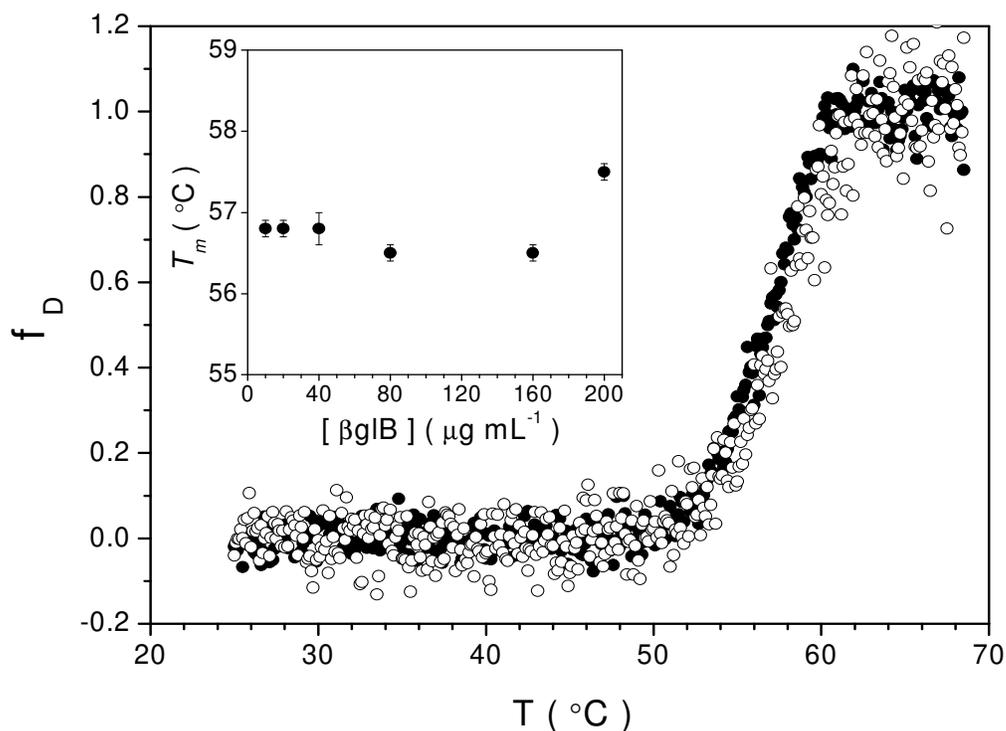
$$f_N = \frac{(\theta_D - \theta_{obs})}{(\theta_D - \theta_N)} \quad (6)$$

Donde  $\theta_{obs}$  es la elipticidad medida a cada temperatura,  $\theta_N$  y  $\theta_D$  representan la elipticidad de la forma nativa y desnaturalizada, respectivamente.



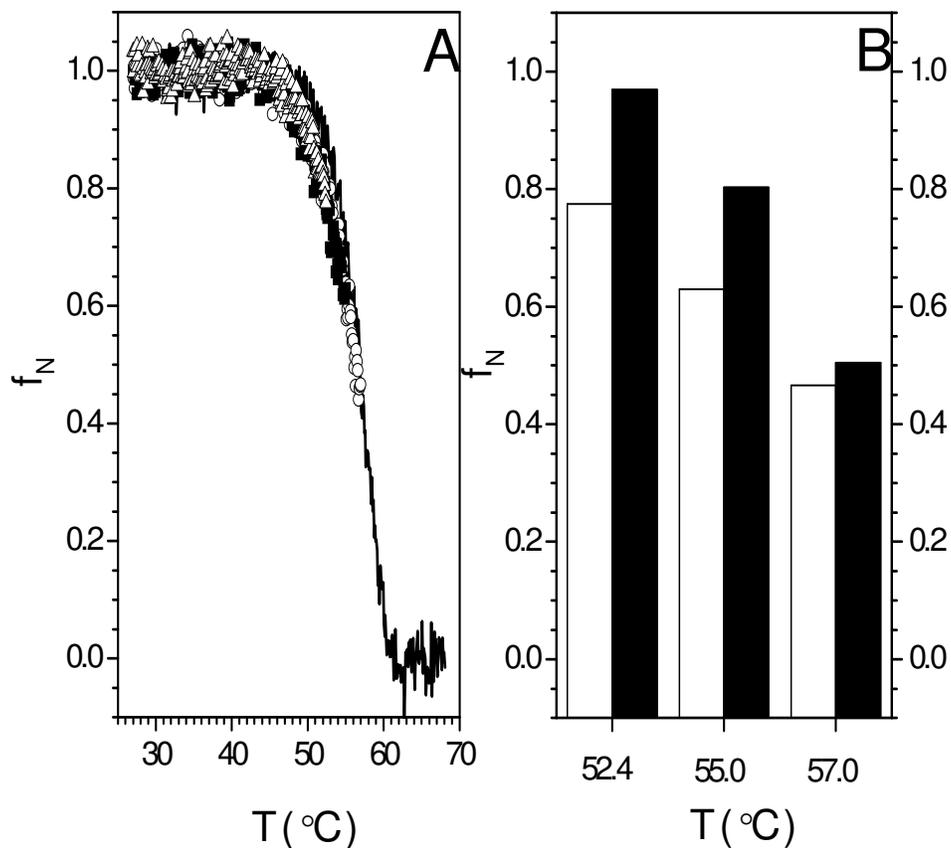
**Figura 4.5.** Barridos térmicos de  $\beta$ glB a diferentes velocidades de calentamiento (0.2 - 4.0  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). El inserto muestra las energías de activación determinadas a diferentes tasas de cambio (línea continua). Se realizaron con una concentración de enzima de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.0, en una celda de 1.0 cm de paso óptico con agitación continua.

También se realizaron barridos térmicos variando la concentración de la enzima silvestre. Las transiciones obtenidas a las diferentes concentraciones de proteína (entre 10 y 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) son prácticamente indistinguibles (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Perfiles térmicos a diferentes concentraciones de enzima  $\beta\text{glB}$  silvestre (10-200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), monitorizando los cambios de estructura secundaria a 220 nm en DC, en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0., con agitación continua. El inserto muestra los valores de  $T_m$  de los perfiles térmicos.

Considerando la posibilidad de cierto grado de reversibilidad en la desnaturalización, se realizaron barridos térmicos parciales, deteniendo la reacción a distintas temperaturas (52.4, 53.5, 55 y 57  $^{\circ}\text{C}$ ), (ver Figura 4.7) y enfriando rápidamente (aproximadamente a 7  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) la celda hasta 25  $^{\circ}\text{C}$ . Una vez alcanzada esta temperatura se realizaron cinéticas cortas para determinar la elipticidad promedio recuperada y se calculó la fracción de enzima nativa recuperada (Figura 4.7B), la cual fue mayor a temperaturas de interrupción bajas.



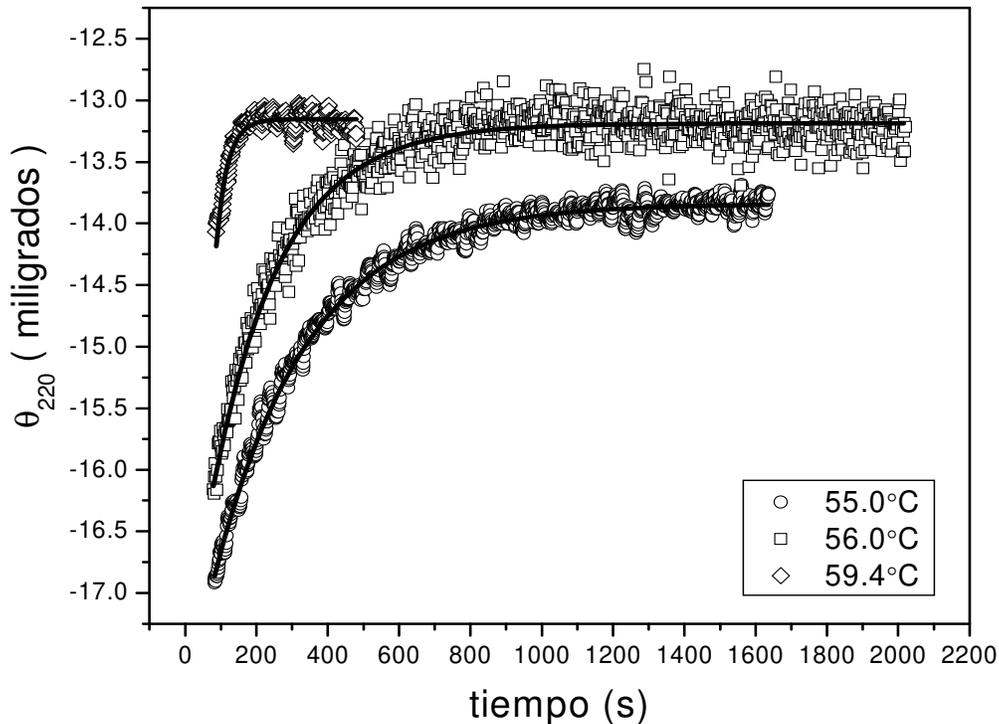
**Figura 4.7.** Reversibilidad parcial de la desnaturalización térmica de  $\beta$ galB. **A)** Barrido térmico completo (—) a  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , barridos térmicos parciales de DC a  $52.4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta$ ),  $55.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\blacksquare$ ) y  $57.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\circ$ ) a  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  con una concentración de enzima  $\beta$ galB de  $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , en amortiguador de fosfatos  $50\text{ mM}$ , pH  $7.0$ . Al llegar a la temperatura deseada se enfrió rápidamente la solución proteínica hasta  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y **B)** se muestra la fracción nativa en la que se detuvo el barrido térmico parcial (rectángulo vacío), así también se muestra la fracción nativa recuperada una vez que se reenfrío la solución de enzima desde las diferentes temperaturas (rectángulo negro).

#### 4.4.2 Cinéticas de desplegamiento térmico de $\beta$ glB silvestre

Se realizaron cinéticas del desplegamiento térmico de  $\beta$ glB silvestre a 56.0 °C con distintas concentraciones de enzima (en un intervalo de 10 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0, monitorizando la elipticidad de la enzima a 220 nm. En la Figura 4.8, se presenta algunas de las réplicas de las cinéticas obtenidas de la enzima silvestre a diferentes temperaturas. Como puede observarse, el modelo de una exponencial de primer orden (línea negra), describe bien el comportamiento de los datos:

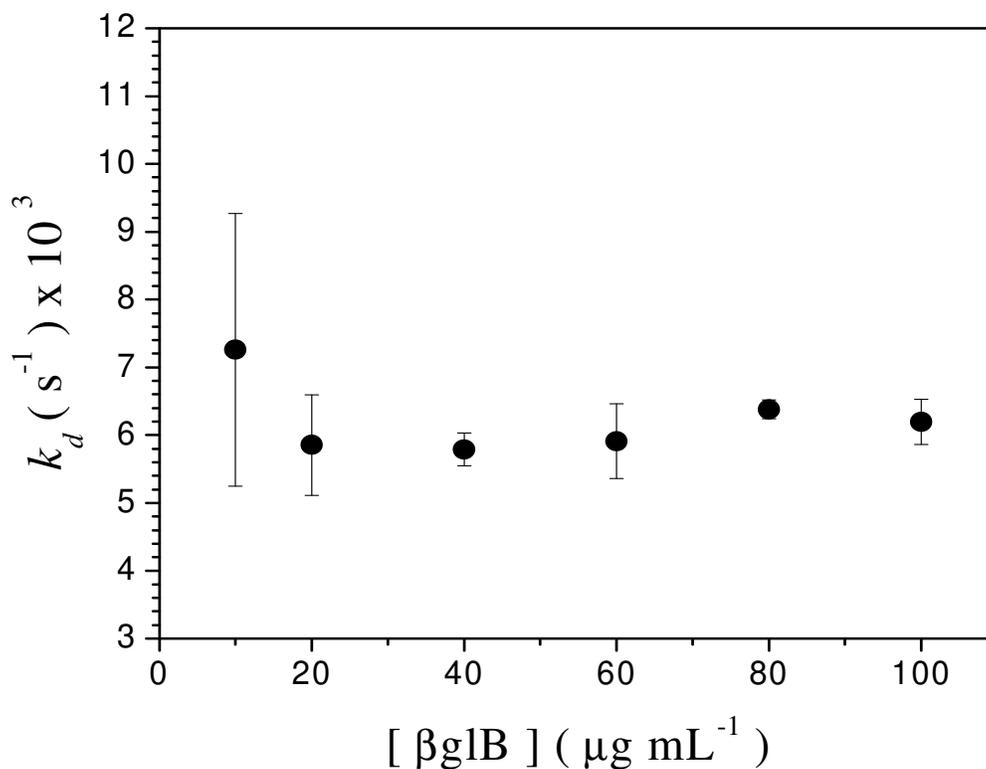
$$\theta_t = \theta_f + (\theta_o - \theta_f) \exp(-k_d t) \quad (7)$$

En donde  $\theta_t$  es la elipticidad medida al tiempo  $t$ ,  $\theta_f$  es el valor final de elipticidad,  $\theta_o$  representa el valor correspondiente al tiempo cero y  $k_d$  es la constante de velocidad de desnaturalización.



