

DISEÑO MOLECULAR DE SUBTILISINAS CON NUEVAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS MEDIANTE ENFOQUES DE MUTAGÉNESIS RACIONAL Y EVOLUCIÓN DIRIGIDA

Eliel R. Romero-García, Joel A. Esquivel-Naranjo, Jesús García-Soto, Mario Pedraza-Reyes
Instituto de Investigación en Biología Experimental de la Facultad de Química, Universidad de Guanajuato,
Apdo. Postal 187, Guanajuato, Gto. CP. 36000, México. Fax (473) 2-00-06 ext. 8153
Correo electrónico: mariopr@utdallas.edu

Palabras Clave: *subtilisina*, *evolución dirigida*

Introducción. El estudio de las proteasas ha permitido un avance substancial en el entendimiento de las bases moleculares que rigen la relación estructura-función de las enzimas (1,2). *Bacillus subtilis* es un microorganismo ampliamente utilizado en diferentes aspectos biotecnológicos por su capacidad para producir una gran diversidad de compuestos con actividades diversas como proteasas, insecticidas, antibióticos, entre otros. La subtilisina E es una proteasa de serina codificada por el gen *aprE* de *B. subtilis* 168 (3). En nuestro laboratorio, para mejorar su eficiencia catalítica (K_{cat}), obtuvimos por mutagénesis aleatoria *in vivo* del gen *aprE* una enzima mutante con una K_m dos veces superior a la de la enzima silvestre. La secuenciación del gen *aprE* variante reveló una doble mutación que resultó en una sola sustitución, v.g. Ser85A, localizada en el extremo –COOH del asa que conecta una hoja β con un hélice α , la cual contiene el residuo catalítico His64 (4). Se han reportado otras mutaciones puntuales en esta región, las cuales generan enzimas con propiedades bioquímicas de interés para su aplicación a nivel industrial. El propósito de este estudio es establecer la función del residuo 85, de la tríada 83GVS85 y la región conformada por los aminoácidos T71-A82 del gen *aprE* silvestre. La purificación y caracterización bioquímica de la (s) enzima (s) mutantes contribuirá en abundar en el conocimiento de la relación estructura-función de la subtilisina E.

Metodología. Un fragmento de 1.2 Kpb del gen *aprE* de la cepa *B. subtilis* 168 se clono en el plásmido pALTER[®] (pPERM236) que contiene el gen *TEM-1* el cual genera una β -lactamasa inactiva. Se diseñaron oligonucleótidos para llevar a cabo una mutagénesis saturante del residuo Ser85, eliminar la secuencia 83GVS85, o el asa que conecta los dos elementos de estructura secundaria, v.g., la hoja β con la hélice α . La mutagénesis se efectuó de acuerdo al protocolo del sistema Altered Sites[®] II (Promega). Los genes con las mutaciones de interés se subclonaron en el vector de replicación autónoma pDG148, bajo el control del promotor fuerte Pspac, o se introdujeron por transformación en una sola copia en el locus *amyE* de la cepa *B. subtilis* IA751 (deficiente en la secreción de proteasas), utilizando el vector de integración pDG364. Las variantes hiperactivas se seleccionan directamente en placas que contienen sustratos

para medir actividad de proteasa utilizando como control la actividad secretada por una cepa que expresa al gen *aprE* silvestre.

Resultados y Discusión. Siguiendo el protocolo señalado, se obtuvieron mutantes de la subtilisina E de *B. subtilis* 168 en el codón 85 de la secuencia GVA, así como aquellos que carecen del asa conformada por los residuos T71-A82. Como se mencionó, los resultados de nuestro laboratorio demostraron que la simple sustitución del residuo Ser85 por Ala produce un efecto dramático sobre la eficiencia catalítica de la subtilisina E, la genoteca de mutantes obtenidos en este trabajo permitirán demostrar cual es el efecto que tienen cada uno de los diferentes aminoácidos sobre la eficiencia catalítica de esta enzima. Por otro lado, se han aislado algunos genes de subtilisinas cuyo producto predicho carecen del asa T71-A82, sin embargo se desconoce cual es el efecto que tiene esta ausencia sobre la actividad enzimática de dichas subtilisinas, los mutantes obtenidos en este trabajo, permitirán contestar esta pregunta.

Conclusión. Se cuenta con una genoteca de mutantes *aprE* tanto en el codón 85 como en el asa T21-A82 los cuales se expresaran en *B. subtilis* con el propósito de obtener sus productos y entender al papel bioquímico que juegan dichos residuos en la actividad enzimática de la subtilisina E.

Agradecimientos. Este trabajo es financiado por el CONACyT y la Universidad de Guanajuato. A LA MEMORIA DEL M. en C. Joel A. Esquivel Naranjo.

Bibliografía.

1. Kuchner, O. & Arnold F. (1997) Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol.* 15, 523-530.
2. Zhao, H. & Arnold, F.H. (1999) Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Prot. Eng.* 12 (1): 47-53.
3. Takagi, H., Morinaga, Y., Ikemura, H. & Masayori, I. (1988) Mutant Subtilisin E with Enhanced Protease Activity Obtained by Site-directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 36, 19592-19596.
4. Esquivel-Naranjo y col. (Manuscrito en preparación).