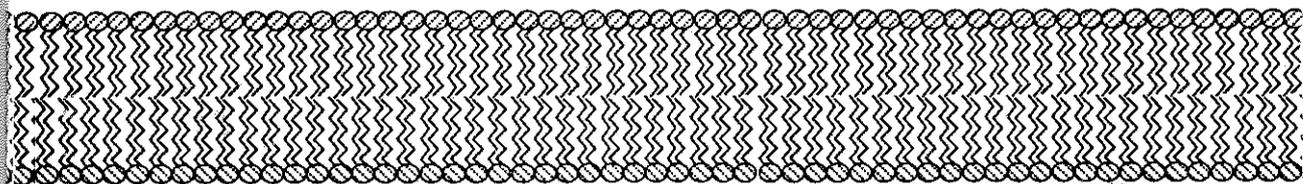


Caracterización y activación de enzimas lipolíticas en medios no acuosos.

ISMAEL MINGARRO I MUÑOZ



Caracterización y activación de enzimas lipolíticas en medios no acuosos

Memoria presentada por:
Ismael Mingarro i Muñoz
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Directores:
Dr. Lorenzo Braco Soler
Dra. Concepción Abad Mazario



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Facultat de Ciències Biològiques

Setembre 1994

..., una bona teoria es caracteritza per fer un gran nombre de prediccions
que en principi, podrien ser refutades o falsejades per l'observació.
Cada vegada que s'observa que nous experiments concorden amb les seves prediccions,
la teoria sobreviu, però si es troba tan sols una nova observació que en discrepi,
cal abandonar o modificar la teoria. Com a mínim, això és el que se suposa que ha de passar,
però sempre podeu posar en dubte la competència de la persona que dugué a terme l'observació.

Karl Popper

Índice

Abreviaturas	xi
1. Introducción	1
1.1. ENZIMOLOGÍA EN MEDIOS ORGÁNICOS	1
1.1.1. Aspectos fundamentales y fenomenológicos	1
1.1.2. Aproximación histórica	2
1.1.3. Consideraciones cinéticas y termodinámicas	3
1.1.3.1. Papel del agua	3
1.1.3.2. "Jaula" conformacional	4
1.1.3.3. Alteración de parámetros cinéticos	5
1.2. ENZIMAS ESTUDIADAS	6
1.2.1. Fosfolipasa A2 (PLA2)	6
1.2.2. Lipasas	9
1.3. ENZIMAS LIPOLÍTICAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS	10
1.3.1. ¿Por qué estudiar la actividad PLA2 en medios orgánicos?	10
1.3.2. Lipasas en medios orgánicos	11
1.4. ACTIVACIÓN DE ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS	11
1.4.1. Activación de enzimas lipolíticas por impresión molecular	14
1.4.1.1. Razones estructurales para la activación de PLA2	14
1.4.1.2. Razones estructurales para la activación de lipasas	16
1.5. OBJETIVOS	19

2. Materiales y métodos	21
2.1. MATERIALES	21
2.2. EXPERIENCIAS CON PLA2	22
2.2.1. Optimización de PLA2 en forma particulada	22
2.2.2. Ensayo de PLA2 en disolventes orgánicos	22
2.2.3. Inactivación térmica	23
2.2.4. Ensayo de hidrólisis de PLA2 en medio acuoso	23
2.3. EXPERIENCIAS CON LIPASAS	24
2.3.1. Optimización de lipasas en forma particulada	24
2.3.2. Ensayo de lipasas en medios orgánicos	24
2.4. ACTIVACIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS POR IMPRESIÓN MOLECULAR	25
2.4.1. PLA2	25
2.4.2. Lipasas	26
2.5. DETERMINACIONES CROMATOGRÁFICAS	26
2.5.1. Análisis por cromatografía en capa fina	26
2.5.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	27
2.6. DETERMINACIONES ELECTROFORÉTICAS	28
2.7. DETERMINACIONES ESPECTROSCÓPICAS	29
3. Resultados y discusión	31
3.1. ACTIVIDAD HIDROLÍTICA (DESACILANTE) DE PLA2 EN MEDIOS ORGÁNICOS MONOFÁSICOS	31
3.1.1. Efecto de la concentración de Ca^{2+}	33
3.1.2. Efecto de la concentración de sustrato	34
3.1.3. Efecto de la concentración de producto	40
3.1.4. Termoestabilidad	41
3.1.5. Especificidad de sustrato	42
3.1.6. Reutilización e inmovilización de la enzima	45
3.2. ACTIVIDAD SINTÉTICA (ACILANTE) DE PLA2 EN MEDIOS ORGÁNICOS MONOFÁSICOS	46
3.2.1. Efecto de la concentración de LPC	46

3.2.2. Efecto de la concentración de ácido graso	48
3.2.3. Efecto de la temperatura	49
3.2.4. Efecto de los disolventes orgánicos	50
3.2.5. Efecto de la longitud de cadena y del grado de insaturación del ácido graso	51
3.3. ACTIVACIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS POR IMPRESIÓN MOLECULAR	53
3.3.1. Activación de PLA2	53
3.3.1.1. Efecto de la concentración de anfífilo	55
3.3.1.2. Optimización de la molécula impresora y de la calidad interfacial	57
3.3.2. Activación de lipasas	59
3.3.3. ¿Activación interfacial o lioprotección enzimática?	63
3.3.4. Inducción de actividad fosfolipasa en lipasas	65
3.3.5. ¿En qué se basa la activación por impresión molecular de enzimas lipolíticas?	67
4. Conclusiones	71
5. Bibliografía	73

Abreviaturas

AOT, bis-2-etilhexil sulfocinato sódico (Aerosol OT)
CD, dicroísmo circular
cmc, concentración micelar crítica
CL, cardiolipina
CrL, lipasa de *Candida rugosa*
DMPC, dimiristoilfosfatidilcolina
DPH, 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPC, dipalmitoilfosfatidilcolina
DOPC, dioleoilfosfatidilcolina
DSPC, diestearoilfosfatidilcolina
DTAB, bromuro de dodeciltrimetilamonio
FA, factor de activación
FTIR, espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier
GcL, lipasa de *Geotricum candidum*
gpL, lipasa de cobaya (guinea pig)
HPLC, cromatografía líquida de alta eficacia
IMAI, impresión molecular basada en activación interfacial
 λ_{em} , longitud de onda de emisión
 λ_{ex} , longitud de onda de excitación
LPC, lisofosfatidilcolina
n-OG, *n*-octil- β -D-glucopiranosido
PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida
PC, fosfatidilcolina
PE, fosfatidiletanolamina
PG, fosfatidilglicerol
PI, fosfatidil inositol
PLA2, fosfolipasa A₂
ppL, lipasa de páncreas porcino
ppPLA2, fosfolipasa A₂ de páncreas porcino
PS, fosfatidilserina
RdL, lipasa de *Rhizopus delemar*
RmL, lipasa de *Rhizomucor miehei*
RMN, resonancia magnética nuclear
SDS, dodecil sulfato sodico

SUV, vesículas unilamelares pequeñas
TLC, cromatografía en capa fina
Tris, 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
TX-100, Triton X-100
UV, ultravioleta
v/v, relación volumen/volumen

1. Introducción

1.1. ENZIMOLOGÍA EN MEDIOS ORGÁNICOS

1.1.1. Aspectos fundamentales y fenomenológicos

Pese al enigma que encierran los orígenes de la evolución biológica (de ahí el plural), si en algo hay un consenso es en el hecho de que la evolución ha tenido lugar en un ambiente en que el agua es el componente principal. Así pues, dado que el agua juega un papel central en multitud de procesos metabólicos, no es de extrañar que convencionalmente casi todos los estudios en enzimología se hayan realizado en soluciones acuosas. Sin embargo, existen muchos procesos enzimáticos en la célula que no tienen lugar en un entorno totalmente acuoso, y que por tanto tales ambientes no tienen porque ser los más adecuados. Así, muchas enzimas o complejos multienzimáticos, incluyendo lipasas, esterasas, deshidrogenasas, fosfolipasas y citocromos, funcionan en ambientes "naturales" relativamente hidrofóbicos, generalmente en presencia de membranas o inmovilizadas en ellas (Dordick, 1991a), en las que la actividad del agua es significativamente menor que la unidad. Además, desde el punto de vista biotecnológico existen numerosas ventajas para realizar las conversiones enzimáticas en medios orgánicos en lugar de acuosos. Algunas de estas potenciales ventajas (Dordick, 1991b) se podrían resumir en:

- incrementar la solubilidad de sustratos apolares (bastante comunes desde el punto de vista industrial);
- dirigir el equilibrio termodinámico de las reacciones favoreciendo las síntesis a las hidrólisis;
- suprimir posibles reacciones colaterales dependientes de agua;
- controlar la especificidad de sustrato, la regioespecificidad y la enantioselectividad;
- facilitar la recuperación de los productos de reacción, algo a menudo caro y difícil debido al elevado punto de ebullición del agua;

- potenciar la termoestabilidad enzimática;
- la insolubilidad de las enzimas en disolventes orgánicos, permite su recuperación y reutilización sin necesidad de inmobilizaciones a menudo tediosas.

1.1.2. Aproximación histórica

Los primeros intentos por confinar las enzimas en medios distintos al agua se remontan a principios de siglo. Inicialmente se adicionaron disolventes orgánicos miscibles (cosolventes) a las disoluciones acuosas de enzimas. En tanto que se mantenían grandes proporciones de agua las enzimas seguían siendo catalíticamente activas, aunque por lo general mucho menos que en agua. El siguiente paso en la aproximación a la enzimología en medio orgánico fue el uso de mezclas bifásicas: una solución acuosa de enzima es emulsificada con un disolvente inmiscible en el que se hallan los sustratos que así podrán difundir hasta la fase acuosa, permitiendo la conversión enzimática y la posterior difusión de los productos hacia la fase orgánica. Con objeto de facilitar la transferencia de masa, el volumen de agua en estos sistemas bifásicos se redujo, con la ayuda de detergentes, hasta llegar a formar microemulsiones agua-en-aceite, comúnmente conocidas como micelas reversas (Martinek *et al.*, 1986; Luisi *et al.*, 1988 y Garza-Ramos *et al.*, 1992). El siguiente paso fue el uso de suspensiones de enzimas sólidas en disolventes predominantemente no acuosos o incluso el empleo de disolventes orgánicos anhidros como medios de reacción para las catálisis enzimáticas (Klibanov, 1986): tales disolventes, en los que se suspende la enzima en forma particulada, se conocen comúnmente como medios orgánicos monofásicos (Dordick, 1991b).

De las modalidades anteriores no resulta sorprendente que las enzimas permanezcan activas en las tres primeras situaciones descritas. En estas aproximaciones las moléculas de enzima están localizadas esencialmente en microentornos acuosos, y por tanto, las propiedades de las enzimas no deben diferir mucho de las que exhiben en agua, ya que la catálisis en estos sistemas se realiza por un enzima completamente "disuelta".

Por otro lado, sí que resultó más asombroso que las enzimas funcionasen como biocatalizadores al suspenderlas en disolventes orgánicos conteniendo una muy pequeña o despreciable cantidad de agua, en las que la enzima es, de hecho, insoluble y la superficie de la proteína es realmente accesible al disolvente. Aunque a mediados de los años sesenta Price y colaboradores demostraron inequívocamente que la α -quimotripsina cristalizada (Dastoli *et al.*, 1966) y la xantina oxidasa liofilizada (Dastoli & Price, 1967a y b) se mostraban activas suspendidas en varios disolventes orgánicos, sorprendentemente, la investigación en esta rama de la enzimología en medio orgánico ha sufrido un periodo de latencia de casi dos décadas hasta consolidarse firmemente en la actualidad.

1.1.3. Consideraciones cinéticas y termodinámicas

1.1.3.1. Papel del agua

Desde antaño, se ha admitido que las interacciones agua-proteína juegan un papel crucial en el plegamiento, estabilidad, y función biológica de las proteínas. Sin embargo, la propia presencia de agua es al mismo tiempo y en último término responsable de la mayoría de procesos (covalentes o no) implicados en la desnaturalización, según se ha demostrado recientemente (Klibanov & Ahern, 1987). Así, la Figura 1.1 resume los principales mecanismos que pueden conducir a la inactivación de una enzima en medio acuoso (Klibanov & Ahern, 1987):

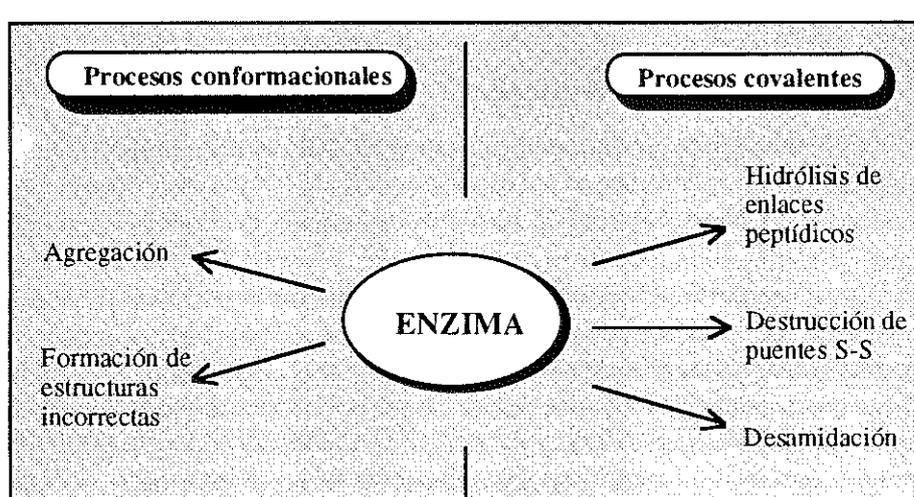


Figura 1.1. Mecanismos generales de inactivación enzimática irreversible.

Por una parte, la posibilidad ofrecida a la proteína por el medio acuoso de "respirar" desde un punto de vista conformacional, permite eventualmente, (y en especial al elevar la temperatura) la formación de estructuras incorrectas y de agregación. Por otra, el agua tiene también un papel directo como reactivo en diversos procesos covalentes de inactivación. Puede entenderse por todo ello, que en un medio con bajo contenido en agua la estabilidad de la enzima pueda verse exaltada.

Ahora bien, aunque de hecho las enzimas requieren para la catálisis un nivel determinado de hidratación (Gupta, 1992), ya que su total eliminación podría inactivarlas, la cuestión es en realidad cuánta agua es imprescindible. Lógicamente, la molécula de enzima no puede "ver" más que unas pocas capas de agua a su alrededor. Por

tanto, si esta agua "esencial" no es eliminada de la superficie de la enzima, se podría reemplazar el resto del agua del medio de reacción por un disolvente orgánico sin un efecto desfavorable sobre la enzima (Klibanov, 1989). Esta situación sería equivalente a una enzima funcionando en medios orgánicos casi anhidros, dado que la cantidad de agua contenida en esta monocapa es ínfima. Este razonamiento, aunque simplificado, es consistente con los datos existentes de hidratación de proteínas anhidras (Rupley *et al.*, 1983).