**Figura 4.8.** Cinéticas de desnaturalización térmica de la enzima  $\beta$ glB silvestre. Se siguieron los cambios de elipticidad a 220 nm de la solución de  $\beta$ glB a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en fosfatos 50 mM, pH 7.0. Se muestra el comportamiento exponencial sencillo (Ec. 7, línea continua) de los datos, a diferentes temperaturas.

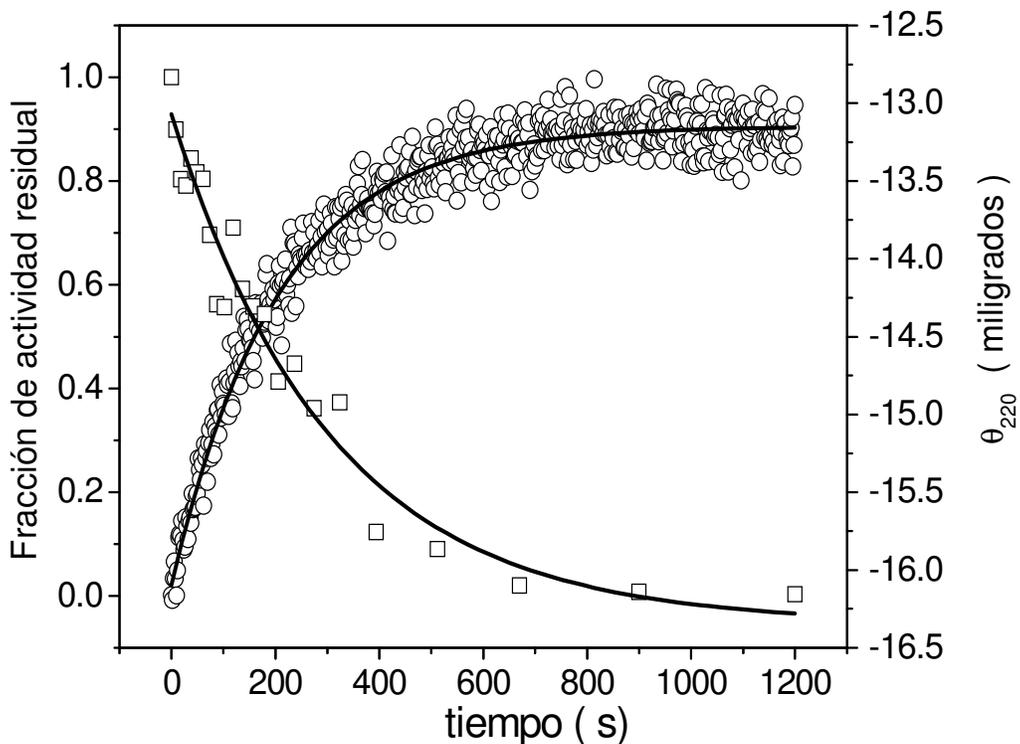
En la Figura 4.9 se muestran las constantes de velocidad de desnaturalización ( $k_d$ ) determinadas para  $\beta$ glB silvestre a diferentes concentraciones a 56 °C, obtenidas por triplicado.



**Figura 4.9.** Constantes cinéticas de la desnaturalización térmica de la enzima  $\beta$ glB silvestre. Las barras muestran la desviación estándar. Los puntos se obtuvieron a 56.0 °C, siguiendo los cambios de la señal de DC a 220 nm, a diferentes concentraciones, en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 con agitación continua.

### 4.4.3 Inactivación térmica

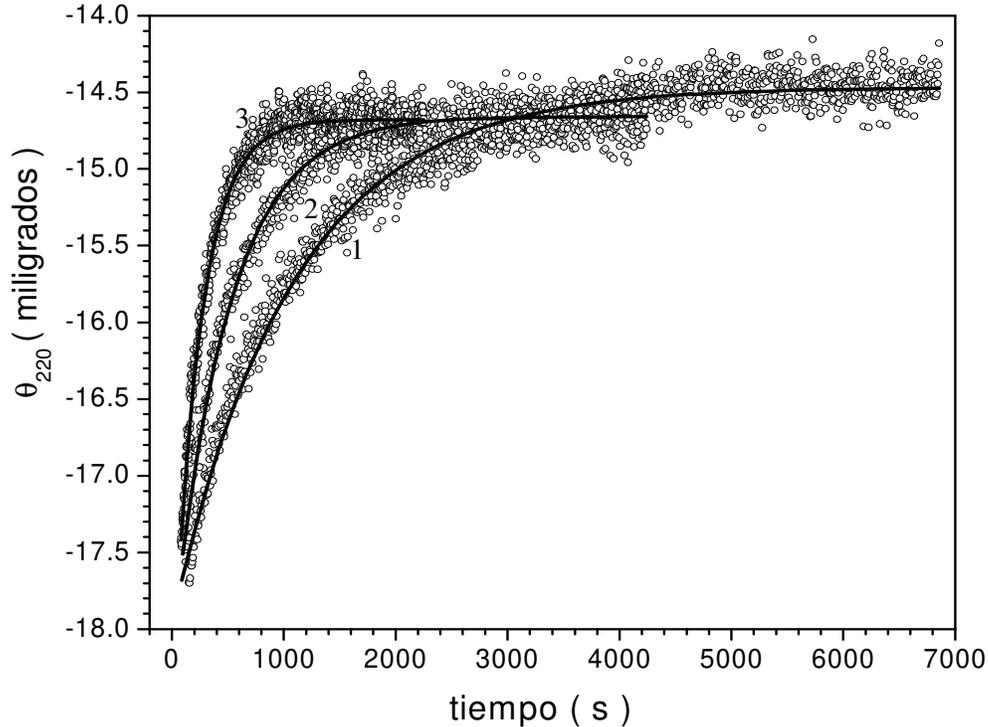
Se realizaron estudios de inactivación térmica de la  $\beta$ glB silvestre, siguiendo la actividad enzimática con respecto al tiempo de incubación a 56.0 °C. Para ello, se equilibró amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 en tubos de plástico sumergidos en un baño de agua con temperatura controlada a 56.0 °C. A cada tubo se le adicionó una alícuota de  $\beta$ glB silvestre suficiente para tener una concentración final de 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. La reacción de desnaturalización térmica se detuvo a diferentes tiempos colocando los tubos en una mezcla de hielo con agua. Posteriormente se midió la actividad enzimática de cada tubo a 25 °C, utilizando p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido como sustrato. Los resultados se muestran en la Figura 4.10 ajustando al modelo de decaimiento exponencial sencillo, el valor de la constante fue de  $5.1 (\pm 0.5) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , similar al obtenido por DC ( $5.9 (\pm 0.7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ).



**Figura 4.10.** Pérdida de actividad y estructura de la  $\beta$ glB silvestre. Cinética de la pérdida de actividad enzimática ( $\square$ ), la línea continua corresponde a una ecuación exponencial de primer orden, la enzima fue incubada a 56.0 °C en regulador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. Cinética de desplegamiento térmico seguida por DC ( $\circ$ ) a 220 nm y 56.0 °C, en línea continua se muestra el comportamiento exponencial sencillo (Ec. 7).

## 4.5 Cinéticas de desplegamiento

Se realizaron cinéticas del desplegamiento térmico de la  $\beta$ glB silvestre y sus mutantes (MED y MDQ), a distintas temperaturas con una concentración de enzima de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  en fosfatos  $50 \text{ mM}$ , pH 7.0, siguiendo la elipticidad de la enzima a  $220 \text{ nm}$ . En la Figura 4.11, se presentan algunas cinéticas de desnaturalización de la triple mutante. Los datos de las cinéticas de desplegamiento térmico de la enzima silvestre y las mutantes, muestran un decaimiento exponencial simple (Ec. (7) del texto, en líneas continuas). En las Tablas 5 y 6, se muestran las constantes de velocidad de desnaturalización ( $k_d$ ), obtenidas a partir del modelo de decaimiento de exponencial simple que se ajusta bien a los datos para la  $\beta$ glB silvestre y sus mutantes a diferentes temperaturas.



**Figura 4.11.** Cinéticas de desnaturalización térmica de la triple mutante H62R/N223Y/M319I. Se siguieron los cambios de elipticidad a  $220 \text{ nm}$ , empleando  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de enzima en regulador de fosfatos  $50 \text{ mM}$ , pH 7.0, en agitación continua. Se muestra un comportamiento de decaimiento exponencial sencillo (Ec. 7, líneas continuas). (1)  $58.0^\circ\text{C}$ , (2)  $59.4^\circ\text{C}$ , (3)  $61.0^\circ\text{C}$ .

**Tabla 5.** Constantes de desnaturalización térmica de la  $\beta$ -glucosidasa B silvestre y sus mutantes (MED).

T (°C)	$k_d^{silvestre} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> ) 6*	$k_d^{H62R} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> ) 4*	$k_d^{N223Y} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> ) 4*	$k_d^{M319I} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> ) 5*	$k_d^{H62R/N223Y/M319I} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> ) 6*
49.5	0.42 ± 0.16	-	-	-	-
50.8	0.69 ± 0.31	-	-	-	-
52.4	1.34 ± 0.40	0.48 ± 0.18	0.67 ± 0.24	0.66 ± 0.22	-
53.5	2.24 ± 0.47	0.65 ± 0.14	0.98 ± 0.28	1.01 ± 0.39	-
55.0	4.07 ± 0.62	1.15 ± 0.13	1.68 ± 0.20	2.49 ± 0.88	-
56.4	7.06 ± 0.99	2.06 ± 0.40	2.88 ± 0.37	3.33 ± 0.40	0.63 ± 0.08
58.0	14.09 ± 1.70	4.36 ± 0.19	5.79 ± 0.64	6.59 ± 0.68	1.06 ± 0.17
59.4	21.81 ± 5.48	7.71 ± 1.07	12.32 ± 3.85	11.51 ± 1.61	1.75 ± 0.16
61	49.41 ± 0.16	14.73 ± 0.70	22.97 ± 3.96	22.17 ± 1.88	3.42 ± 0.41
62.4	-	-	-	-	6.79 ± 0.75
63.7	-	-	-	-	12.27 ± 0.98
64.9	-	-	-	-	23.78 ± 2.30
66.0	-	-	-	-	47.21 ± 8.18

Las constantes de velocidad se determinaron a partir de medidas de elipticidad a 220 nm, en experimentos de desnaturalización a diferentes temperaturas como los que se muestran en las Figuras 4.8 y 4.11, con soluciones de enzima a 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$  en regulador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0.

\* Número de replicas del experimento a cada temperatura, desviación estándar ( $\pm$  DE).

**Tabla 6.** Constantes de desnaturalización térmica de la  $\beta$ glB silvestre y sus mutantes MDQ a diferentes temperaturas.

T (°C)	$k_d^{\text{BglB}} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> )	$k_d^{\text{A91R}} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> )	$k_d^{\text{A112R}} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> )	$k_d^{\text{A238R}} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> )	$k_d^{\text{V323R}} \times 10^3$ (s <sup>-1</sup> )
52.4	1.34 ± 0.40	1.30 ± 0.23	1.17 ± 0.23	1.56 ± 1.00	6.67 ± 3.05
53.5	2.24 ± 0.47	2.28 ± 0.20	1.65 ± 0.16	2.17 ± 0.44	9.57 ± 0.28
55.0	4.07 ± 0.62	3.90 ± 0.72	2.97 ± 0.08	3.81 ± 0.62	17.05 ± 2.86
56.4	7.06 ± 0.99	6.70 ± 0.42	5.30 ± 0.73	6.19 ± 0.98	32.43 ± 7.16
55.0	14.09 ± 1.70	12.54 ± 0.89	9.36 ± 1.00	14.22 ± 1.79	57.72 ± 15.53
59.4	21.81 ± 5.48	20.05 ± 18.75	17.03 ± 1.47	23.88 ± 3.00	108.86 ± 24.76
61.0	49.41 ± 0.16	39.33 ± 3.14	28.30 ± 5.39	56.04 ± 2.18	214.55 ± 46.14

Constantes determinadas por triplicado y desviación estándar ( $\pm$  DE). Obtenidas a partir del ajuste a una ecuación de primer orden.

Las constantes de velocidad se determinaron a partir de medidas de elipticidad a 220 nm, en experimentos de desnaturalización a diferentes temperaturas como los que se muestran en las Figuras 4.8 y 4.11, con soluciones de enzima a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en regulador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0.

Cuando se conocen las constantes de velocidad de desnaturalización a varias temperaturas, se puede emplear la teoría del estado de transición (*ET*) para caracterizar energéticamente la barrera de activación del proceso de desnaturalización de la enzima (Fersht, A., 1999). La constante cinética de desnaturalización aparente  $k_d$ , está relacionada con la energía libre de la barrera de activación  $\Delta G^{N \rightarrow ET}$  a través de la expresión:

$$k_d = \frac{\kappa k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G^{N \rightarrow ET}}{RT}\right) \quad (8)$$

Donde  $\kappa$  es el coeficiente de transmisión,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $h$  la constante de Planck y  $T$  es la temperatura absoluta en Kelvin. Puesto que la constante  $\kappa$  no se conoce para el desplegamiento de proteínas, no es posible obtener un valor absoluto confiable de  $\Delta G^{N \rightarrow ET}$ , sin embargo un cambio en su valor ( $\Delta\Delta G$ ) por efecto de un cambio estructural pequeño como una mutación puntual, si es posible calcularlo suponiendo que el coeficiente de transmisión no cambia, de acuerdo a la ecuación:

$$\Delta\Delta G_{mutante-silvestre}^{N \rightarrow ET} = \Delta G_{mutante}^{N \rightarrow ET} - \Delta G_{silvestre}^{N \rightarrow ET} = RT \ln \frac{k_d^{silvestre}}{k_d^{mutante}} \quad (9)$$

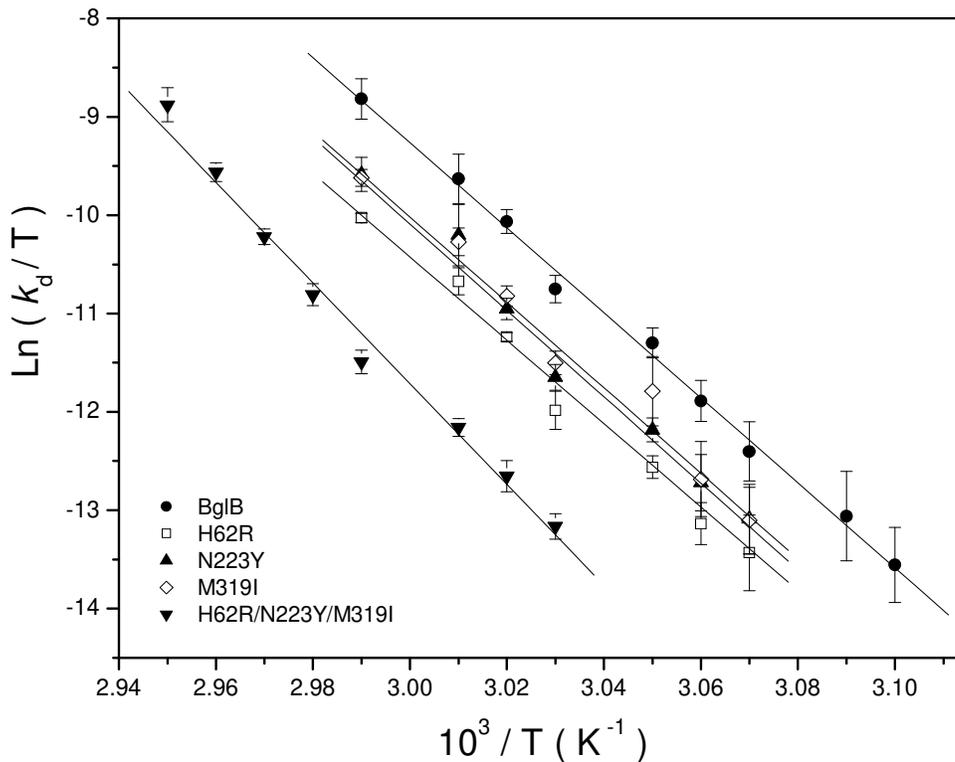
A fin de poder calcular la contribución entálpica a la barrera de activación, se utilizó la ecuación de Eyring:

$$\ln\left(\frac{k_d}{T}\right) = \ln E + \frac{\Delta S^{N \rightarrow ET}}{R} - \left(\frac{\Delta H^{N \rightarrow ET}}{R}\right) \left(\frac{1}{T}\right) \quad (10)$$

donde  $E$  representa el factor preexponencial  $\frac{\kappa k_B T}{h}$  mostrado en la ecuación 8;  $\Delta H^{N \rightarrow ET}$  y  $\Delta S^{N \rightarrow ET}$  representan los cambios de entalpía y entropía asociados con la formación del estado de transición a partir del estado nativo, respectivamente (Zubillaga *et al.* 2006).

## 4.6 Contribuciones de la entalpía a la barrera de activación Grupo MED

En la Figura 4.12 se muestra un gráfico de Eyring con las constantes cinéticas de desnaturalización térmica ( $k_d$ ), a las diferentes temperaturas. Como puede notarse, el conjunto de datos de la enzima  $\beta$ glB silvestre y sus mutantes MED, presentan un comportamiento lineal que de acuerdo con la ecuación 10, la pendiente de estas rectas es igual a  $-\Delta H^{N-ET}/R$ . En la Tabla 7 se muestran los valores de las entalpías de activación para todas las variantes de  $\beta$ glB estudiadas.



**Figura 4.12.** Gráfico de Eyring para las constantes de desnaturalización ( $k_d$ ) de  $\beta$ glB silvestre y sus mutantes MED. Las constantes de velocidad de desplegamiento fueron determinadas por DC en el UV lejano a pH 7.0. Los datos mostrados corresponden a  $\beta$ glB silvestre ( $\bullet$ ), H62R( $\square$ ), N223Y( $\blacktriangle$ ), M319Y( $\diamond$ ), H62R/N223Y/M319I( $\blacktriangledown$ ). Las líneas corresponden a las regresiones lineales hechas de acuerdo a la Ec. 10 descrita en el texto.

**Tabla 7.** Entalpías de activación de la desnaturalización térmica de las variantes de  $\beta$ glB,

Enzima	$\Delta H_{Enzima}^{N \rightarrow ET}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
$\beta$ glB silvestre	368 ± 22
H62R	377 ± 13
N223Y	383 ± 25
M319I	367 ± 21
H62R/N223Y/M319I	410 ± 13

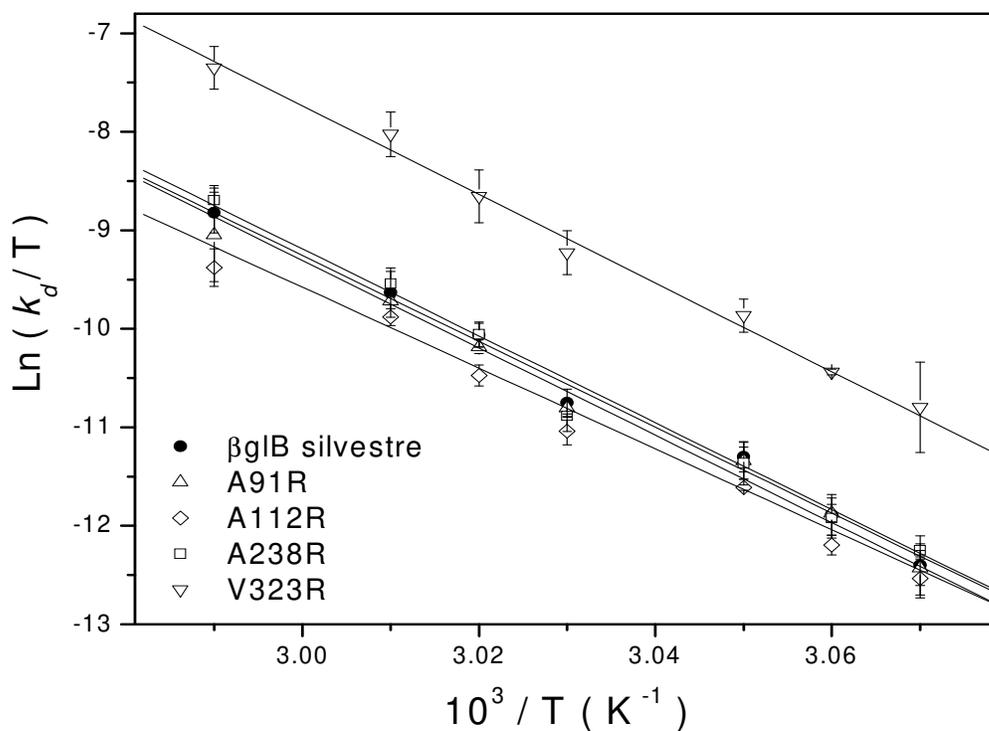
En la Tabla 8, se muestran los valores de  $\Delta\Delta G^{N \rightarrow ET}$ , calculados a partir de las constantes de desnaturalización térmica a diferentes temperaturas empleando la Ec. 9 del texto.

**Tabla 8.** Valores de la energía libre de Gibbs en el estado activado de las mutantes del grupo MED con respecto a la enzima  $\beta$ glB silvestre.

T (°C)	$\Delta\Delta G_{H62R-silvestre}^{N \rightarrow ET}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G_{N223Y-silvestre}^{N \rightarrow ET}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G_{M319I-silvestre}^{N \rightarrow ET}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G_{H62R/N223Y/M319I-silvestre}^{N \rightarrow ET}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
52.4	2.9 ± 1.1	2.0 ± 0.9	2.0 ± 1.1	-
53.5	3.4 ± 0.6	2.3 ± 0.8	2.3 ± 1.1	-
55.0	3.5 ± 0.3	2.4 ± 0.3	1.5 ± 0.8	-
56.4	3.4 ± 0.6	2.5 ± 0.4	2.1 ± 0.3	6.7 ± 0.3
58.0	3.2 ± 0.1	2.5 ± 0.3	2.1 ± 0.3	7.3 ± 0.3
59.4	2.9 ± 0.4	1.7 ± 0.8	1.8 ± 0.4	7.0 ± 0.2
61	3.4 ± 0.1	2.2 ± 0.5	2.2 ± 0.2	7.4 ± 0.3

(± DE) desviación estándar

Por otro lado, se determinó la entalpía de activación para el grupo de mutantes MDQ a partir del gráfico de Eyring correspondiente (Figura 4.13).



**Figura 4.13.** Gráfico de Eyring para las constantes de desnaturalización ( $k_d$ ), de  $\beta$ gIB silvestre y sus mutantes MDR. Las constantes de velocidad de desplegamiento fueron determinadas a partir de datos de DC en el UV lejano a pH 7.0. Los datos mostrados corresponden a  $\beta$ gIB silvestre (●), A91R (△), A112R (◇), A238R (□), V323R (▽). Los comportamientos rectilíneos corresponden a las regresiones lineales de acuerdo a la Ec. 10 del texto.