En los últimos años, además de esfuerzos encaminados hacia los aspectos fundamentales de la enzimología en medios orgánicos monofásicos (ver por ejemplo, Zaks & Klibanov, 1988a; Affleck *et al.*, 1992; Burke *et al.*, 1992; Gorman & Dordick, 1992 y Ryu & Dordick, 1992), se han desarrollado una gran variedad de aplicaciones basadas en esta estrategia (revisadas en Dordick, 1991a y b; Blinkovsky *et al.*, 1992).

1.1.3.2. "Jaula" conformacional

Dado que la idea de que las enzimas necesitan disoluciones acuosas para funcionar es uno de los dogmas centrales de la bioquímica, el hecho de que éstas funcionen en ausencia casi absoluta de agua suscita la inquietante pregunta de cómo es esto posible. En principio, se podría recurrir básicamente a dos explicaciones para la catálisis enzimática en medio orgánico. La primera es que las conformaciones de las enzimas en medios orgánicos sean sustancialmente diferentes a las adquiridas en agua, y que aún así la enzima siga siendo catalíticamente activa. La alternativa es que la conformación de las enzimas (en particular la conformación del centro activo) en medios orgánicos sea esencialmente la misma que en agua y por tanto, mantenga intacta su actividad catalítica. La primera explicación, además de ser poco compatible con el pensamiento convencional de la relación estructura-función de las proteínas (Anfinsen & Scheraga, 1975), está en contradicción con algunos datos experimentales tanto de RMN de estado sólido (Burke *et al.*, 1989 y 1992) como de cristalografía de rayos-X (Fitzpatrick *et al.*, 1993 y 1994), que más bien avalan la segunda explicación.

Esta conformación semejante en ambos medios puede ser debida a razones termodinámicas (que la enzima no "quiera" desplegarse en el disolvente orgánico) o a razones cinéticas (que la enzima sea "incapaz" de desplegarse debido a que existan importantes barreras cinéticas que dificulten este desplegamiento). La explicación termodinámica es fácilmente descartable puesto que es poco probable que el balance delicado de todas las interacciones no covalentes que participan manteniendo la conformación nativa de la proteína como la favorecida termodinámicamente (Schulz & Schirmer, 1979) sean las mismas en disolventes tan dispares como por ejemplo el agua, el octano y el tetrahidrofurano (así por ejemplo, en los dos últimos las interacciones hidrofóbicas no existirán mientras que las interacciones electrostáticas y los puentes de

hidrógeno estarán más potenciados que en agua). Por tanto, la explicación más plausible es que la enzima sea catalíticamente activa en disolvente orgánico porque no pueda cambiar radicalmente su conformación nativa en la transición desde el agua hasta los disolventes no acuosos debido a grandes barreras cinéticas, es decir, que la enzima queda cinéticamente "atrapada" en una conformación semejante a la nativa, habiéndose encontrado recientemente significativas diferencias de flexibilidad entre proteínas en medios acuosos y en medios orgánicos (Hartsough & Merz, 1993).

1.1.3.3. Alteración de parámetros cinéticos

Por lo que respecta al tipo de cinéticas que describen la catálisis enzimática en estos medios, como se ha podido comprobar con distintas enzimas, tanto lipasas (Zaks & Klivanov, 1985) como proteasas (Zaks & Klivanov, 1988a), en disolventes orgánicos las enzimas también muestran cinéticas de Michaelis-Menten. Los cambios más obvios que se producen en el entorno de una enzima por situarla en un disolvente orgánico son un incremento de la hidrofobicidad, una disminución de la constante dieléctrica y la lógica disminución del contenido en agua del medio. Estos tres cambios pueden afectar a la catálisis enzimática, tanto desde el punto de vista de la especificidad de sustrato (Fitzpatrick & Klivanov, 1991; Wescott & Klivanov, 1993) como de la eficiencia catalítica (Dordick, 1991b; Blinkovsky *et al.*, 1992), inicialmente dependiente de la capacidad de la enzima para utilizar la energía libre de unión a los sustratos. Estas energías de unión reflejan las diferencias entre las energías de unión de las interacciones enzima-sustrato y disolvente-sustrato (Fersht, 1985).

Los parámetros cinéticos que describen la función enzimática, tales como la constante de unión al sustrato, K_s , la constante de Michaelis, K_m , y el número de recambio, k_{cat} o la velocidad máxima de la reacción V_{max} , dependerán considerablemente del medio de reacción. Debe esperarse, pues, que la sustitución del agua por un disolvente orgánico pueda conducir a profundos cambios en las cinéticas observadas, tanto por alteración de la especificidad de sustrato en el disolvente orgánico, como por la rigidez que muestra la enzima en estos medios. De hecho, se ha demostrado que éste es el caso (Zaks & Klivanov, 1986) con enzimas como quimotripsina, subtilisina y carboxilesterasa, que presentan un centro activo de carácter hidrofóbico. Así, en disolución acuosa, los derivados de aminoácidos apolares (por ejemplo ésteres de fenilalanina y tirosina) tienen favorecido el reparto desde el medio de reacción hacia el centro activo de la enzima, lo que causa un incremento en la eficiencia catalítica de la enzima con respecto a los derivados de aminoácidos más polares (como por ejemplo serina). Por el contrario, en octano la situación llega a invertirse y el reparto se favorece para los derivados de aminoácidos polares. A modo de ejemplo, mientras N-Ac-L-Phe-OMe es hasta cuatro órdenes de magnitud más reactivo que N-Ac-L-Ser-OMe en una

reacción hidrolítica en medio acuoso, el derivado de Ser es casi veinte veces más reactivo que el de Phe en una reacción modelo de transesterificación en octano.

1.2. ENZIMAS ESTUDIADAS

1.2.1. Fosfolipasas A₂ (PLA₂)

En este contexto, lipasas (y proteasas) se han convertido en las enzimas más utilizadas tanto en estudios básicos como aplicados en medios no acuosos, lo que paradójicamente contrasta con los pobres conocimientos que se tienen de las fosfolipasas, particularmente en medios orgánicos monofásicos. De hecho, la mayoría de estos estudios se ha realizado con fosfolipasas D de distintas fuentes en medios bifásicos o en micelas reversas, y se han orientado principalmente a la síntesis o conversión de fosfolípidos (Juneja *et al.*, 1989; Testet-Lamant *et al.*, 1992).

Esta falta de información es aún más notoria en el caso de las fosfolipasas A₂ (PLA₂) (fosfatidilcolina 2-acilhidrolasas, EC 3.1.1.4). Las PLA₂s fueron las primeras fosfolipasas identificadas; ya en 1877 Bokay observó que existía un componente en el jugo pancreático capaz de degradar fosfatidilcolina, este componente es lo que ahora conocemos como fosfolipasa A₂ pancreática.

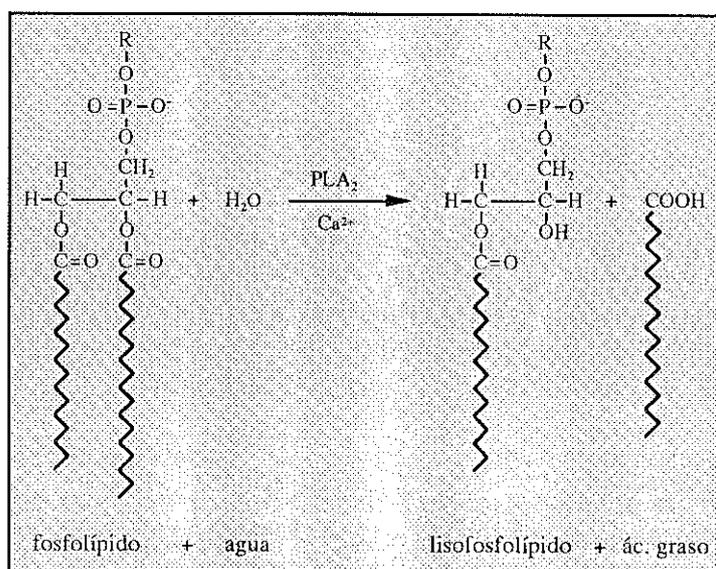


Figura 1.2. Mecanismo de catálisis de la PLA₂, que implica el consumo de agua para la hidrólisis del enlace éster situado en la posición 2-*sn* de un fosfolípido de membrana. R representa la cabeza polar del fosfolípido.

Las PLA2s son una familia de enzimas dependientes de Ca^{2+} , altamente conservadas, que catalizan la hidrólisis estereoespecífica del enlace 2-*sn*-éster de acilo de los 3-*sn*-fosfoglicéridos (Figura 1.2) y están implicadas en un gran número de procesos metabólicos y reguladores fisiológicamente relevantes (Waite, 1987; Jain & Berg, 1989; Glaser *et al.*, 1993; Exton, 1994).

El mecanismo general de catálisis de la PLA2 se ha estudiado con detalle y consiste en un sistema de desplazamiento de protón que emplea una molécula de agua como nucleófilo para atacar el enlace éster antes mencionado (Verheij *et al.*, 1981). Contrariamente a lo que ocurre usualmente en el caso de las esterasas, este mecanismo no implica la acción de una serina, sino que en este caso, un par Asp-His elimina un protón de una molécula de agua unida, generando un grupo hidroxilo que actuará como nucleófilo (Figura 1.3). El ión Ca^{2+} , parte esencial de este mecanismo de catálisis propuesto, interacciona con los grupos fosfato y carbonilo del éster permitiendo la hidrólisis al mismo tiempo que el ácido graso formado se une al carboxilo de otro Asp hasta que difunde del centro activo. Durante la catálisis todos estos componentes se encuentran ocultos en el interior de la enzima donde quedan exentos de formar puentes de hidrógeno con el disolvente (Scott *et al.*, 1990).

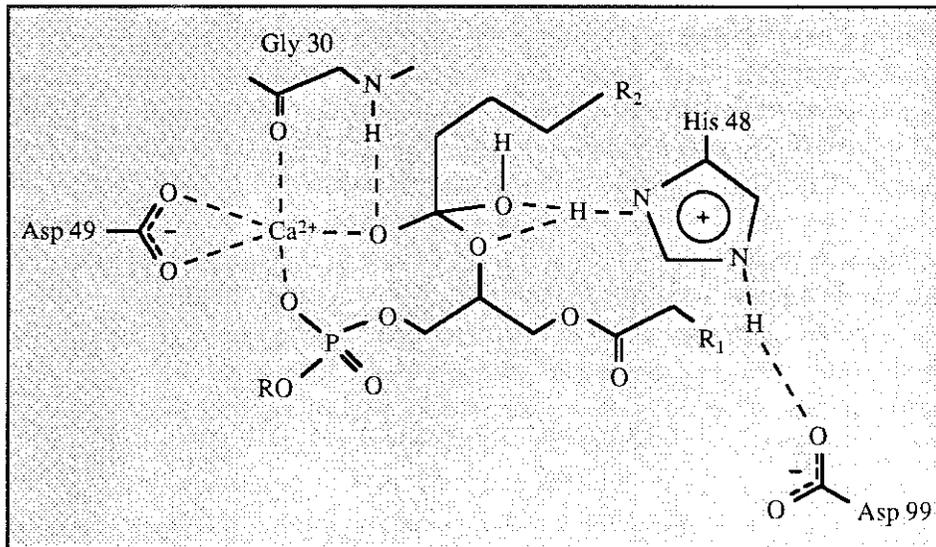


Figura 1.3. Complejo catalítico del estado de transición de una PLA2 de secreción (de veneno de *Naja naja*) propuesto en base a los estudios de cristalografía de rayos-X de la enzima unida a un inhibidor. El ión Ca^{2+} es una parte esencial del mecanismo de catálisis. R representa la cabeza polar de los fosfolípidos, y R_1 y R_2 sus ácidos grasos.

En particular las PLA2s extracelulares o de secreción son (a diferencia de de las intracelulares) proteínas relativamente pequeñas (*ca.* 14 kDa), altamente estables debido al gran número de puentes disulfuro que presenta su estructura, y que en el caso de las enzimas pancreáticas se sintetizan como zimógenos que son activados por eliminación trípica de un heptapéptido. Ambos, tanto el zimógeno como la enzima procesada pueden hidrolizar fosfolípidos monoméricos, ahora bien, la eliminación del heptapéptido indicado expone los sitios de unión hidrofóbicos necesarios para permitir la interacción de la enzima con agregados lipídicos (monocapas, bicapas o micelas).

Existen claras evidencias para diferenciar el centro catalítico de la enzima del sitio de unión a lípidos, así se ha demostrado por modificación química de la enzima procesada que el bloqueo de la His catalítica no evita la unión a los sustratos. En este sentido, la presencia de sitios de unión y catalíticos distintos podría justificar el que tanto el zimógeno como la enzima procesada tengan actividad sobre los monómeros mientras que sólo esta última pueda unirse a y actuar sobre interfases. La conversión de zimógeno en enzima procesada originará, pues, un cambio conformacional que no sólo consiste en exponer residuos más hidrofóbicos sino que debe alinear el centro activo con la interfase. Con ello la actividad hacia fosfolípidos organizados (micelas, monocapas o bicapas) se ve potenciada considerablemente, lo que en parte puede justificarse por el gran incremento (unas mil veces) de concentración de sustrato efectivo que se origina en las interfases. Este fenómeno es comúnmente conocido como **activación interfacial** (Sarda & Desnuelle, 1958) y desde hace tiempo se han canalizado muchos esfuerzos hacia la comprensión de las bases moleculares de este efecto (Verheij *et al.*, 1981; Jain & Berg, 1989). Una posibilidad es que la enzima presente distintas conformaciones en presencia de fosfolípidos agregados o en su ausencia: modelo del cambio conformacional (Peters *et al.*, 1992). Y otra posibilidad distinta, aunque no excluyente, es que la orientación restringida de los fosfolípidos cuando se hallan organizados en agregados lipídicos sea más favorable para la hidrólisis: modelo del sustrato (Barlow *et al.*, 1988).

Esta activación que muestra la PLA2 en presencia de agregados de fosfolípidos puede presentar un período de latencia fuertemente dependiente de la naturaleza fisicoquímica y del estado físico de los sustratos fosfolipídicos. Por decirlo de alguna forma, la "calidad" de la interfase se ha revelado como uno de los factores determinantes de la actividad fosfolipasa A₂ (Thuren *et al.*, 1987). Así, la enzima hidroliza instantáneamente los sustratos fosfolipídicos cuando se le presentan en forma de micelas mixtas (con detergentes) o como vesículas pequeñas unilamelares (SUV). En el caso concreto de vesículas grandes unilamelares o multilamelares, que poseen un radio de curvatura grande, aparece una fase de latencia de duración variable (dependiendo entre otros factores del grado de empaquetamiento de los sustratos en la interfase), seguida de un brusco incremento en la actividad enzimática. Además, se ha deducido la secuencia temporal de sucesos para la PLA2 de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* a partir de

cambios en la fluorescencia de la enzima, de la velocidad de hidrólisis de los sustratos y de los espectros de emisión de sondas fluorescentes de las estructuras lipídicas (Bell & Biltonen, 1989). Se ha sugerido que lo primero que tiene lugar es la unión de la enzima a la superficie lipídica seguida de una lenta hidrólisis hasta alcanzar una fracción molar crítica de productos de reacción (ácido graso y lisofosfolípido). En este momento, se produce un cambio relevante en la estructura del lípido que genera un cambio en la estructura de la proteína. Siendo estos seguidos estos sucesos por una rápida hidrólisis.