**Tabla 9.** Contribución de la entalpía a la barrera de activación de las variantes del grupo MDQ de  $\beta$ glB, determinadas a partir de las pendientes del gráfico de Eyring de la figura 4.13.

<b>Enzima</b>	$\Delta H_{Enzima}^{N \rightarrow ET}$ <b>(kJ mol<sup>-1</sup>)</b>
$\beta$ glB silvestre	368 ± 22
A91R	369 ± 13
A112R	341 ± 13
A238R	367 ± 13
V323R	374 ± 19

(± DE) desviación estándar

Así mismo en la tabla 10, se muestran los valores de  $\Delta\Delta G^{N \rightarrow ET}$ , calculados con la Ec. 9 del texto para las mutantes del grupo MDQ de la  $\beta$ glB.

**Tabla 10.** Valores del tamaño de la barrera de activación de las mutantes del grupo MDQ con respecto a la enzima  $\beta$ glB silvestre.

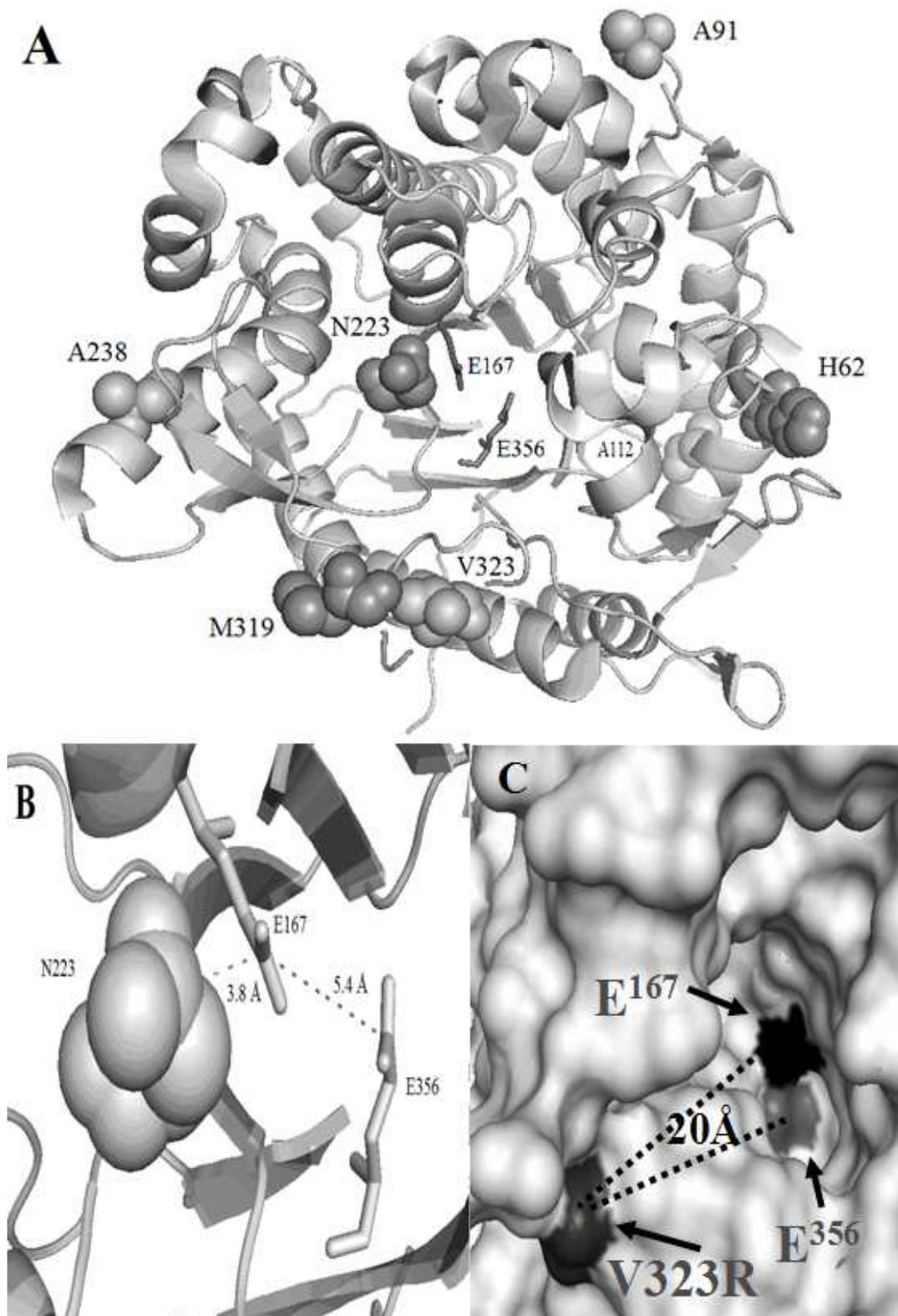
<b>T</b> <b>(°C)</b>	$\Delta\Delta G_{A95R-wt}^{N \rightarrow TS}$ <b>(kJ mol<sup>-1</sup>)</b>	$\Delta\Delta G_{A112R-wt}^{N \rightarrow TS}$ <b>(kJ mol<sup>-1</sup>)</b>	$\Delta\Delta G_{A238R-wt}^{N \rightarrow TS}$ <b>(kJ mol<sup>-1</sup>)</b>	$\Delta\Delta G_{V323R-wt}^{N \rightarrow TS}$ <b>(kJ mol<sup>-1</sup>)</b>
52.4	0.10 ± 0.4	0.39 ± 0.4	-0.41 ± 0.2	-4.17 ± 0.2
53.5	-0.04 ± 0.2	0.84 ± 0.2	0.13 ± 0.5	-3.94 ± 0.1
55.0	0.14 ± 0.4	0.85 ± 0.1	0.20 ± 0.4	-3.88 ± 0.4
56.4	0.15 ± 0.1	0.80 ± 0.3	0.38 ± 0.4	-4.13 ± 0.5
58.0	0.32 ± 0.2	1.14 ± 0.2	-0.01 ± 0.3	-3.82 ± 0.6
59.4	0.23 ± 0.1	0.69 ± 0.2	-0.24 ± 0.3	-4.39 ± 0.6
61.0	0.89 ± 1.3	1.58 ± 0.5	-0.33 ± 0.3	-4.03 ± 0.5

(± DE) desviación estándar

## 5. Discusión

### 5.1 Actividad enzimática

A partir del estudio de las ocho mutantes, cinco de ellas mostraron una actividad catalítica semejante a la  $\beta$ glB silvestre, H62R y M319I del grupo MED y A91R, A112R y A238R del grupo MDQ (ver Tabla 3). Del grupo MED, sólo las mutantes N223Y y triple mutante, TM (H62R/N223Y/M319I), muestran una eficiencia catalítica ( $k_{cat} / K_M$ ) mayor que la enzima silvestre (9 y 14 veces, respectivamente). Este incremento se debe a la disminución de  $K_M$ , ya que la N223Y y la triple mutante muestran una afinidad mayor por el PNPG (18.7 y 28.0 veces respectivamente). En la literatura especializada se ha reportado una posible explicación para esta observación, y es que las tirosinas y los triptófanos son residuos comúnmente presentes en el sitio catalítico de glicosidasas y otras proteínas unidoras de carbohidratos (McCarter y Withers, 1994; Verdoucq *et al.*, 2004); presumiblemente la combinación de su carácter hidrofóbico y la capacidad de formar puentes de hidrógeno proporcionan un ambiente favorable a la unión de carbohidratos. En  $\beta$ glB la Asn223 se localiza en el sitio de unión del sustrato, a un lado del residuo catalítico E<sup>167</sup> (3.82 Å entre átomos de C $_{\beta}$  de ambos residuos). Al mutar este residuo por tirosina aumenta la afinidad por el PNPG disminuyendo la  $K_M$ . La triple mutante puede estar adoptando en gran parte la afinidad que le otorga la mutación en la posición 223. Por otro lado, el número de recambio ( $k_{cat}$ ) de N223 y la triple mutante disminuye prácticamente a la mitad ( $11.5 \pm 0.3$  y  $15.5 \pm 0.2$  s<sup>-1</sup>), respecto al de la silvestre ( $25.0 \pm 0.3$  s<sup>-1</sup>). Este cambio puede deberse a que al sustituir Asn por Tyr, se modifica la geometría del sitio activo haciendo menos eficiente el proceso catalítico. Por otro lado, dentro del grupo MDQ, la eficiencia catalítica de V323R se ve disminuida respecto a la enzima silvestre en un 40%. En este caso la mutación se localiza en la periferia del sitio activo modificando desfavorablemente la unión y actividad, donde cabe la posibilidad que este residuo modifique la geometría de la entrada al sitio activo, afectando la afinidad por el sustrato así como el valor de  $k_{cat}$  (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Localización de las diferentes posiciones mutadas en  $\beta$ glB. A) Se muestran los residuos catalíticos E167 y E356 en varillas y los residuos mutados en esferas. B) Localización del residuo N223 en el sitio catalítico. C) Localización del residuo V323R y su distancia (20Å), respecto a los residuos del sitio catalítico.

## 5.2 Propiedades Estructurales de las Mutantes (MED y MDQ) de $\beta$ glB

### 5.2.1 Espectros de Dicroísmo Circular de la $\beta$ glB silvestre y sus mutantes

Los espectros de dicroísmo circular de las diferentes mutantes de los grupos MED y MDQ de  $\beta$ glB (Figura 4.2), no muestran diferencias considerables con respecto al de la enzima silvestre, ya que no pierden la forma característica de los espectros de enzimas con la estructura de barril  $(\alpha/\beta)_8$ . Las pequeñas diferencias entre los espectros de DC son sólo en magnitud de la señal, ya que los dos mínimos permanecen sin alteración o corrimiento hacia otras longitudes de onda. Esto indica que las mutaciones no afectan significativamente la estructura secundaria de la enzima. También hay que resaltar que al incubar la solución enzimática hasta 75 °C, desnaturizando la glucosidasa, y reenfriando a 25 °C, no recupera su estado nativo; se observan indicios de la existencia de estructura residual considerable, ya que el espectro de la proteína reenfriada muestra un pico ancho, disminuido en magnitud y con un mínimo alrededor de 215 nm; esto sugiere una pérdida de estructura helicoidal y formación de hoja  $\beta$ . Al analizar los espectros de DC con el programa K2D2, el cual predice el porcentaje de estructura secundaria (Pérez y Andrade, 2008), se observaron estos cambios en el porcentaje de estructura secundaria (ver Tabla 11).

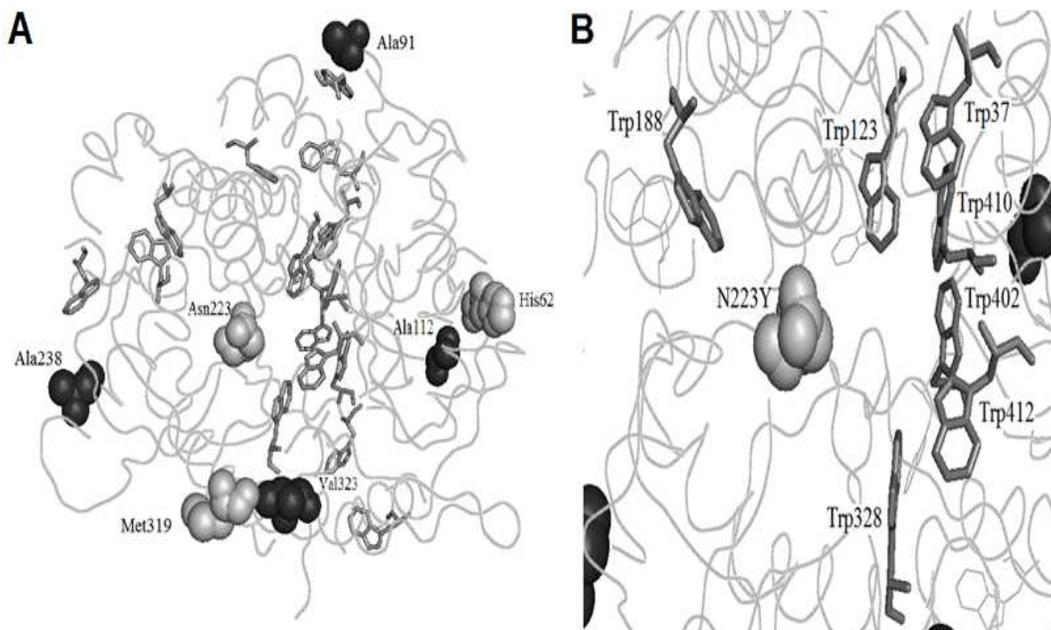
**Tabla 11.** Porcentajes de estructura secundaria predicha con K2D2, a temperatura de 25 °C y reenfriados, de los diferentes grupos de mutantes.