1.2.2. Lipasas

Del gran espectro de enzimas en los que se ha demostrado una actividad en medios orgánicos en los últimos años, destacan en gran medida las lipasas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3).

Las lipasas son enzimas, pertenecientes a la familia de las α/β hidrolasas (Ollis *et al.*, 1992), encargadas de descomponer triacilglicéridos en di- y mono-glicéridos, glicerol y ácidos grasos. Para ello, el enlace éster que une el ácido graso al glicerol es susceptible de hidrólisis por un ataque nucleofílico de una serina activada. Estas enzimas se encuentran abundantemente en la naturaleza y presentan una gran variedad de tamaños, especificidades y propiedades catalíticas. Característicamente son también inactivas o muy poco activas frente a sustratos monoméricos en medio acuoso. Sin embargo, la presencia de micelas lipídicas (sus sustratos naturales son insolubles en agua) que generan interfases lípido/agua las activa de una forma cinéticamente similar a la activación que presenta PLA2, aunque con una base estructural completamente diferente.

Así, en el caso de las lipasas las bases estructurales que determinan su mecanismo catalítico son: (i) Aunque aparentemente no relacionado con su secuencia, estas enzimas muestran un núcleo central formado por cinco hojas β paralelas. (ii) La serina catalítica es parte de una tríada equivalente a la que presentan las serín proteasas. (iii) Esta serina catalítica tiende a estar situada exactamente en el mismo sitio en la estructura de la hoja β central. (iv) El residuo de ácido carboxílico de la tríada catalítica es variable por lo que respecta a su posición, pudiendo ser ácido aspártico o ácido glutámico. (v) Finalmente, el centro activo de las lipasas está protegido del entorno exterior inmediato por lazos y/o hélices que a modo de solapas son desplazadas en el proceso de activación interfacial.

Por lo que respecta a la secuencia de aminoácidos de las lipasas la principal diferencia radica en su longitud ya que, por ejemplo la lipasa pancreática humana (HPL) contiene 449 aminoácidos mientras que la enzima fúngica de *Rhizomucor miehei* (RmL) contiene sólo 269 residuos. Esto hace que virtualmente no existan identidades o similitudes en esta familia, aparte de lo que concierne al entorno inmediato del centro catalítico, donde sí aparece el motivo común Gly-X-Ser-X-Gly, siendo X un residuo variable. También está conservado el inusual ángulo positivo (*ca.* 60°) de la serina

catalítica, la cual adopta una conformación generalmente propia de residuos de glicina, lo que se debe a que está situada en la unión entre una hoja β y una hélice α . Curiosamente, la secuencia consenso de este pentapéptido también se encuentra en las serín proteasas, con la única excepción de que la última glicina se reemplaza por alanina en algunos casos.

En contraste con esta diversidad por lo que respecta a la estructura primaria, cabe señalar que las lipasas poseen estructuras secundarias y terciarias mucho más conservadas, formadas por el anteriormente mencionado núcleo central y un lazo superficial (solapa) que restringe el acceso de los sustratos al centro activo (Dodson *et al.*, 1992).

1.3. ENZIMAS LIPOLÍTICAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

1.3.1. ¿Por qué estudiar la actividad PLA2 en medios orgánicos?

El estudio de las propiedades de PLA2 en medios no acuosos monofásicos parece interesante en base a las siguientes consideraciones. (i) Las PLA2s, al igual que otras fosfolipasas, son enzimas asociadas a interfases lípido/agua, y que funcionan por tanto en ambientes naturales relativamente hidrofóbicos, más que en entornos totalmente acuosos. Además, la naturaleza anfífilica y relativamente voluminosa de los sustratos fosfolipídicos incentivan su estudio en medios orgánicos. (ii) Por otro lado, nunca se ha intentado comprender las causas de la aparente reticencia de las PLA2s (al contrario de lo que ocurre con las lipasas) a catalizar reacciones de acilación, incluso en medios anhidros (Pernas *et al.*, 1990). Y (iii), dado que los sustratos naturales de PLA2 se hallan difícilmente presentes como monómeros en fase acuosa (Jain, 1988) -debido a que el efecto hidrofóbico en dichos anfífilos promueve la formación de agregados tales como vesículas, micelas o emulsiones- presentando una concentración micelar crítica (cmc) muy baja, típicamente inferior a 100 μ M, los estudios de actividad hidrolítica o de especificidad de la enzima hacia sustratos dispersos monomolecularmente se han tenido que realizar con fosfolípidos de cadena corta o con análogos de fosfolípidos (Verheij *et al.*, 1981; van Oort *et al.*, 1985a y b; Jain & Berg, 1989; Bhat *et al.*, 1993a). Desde este punto de vista, la aproximación de la enzimología no acuosa puede permitir investigar el comportamiento de PLA2 frente a los sustratos fosfolipídicos monodispersos incluso de cadena larga, conformacionalmente menos restringidos que en agua. Además, en los medios no acuosos debe de estar facilitada la difusión de los productos de reacción (hidrofóbicos) desde el centro catalítico de la enzima al exterior de modo similar a lo que ocurre cuando la enzima está unida a una interfase agregado lípido/agua, uno de los factores propuestos para explicar la activación interfacial de las PLA2s (Waite, 1985).

1.3.2. Lipasas en medios orgánicos

Aunque las lipasas de triglicéridos, al contrario que las fosfolipasas, han sido utilizadas con profusión -no en vano constituyen la cuarta parte del total de las biotransformaciones industriales (Faber & Franssen, 1993)- y su comportamiento en medios orgánicos investigado más a fondo, conviene simplemente resumir la justificación de su estudio en medios no acuosos: (i) Son, como las fosfolipasas, enzimas asociadas a interfases lípido/agua, y que por tanto también funcionan en ambientes relativamente hidrofóbicos. Además sus sustratos naturales los 3-*sn*-triacilglicéridos también son relativamente insolubles en agua lo que incentiva este estudio en medio orgánico. (ii) Para su utilización con fines sintéticos, donde el agua deja de ser sustrato de la reacción, es absolutamente necesario reducir la concentración de agua en el medio de reacción para lo que resulta muy conveniente su dispersión en disolventes orgánicos *cuasi*-anhidros. (iii) Las lipasas no requieren cofactor alguno en su catálisis lo que en principio es una ventaja en cuanto a la simplicidad del mecanismo catalítico.

1.4. ACTIVACIÓN DE ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

Aumentar la actividad enzimática en disolventes orgánicos monofásicos sigue siendo uno de los principales desafíos de la enzimología no acuosa. De entre las estrategias exploradas para la consecución de esta meta cabe destacar la optimización de la naturaleza del disolvente y del contenido de agua (Zaks & Klivanov, 1985, 1988a y b; Ryu & Dordick, 1992), la modificación química (Inada *et al.*, 1986), la inmovilización sobre soportes (Adlercreutz, 1991) y la ingeniería de proteínas (Arnold, 1993a y b).

Además de las ventajas inherentes expuestas con anterioridad, el hecho de que las enzimas sean insolubles en la mayoría de los disolventes orgánicos y formen suspensiones particuladas elimina la flexibilidad conformacional, lo cual las preserva de adquirir conformaciones en disolvente orgánico distintas a la acuosa, en otras palabras, en el polvo liofilizado de la enzima está "congelada" la conformación adquirida por la proteína en el tampón de liofilización. Este fenómeno de mantenimiento de la conformación no sólo concierne a la estructura secundaria y terciaria sino que también implica el mantenimiento, durante la liofilización y su posterior uso en disolvente orgánico, del estado de ionización que los grupos ionogénicos de las enzimas adquieren al pH de la disolución acuosa de la que se liofilizaron; este fenómeno se conoce como "memoria" de pH (Zaks & Klivanov, 1988a) y ha sido ampliamente demostrado.

Esta drástica reducción de flexibilidad conformacional de una enzima en un entorno no acuoso, se ha comprobado que se traduce en una disminución acusada de su velocidad de termoinactivación irreversible (Klivanov & Ahern, 1987). A ello contribuye también

la minimización de reacciones indeseables de las que el agua es directamente responsable (ver Figura 1.1). De hecho, se ha demostrado que las enzimas tienen una gran estabilidad térmica pudiendo mostrarse, en algunos casos, activas durante horas a 100°C en medios orgánicos anhidros (Zaks & Klivanov, 1984), mientras que como es sabido, se inactivan rápidamente incluso con temperaturas más bajas en agua.

Debido a la propia insolubilidad de las proteínas en casi todos los disolventes orgánicos, durante muchos años no se han podido dar pruebas físicas de la **no desnaturalización** de las enzimas suspendidas en medios no acuosos, pero recientemente se ha podido demostrar la integridad estructural de una enzima en disolvente orgánico por resonancia magnética nuclear de estado sólido (Burke *et al.*, 1989 y 1992), y más recientemente todavía se ha comprobado por cristalografía de rayos X que la estructura tridimensional de una proteasa en disolvente orgánico es indistinguible de la adoptada en agua (Fitzpatrick *et al.*, 1993 y 1994).

En particular, una faceta importante en la explotación de esta flexibilidad conformacional drásticamente reducida de una proteína en un disolvente orgánico se ha materializado recientemente en el fenómeno de "memoria" inducida por ligando (Russell & Klivanov, 1988; Braco *et al.*, 1990; Ståhl *et al.*, 1991; Dabulis & Klivanov, 1992), consistente en la inducción de un cambio conformacional sobre una proteína por una molécula molde mediante el pretratamiento de la proteína con determinados ligandos en el medio acuoso previo a la liofilización. De interés entre las estrategias para la activación de enzimas en los medios no acuosos que nos ocupan, esta vía alternativa, denominada comúnmente **impresión molecular** o bioimpresión molecular, se ha aplicado con éxito recientemente para incrementar las actividades catalíticas (así como cambiar la selectividad y estabilidad) de enzimas en disolventes orgánicos. Este fenómeno, basado en la reducción drástica de flexibilidad que sufren las proteínas en disolventes anhidros, consiste en la práctica en incubar las proteínas (u otras macromoléculas) en disolución acuosa en presencia de un ligando o molécula molde apropiado. Posteriormente, y después de la congelación y secado de las muestras, éstas se lavan con objeto de eliminar el ligando y se ensayan o utilizan en condiciones anhidras (Figura 1.4).

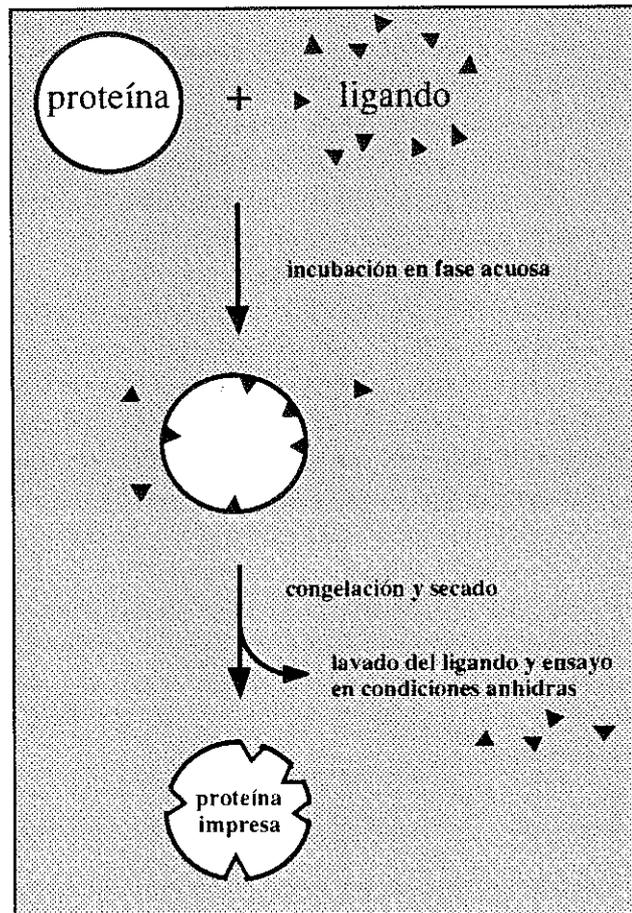


Figura 1.4. Esquema resumido del protocolo de impresión molecular de proteínas.

Conviene no confundir el fenómeno de la impresión molecular de proteínas con la prometedora impresión molecular de polímeros (Mosbach, 1994), también desarrollada en los últimos años. Dicha estrategia, aunque conceptualmente similar a la impresión de proteínas, se basa en la polimerización de una disolución de monómeros y entrecruzadores en presencia de una molécula impresora, de modo que tras la polimerización y "lavado" (extracción) del molde con pases sucesivos de un disolvente apropiado, se consigue disponer de un polímero "impreso" con cavidades complementarias en geometría y funcionalidad a grupos de la molécula impresora, es decir, se genera un bioadsorbente específico capaz de unir selectivamente el molde de entre un conjunto de moléculas. Esta estrategia ha suscitado gran interés y, de hecho, los

polímeros impresos se han propuesto para separaciones cromatográficas -incluidas separaciones quirales- (Andersson *et al.*, 1990), como una alternativa a los anticuerpos monoclonales en radioinmunoensayos (Vlatakis *et al.*, 1993) o en la fabricación de biosensores de nueva generación (Mosbach, 1994).

En el caso de proteínas, concretamente en los estudios iniciales se encontró que la liofilización de la serín proteasa subtilisina Carlsberg desde una disolución acuosa que contuviese un inhibidor competitivo del centro activo, seguida de la eliminación de éste en medio orgánico anhidro, proporcionaba una enzima que era hasta cien veces más activa en disolventes anhidros que la misma enzima liofilizada en ausencia de tales ligandos (Russell & Klibanov, 1988). Este fenómeno fue posteriormente extendido a la serín proteasa α -quimotripsina (Ståhl *et al.*, 1991) e incluso a otras proteínas no enzimáticas (Braco *et al.*, 1990). En todos los casos las conformaciones impresas desaparecen a partir de un cierto umbral de flexibilidad enzimática inducida por hidratación, posiblemente porque el agua actúe como "lubricante molecular" induciendo la pérdida de la estructura adquirida por la proteína (Poole & Finney, 1983; Guinn *et al.*, 1990).