Enzima	Hélice (%)	Hoja $\beta$ (%)	Hélice (%)	Hoja $\beta$ (%)
	25 °C	25 °C	25 °C reenfriamiento	25 °C reenfriamiento
WT	43 (42)	11 (16)	22	28
H62R	43	11	22	28
N223Y	36	11	19	32
M319I	39	10	22	28
Triple	46	11	22	28
A91R	39	11	19	32
A112R	40	10	22	28
A238R	36	12	19	32
V323R	46	11	22	28

Valores (determinados por DSSP) mostrados en PDB: 2O9P  $\beta$ glB silvestre. [Kabsch, y Sander, 1983]

## 5.2.2 Espectros de Fluorescencia intrínseca de la $\beta$ glB silvestre y sus mutantes (MED y MDQ)

Los espectros de fluorescencia intrínseca, IF, obtenidos para los grupos MED y MDQ, (Figura 4.3 A y B), no evidencian diferencias de consideración en las estructuras terciarias. Los valores del *CME* fueron muy semejantes, variando en más o menos un nanómetro (Tabla 4) en comparación con la enzima  $\beta$ glB silvestre, lo que indica que las mutaciones sencillas y triple, no causaron cambios considerables en la estructura terciaria de la enzima. Cabría discutir las diferencias en magnitud de IF que muestran las mutantes N223Y, M319I y V323R. La disminución de la señal de IF de N223Y puede deberse a la interacción que establece la nueva Tyr con Trp cercanos, ver Figura 5.2B, siendo los más próximos Trp123 y Trp328 (7.4 y 9.3 Å), que están localizados en la cavidad de sitio activo. Así mismo la mutante V323R muestra una *IF* de mayor magnitud que la de la silvestre, esta posición está cercana a los Trp328 y 412 (3.0 y 10.0 Å respectivamente, ver Figura 5.2A), estos mismos residuos colindan con la posición de la mutante M319I (a 6.5 y 11.2 Å), la cual muestra un cambio más pequeño en *IF* que la V323R. Las mutantes A91R y A112R, se localizan cerca de los triptofanos 128 (3.7 Å) y 167 (7.1 Å) respectivamente, lo que sugiere que las mutantes forman cambios locales que no deforman significativamente la estructura terciaria.



**Figura 5.2.** A) Se resaltan en la estructura de la  $\beta$ glB, las posiciones de los 16 residuos de triptófano en líneas, en color gris claro las posiciones del grupo MED y en color gris oscuro la ubicación de las mutantes del grupo MDQ. B) Se observa los triptófano que se localizan alrededor de la mutación N223Y.

### 5.3 Perfiles de desnaturalización térmica

En el grupo MED todos los perfiles de desplegamiento térmico de las mutantes muestran una mayor estabilidad respecto a la  $\beta$ glB silvestre (Figura 4A). Las mutantes más estables fueron la H62R y la triple, con una  $T_m$  mayor en 4 y 5 °C al de la enzima silvestre. El orden de estabilidad en cuanto a su  $T_m$  sería: H62R/N223Y/M319I > H62R > M319I > N223Y >  $\beta$ glB (ver inserto de la Figura 4.4A). Sin embargo la mutante V323R, del grupo MDQ, muestra una desestabilización estructural ya que su  $T_m$  desciende unos 4 °C con respecto a la enzima silvestre (Figura 4.4B), mientras la mutante sencilla A112R, tiene una estabilización pequeña; así mismo existe una invariancia de la  $T_m$  por parte del resto de las mutantes con respecto a la de la enzima silvestre. Lo anterior indica que las mutantes por evolución dirigida muestran una estabilización térmica ligeramente mayor que la mostrada por las mutantes de carga.

### 5.4 Mecanismo de desnaturalización térmica de la $\beta$ -glucosidasa B

Como se indico anteriormente, al llevarse acabo la desnaturalización térmica de la  $\beta$ glB silvestre y reenfriar la solución de enzima, el proceso de renaturalización no ocurre y además se observa la formación de agregados. En la Figura 4.5, se muestran los perfiles térmicos a diferentes velocidades de calentamiento, los cuales muestran un comportamiento monofásico. Al incrementar la velocidad de calentamiento las transiciones se desplazan hacia temperaturas más altas, lo que indica que es un proceso controlado cinéticamente (Duy y Fitter, 2005). Las transiciones aparentemente no muestran intermediarios. Estos resultados son indicativos de que tal vez el mecanismo de desplegamiento corresponde a un modelo de dos estados irreversible en el que el estado nativo ( $N$ ) se transforma en el estado desnaturalizado ( $D$ ) en un solo paso con una constante cinética  $k_f$ :



Se asumió este modelo como primera aproximación en el análisis de los datos. Para ello, se utilizaron las ecuaciones 12 y 13, deducidas por Sánchez-Ruiz y colaboradores (Rodríguez *et al.*, 2006; Plaza *et al.*, 2000), que permiten estimar la energía de activación aparente ( $E$ ) del proceso a partir de curvas de desnaturalización obtenidas por calorimetría diferencial de barrido a diferentes velocidades de calentamiento ( $v$ ). Dicha

energía de activación es prácticamente igual a la entalpía de activación ( $\Delta H^\ddagger = E - RT$ ) según la teoría del estado de transición (Laidler, K., 1987).

$$f_N = \exp \left[ - \exp \left( \frac{E (T - T_{max})}{RT_{max}^2} \right) \right] \quad (12)$$

$$\ln \left( \frac{v}{T_{max}^2} \right) = \ln \left( \frac{AE}{R} \right) - \frac{E}{RT_{max}} \quad (13)$$

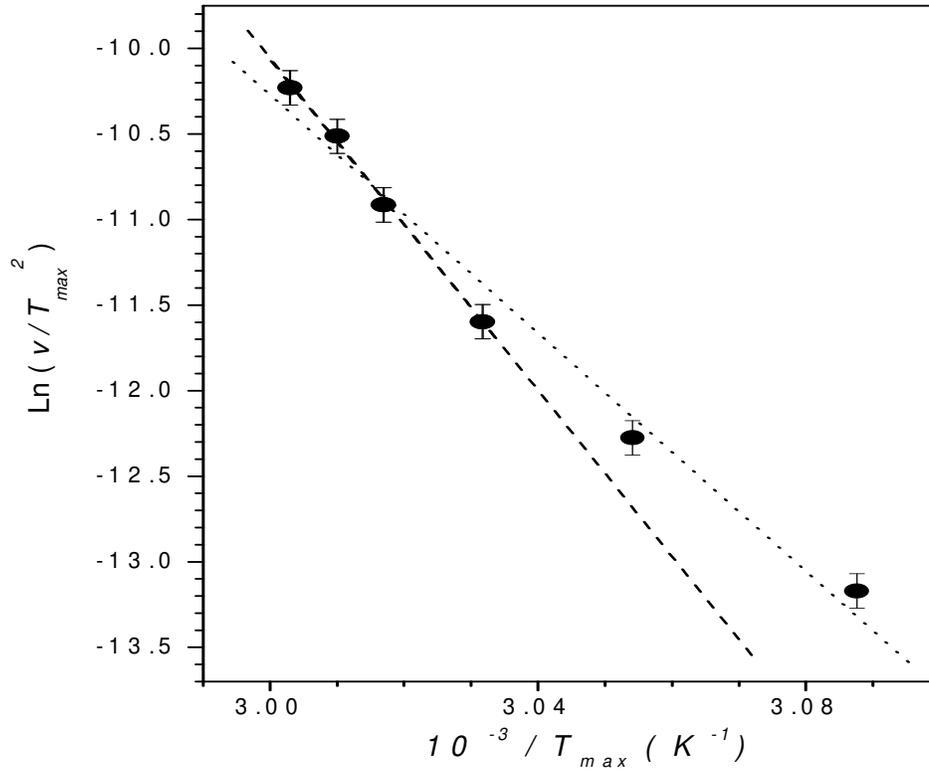
La Ec. 12 relaciona la fracción de proteína en estado nativo  $f_N$ , con la energía de activación de la desnaturalización  $E$ , la temperatura de la solución  $T$  y la temperatura a la cual se observa un máximo en la curva calorimétrica  $T_{max}$  que corresponde con la temperatura en que  $f_N = 0.37$  ( $f_N = e^{-1}$ ).  $R$  es la constante de los gases. En la Ec. 13,  $A$  es la frecuencia o factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius.

Las líneas continuas en la Figura 4.5 representan la Ec. 12 ajustada a los diferentes conjuntos de datos. Como parámetros de ajuste se obtuvieron  $E$  y  $T_{max}$  para cada curva. La energía de activación aumenta con la velocidad de calentamiento, alcanzando un valor promedio de  $393 \pm 9 \text{ kJ mol}^{-1}$  como valor límite a  $v \geq 1.0 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  (ver inserto de la Figura. 4.5).

Por otro lado, de acuerdo con la Ec. 13, un gráfico de  $\ln (v/T_{max}^2)$  vs  $1/T_{max}$  debe dar una línea recta con una pendiente igual a  $-E/R$ . Sin embargo, esta linealidad no se observó (Fig. 5.3). La energía de activación estimada a partir de la pendiente de la recta ajustada (línea punteada) fue de  $289 \pm 12 \text{ kJ mol}^{-1}$ , significativamente diferente al valor límite de  $393 \text{ kJ mol}^{-1}$  mencionado en el párrafo anterior. Estos resultados sugieren que el mecanismo de desnaturalización de dos estados no es del todo apropiado para describir el desplegamiento térmico de  $\beta\text{glB}$  en todo el intervalo de temperaturas analizado.

La presencia de agregados después de enfriar las muestras de enzima desnaturalizada, indica que el estado desnaturalizado de  $\beta\text{glB}$  es propenso a agregarse, lo que podría estar afectando la cinética de desnaturalización. Por ello se obtuvieron perfiles de desnaturalización a diferentes concentraciones de enzima y a la misma velocidad de calentamiento de  $2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  (Figura. 4.6). Dado que los perfiles son prácticamente iguales es claro que el proceso de agregación, que debió acelerarse por el

incremento en la concentración de proteína, no tiene una influencia significativa en la cinética global de desnaturalización.



**Figura 5.3.** Se muestran los valores de las temperaturas a las que  $f_N = 0.37 (T_{max})$  de la  $\beta$ -glucosidasa B a diferentes velocidades de calentamiento ( $v$ ). Se muestran el modelo lineal para todos los datos, en línea en puntos, (...), en línea con guiones se muestran los cuatro datos a mayor velocidad de barrido (---).

Con base en las anteriores observaciones el mecanismo de desnaturalización podría ser alguno de los siguientes:



Donde  $N$  es el estado nativo,  $D$  el estado desnaturalizado e  $I$  el estado final irreversible y  $k_{N \rightarrow D}$ ,  $k_{D \rightarrow I}$  y  $k_{D \rightarrow N}$  las constantes cinéticas que rigen las etapas de los mecanismos.

Los barridos térmicos incompletos (Figura 4.7A) mostraron que existe al menos reversibilidad parcial y que la fracción de enzima nativa recuperada al reenfriar, después de interrumpir el calentamiento, a temperaturas bajas es mayor (52.4 y 55.0 °C). Mientras que la fracción nativa recuperada para el caso en que se interrumpió el calentamiento a 57 °C, fue solo del 7% (ver Figura 4.7B) (Plaza *et al.*, 2000), lo que indica que el paso irreversible se vuelve más predominante.