Aunque los resultados preliminares fueron altamente esperanzadores en términos de potenciar las actividades e incluso de alterar la estereoselectividad (Ståhl *et al.*, 1990), esta estrategia ha sido aplicada a unas pocas proteasas usando derivados de aminoácidos como moldes, sin caracterizarse la naturaleza de los presumibles cambios conformacionales inducidos.

1.4.1. Activación de enzimas lipolíticas por impresión molecular

Bajo este punto de vista, parece atractivo intentar aplicar la estrategia de la impresión molecular a las enzimas lipolíticas con el objetivo de incrementar su eficacia catalítica en medios orgánicos. A continuación se exponen, con cierto detalle, los motivos estructurales para la aplicación, tanto en el caso de fosfolipasas A_2 como de lipasas de triglicéridos, de lo que hemos acuñado como **impresión molecular de enzimas lipolíticas basada en activación interfacial (IMAI)**.

1.4.1.1. Razones estructurales para la activación de PLA2

En este sentido en el caso de la PLA2, se han propuesto modelos alternativos (y probablemente no mutuamente excluyentes) que implican al sustrato y a la conformación de la enzima para justificar esta activación interfacial (Peters *et al.*, 1992).

Los datos cristalográficos derivados de varios complejos PLA2-inhibidor monomérico (White *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1990; Thunnissen *et al.*, 1990) parecen sugerir que la activación no implica grandes cambios conformacionales, sino más bien es el resultado de la orientación favorecida que adquieren los sustratos cuando están

agregados, lo que permite el desplazamiento de una molécula de fosfolípido desde la interfase lípido/agua hasta unirse al sitio catalítico de la enzima pasando a través de un canal hidrofóbico (Figura 1.5a).

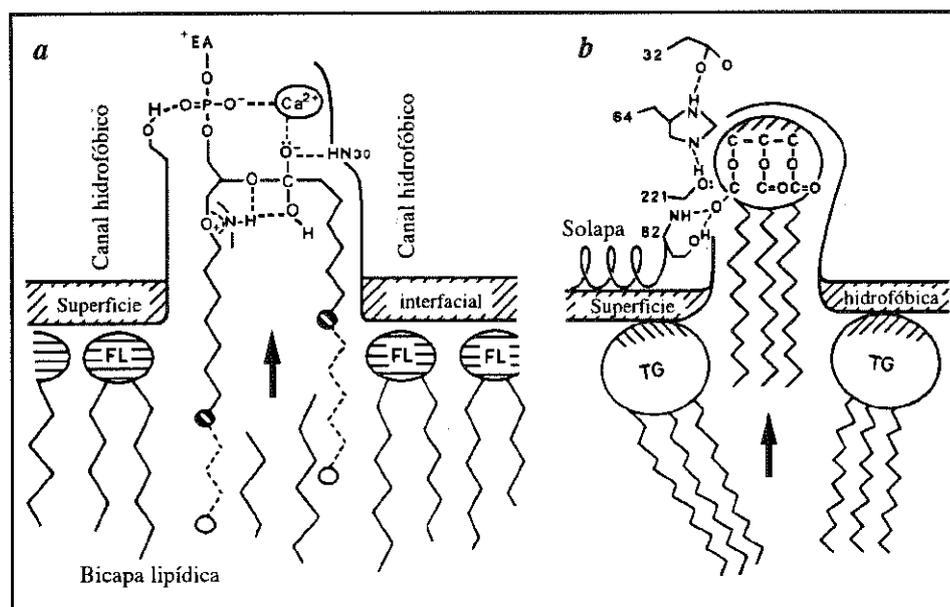


Figura 1.5. Diagramas de (a), una fosfolipasa A_2 , y (b) una lipasa, unidas a sustratos organizados en interfases. FL, fosfolípido; TG, triacilglicérido. (adaptadas de Blow, 1991).

Sin embargo, estudios recientes de espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) (Kennedy *et al.*, 1990) y especialmente datos de resonancia magnética nuclear (NMR) (Peters *et al.*, 1992) muestran que en la unión de una PLA2 pancreática a micelas que contienen un inhibidor análogo del sustrato se producen cambios conformacionales locales de relevancia, que implican entre otros, al segmento amino terminal (el cual adopta una conformación de hélice rígida en lugar de la más flexible que presenta cuando se halla libre en disolución) y a la maquinaria del sitio catalítico (donde se establece una red catalítica más ajustada y por tanto más competente) (Figura 1.6). Interesantemente, a este respecto, se ha comprobado que una PLA2 de secreción (Scott *et al.*, 1991) presenta un ensanchamiento de su canal hidrofóbico (gracias al movimiento del segmento N-terminal) al unirse a un análogo del estado de transición, mientras que en la forma libre de la enzima el canal parece bloqueado (o al menos con el acceso

restringido). Teniendo todo esto en cuenta, se puede pensar razonablemente que el proceso de activación interfacial de la PLA2 implique algunos cambios conformacionales locales que alivien las restricciones de acceso del sustrato, lo que se traduciría en una clara implicación del modelo del cambio conformacional al proceso global de activación interfacial.

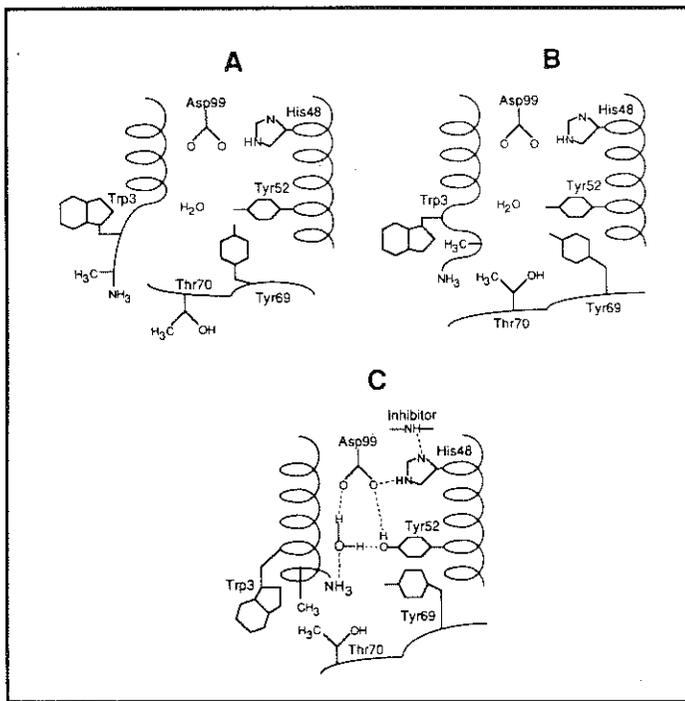


Figura 1.6. Visión esquemática de los cambios estructurales sufridos por la ppPLA2. **A.** Conformación de la enzima en solución. Nótese que el extremo N-terminal no es helicoidal, y además, la red interna de puentes de hidrógeno no está completa. **B.** Conformación adoptada al unirse a una micela. Se produce un reordenamiento en la región N-terminal: las cadenas laterales del triptófano 3 y la alanina 1 interaccionan con la micela. La red interna de puentes de hidrógeno es incompleta. **C.** Conformación al unirse a una micela que contiene un inhibidor del centro activo. El extremo N-terminal adquiere una conformación helicoidal, y la red interna de puentes de hidrógeno está totalmente formada. (Adaptado de Peters *et al.*, 1992).

1.4.1.2. Razones estructurales para la activación de lipasas

En este contexto, las lipasas constituyen *a priori* un buen banco de pruebas debido a que como se ha expuesto anteriormente, en su mecanismo de catálisis también tiene

lugar el proceso de activación interfacial en el que además se encuentra claramente implicada la solapa que restringe el acceso al centro catalítico.

Las razones estructurales que explican la activación interfacial de las lipasas han sido objeto de estudio exhaustivo en los últimos años. Así, al igual que lo que ocurría en el caso de la PLA2 los sustratos de las lipasas también adquieren una orientación favorecida cuando están agregados, permitiéndose el desplazamiento de la molécula de triglicérido desde la interfase lípido/agua hasta el sitio catalítico de la enzima (Figura 1.5b). Además, la cristalografía de rayos X ha proporcionado abundantes pruebas de que diferentes lipasas caracterizadas de distintas fuentes (tanto de origen microbiano como de mamíferos) presentan cambios conformacionales apreciables cuando se comparan las estructuras de las enzimas libres y de los complejos enzima-inhibidor o enzima-sustratos agregados (Lawson *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Cambillau & van Tilbeurgh, 1993; Derewenda & Sharp, 1993). Mientras en la forma libre de las lipasas el centro catalítico está cubierto por una solapa helicoidal, en los complejos enzima-inhibidor esta solapa se desplaza exponiendo al medio la maquinaria catalítica y creando un ambiente apolar alrededor del centro catalítico que estabiliza el contacto entre la enzima y la superficie del lípido (Figura 1.7), y lo que es aún más interesante, aumentando en gran medida la accesibilidad de los sustratos al centro catalítico.

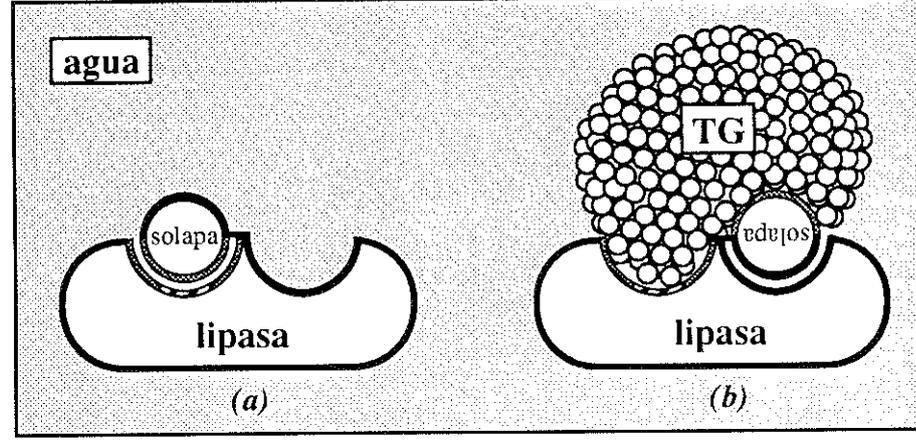


Figura 1.7. Diagrama esquemático en el que se muestran los cambios electrostáticos asociados a la activación de una lipasa. Las superficies hidrofílicas se muestran en negro, las superficies hidrofóbicas como punteado fino, y el centro activo aparece rayado. En la enzima inactiva (a) hay poca superficie hidrofóbica expuesta al entorno. Sin embargo, cuando la enzima se enfrenta a una micela lipídica (b), se activa: la solapa se retira exponiendo una zona hidrofóbica anteriormente oculta a las moléculas de agua y que ahora interacciona favorablemente con la superficie apolar al mismo tiempo que el centro activo queda expuesto a los triglicéridos (TG) haciéndose posible la lipólisis. (Adaptado de Dodson *et al.*, 1992).

Además, concomitante a este movimiento de la solapa se produce un reordenamiento de los residuos de aminoácidos que forman parte de la maquinaria catalítica (que pasa a ser más competente) y se crea un "agujero" oxianiónico (Brzozowski *et al.*, 1991; Derewenda *et al.*, 1992; van Tilbeurgh *et al.*, 1993).

En suma, a la vista del conocimiento estructural disponible actualmente y de los cambios conformacionales mencionados, la aplicación racional de la estrategia de la impresión molecular que se propone tanto en el caso de fosfolipasa A₂ como de lipasas consistirá en intentar "atrapar" (congelando) las enzimas en una conformación presumiblemente activada por estar unidas a o incluso actuando sobre una interfase anfífilo/agua, y ensayarlas (después de la eliminación de los anfífilos por sucesivos lavados con disolventes orgánicos anhidros) en medios no acuosos para preservar la conformación impresa.

1.5. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es doble, por una parte trata de suplir las claras deficiencias en el conocimiento básico del comportamiento de PLA2s (a diferencia de lo que ocurre con las lipasas) en medios no acuosos, y en una segunda etapa intenta desarrollar una estrategia racional para incrementar la actividad catalítica de enzimas lipolíticas en general (tanto fosfolipasas como lipasas), analizando sistemáticamente las bases del método y las variables de las que depende. A lo largo de todo el trabajo, la aproximación experimental es la de utilizar enzimas particuladas en suspensión en disolventes orgánicos monofásicos. Así, se propone en concreto:

1) Caracterizar sistemáticamente el comportamiento de la PLA2 pancreática porcina, como fosfolipasa extracelular modelo, analizándose las actividades tanto hidrolíticas como sintéticas.

2) Potenciar las actividades enzimáticas acilante y desacilante de la PLA2 por medio de la estrategia de la impresión molecular basada en la activación interfacial que presenta la enzima.

3) Extender dicha estrategia a otras enzimas lipolíticas como son las lipasas, en las que el proceso de activación interfacial ha sido extensamente demostrado.

Para cubrir estos objetivos se seleccionaron enzimas lipolíticas prototípicas, en el sentido de que están ampliamente documentadas y de que son conocidas sus estructuras tridimensionales, lo que posibilita, en principio, una interpretación molecular de los resultados.

2. Materiales y métodos

2.1. MATERIALES

Por lo que respecta a las enzimas, en este estudio se ha utilizado fosfolipasa A₂ de páncreas porcino (ppPLA₂) como PLA₂ modelo, generosamente cedida por Novo Industri A/S (Copenague, Dinamarca) o bien obtenida de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). Para el estudio con lipasas se seleccionaron cuatro enzimas ciertamente prototípicas por conocerse con detalle sus estructuras tridimensionales: lipasa pancreática porcina (PPL), de Sigma, y tres enzimas fúngicas, lipasa de *Candida rugosa* (CCL), de Sigma y lipasas de *Rhizomucor miehei* (RmL) y *Geotricum candidum* (GcL), generosamente cedidas por Novo y Amano (Nagoya, Japón), respectivamente. Además, en el apartado 3.3.4. se utilizó otra lipasa, de *Rhizopus delemar* (RdL), también generosamente cedida por Amano. La α -quimotripsina y la subtilisina fueron de Sigma.

La fosfatidilcolina de yema de huevo (PC), comercial de Merck (Darmstadt, Alemania), se purificó por cromatografía de adsorción preparativa en columna siguiendo el método de Singleton *et al.* (1965), y su pureza se controló por cromatografía en capa fina (TLC). Todos los restantes fosfolípidos, las bolitas de vidrio de poro controlado PG2000-200 (tamaño de malla 120-200), así como el 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), fueron de Sigma. El ácido oleico tritiado (actividad específica 10 Ci/mmol) se obtuvo de Amersham (Buckinghamshire, Gran Bretaña). Los detergentes sintéticos, así como otros productos químicos usados fueron de diversas casas comerciales (Aldrich, Merck, Sigma o Serva) y siempre de calidad para análisis.