Esta evidencia apunta a un modelo que tenga por lo menos una etapa reversible, por lo que se descartó el modelo de la Ec. 14. Con la evidencia hasta el momento se propone inspeccionar el modelo de Lumry-Eyring (Ec. 15) para la desnaturalización de la enzima (Lumry y Eyring, 1954). La constante cinética aparente que rige este modelo se puede expresar en términos de las constantes elementales del mecanismo de la siguiente forma (ver Apéndice 2A):

$$k_{d,app} = \frac{k_{N \rightarrow D}}{k_{D \rightarrow N} + k_{D \rightarrow I}} k_{D \rightarrow I} \quad (16)$$

Entonces con el análisis anterior se puede proponer que se favorece más el estado irreversible a temperaturas cercanas o por arriba de la  $T_{max}$ , donde  $k_{D \rightarrow I} \gg k_{D \rightarrow N}$ .

Tomando en cuenta esta consideración, la Ec. 16 describiría la constante de desnaturalización aparente como una constante para un mecanismo de dos estados:

$$k_{d,app} \approx k_{N \rightarrow D} \quad (17)$$

Así mismo se pudo constatar que la etapa limitante de la reacción es unimolecular, prueba de ello fue que la constante cinética aparente de desnaturalización ( $k_d$ ) obtenida a partir de la pérdida de estructura secundaria a 56 °C, permaneció invariante al cambiar la concentración de enzima entre 10 y 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , como se muestra en la Figura 4.9. La agregación debe ser muy rápida, considerando que al disminuir 10 veces la concentración de  $\beta\text{glB}$  no se observa cambio en la constante cinética aparente.

También se realizaron estudios de la cinética de inactivación de la  $\beta\text{glB}$  silvestre, monitorizando la actividad enzimática remanente a 56 °C. Estos valores están bien representados por un modelo exponencial monofásico (Zubillaga *et al.*, 2006). A partir del ajuste se obtuvo una constante aparente de  $5.1 (\pm 0.5) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , similar al valor obtenido por DC ( $5.9 (\pm 0.7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), mostrados en la Figura 4.10, donde se observa que al ir perdiendo estructura secundaria la enzima simultáneamente pierde su actividad catalítica. Por lo que se puede decir que a esta temperatura la desnaturalización de la

$\beta$ glB silvestre, se apega a un mecanismo de dos estados, como caso límite del modelo de Lumry-Eyring con  $k_{D \rightarrow I} \gg k_{D \rightarrow N}$ . Con estos resultados se propone que a temperaturas  $\geq T_{max}$  la energía de activación solo involucra la etapa elemental de desnaturalización ( $N \rightarrow D$ ) (Camarillo-Cadena *et al.*, 2011), donde tiene que ocurrir primero la desnaturalización para llegar a la etapa irreversible.

## 5.5 Estabilidad cinética de las mutantes MED de $\beta$ glB

Uno de los propósitos de este trabajo es determinar cómo se relacionan los efectos estabilizantes de las tres mutantes puntuales (H62R, N223Y, M319I) del grupo MED en la TM (H62R/N223Y/M319I) y explicarlo en términos energéticos y moleculares. Por ello se realizaron cinéticas de desnaturalización de las MED. En la Figura 4.11 se muestran algunas cinéticas correspondientes a la TM, realizadas a diferentes temperaturas. Los datos se describen bien con las funciones exponenciales sencillas, lo que sugiere que el mecanismo de desnaturalización se mantiene igual que en la enzima silvestre. Cabe mencionar que todas las variantes de ambos grupos de mutantes (MED y MDQ) mostraron cinéticas de este tipo.

A partir de los ajustes con el modelo de la ecuación 7, se obtuvieron los valores de las constantes cinéticas de desnaturalización,  $k_d$ . Los valores  $k_d$  del grupo MED se muestran en las Tablas 5. Hay que resaltar que las  $k_d$  de la triple mutante a cada temperatura siempre son más pequeñas que para el resto de las mutantes sencillas, lo que implica un proceso de desplegamiento más lento y una barrera de activación más grande.

En la Tabla 8, se muestra la cuantificación de la energía libre en el estado activado,  $\Delta\Delta G^{N \rightarrow ET}$ , de las mutantes por evolución dirigida calculada con la Ec. 9 del texto. El valor promedio de ( $\Delta\Delta G_{mutante-silvestre}^{N \rightarrow ET}$ ) para la variante H62R es de  $3.2 \pm 0.3$  kJ mol<sup>-1</sup>, este valor hace proponer la formación de un puente salino entre His62 con Glu429 (Kumar y Nussinov, 2001; Zubillaga *et al.*, 2006) comparable con la energía de estabilización de los puentes salinos en la barnasa (-5.2 kJ mol<sup>-1</sup> y -4.1 kJ mol<sup>-1</sup>) (Horovitz *et al.*, 1990), y la energía libre de formación del puente salino en péptidos modelo Glu-Lys (-2.1 kJ mol<sup>-1</sup>) (Lyu *et al.*, 1992).

La mutante N223Y mostró un aumento de la barrera  $2.2 \pm 0.5$  kJ mol<sup>-1</sup>. Lo que sugiere que en N223Y se generan un mayor número de interacciones débiles, debidas probablemente a la mayor cantidad de átomos de la nueva cadena lateral. Por otro lado

la presencia del grupo –OH de la tirosina podría permitir la formación de un puente de hidrógeno. No puede descartarse tampoco que la eliminación de la asparagina pudiera evitar una desamidación a temperaturas elevadas, lo que podría contribuir a una mayor estabilidad (Giordano *et al.*, 1999).

El tamaño de la barrera de activación  $2.1 \pm 0.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  de la mutante M319I, se podría explicar como un aumento en hidrofobicidad de la cadena lateral y en concordancia con la diferencia en la energía libre de transferencia promedio agua/alcohol alifático ( $3.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) entre isoleucina y metionina (Guy, H., 1985).

Como se mencionó anteriormente, un objetivo de este trabajo es el determinar el tipo de efecto que confieren las mutantes sencillas a la estabilidad de la triple mutante. Esta determinación es posible a partir de la cuantificación del aumento de la barrera de activación conferido por la triple mutante ( $\Delta\Delta G_{\text{triple mutante}}$ ) y su comparación con la suma de los aumentos provocados por las mutantes puntuales ( $\sum \Delta\Delta G_{\text{mutante}(i)}$ ), es posible

determinar la existencia de aditividad ( $\Delta\Delta G_{\text{triple}}^{N \rightarrow ET} = \sum_{i=1}^n \Delta\Delta G_i^{N \rightarrow ET}$ ) o algún otro efecto

como cooperatividad o anticooperatividad,  $\Delta\Delta G_{\text{triple}}^{N \rightarrow ET} \neq \sum_{i=1}^n \Delta\Delta G_i^{N \rightarrow ET}$ , ( Wells, J. A.

1990.; Redzic y Bowler, 2005). Los posibles efectos hallados hasta el momento en lo ya reportado, son explicados en términos de pérdidas o ganancias de flexibilidad estructural. En un estudio realizado al Iso-1-citocromo c se identificó mediante dicha comparación un efecto de cooperatividad. Esta cooperatividad se debe a una pérdida de flexibilidad en los alrededores donde se localizan las mutaciones, ya que existe una interacción de dos residuos de aminoácidos que se encuentran en diferentes formas helicoidales a una distancia de  $11.48 \text{ \AA}$ , los cuales interactúan formando un puente de hidrogeno originando una rigidez a corto alcance (Wandschneider *et al.*, 2003).

Al realizar la suma de los promedios a diferentes temperaturas, de las energías de activación de las mutantes sencillas de MED ( $7.5 \pm 0.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), son semejantes con el incremento que mostró la triple mutante como se muestra en la Tabla 12, al comparar estas energía de ambas partes ( $\Delta\Delta G_{H62R/N223Y/M319I}^{N \rightarrow ET} - \sum \Delta\Delta G_{mutante(i)}^{N \rightarrow ET}$ ), la triple mutante muestra un efecto de aditividad, lo que sugiere que las mutantes sencillas confieren su energía dando origen a una mayor estabilidad térmica a la triple mutante.

**Tabla 12.** Estabilidad conferida por la triple mutante y la suma de las estabilidades de las tres mutantes puntuales.

T(°C)	$\Delta\Delta G_{H62R/N223Y/M319I}^{N \rightarrow ET}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\sum \Delta\Delta G_{mutantes}^{N \rightarrow ET}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
56.4	6.7 ± 0.3	8.0 ± 0.8
58.0	7.3 ± 0.3	7.8 ± 0.4
59.4	7.0 ± 0.2	6.4 ± 1.0
61.0	7.4 ± 0.3	7.8 ± 0.5
Promedio	7.1 ± 0.3	7.5 ± 0.7

Al realizar los gráficos de Eyring ( $\ln(k_d / T)$  vs  $1 / T$ ), para cada una de las mutantes del grupo MED, los datos mostraron un comportamiento lineal y parecido al de la enzima  $\beta$ glB silvestre, como se observa en las Figuras 4.12 (MED). A partir de las pendientes de estos gráficos ( $\Delta H^{N \rightarrow ET} / R$ , ver Ec. 14), se obtuvieron las contribuciones de la entalpía a la barrera de activación (Tabla 7). Estos valores indican una mayor contribución de la entalpía, a la estabilización térmica de las variantes de  $\beta$ glB, como la triple mutante y H62R, las cuales tienen un incremento de 42 y 9 kJ mol<sup>-1</sup>. Por otro lado, la entalpía de activación aumenta en 15 kJ mol<sup>-1</sup> para N223Y y se mantiene igual para M319I.

## 5.6 Estabilidad cinética del grupo MDQ de $\beta$ glB

En la Tabla 13, se muestra el promedio de los valores de la barrera de activación a diferentes temperaturas del grupo de mutantes de carga eléctrica, donde se aprecia que la mutante A112R se estabiliza en alrededor de 1 kJ mol<sup>-1</sup> respecto de la enzima  $\beta$ glB silvestre, mientras que las mutantes A91R y A238R, no adoptan una mayor estabilidad térmica. Cabe resaltar que la mutante V323R se desestabiliza con respecto a la silvestre en  $-4.1 \pm 0.4$  kJ mol<sup>-1</sup>. Esta menor estabilización de las mutantes de carga respecto a lo esperado, podría deberse a que a pesar de estabilizar al estado nativo, las mutaciones también estabilizan al estado activado y en algunos casos aún más que al propio estado nativo.

**Tabla 13.** Valores promedio del tamaño de la barrera de activación de las mutantes del cambio de carga eléctrica.

	$\Delta\Delta G_{A91R-wt}^{N \rightarrow TS}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G_{A112R-wt}^{N \rightarrow TS}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G_{A238R-wt}^{N \rightarrow TS}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G_{V323R-wt}^{N \rightarrow TS}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
Promedio	$0.26 \pm 0.39$	$0.90 \pm 0.27$	$-0.04 \pm 0.34$	$-4.05 \pm 0.41$

Los gráficos de Eyring ( $\ln(k_d / T)$  vs  $1 / T$ ) para cada una de las mutantes del grupo MDQ mostraron un comportamiento lineal y semejante al de la enzima  $\beta$ glB silvestre, como se observa en las Figura 4.13 (MDQ). A partir de las pendientes de estos gráficos ( $\Delta H^{N \rightarrow ET} / R$ , ver Ec. 10), se obtuvieron las contribuciones de la entalpía a la barrera de activación (Tabla 9). Donde las mutantes A91R y A238R mostraron valores de  $\Delta H^{N \rightarrow E}$  semejantes a la enzima silvestre, mientras que A112R muestra una diferencia de  $-27 \pm 35$  kJ mol<sup>-1</sup>, lo que indica que la entropía tiene que contribuir en mayor medida a la estabilidad de esta mutante. Por otro lado, V323R muestra un valor de  $\Delta H^{N \rightarrow E}$  mayor que la silvestre, por lo que la disminución en la barrera de activación debe tener un origen entrópico.