Todos los disolventes empleados (Merck o Panreac) fueron de calidad analítica o para HPLC. La expresión disolvente "anhidro" hace referencia a disolvente desecado con tamiz molecular de 3Å (Merck) para dar un contenido de agua menor al 0.01%, como se

determinó por valoración de Fisher optimizada (Laitinen & Harris, 1975). Para los tampones y sistemas eluyentes en cromatografía se utilizó agua bidestilada obtenida por purificación en un sistema Milli-Q, de Waters (Milford, MA, USA). Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de soporte de plástico recubiertas con gel de sílice 60 de 0.2 mm de espesor, de Merck.

2.2. EXPERIENCIAS CON PLA2

2.2.1 Optimización de PLA2 en forma particulada

La enzima se preparó para su utilización en disolvente orgánico liofilizándola desde un tampón de pH 8.0, en base al ya mencionado efecto de "memoria" de pH (Zaks & Klivanov, 1988a), y puesto que este valor ha sido rutinariamente usado en ensayos previos de la enzima pancreática (Berg *et al.*, 1991).

Tanto en los ensayos de hidrólisis como en los de síntesis, la PLA2 se optimizó como sigue. Una alícuota de 1 mL de solución de enzima se diluyó (a 4°C) con 29 mL de un tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, Ca²⁺ 5 mM. De esta disolución se añadieron distintas alícuotas directamente a los tubos en los que tenía lugar el ensayo en disolvente orgánico, estos tubos se congelaron en nitrógeno líquido para minimizar la posibilidad de desnaturalizaciones y se liofilizaron durante toda la noche.

2.2.2. Ensayo de PLA2 en disolventes orgánicos

La hidrólisis de fosfolípidos catalizada por PLA2 se ensayó principalmente con PC y en un experimento típico, 1 mg del polvo de enzima optimizado se suspendió en 1 mL de disolución de PC en cloroformo presaturado con agua, en viales de vidrio de tapón de rosca de 2 mL de capacidad. La suspensión se sonicó inmediatamente durante 20 segundos en un baño de sonicación Branson 2200 y se agitó con un agitador magnético a 250 rpm a 25°C. Periódicamente, se extrajeron alícuotas de 10 µL de reacción y se cuantificaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) siguiendo simultáneamente tanto la desaparición del sustrato (PC) como la aparición del producto lisofosfatidilcolina (LPC).

En las cinéticas de hidrólisis de distintas especies fosfolípídicas que diferían en la cabeza polar, se usaron los fosfolípidos comerciales sin purificación previa. Las reacciones se siguieron por cromatografía en capa fina de alícuotas tomadas a diferentes tiempos de incubación.

Para la síntesis de fosfatidilcolina en disolvente orgánico catalizada por PLA2, se usaron típicamente 0.2 mg de polvo de enzima suspendidos en 1 mL de tolueno anhidro (para favorecer el equilibrio de la reacción hacia la síntesis), que contenía el ácido graso y

la LPC. La preparación de cada muestra se realizó añadiendo al polvo de enzima optimizado la LPC disuelta en cloroformo anhidro, el disolvente se evaporó en atmósfera de nitrógeno y finalmente el polvo se resuspendió en el tolueno anhidro que ya contenía disuelto el ácido graso. En los casos puntuales en que se usaron los ácidos grasos marcados radiactivamente, la fosfatidilcolina sintetizada (radiactiva) se purificó por TLC y se midió su radiactividad usando un contador de centelleo 1217 Rackbeta de LKB.

La síntesis de fosfolípidos usando ácido oleico o cualquier otro ácido no marcado (ácido butírico, de Merck, o ácidos cáprico, mirístico, palmítico, esteárico, linoleico y linoléico, todos ellos de Sigma) se siguió por HPLC de forma análoga al procedimiento descrito para la hidrólisis.

La inmovilización de la PLA2 se realizó como en Braco *et al.* (1992), de la siguiente forma: se disolvió la enzima en el tampón de optimización a la concentración de 10 mg/mL, posteriormente esta disolución se depositó sobre el vidrio poroso a razón de 1 μ L por mg de soporte y se procedió a secar las muestras a vacío durante 1 hora.

2.2.3. Inactivación térmica

Las cinéticas de inactivación térmica irreversible de PLA2 en *n*-octano anhidro se realizaron siguiendo esencialmente el protocolo descrito por Zaks & Klivanov (1984), excepto que para la incubación a 100°C se usó un bloque termostático metálico. Brevemente, se prepararon muestras idénticas conteniendo cada una la enzima en polvo optimizada (2 mg) dispersada en 2 mL del disolvente y todo ello en el interior de una ampolla de 4 mL que fue sellada. Tras la incubación en el bloque térmico a 100°C por un determinado periodo de tiempo, cada ampolla se atemperaba y se abría, se filtraba la enzima y se secaba a vacío previamente a su utilización. Finalmente, se cuantificaba su actividad ensayándola en las condiciones usuales de hidrólisis de PC en cloroformo presaturado.

2.2.4. Ensayo de hidrólisis de PLA2 en medio acuoso.

La hidrólisis en agua de PC y de los otros fosfolípidos (de diferente cabeza polar) fue seguida potenciométricamente usando un sistema de pH-stat de Crison MicroTT2050 (Barcelona, España). En este caso, los sustratos se emulsificaron usando como detergente Triton X-100 (TX-100) en una relación molar detergente:fosfolípido de 2:1. Generalmente, se tomaron 4 mL de una solución de NaCl 10 mM, Ca²⁺ 5mM, equilibrada a pH 8.0 y que contuviese el fosfolípido emulsificado, se colocaron en una cubeta termostatizada a 25°C y la reacción fue seguida por autovaloración de forma similar a la descrita por Berg *et al.* (1991). En los casos en que las reacciones tuviesen lugar en el medio tamponado que se usa en la optimización del polvo de PLA2, el

progreso de las reacciones fue seguido por HPLC de forma similar a la descrita anteriormente.

En las experiencias en medios acuosos se usaron como agregados de fosfolípidos modelo, bien vesículas unilamelares pequeñas (SUV), o bien micelas mixtas de PC/TX-100 (relación molar 1:2). Para la preparación de los liposomas se siguió el siguiente protocolo: en primer lugar se evaporó el disolvente de las disoluciones de lípido en mezclas cloroformo/metanol (9:1, v/v) en un rotavapor, posteriormente se aplicó a la película lipídica formada una corriente de nitrógeno para eliminar las trazas de disolvente orgánico, y se hidrató con la fase acuosa deseada mediante agitación durante 3 min en baño de sonicación. La suspensión opaca de vesículas multilamelares se sonicó durante 20 minutos en un generador ultrasónico equipado con una microsonda (Vibracell, Sonics and Materials Inc., U.S.A.) operándose el generador a nivel 4 con ciclos del 50% de tiempo efectivo. Después de la sonicación, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12000 rpm en una centrífuga Biofuge 13 Heraeus (Hanau, Alemania) para eliminar las partículas de titanio de la sonda y los agregados multilamelares residuales. Posteriormente se valoró la concentración de la fosfatidilcolina por HPLC.

2.3. EXPERIENCIAS CON LIPASAS

2.3.1 Optimización de lipasas en forma particulada

El polvo de enzima optimizado se obtuvo rutinariamente por liofilización de la disolución de enzima en un tampón Tris-HCl 10 mM, de pH 7.5, a 4°C; procediéndose en esencia, como en el caso de la PLA2.

2.3.2 Ensayo de lipasas en medios orgánicos

Los ensayos en medio no acuoso de las lipasas se llevaron a cabo usando varias reacciones modelo de esterificación en disolventes anhidros. Se seleccionaron principalmente ácidos grasos de cadena larga y alcoholes tanto lineales como relativamente impedidos (ciclohexanol y alcohol bencílico). El protocolo experimental seguido fue en general el mismo que en los ensayos de PLA2 en medio orgánico, descrito anteriormente. En este caso, el progreso de la reacción se siguió por HPLC en fase reversa.

Además, como modelo de reacción hidrolítica se siguió la hidrólisis de trioleína (10 mM, de Sigma) en isopropanol. Y como modelo de reacción de transesterificación se escogió la reacción entre la tripalmitina (50 mM) y el ácido oleico (100 mM) en tolueno anhidro.

2.4. ACTIVACIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS POR IMPRESIÓN MOLECULAR

2.4.1. PLA2

Las muestras de enzimas se incubaron durante 3 minutos en sus tampones de optimización en ausencia y presencia de los distintos anfífilos para generar las muestras control y activadas respectivamente, posteriormente fueron congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas. Los polvos de enzima (control e impreso) resultantes, se trataron en lo sucesivo exactamente de la misma forma: así, se lavaron (agitando las suspensiones y centrifugando 3 minutos a 13000g) al menos tres veces en un disolvente o mezcla de disolventes anhidros [generalmente benceno o benceno/etanol 95:5 para *n*-octil- β -D-glucopiranosido (*n*-OG), PCs y LPC, y acetato de etilo para Triton X-100 (TX-100) y Aerosol OT (AOT)], los cuales fueron cuidadosamente seleccionados con objeto de maximizar la solubilidad de los anfífilos y minimizar posibles efectos perjudiciales para las enzimas; de hecho, se verificó que preparaciones de enzimas control no lavadas mostraban una actividad similar a la de los controles lavados. Después de los lavados, las muestras se secaron a vacío durante al menos 3 horas. Posteriormente, una cantidad determinada de polvo de enzima, activado o control (típicamente 3 mg), se suspendió en un volumen dado (generalmente 3 mL) del medio de reacción que contenía los sustratos (se tomó el tiempo cero de reacción después de 10 segundos de sonicación) en tubo de vidrio de cierre hermético. Periódicamente, las mezclas de reacción fueron analizadas por HPLC.

En el caso de los ensayos de **desacilación** catalizada por ppPLA2, debido a los datos previos a cerca del efecto de la concentración de cofactor (Ca^{2+}) en el tampón de liofilización, que modula la actividad en el medio orgánico, se ajustó esta concentración deliberadamente a 0.2 mM para obtener medidas de velocidades de reacción lentas pero fiables para las muestras enzimáticas control, con objeto de poder evaluar con mayor precisión las activaciones producidas por la impresión. En cambio, en la **acilación** catalizada por esta enzima la concentración de Ca^{2+} utilizada fue 3 mM debido a la lentitud de de la reacción estudiada. Deliberadamente en este caso, se eligió como anfífilo molde LPC (3 mM), y debido a que éste es también sustrato de la reacción de acilación no se realizaron los lavados de eliminación del anfífilo. Así el polvo liofilizado de la ppPLA2 (0.5 mg) fue suspendido directamente en 1 mL de cloroformo anhidro conteniendo LPC 30 mM (para la enzima control) o el mismo volumen de cloroformo anhidro pero conteniendo LPC 27 mM (para la enzima activada), de forma que la cantidad de anfífilo existente al final fuese exactamente la misma en ambas muestras. Posteriormente, se evaporó el cloroformo en atmósfera de nitrógeno y se secaron las muestras a vacío durante 4 horas al menos para eliminar cualquier traza del disolvente orgánico. Finalmente, se añadió a cada muestra (control e impresa) de ppPLA2 seca 1

mL de tolueno anhidro que contenía el ácido oleico (500 mM) para comenzar la reacción, de acuerdo al procedimiento previamente descrito.

En las experiencias en que se usaron liposomas como interfases modelo para la impresión molecular, el protocolo consistió en la incubación de las vesículas fosfolípicas (obtenidas según se describe en el apartado 2.2.4.) con la solución de enzima (concentración final de Ca^{2+} 0.2 mM) a 4°C durante 2 minutos antes de la congelación en nitrógeno líquido. Para lavar los fosfolípidos se usó como disolvente anhidro benceno o benceno/etanol 95:5. A partir de este punto las condiciones para el ensayo en medio no acuoso y su seguimiento fueron como el descrito hasta ahora.

2.4.2 Lipasas

Las lipasas se prepararon disolviéndolas en el tampón a 4°C, bien conteniendo el anfifilo (para las enzimas activadas), o bien la misma disolución en ausencia de éste (para las enzimas control). A partir de este momento, las muestras (tanto de las series activadas como de los controles) se trataron de idéntica forma: se congelaron en nitrógeno líquido, se liofilizaron, y se lavaron al menos cuatro veces con benceno/etanol 90:10 o acetato de etilo anhidros. De nuevo, al igual que se hizo para la ppPLA2, se comprobó que las preparaciones de enzima control no perdían aparentemente actividad por los tratamientos de lavado. El protocolo experimental general fue el mismo que se ha descrito para la fosfolipasa.

2.5. DETERMINACIONES CROMATOGRÁFICAS

2.5.1. Análisis por cromatografía en capa fina

La separación de los distintos fosfolípidos de los productos de su reacción de hidrólisis se realizó en placas cromatográficas de gel de sílice. En ellas se aplicaron volúmenes de reacción entre 4 y 12 μL y se eluyeron con una mezcla ternaria cloroformo/metanol/agua (65:25:4). El revelado se realizó con vapores de yodo y, en el caso de las muestras radiactivas el seguimiento se realizó cualitativamente por autorradiografía, para lo cual las placas de cromatografía se pusieron en contacto directamente con películas autorradiográficas Hiperfilm MP (Amersham, G.B.), y la impresión de las películas se desarrolló a -80°C durante períodos variables entre dos días y tres semanas, dependiendo de la radiactividad presente. Las placas autorradiográficas se revelaron con revelador Kodak D-19 durante cinco minutos. Por otro lado, el seguimiento cuantitativo de la PC marcada, purificada por TLC, se realizó en un contador de centelleo.

En las cinéticas de hidrólisis de las especies fosfolipídicas que diferían en la cabeza polar, las reacciones se siguieron tomando alícuotas a diferentes tiempos de incubación. Para cada fosfolípido, se cuantificaron el sustrato y los productos de la reacción, tras separación en capa fina, directamente con un analizador de imagen IBAS 2000 (Kontron) y las densidades integradas a los distintos tiempos fueron convertidas en porcentajes relativos a manchas de sustratos control no hidrolizados.

2.5.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La separación completa de todas las moléculas implicadas en las reacciones catalizadas por la PLA2, PC, LPC y ácido graso se llevó a cabo en una columna de fase normal Resolve (15 x 3.9 cm) de Waters, usando un cromatógrafo líquido Waters equipado con un detector de índice de refracción 410. La columna se eluyó isocráticamente con una mezcla ternaria acetonitrilo/metanol/agua (55:45:4, v/v/v) a un caudal de 1.5 mL/min. Para las medidas cinéticas de hidrólisis, se disolvieron alícuotas de 10 μ L de mezcla de reacción en 90 μ L de eluyente con el fin de parar la reacción, se centrifugó 3 minutos a 13000g con el fin de eliminar la proteína insoluble presente y se inyectaron 50 μ L del sobrenadante. En el caso de las cinéticas de síntesis las alícuotas de la mezcla de reacción (tolueno generalmente) fueron centrifugadas para separar las partículas de enzima y se inyectaron directamente 10 μ L de sobrenadante. La Figura 2.1 muestra, a modo de ejemplo, los perfiles de elución correspondientes a una cinética de hidrólisis de PC en la que puede observarse simultáneamente la aparición de LPC y la desaparición concomitante de la PC sustrato.

Para las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas, la separación de las especies implicadas (ácidos grasos, alcoholes y ésteres originados) se realizó en una columna de fase reversa RP C-18 LiChrospher 100 (15 x 3.9 cm), de Merck, eluida con metanol a un caudal de 1 mL/min y con detección por índice de refracción. El protocolo experimental general para la preparación de las muestras fue en esencia el seguido en el caso de la PLA2. Para las cuantificaciones se tuvo en cuenta tanto la desaparición de los sustratos (ácido graso y alcohol) como la aparición del éster formado.

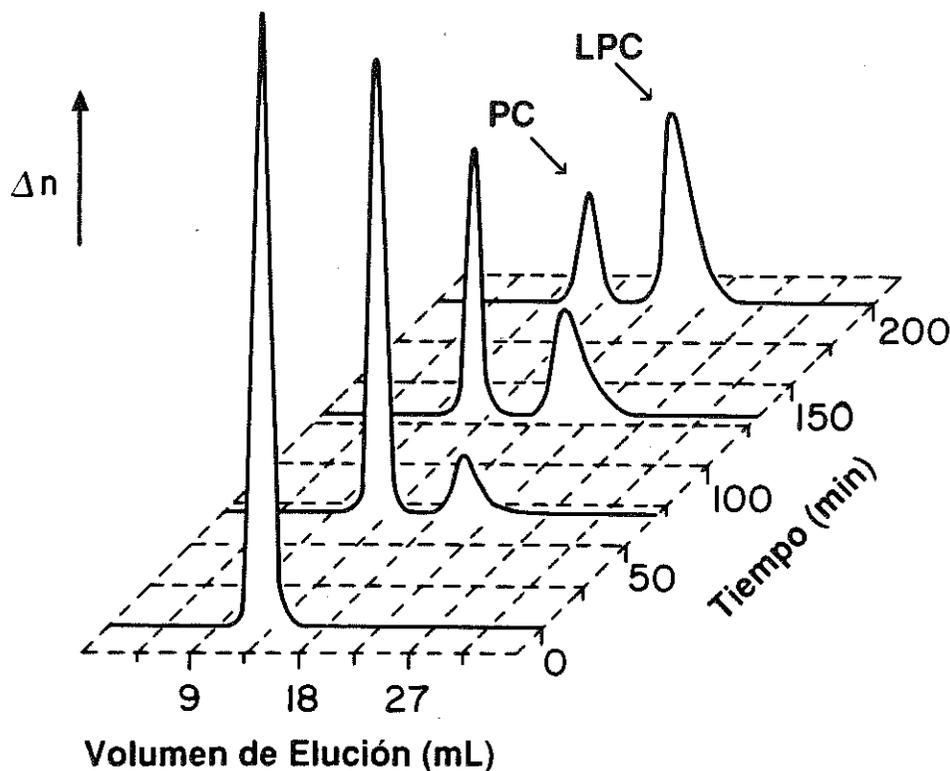


Figura 2.1. Seguimiento cromatográfico de una cinética típica de hidrólisis de fosfatidilcolina en cloroformo presaturado catalizada por ppPLA2 en forma particulada. (Condiciones, ver texto).

2.6. DETERMINACIONES ELECTROFORÉTICAS

La comprobación de la pureza de algunas muestras de enzimas se realizó por electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) según Laemmli (1970) a corriente constante (30 mA) y temperatura ambiente. La tinción de proteínas totales se llevó a cabo mediante azul de Coomassie R-250 (Merck) 0.1% (p/v) en ácido acético 8% (v/v) y metanol 46% (v/v) durante 30 minutos, procediéndose a destañar con una disolución de ácido acético 5% (v/v) y metanol 20% (v/v). El contenido en cada una de las proteínas de cada muestra se cuantificó mediante un

densitómetro láser LKB Ultrascan 2202 acoplado a un integrador 3390A Hewlett Packard.

2.7. DETERMINACIONES ESPECTROSCÓPICAS

La valoración del contenido de proteínas de las muestras se realizó de acuerdo al método de Lowry *et al.* (1951). Como proteína patrón se empleó seroalbúmina bovina (Sigma). Las medidas de espectroscopía de absorción UV-Visible fueron llevadas a cabo empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

La concentración de Ca^{2+} en las soluciones comerciales de PLA2 fue determinada por espectroscopía de absorción atómica usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo 5000.

Los valores de la cmc para los anfífilos se tomaron de la bibliografía (Mukerjee & Mysels, 1971) o se determinaron fluorimétricamente en un espectrofluorímetro LS-5B Perkin-Elmer utilizando la sonda DPH, de acuerdo al método propuesto por Chattopadhtay & London (1984). Además, basándonos en que la PLA2 de páncreas porcino únicamente presenta un triptófano en su secuencia el cual está situado en la zona de unión a los sustratos agregados, con lo que su movimiento es indicador de los cambios conformacionales debidos a la unión de la proteína a agregados micelares (Vincent *et al.*, 1993), se realizó un estudio de anisotropía de fluorescencia en presencia de distintas concentraciones de liposomas. Las medidas de anisotropía de fluorescencia se obtuvieron a 24°C con $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$, seleccionando la abertura de las rejillas de emisión y excitación a 3.0 y 5.0 nm respectivamente.

En el caso de la PLA2, se comprobó el cambio conformacional inducido por la presencia de liposomas de PC (3 mM) sobre una muestra de la enzima purificada por HPLC, por dicroísmo circular en el UV lejano utilizando un dicrógrafo CD-6 de Jobin-Yvon, calibrado con isoandrosterona. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 0.5 mm de paso óptico y la velocidad de barrido fue de 0.5 nm/s, con una constante de tiempo de integración de 1 s. La Figura 2.2 muestra los espectros obtenidos por acumulación de cinco barridos.

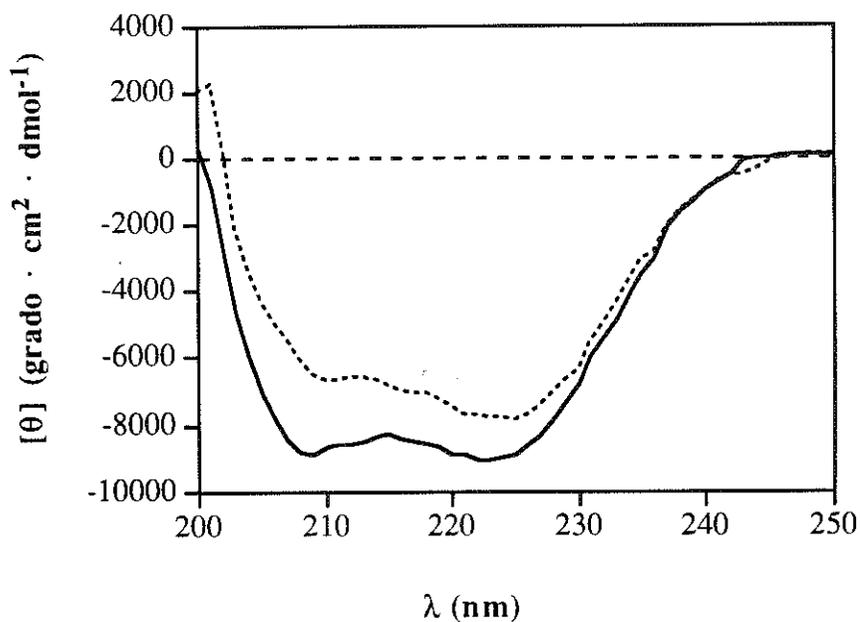


Figura 2.2. Comparación de los espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano de una muestra de PLA2 (purificada) en ausencia (línea continua) y en presencia de SUV de PC (línea de puntos). Relación molar lípido/enzima 30:1.

3. Resultados y discusión

3.1. ACTIVIDAD HIDROLÍTICA (DESACILANTE) DE PLA2 EN MEDIOS ORGÁNICOS MONOFÁSICOS

Parece que hay un acuerdo general en que las enzimas en ambientes predominantemente no acuosos o con bajo contenido en agua funcionan provistas de una capa de agua esencial que las envuelve (Klibanov, 1986). Así, la "regla de oro" (típicamente regla del log P, donde P es el coeficiente de reparto del disolvente entre 1-octanol y agua) de la enzimología en medio orgánico (Zaks & Klibanov, 1988a) según la cual los disolventes apolares son mejores medios de reacción que los polares, podría explicarse en base a que los disolventes polares, habitualmente miscibles con el agua, podrían diezmar esa capa de agua esencial de la proteína (Zaks & Klibanov, 1988b). Según este principio, el efecto de un disolvente orgánico sobre una enzima se debería más a las interacciones del disolvente con esta cubierta de agua que la envuelve que a las que pueda tener directamente con la proteína.

Dado que la función enzimática en medio orgánico puede mejorarse tanto por ingeniería del medio (escogiendo disolventes que resalten la selectividad y reactividad deseadas) como por ingeniería del biocatalizador (optimizando las proteínas para este medio de reacción), parece lógico comenzar el estudio en estos ambientes seleccionando el medio de reacción más adecuado, ya que la ingeniería del medio es sin duda la aproximación más simple, y quizá la menos valorada, para la mejora de las funciones enzimáticas, y hay que tener en cuenta que, a diferencia de lo que ocurre en las disoluciones acuosas, existen cientos de disolventes y mezclas de disolventes que podrían usarse en la catálisis enzimática.

Con estas premisas se verificó la actividad hidrolítica de la PLA2 en diversos disolventes tanto miscibles como inmiscibles con el agua. La inspección detallada de la Tabla 3.I revela que, en principio, el comportamiento de la PLA2 en función de la polaridad del disolvente se ajusta bastante a la tendencia antes mencionada.

Tabla 3.I. Actividad hidrolítica de la ppPLA2 en distintos disolventes orgánicos. La enzima se suspendió (1 mg/mL) en los distintos disolventes orgánicos conteniendo PC 5 mM. Los disolventes anhidros se obtuvieron por deshidratación con tamiz molecular de 3 Å durante 24 horas.

Disolvente	log P	Porcentaje de agua (v/v)	Velocidad inicial (mM·min ⁻¹ ·mg prot ⁻¹)
Tolueno	2.50	anhidro	0.013
		saturado	0.180
Benceno	2.00	anhidro	0.006
		saturado	0.096
Cloroformo	1.97	anhidro	0.006
		saturado	0.260
Eter Isopropílico	1.90	anhidro	0.000
		saturado	1.400
Eter Etilico	0.85	anhidro	0.002
		saturado	25.000
Acetato de Etilo	0.68	anhidro	0.000
		saturado	95.000
Tetrahidrofurano	0.49	anhidro	0.000
		1	1.333
		2	3.333
		3	0.909
		5	0.064
Acetona	-0.23	anhidro	0.001
		1	1.500
		2	3.272
		3	6.000
		5	2.570
Etanol	-0.24	anhidro	0.000
		1	0.026
		3	0.038
		12	0.072
		16	0.105
		25	0.170
Acetonitrilo	-0.33	anhidro	0.000
		1	20.000
		2	41.750
		3	66.250
		5	35.750
Metanol	-0.76	anhidro	0.000
		1	0.001
		3	0.001
Sulfóxido de dimetilo	-1.30	anhidro	0.000
		1	0.000
		3	0.000

Los únicos disolventes en los que la enzima se mostró prácticamente inactiva fueron el sulfóxido de dimetilo, disolvente del que es clásicamente conocida su capacidad de disolución real de proteínas (Singer, 1962), y el metanol, en el cual se ha comprobado muy recientemente que también existe una elevada solubilidad de proteínas (Chin *et al.*, 1994); parece probable pues, que la enzima en éstos pueda cambiar su conformación y consecuentemente inactivarse.

De los datos de esta tabla se desprende que la PLA2 requiere una cierta cantidad de moléculas de agua para su actividad enzimática y que además se muestra como una enzima robusta siendo activa en muchos y muy variados disolventes incluyendo un disolvente "adverso" como es el etanol, máxime cuando se usan proporciones muy variadas de agua, en concordancia con datos recientes de Warwicker *et al.*, (1994).

La hidrólisis de PC en disolvente orgánico aquí descrita resultó ser altamente estereoespecífica, al igual que las hidrólisis en medios acuosos (Volwerk & de Haas, 1982), ya que la ppPLA2 se mostró activa sólo frente a los L- α -fosfolípidos, no presentando actividad frente a D- α -fosfolípidos (resultados no mostrados).

Para los posteriores estudios se decidió seleccionar como disolvente rutinario de trabajo el cloroformo presaturado ya que las cinéticas permitían un seguimiento cómodo (en el tiempo) y además en este disolvente se solubilizan no sólo los sustratos fosfolipídicos sino también sus productos liso-derivados, lo que además de colaborar en la cuantificación debe facilitar la difusión de éstos desde el centro catalítico de la enzima al medio.

3.1.1. Efecto de la concentración de Ca^{2+}

Debido a que la ppPLA2 presenta un requerimiento absoluto de Ca^{2+} , se investigó en primer lugar la dependencia de la actividad enzimática en medio no acuoso respecto de la concentración de cofactor en la solución acuosa previa a la liofilización. El inserto de la Figura 3.1 muestra, a modo de ejemplo, las cinéticas de hidrólisis de PC catalizada por ppPLA2 en cloroformo presaturado, para distintas concentraciones del catión. El ajuste de los datos a una función de primer orden proporciona unos valores de constante de velocidad de $(4.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-4}$, $(8.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$ y 0 s^{-1} para las tres concentraciones de calcio que se muestran, 5, 10 y 30 mM, respectivamente. En condiciones óptimas, la hidrólisis de los sustratos se completa en aproximadamente 2 horas. Como muestra la Figura 3.1 la ppPLA2 tiene una velocidad inicial de hidrólisis altamente dependiente de la concentración de cofactor presente en la disolución previa a la liofilización, presentando un máximo de actividad alrededor de 5 mM (de acuerdo con los datos previos de Pernas *et al.*, 1990) y una fuerte inhibición a concentraciones moderadamente altas de éste. Por tanto, las condiciones de óptima actividad no sólo implican la liofilización desde un pH apropiado (Zaks & Klivanov, 1988a), sino que también debe tenerse en

cuenta la adecuada concentración de Ca^{2+} . La inhibición de la actividad en medio orgánico al incrementar la concentración del catión en medio acuoso puede deberse, como se ha sugerido, al aumento de la atmósfera iónica creada alrededor de la enzima en el proceso de congelado y posterior sublimación del disolvente (Pernas *et al.*, 1990). Aunque esta interpretación puede ser correcta, la inhibición podría también ser el resultado de una "memoria" de cofactor, análoga a la de pH, sobre todo teniendo en cuenta datos previos que indican la existencia de inhibiciones de ppPLA2 a concentraciones moderadas de Ca^{2+} en disolución acuosa (Thuren *et al.*, 1987).