## 6. CONCLUSIONES

- Todas las mutantes aquí estudiadas de  $\beta$ glB son activas y muestran una eficiencia catalítica semejante o mayor a la enzima silvestre como la TM, excepto la mutante V323R que mostró una eficiencia catalítica 40 % menor y también se desestabilizó de forma importante.
- Las estructuras de todas las mutantes de  $\beta$ glB aquí estudiadas no mostraron diferencias significativas en relación a la de la enzima silvestre, a juzgar por sus espectros de fluorescencia intrínseca y de dicroísmo circular en el UV lejano.
- La desnaturalización térmica de la  $\beta$ glB silvestre ocurre a través de un mecanismo tipo Lumry-Eyring y a temperaturas cercanas o mayores a  $T_{max}$  la energía de activación solo involucra la etapa elemental de desnaturalización ( $N \rightarrow D$ ).
- El incremento en la barrera de activación para la desnaturalización de las mutantes sencillas H62R, N223Y y M319I del grupo MED, muestra un efecto aditivo en la triple mutante (H62R/N223Y/M319I), esto es:  $\Delta\Delta G_{triple}^{N \rightarrow ET} = \sum_{i=1}^3 \Delta\Delta G_i^{N \rightarrow ET}$ .
- De las cuatro mutantes de carga (MDQ) solo una presentó un ligero aumento en la barrera de activación ( $\Delta G^{N \rightarrow ET}$ ) de alrededor de 1 kJ mol<sup>-1</sup>, dos de ellas mostraron una estabilidad similar a la de la enzima  $\beta$ glB silvestre y la V323R mostró una disminución de 4.0 kJ mol<sup>-1</sup>.

## 7. PERSPECTIVAS

- Explorar mutantes múltiples de carga de la  $\beta$ glB, que podrían originar un incremento significativo en la estabilidad térmica.
  
- Analizar que otros factores, además de la energía electrostática del estado nativo, están afectando la estabilidad de las mutantes de carga.
  
- Estudiar las propiedades dinámicas de las mutantes de  $\beta$ glB mediante:
  - Simulaciones de dinámica molecular
  - Ensayos de apagamiento de fluorescencia por adición de acrilamida

## Bibliografía

Arnold, F. H., Winrode, P. L., Miyazaki, K., y Gershenson, A. (2001). How Enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem. Sci.* **26**:100-106.

Arrizubieta, M. J. y Polaina, J. (2000). Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a beta-glucosidase by random mutagenesis and in vitro recombination. *J. Biol. Chem.* **275**:28843- 28848.

Bloom, J. D. y Arnold, F. H. (2009). In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 Suppl 1:9995-10000.

Camarillo, C. M., Garza R., G., Peimbert, M. Gerardo Pérez, H. G. y Zubillaga R. A. (2011). Thermal denaturation of  $\beta$ -glucosidase B from *Paenibacillus polymyxa* proceeds through a lumry-cyring mechanism. *Protein J.* **30**:318-323.

Chakravarty, S. y Varadarajan, R. (2002). Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study. *Biochem.* **41**:8152-8161

Choudhury, D., Biswas S., Roy S. y Dattagupta J. K. (2010). Improving thermostability of papain through structure-based protein engineering. *Protein Eng Des Sel.* **23**:457-467

Dougherty, M. y Arnold, F., (2009). Directed evolution: new part and optimized function. *Curr Opin Biotechnol.* **20**: 486–491

Duy, C. y Fitter, J. (2005). Thermostability of Irreversible Unfolding  $\alpha$ -Amylases Analyzed by Unfolding Kinetics. *J. Biol. Chem.* **280**:37360-37365.

Eijsink, V. G. H., Bjørk, A., Gåseidnes, S., Sirevåg, R., Synstad, B., van den Burg B. y Vriend, G. (2004). Rational engineering of enzyme stability. *J. Biotechnol.* **113**:105-120

Elcock, A. D. (1998). The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins. *J. Mol. Biol.* **284**:489-502.

Fersht, A. (1999). Structure and Mechanism in Protein science. W. H. Freeman, New York, N.Y.

Fields, P. A. (2001). Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **129**:417-431.

Giordano, A., Canino R., La Cara F., Bartolucci, S., Rossi, M., y Raia, C. A. (1999). Asn249Tyr substitution at the coenzyme binding domain activates *Sulfolobus solfataricus* alcohol deshydrogenase and increases its thermal stability. *Biochem.* **38**:3043-3054.

Gilson, M. K. y Honig, B. (1988). Calculation of the total electrostatics energy of a macromolecular system: solvation energies, binding energies, and conformational analysis. *Proteins.* **4**:7-18.

- González, C. L., Aristoy, M. C., Polaina, J. y Flors, A. (1989). Cloning and Characterization of Two Genes from *Bacillus polymyxa* expressing  $\beta$ -Glucosidase Activity in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3173-3177.
- Guy, H. R. (1985). Amino acid side-chain partition energies and distribution of residues in soluble proteins. *Biophys. J.*, **47**:61-70.
- Henrissat, B. y Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**:695-696.
- Horovitz, A., Serrano, L., Avron, B., Bycroft, M. y Fersht, A. R. (1990). Strength and Co-operativity of Contributions of Surface Salt Bridges to Protein Stability. *J. Mol. Biol.* **216**:1031- 1044.
- Ikeda, M. y Clark D. S. (1998). Molecular Cloning of Extremely Thermostable Esterase Gene from Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* **57**:624-629
- Isorna, P., Polaina, J., Latorre, G, L. Cañada, J. F., González, B., y Sanz, A. J. (2007). Crystal structures of *Paenibacillus polymyxa* beta-glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights into the catalytic machinery of family I glycosidases. *J. Mol. Biol.* **371**:1204-18.
- Jaswal, S. S., Truhlar, S. M., Dill, K. A., y Agard, D. A. (2005). Comprehensive analysis of protein folding activation thermodynamics reveals a universal behavior violated by kinetically stable proteases. *J. Mol Biol.* **347**:355-66
- John, R. A. (1992). In: Eienthal R, Danson M. J. (eds) *Enzyme assays, a practical approach*. IRL Press, Oxford, pp 59–92.
- Kabsch, W. y Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers.* **22**:2577-637.
- Karshikoff, A. y Ladenstein, R. (2001). Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles:a “traffic rule” for hot roads. *Trends. Biochem Sci.* **26**:550-556.
- Kumar, S. y Nussinov, R. (2001). How do thermophilic proteína deal with heat?. *Cell Mol Life Sci.* **58**:1216-1233.
- Laidler, K. J. (1987). *Chemical kinetics*. Harper Collins Publishers, New York, pp 112-115.
- Lehmann, M., y Wyss, M. (2001). Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr. Opin. Biotech.* **12**: 371-375.
- Loladze, V. V., Ibarra, M. B., Sánchez, R. J. M. y Makhatadze, G. I. (1999). Engineering a thermostable proteína via optimization of charge-charge interactions on the protein surface. *Biochem.* **38**:16419-16423.

- Luke, K. A., Higgins, C. L. y Wittung-Stafshede, P. (2007). Thermodynamic stability and folding of proteins from hyperthermophilic organisms. *FEBS J.* **274**:4023-33.
- Lumry, R. y Eyring, H. (1954). Conformation Changes of Proteins. *J Phys Chem.* **58**:110–120.
- Lyu, P. C., Gans, P. J. y Kallenbach, N. R. (1992). Alpha-helix-forming propensities in peptides and proteins. *J. Mol. Biol.* **223**:343-350.
- McCarter, J. D., y Withers, S. G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol.* **4**:885-892.
- Müller, V. y Oren A. (2003). Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles.* **7**:261-266.
- Pérez, I. C. y Andrade N. M. A. (2008). K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct. Biol.* **13**:8-25.
- Plaza, P. I. M., Ibarra, M. B. y Sánchez, R. J. M. (2000). Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases. *Proteins.* **40**:58-70.
- Razvi, A. y Scholtz, J. M. (2006). Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Sci.* **15**:1569-1578
- Redzic, J. S. y Bowler, B. E. (2005). Role of Hydrogen Bond Networks and Dynamics in Positive and Negative Cooperative Stabilization of a protein. *Biochem.* **44**:2900-2908.
- Rodriguez, L. D., Minning, S., Borchert, T. V. y Sanchez, R. J. M. (2006). Role of solvation barriers in protein kinetic stability. *J Mol Biol.* **360**:715–724.
- Rye, C. S., y Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol.* **4**:573-580.
- Siddiqui, K. S. y Cavicchioli, R. (2006), Cold Adapted Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **75**:403-433.
- Stemmer, W. P. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:10747-516.
- Stryer, L. (1995). “Bioquímica”, Tomo I, pp. 17-44, eds., Reverté, S. A. España.
- Timmusk, S., Grantcharova, N., Wagner, E. G. (2005). *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7292-300.
- Torrez, M, Schultehenrich, M, y Livesay, D.R. (2003). Conferring thermostability to mesophilic proteins through optimized electrostatic surfaces *Biophys J.* **85**:2845-53.

van den Burg B. y Eijssink, V. G. (2002). Selection of mutations for increased protein stability. *Curr Opin Biotechnol.* **13**:333-337.

Verdoucq, L, Morinière, J., Bevan, D. R., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B. y Czjze, M. (2004). Structural determinants of substrate specificity in family 1 beta-glucosidases: novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant beta-glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate. *J Biol Chem.* **279**:31796-803

Wandschneider, E., Hammack, B. N. y Bowler, B. E. (2003). Evaluation of Cooperative Interactions between Substructures of Iso-1-Cytochrome *c* Using Double Mutant Cycles. *Biochem.* **42**:10659-10666.

Wells, J. A. (1990). Additivity of mutational effects in proteins. *Biochem.* **29**:8509-8517.

Yano, J. K. y Poulos, T. L., (2003). New understandings of thermostable and peizostable enzymes. *Curr Opin Biotechnol.* **14**:360-365.

Zubillaga, R. A., García-Hernández, E., Camarillo-Cadena, M., León, M. y Polaina, J. (2006). Effect of a new ionic pair on the unfolding activation barrier of  $\beta$ -glucosidase B. *Prot Pept Lett.* **13**:113-118.

Zubillaga, R. A. y Pérez-Hernández, G. (2008). Optimización de interacciones electrostáticas superficiales como estrategia de termoestabilidad en proteínas., pp. 95-106, eds., El COLEGIO NACIONAL. México.

## Apéndice

### A1. Tratamiento de datos de Perfiles térmicos

La información recabada de la propiedad física denominada elipticidad ( $\theta$ , expresada en miligrados) de los cambios que sufre la enzima durante el desplegamiento térmico, obtenida por dicroísmo circular, que monitoriza la pérdida de estructura secundaria de la enzima, puede ser tratada como una transición sencilla entre dos estados: el nativo ( $N$ ) y el desnaturalizado ( $D$ ). Asumiendo que existe aditividad en la elipticidad de ambas especies, la señal registrada a cada temperatura ( $\theta_{obs}$ ) puede expresarse como:

$$\theta_{obs} = f_N \theta_N + f_D \theta_D \quad (A1.1)$$

donde  $f_D$  y  $f_N$  representan la fracción de moléculas de proteínas en estado nativo y desnaturalizado, respectivamente. Asimismo,  $\theta_N$  y  $\theta_D$  son la elipticidad de las especies nativa y desnaturalizada, respectivamente.