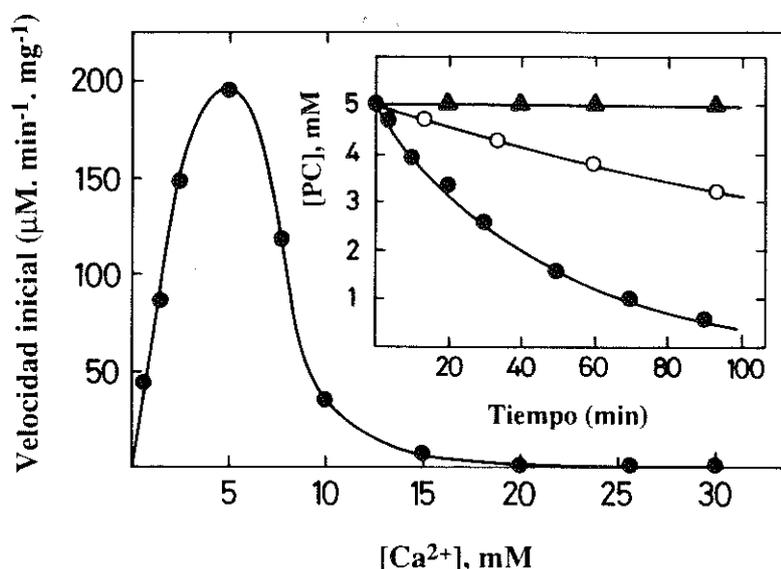


Figura 3.1. Dependencia de la velocidad inicial de hidrólisis de PC (expresada como micromolar por minuto y por miligramo de proteína) catalizada por ppPLA2 en cloroformo saturado respecto a la concentración de Ca^{2+} en el tampón acuoso previo a la liofilización. El inserto muestra, a modo de ejemplo, las cinéticas de hidrólisis para tres diferentes concentraciones del catión: (●) 5 mM; (○) 10 mM; y (▲) 30 mM. La concentración inicial de sustrato fue 5 mM.

3.1.2. Efecto de la concentración de sustrato

Se continuó el estudio ensayando la actividad hidrolítica de PLA2 en cloroformo presaturado en función de la concentración de sustrato (PC), pero a diferencia de otras enzimas en medios orgánicos (Zaks & Klivanov, 1985 y 1988a) la ppPLA2 no mostró un comportamiento cinético micasiano, sino que sorprendentemente se obtuvo una curva acampanada (Figura 3.2A) mostrando un máximo de actividad alrededor de 30 mM

de PC y una inhibición por sustrato bastante severa para concentraciones superiores a 80 mM. Este particular comportamiento de inhibición por concentraciones crecientes de PC, aunque singular, se ha descrito con anterioridad en el caso de fosfolipasa D en sistemas bifásicos (Juneja *et al.*, 1989), aunque con una inhibición mucho menos acusada que la que aquí se describe.

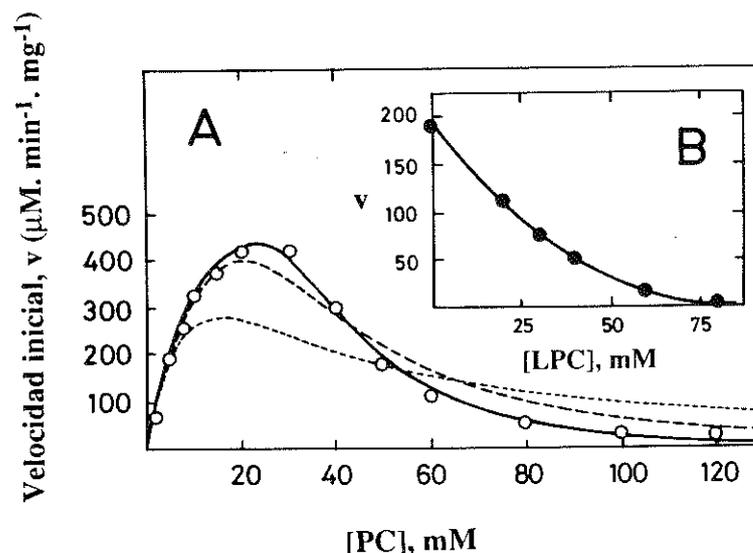


Figura 3.2. (A) Dependencia de la velocidad inicial de hidrólisis de PC, catalizada por ppPLA2 en cloroformo saturado, con la concentración de sustrato inicial (\circ). Las curvas corresponden a los valores de velocidad inicial teóricos obtenidos por ajuste no lineal de los datos experimentales a la ecuación 1 (línea de trazo corto), a la ecuación 2 (línea de trazo largo), y a la ecuación 3 (línea continua) del modelo cinético número 1 (ver texto). (B) Variación de la velocidad inicial de hidrólisis de PC con la concentración de LPC en el medio de reacción. La concentración inicial de PC en todos los casos fue 5 mM.

Con el objetivo de encontrar una explicación a este comportamiento acampanado, y debido a que un modelo cinético simple de inhibición competitiva por concentración alta de sustrato, donde *sólo una* molécula de sustrato se une a la PLA2 libre para generar un complejo enzima-sustrato improductivo, no conduce a que la concentración de sustrato aparezca como un término de segundo orden (lo que es necesario para describir un comportamiento acampanado), se intentaron ajustar los datos experimentales a modelos cinéticos de inhibición más complejos, implicando a *dos o más* moléculas de PC incorrectamente unidas a la enzima. Así, se proponen dos modelos cinéticos de inhibición competitiva por concentración alta de sustrato: el **modelo 1** se basa en la

improductivo y agregado (probablemente de tipo invertido) de n moléculas de sustrato, y k_1 , k_{-1} y k_p (constante catalítica) son constantes de velocidad. $K_m = k_{-1}/k_1$ se aproxima a la constante de Michaelis-Menten, K_{ag} hace referencia a la constante de disociación para el proceso de agregación del sustrato en medio orgánico, y las constantes de inhibición K_{pc1} , K_{pc2} , K_{pc3} , K_{pc4} y K_{pc} se definen siempre como constantes de disociación. Asumiendo condiciones de estado estacionario, se pueden obtener con facilidad las siguientes ecuaciones de velocidad para el modelo 1:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + \left(1 + \frac{K_m}{K_{pc1}}\right)[S] + \frac{K_m}{K_{pc1}K_{pc2}}[S]^2} \quad (1)$$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + \left(1 + \frac{K_m}{K_{pc1}}\right)[S] + \frac{K_m}{K_{pc1}K_{pc2}}[S]^2 + \frac{K_m}{K_{pc1}K_{pc2}K_{pc3}}[S]^3} \quad (2)$$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + \left(1 + \frac{K_m}{K_{pc1}}\right)[S] + \frac{K_m}{K_{pc1}K_{pc2}}[S]^2 + \frac{K_m}{K_{pc1}K_{pc2}K_{pc3}}[S]^3 + \frac{K_m}{K_{pc1}K_{pc2}K_{pc3}K_{pc4}}[S]^4} \quad (3)$$

y para el modelo 2:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S] + \frac{K_m}{K_{ag}K_{pc}}[S]^n} \quad (4)$$

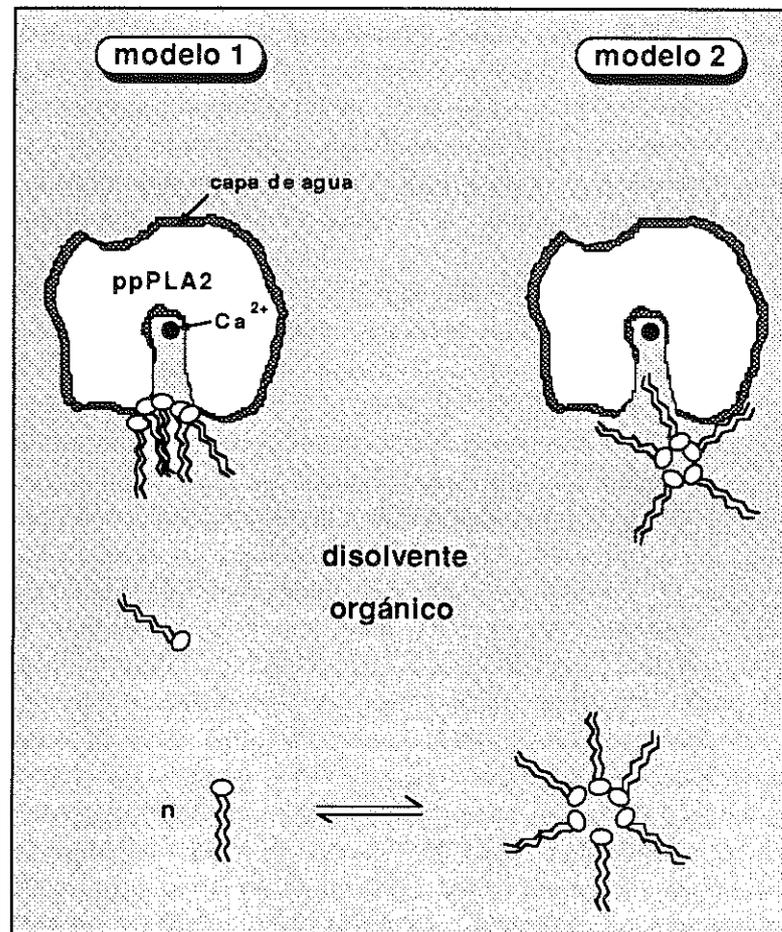
Nótese que en la ecuación (1) sólo el paso 2 está incluido, mientras que en las ecuaciones (2) y (3), se añaden los pasos 3 y 4 respectivamente.

Las curvas de la Figura 3.2A muestran, a modo de ejemplo, los ajustes de regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación (1) (línea de trazo corto), a la ecuación (2) (línea de trazo largo) y a la ecuación (3) (línea continua), todas ellas correspondientes al modelo 1. Como puede verse, el comportamiento del sistema puede ser descrito satisfactoriamente asumiendo una unión competitiva de *más de dos*

moléculas de PC (preferiblemente cuatro). El ajuste de los datos experimentales a la ecuación (3) permitió obtener unos valores de V_{max} y K_m de $1.1 \pm 0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg proteína})^{-1}$ y $23 \pm 3 \text{ mM}$, respectivamente, y de K_{pc1} a K_{pc4} de $(2.3 \pm 0.4) \cdot 10^2$, $(2.4 \pm 0.5) \cdot 10^2$, 21 ± 6 y $0.8 \pm 0.3 \text{ mM}$, respectivamente. Alternativamente, se puede describir también el sistema ajustando los datos experimentales a la ecuación (4) (modelo 2) para $n = 3$ o mejor incluso $n = 4$ (no se muestra el ajuste en la Figura 3.2A porque la curva que se predice para $n = 4$ es prácticamente superponible a la línea continua). En este caso, los valores estimados para V_{max} y K_m son esencialmente los mismos que se obtienen con el modelo 1.

Esta V_{max} obtenida en medio no acuoso es alrededor de un orden de magnitud menor que la obtenida con ppPLA2 en agua usando como sustrato diacilglicerolcolina monomérica (van Oort *et al.*, 1985b) y es del mismo orden que las obtenidas también para ppPLA2 en agua frente a *n*-acilglicol lecitinas monoméricas (van Oort *et al.*, 1985a) o frente a un análogo tioéster de glicol (Bhat *et al.*, 1993a). La menor velocidad de reacción observada con respecto al medio acuoso (incluso comparando sustratos monoméricos) no es sorprendente, ya que para un amplio número de enzimas se ha descrito como norma general un descenso moderado de actividad al pasar de un medio acuoso a un medio orgánico monofásico.

En este punto se requiere un breve comentario acerca de los modelos propuestos para explicar estos datos de inhibición por sustrato (PC). En el modelo 1 se puede apreciar un considerable decrecimiento del valor de la constante de inhibición desde la K_{pc2} hasta la K_{pc4} que podría interpretarse como sugerente de una cierta "cooperatividad" en la unión de moléculas adicionales de PC (presumiblemente en la entrada de la cavidad del centro activo de la enzima) cuando en ella ya se encuentren unidas dos moléculas de sustrato, lo que refleja en cierta medida la conocida tendencia de los fosfolípidos a formar agregados (de tipo invertido) en medios apolares. En este sentido, se podría especular que a concentraciones altas de sustrato la presencia de al menos dos moléculas de PC en la entrada de la cavidad actuaría como un elemento de "nucleación" para congregar más moléculas de sustrato, donde presumiblemente se podrían formar agregados mixtos, a modo de micelas entre algunos residuos de proteína y moléculas de sustrato. Por otro lado, la posibilidad alternativa (aunque no excluyente), que concierne a la previa formación de agregados invertidos de sustratos constituidos por unas pocas moléculas de PC que funcionasen como inhibidores se contempla en el modelo 2 (ver Esquema 3.1). Debe añadirse en este momento que los datos experimentales pueden ser también ajustados con éxito a modelos alternativos no estrictamente competitivos en los que dos o preferiblemente tres moléculas de sustrato se unen secuencialmente al complejo enzima-sustrato ya formado (datos no mostrados).



Esquema 3.1. Representación esquemática de los dos posibles modelos de inhibición por concentración alta de sustrato.

De cualquier forma, todos los modelos ensayados que describen el comportamiento experimental tienen en común la participación de varias moléculas de sustrato (simultáneamente unidas a la molécula de ppPLA2) en el mecanismo de inhibición, lo cual apoya de alguna forma una restricción en el acceso de los sustratos (o en la eliminación de los productos de reacción) a través del canal que conduce al centro activo. Interesantemente en este sentido, esta tendencia postulada de los sustratos a formar agregados en la entrada de la cavidad de unión no es estrictamente nueva ya que se ha descrito con anterioridad que detergentes aniónicos (análogos de fosfolípidos) a concentraciones premicelares tienen tendencia a unirse con alta afinidad al dominio de

unión a lípido de la PLA2 pancreática (predominantemente a través de interacciones electrostáticas con residuos cargados positivamente) y a aglomerarse formando agregados premicelares proteína-lípido (van Oort *et al.*, 1985a). Además, conviene recordar que, debido a la baja constante dieléctrica de los medios orgánicos en los que se han obtenido los datos, la interacción entre residuos de la enzima y la cabeza polar zwitteriónica de la fosfatidilcolina debe estar potenciada con respecto a la interacción que tendría lugar en agua.