Dado que:

$$f_N + f_D = 1 \quad (A1.2)$$

Podemos despejar  $f_N$ :

$$f_N = 1 - f_D \quad (A1.3)$$

sustituyendo la Ec. Anterior en (A1.1):

$$\theta_{obs} = (1 - f_D) \theta_N + f_D \theta_D$$

$$\theta_{obs} = \theta_N + f_D (\theta_D - \theta_N)$$

despejando  $f_D$ :

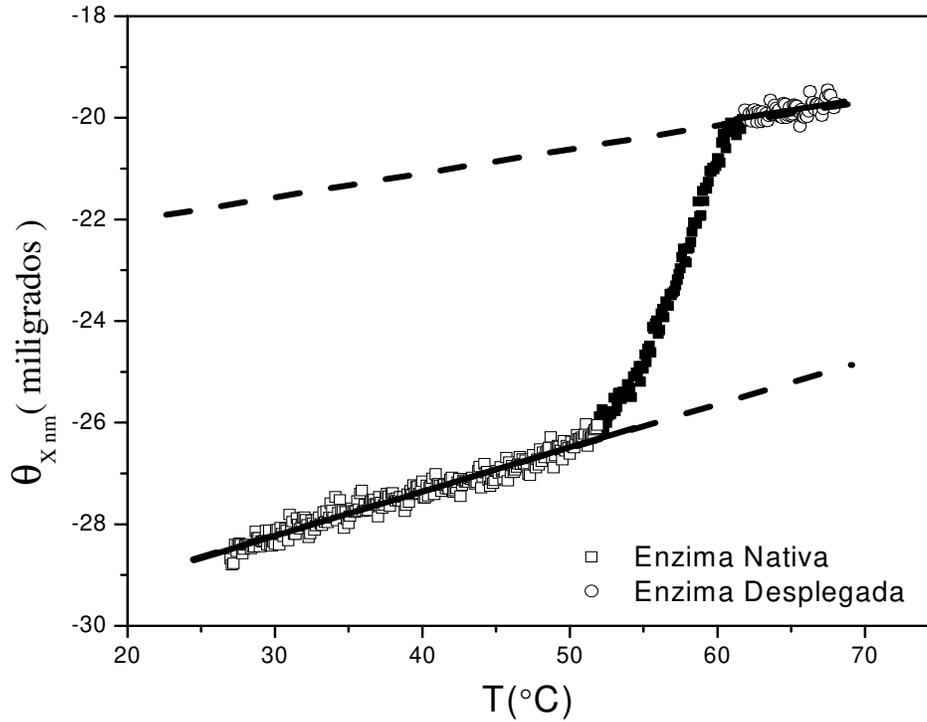
$$f_D = \frac{(\theta_{obs} - \theta_N)}{(\theta_D - \theta_N)} \quad (A1.4)$$

que es la Ec. 4 de la tesis. Sustituyendo ahora A1.4 en A1.3, obtenemos:

$$f_N = \frac{(\theta_D - \theta_{obs})}{(\theta_D - \theta_N)} \quad (A1.5)$$

que corresponde a la Ec. 6 de la tesis.

La ecuación A1.4 puede ser expresada en términos de los parámetros de las rectas ( $y = mx + b$ ), que describen el comportamiento lineal de  $\theta_N$  y  $\theta_D$ , obtenidos gráficamente de los datos crudos de a transición térmica como puede observarse en la Figura A1. La ecuación que se obtiene es:

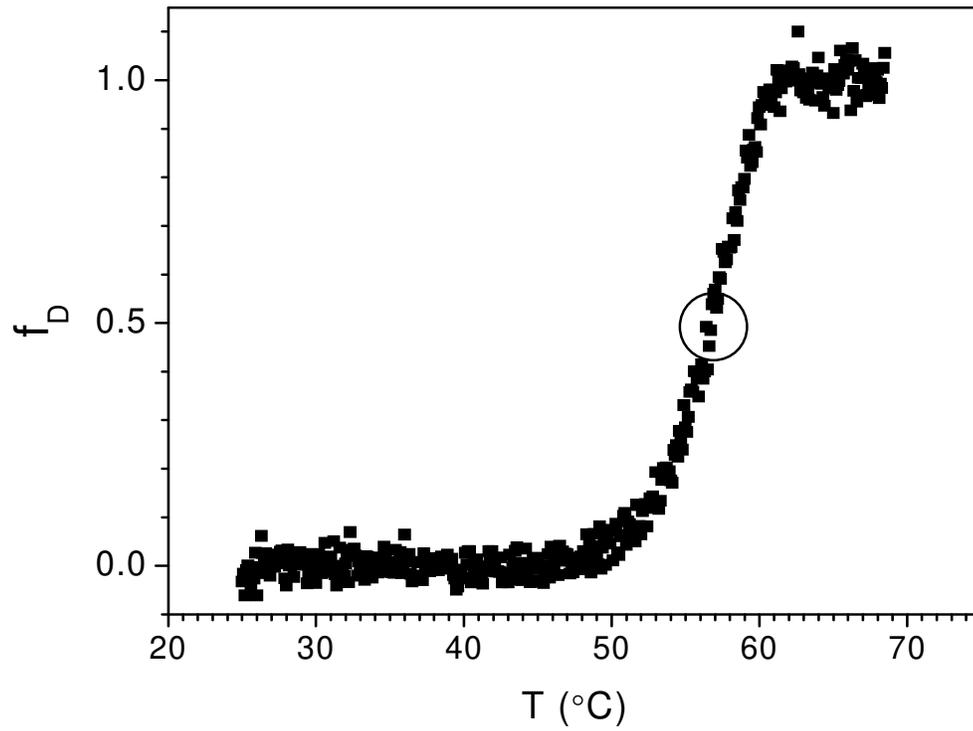


**Figura A1.** Perfil térmico donde se muestran las pendientes de las zonas de las especies nativa y desnaturalizada de la enzima.

$$f_D = \frac{(\theta_{obs} - (m_N x_N + b_N))}{((m_D x_D + b_D) - (m_N x_N + b_N))} \quad (A1.6)$$

Un punto característico de la transición  $N$  a  $D$  al ir calentando la solución de proteína es cuando la mitad de la proteína ha sido desnaturalizada. A la temperatura en que ocurre esta condición ( $f_D = f_N = 0.5$ ) se le conoce como temperatura media  $T_m$ .

Entonces al graficar la fracción desnaturalizada contra la temperatura tenemos como resultado algo similar a la Figura A2, de donde podemos obtener la  $T_m$  localizando la  $T$  a la cual  $f_D$  es igual a 0.5.



**Figura A2.** Perfil térmico expresado en fracción desnaturalizada,  $f_D$ , donde el círculo indica 0.5, que es el punto donde coexisten equitativamente en sus estados de la proteína nativa y desnaturalizada.

## A2. Modelo de Lumry-Eyring

La desnaturalización térmica de una proteína puede ser un proceso irreversible. Este proceso de desplegamiento de la enzima se puede llevar por diferentes rutas las cuales pueden llevar a la formación de agregados. Uno de los modelos más sencillos que pueden explicar este proceso de irreversibilidad es el modelo Lumry-Eyring, el cual es descrito por sus constantes de velocidad de las etapas que lo forman, este modelo se describe continuación:



donde,  $N$  es el estado Nativo de la enzima,  $D$  el estado desplegado,  $I$  el estado irreversible y sus constantes de velocidad  $k_{N \rightarrow D}$ ,  $k_{D \rightarrow N}$  y  $k_{D \rightarrow I}$  para cada etapa del modelo.

Las ecuaciones de velocidad, se expresan de la siguiente manera, donde se involucran las concentraciones de cada una de las especies en un tiempo,  $t$ , tomando la siguiente forma:

$$\frac{d[N]}{dt} = -k_{N \rightarrow D}[N] + k_{D \rightarrow N}[D] \quad (\text{A2.2})$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k_{N \rightarrow D}[N] - k_{D \rightarrow N}[D] - k_{D \rightarrow I}[D] \quad (\text{A2.3})$$

$$\frac{d[I]}{dt} = k_{D \rightarrow I}[D] \quad (\text{A2.4})$$

Las expresiones tienen que ser escritas en términos de la velocidad de calentamiento, para lo que tenemos la siguiente expresión:

$$\frac{dt}{dT} = \frac{1}{\nu} \quad (\text{A2.5})$$

Entonces las expresiones A2.2, 3 y 4, en términos de la velocidad de calentamiento, toman la siguiente forma:

$$\frac{d[N]}{dT} = \frac{1}{\nu} (-k_{N \rightarrow D}[N] + k_{D \rightarrow N}[D]) \quad (\text{A2.6})$$

$$\frac{d[D]}{dT} = \frac{1}{\nu} (k_{N \rightarrow D}[N] - k_{D \rightarrow N}[D] - k_{D \rightarrow I}[D]) \quad (\text{A2.7})$$

$$\frac{d[I]}{dT} = \frac{1}{\nu} (k_{D \rightarrow I}[D]) \quad (\text{A2.8})$$

Si asumimos la aproximación de estado estacionario para la especie  $D$ , con lo que la ecuación A2.7 la igualamos a cero:

$$\frac{d[D]}{dT} = 0 \quad (\text{A2.9})$$

Despejando y factorizando la especie  $D$ , la expresión es la siguiente:

$$\frac{1}{\nu} k_{N \rightarrow D}[N] = \frac{1}{\nu} (k_{D \rightarrow N} + k_{D \rightarrow I})[D] \quad (\text{A2.10})$$

Dejando en términos de la especie desnaturalizada  $D$  y  $N$ ,

$$[D] = \left( \frac{k_{N \rightarrow D}}{(k_{D \rightarrow N} + k_{D \rightarrow I})} \right) [N] \quad (\text{A2.11})$$

Entonces la ecuación A2.12, se sustituye en la ecuación A2.8,

$$\frac{d[I]}{dT} = \frac{1}{\nu} \left( \frac{k_{N \rightarrow D} k_{D \rightarrow I}}{k_{D \rightarrow N} + k_{D \rightarrow I}} \right) [N] \quad (\text{A2.12})$$

Si tomamos el cociente de las constantes y se expresan en una constante que se llame  $k_{d,app}$ , que da la ecuación:

$$k_{d,app} = \frac{k_{N \rightarrow D}}{k_{D \rightarrow N} + k_{D \rightarrow I}} k_{D \rightarrow I} \quad (A2.13)$$

Sustituyendo la ecuación A2.11 en la ecuación elemental A2.2 y desarrollando, esta da como resultado la ecuación A2.14:

$$\frac{d[N]}{dt} = -k_{D \rightarrow N} [N] + k_{D \rightarrow N} \left( \frac{k_{N \rightarrow D}}{k_{D \rightarrow N} + k_{D \rightarrow I}} \right) [N]$$

$$\frac{d[N]}{dt} = [N] \left( \left( \frac{k_{D \rightarrow N} k_{N \rightarrow D}}{k_{D \rightarrow N} + k_{D \rightarrow I}} \right) - k_{N \rightarrow D} \right)$$

Entonces la ecuación elemental A2.1 que da expresada en términos de las concentración de la enzima nativa y las constantes de velocidad que rigen el mecanismo que dando la Ec. A2.14.

$$- \frac{d[N]}{dt} = [N] \left( \left( \frac{k_{D \rightarrow I} k_{N \rightarrow D}}{k_{D \rightarrow N} + k_{D \rightarrow I}} \right) \right) \quad (A2.14)$$



"Evaluación Físicoquímica de Mutantes Termorresistentes de la  $\beta$ -glucosidasa B de *Paenibacillus polymyxa*"

En México, D.F., se presentaron a las 16:00 horas del día 25 del mes de noviembre del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ANDRÉS HERNÁNDEZ ARANA
- DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
- DR. EDGAR VAZQUEZ CONTRERAS
- DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO
- DRA. DOLORES SILVIA SOLÍS MENDIOLA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS (QUÍMICA)

DE: MENANDRO CAMARILLO CADENA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

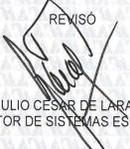
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



*Menandro Camarillo Cadena*

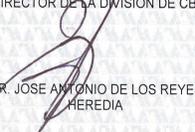
MENANDRO CAMARILLO CADENA  
ALUMNO

REVISÓ



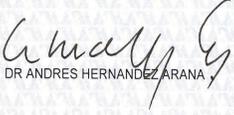
LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI



DR. JOSÉ ANTONIO DE LOS REYES  
HEREDIA

PRESIDENTE



DR. ANDRÉS HERNÁNDEZ ARANA

VOCAL

*CANCELADO*

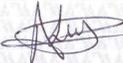
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE  
LOS MONTEROS

VOCAL



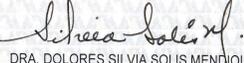
DR. EDGAR VAZQUEZ CONTRERAS

VOCAL



DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO

SECRETARIA



DRA. DOLORES SILVIA SOLÍS MENDIOLA