Algunas experiencias adicionales en relación con la actividad hidrolítica de la PLA2 que igualmente merecen ser mencionadas hacen referencia al efecto de la longitud de cadena de ácido graso del sustrato. Se ensayó comparativamente la hidrólisis en cloroformo saturado de L- α -DSPC, L- α -DMPC, y L- α -DDPC, obteniéndose en todos los casos una dependencia acampanada de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato, de forma similar a la expuesta en la Figura 3.2A, lo que permitió la estimación de los valores de V_{max} y K_m de forma similar a la descrita anteriormente para la PC. Curiosamente, no se encontraron diferencias significativas en los valores de K_m respecto del valor para la PC. En cambio se observó un notorio incremento del valor estimado para la V_{max} de sustratos cortos [2.7 ± 0.4 mmol·min⁻¹·(mg de proteína)⁻¹ para L- α -DDPC] con respecto a L- α -DDPC y L- α -DSPC [1.0 ± 0.3 y 0.8 ± 0.2 mmol·min⁻¹·(mg de proteína)⁻¹, respectivamente] o al valor para la PC dado anteriormente. Por otro lado, cabe añadir que también se obtuvo un comportamiento similar de inhibición por concentración de sustrato para otros fosfolípidos de diferente cabeza polar (PE y PS).

De cualquier modo, una explicación a nivel molecular de este fenómeno de inhibición no es inmediata. Estudios recientes de RMN han sugerido que la dipalmitoilfosfatidilcolina puede formar micelas reversas en cloroformo, siendo el valor de su cmc de aproximadamente 6 mM (Datta *et al.*, 1992). En nuestro caso, la posibilidad de incorporación de una fracción de enzima a micelas reversas es escasa debido a que la relación molar agua/lípido (w_0) es muy pequeña en el sistema. Más aún, el polvo de enzima permanece claramente como una suspensión particulada a medida que transcurre la reacción, no detectándose proteína "solubilizada" en medidas espectrofotométricas de filtrados (a través de filtros de 0.22 μ m) de alícuotas de la suspensión tomadas a distintos tiempos.

3.1.3. Efecto de la concentración de producto

Debido a la semejanza estructural que presentan la PC y la LPC, se podría esperar que la actividad enzimática también se viese afectada por la presencia de este producto de reacción. La Figura 3.2B muestra que éste es en efecto el caso, la presencia de LPC en el medio de reacción inhibe de forma bastante severa (nótese que a 80 mM de LPC la velocidad de reacción es prácticamente nula) la actividad hidrolítica de la pPLA2. Si de

nuevo se intentan ajustar los datos de inhibición por producto a modelos donde *sólo una* molécula de LPC se una a la enzima, los resultados son muy pobres (datos no mostrados), de modo que muy probablemente en esta inhibición también puedan estar implicadas varias moléculas de producto en mecanismos más complejos. Por lo que respecta al efecto del otro producto de reacción (ácido graso), la inhibición a concentraciones elevadas de ácido palmítico resultó ser mucho menos pronunciada que para la PC o la LPC (datos no mostrados).

3.1.4. Termoestabilidad

Se ha mostrado que, en general, las enzimas exhiben una estabilidad térmica notoriamente potenciada cuando se encuentran en medios casi anhidros, lo que se ha demostrado que es debido a un incremento de la rigidez conformacional y a una minimización de procesos covalentes indeseables en los que participa directamente el agua (desamidaciones, hidrólisis del enlace peptídico en ciertas posiciones de la secuencia y ruptura alcalina de puentes disulfuro, ver Figura 1.1).

Como muestra la Figura 3.3, éste también fue el caso de la ppPLA2, la cual demostró una notable estabilidad térmica cuando se incubó a 100°C en *n*-octano anhidro, en claro contraste con la desnaturalización casi instantánea que sufre al ponerla en un medio acuoso a la misma temperatura (datos no mostrados).

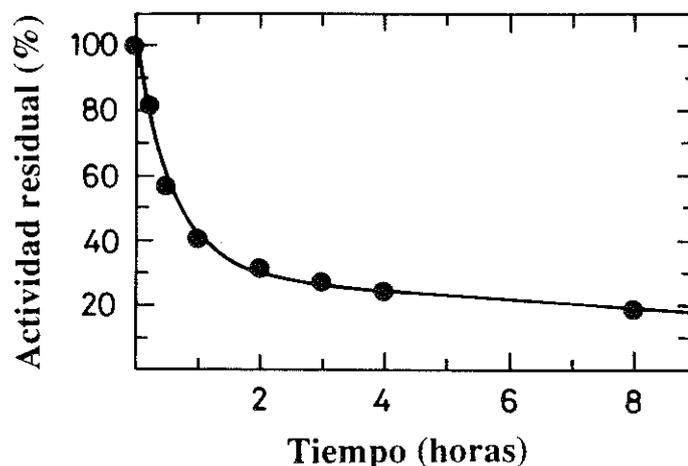


Figura 3.3. Termoestabilidad de la ppPLA2 en *n*-octano anhidro a 100°C. Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad residual en función del tiempo de incubación a 100°C. Los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea mostrada es el resultado del ajuste de estos datos a una función doble exponencial (ver el texto).

De la observación de esta Figura se desprende que la inactivación térmica en disolvente anhidro puede describirse por un proceso aparentemente bifásico, resultado similar al aportado recientemente por Ottolina *et al.*, (1992) para la lipoproteína lipasa en tolueno anhidro a 90°C. De hecho, al usar un modelo de inactivación irreversible los datos experimentales se ajustaron a una función doble exponencial, con valores de constantes de velocidad de $(5.0 \pm 0.7) \cdot 10^{-4}$ y $(1.8 \pm 0.6) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

Sin embargo, como se ha postulado anteriormente (Garza-Ramos *et al.*, 1990), esta estabilidad térmica potenciada no implica necesariamente que las velocidades de reacción en medios orgánicos tengan que aumentar a elevadas temperaturas. En este sentido, se estudió la actividad hidrolítica de la ppPLA2 en cloroformo presaturado (Figura 3.4), observándose un máximo de actividad a temperaturas moderadas (alrededor de 30°C), temperatura próxima al valor máximo de actividad recientemente aportado por Bhat *et al.*, (1993a) para una actividad ppPLA2 en agua, frente a análogos de sustrato en forma monomérica. Así, debido al significativo nivel de actividad hidrolítica a 25°C se escogió esta temperatura como rutinaria en este trabajo, coincidiendo con la usada en la mayoría de estudios en medios acuosos.

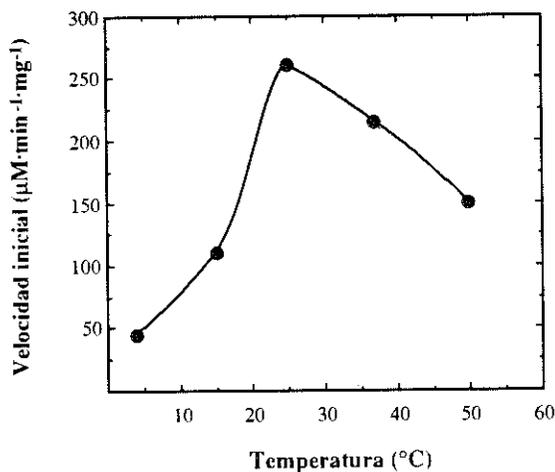


Figura 3.4. Efecto de la temperatura en la hidrólisis de PC en cloroformo presaturado catalizada por la ppPLA2. La concentración de sustrato fue 5 mM.

3.1.5. Especificidad de sustrato

Se ha descrito con anterioridad que la actividad hidrolítica de las PLA2s de diferentes fuentes depende en gran medida de la naturaleza y el estado físico del sustrato

fosfolípido. En particular, es sabido que la ppPLA2 exhibe una clara preferencia hacia los fosfolípidos aniónicos con respecto a los neutros tanto en liposomas como en monocapas o micelas mixtas con detergentes (Pluckthun & Dennis, 1985; Thuren *et al.*, 1987; Ghomashchi *et al.*, 1991), e incluso a concentraciones premicelares (van Oort *et al.*, 1985b; Jain & Berg, 1989). Dado que se ha descrito para algunas enzimas que su especificidad de sustrato puede verse alterada profundamente en medios orgánicos, en el presente caso resultaba interesante conocer si la selectividad de la PLA2 hacia la cabeza polar de los fosfolípidos podía verse modificada en medio no acuoso respecto de lo que ocurre en agua. La Figura 3.5 muestra las cinéticas de hidrólisis de PC, PE, PI, CL, PS y PG, catalizada por ppPLA2 en cloroformo presaturado.

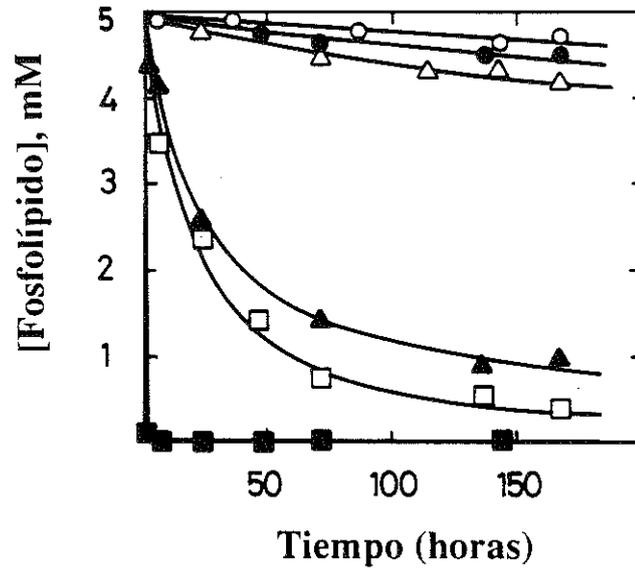


Figura 3.5. Cinéticas de hidrólisis catalizada por ppPLA2 de distintos fosfolípidos en cloroformo presaturado con agua. La concentración inicial de los fosfolípidos sustrato fue en todos los casos 5 mM. (○) PG; (●) PS; (△) PE; (▲) CL; (□) PI; y (■) PC.

Como puede verse, la PC fue rápidamente convertida (*ca.* 2 horas) en su liso-derivado, mientras que PI y CL fueron hidrolizadas mucho más lentamente (se necesitaron más de 50 y 100 horas respectivamente para conseguir un 80% de conversión). Por lo que respecta a PE, PG y PS, la conversión después de 200 horas de incubación fue menor al 20%. Así, el orden de prelación creciente en este entorno de bajo contenido en agua fue: PG $[(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}] \approx$ PS $[(2.0 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}] <$ PE $[(3.1 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}] \ll$ CL $[(4.5 \pm 0.8) \cdot 10^{-6}] <$ PI $[(7.8 \pm 1.0) \cdot 10^{-6}] \ll$ PC $[(4.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-4}]$.

Los números entre corchetes corresponden a los valores de la constante de velocidad de primer orden (s^{-1}) obtenidos por los ajustes de los datos de la Figura 3.5. Este orden obtenido difiere bastante del que se observó en un experimento en paralelo en agua (datos no mostrados) usando como sustratos micelas mixtas de fosfolípido/TX-100 (relación molar 1:2): PE < PC < PI < CL \approx PG < PS, el cual es consistente con el previamente mostrado por Thuren *et al.*, (1987) usando pirenil fosfolípidos como sustratos. Nótese que en medio no acuoso la constante de velocidad de hidrólisis puede llegar a ser significativamente más alta (hasta tres ordenes de magnitud) para la PC que para los fosfolípidos aniónicos, mientras que en disolución acuosa la velocidad es sólo un orden de magnitud mayor para los fosfolípidos aniónicos que para los sustratos neutros (Thuren *et al.*, 1987).

Como se ha descrito anteriormente, se ha demostrado para algunas enzimas que la sustitución del medio de reacción acuoso por uno orgánico puede comportar cambios en la especificidad de sustrato o enantioselectividad (a modo de ejemplo, ver Gololobov *et al.*, 1992 y Tawaki & Klivanov, 1992). Esta aproximación, conocida como "ingeniería del medio (disolvente)" se ha propuesto como una alternativa complementaria a la "ingeniería de proteínas" (estrategia más extensamente usada) para controlar diversas propiedades enzimáticas (Klivanov, 1989; Wescott & Klivanov, 1994). Aunque se han llevado a cabo varios esfuerzos destinados a modificar la actividad, estabilidad o especificidad de sustrato de la PLA2 por ingeniería de proteínas [ver por ejemplo, Noel *et al.*, 1991; Weiss *et al.*, 1991; Dupureur *et al.*, 1992; Sekharudu *et al.*, 1992 y Bhat *et al.*, 1993b], ésta es la primera vez que se describe un cambio en la especificidad de sustrato para la PLA2 basado en la ingeniería del medio de reacción. En medio no acuoso (ver Figura 3.5), la actividad hidrolítica de la enzima hacia un fosfolípido neutro, y zwitteriónico tal como la PC es notablemente mayor que hacia un sustrato aniónico, lo cual es claramente opuesto a lo que ocurre en agua frente a los mismos sustratos (Thuren *et al.*, 1987), o incluso para análogos de fosfolípidos a concentraciones submicelares (van Oort *et al.*, 1985b).

Aunque se han realizado intentos con otras enzimas (proteasas principalmente), tratando de explicar racionalmente los cambios observados en la especificidad de sustrato al colocar la enzima en medio orgánico (Gololobov *et al.*, 1992 y las referencias allí incluidas), en el caso de la PLA2 una interpretación de los resultados no resulta sencilla y para llevarla a cabo, se deberían tener en cuenta algunas consideraciones. En primer lugar, la observación de los resultados de la Figura 3.5 parece indicar que la carga neta de los sustratos (negativa *vs* cero) no es un factor especialmente determinante de la preferencia de la enzima. En este sentido, los razonamientos argumentados para explicar la marcada preferencia de la ppPLA2 en disoluciones acuosas hacia fosfolípidos cargados negativamente (incluso por debajo de la cmc), basados en que la enzima presente una interacción favorecida (activación) hacia estos sustratos frente a los neutros, no parecen

aplicables en el caso de los entornos con bajo contenido en agua. Es de resaltar que la ppPLA2 en medio orgánico pierde la posibilidad de ser "activada" tanto por un cambio conformacional de la proteína (modelo de la enzima), debido a la restringida movilidad conformacional que le confiere el medio, como por una orientación propia del sustrato que facilite su difusión hacia el interior de la enzima (modelo del sustrato) debido a que éste se presenta en forma monomérica en medio orgánico. Tampoco el tamaño de los sustratos parece ser un factor determinante. No puede descartarse, sin embargo, que la distinta constante dieléctrica del medio o el grado de hidratación efectiva de las diferentes cabezas polares pueda afectar de forma importante las interacciones electrostáticas para el acceso del sustrato hasta el centro catalítico. Por otro lado, este orden de preferencia alterado en ambientes no acuosos podría generarse, al menos en parte, por la aparentemente mayor tendencia que tienen los fosfolípidos que son hidrolizados más lentamente a formar agregados de micelas invertidas en disolventes apolares, los cuales podrían reducir la concentración real de sustrato monodisperso accesible a la enzima. De hecho, existen datos de medidas de HPLC de exclusión molecular (Bañó et al., 1988 y otros datos no publicados de nuestro laboratorio) que sugieren que fosfolípidos como por ejemplo PS y PE, forman en disolvente orgánico (el eluyente de cromatografía) agregados más estables con valores de cmc aparente más bajos que otros como PC y CL. De cualquier forma, una interpretación detallada de los cambios en la especificidad de sustrato observados en la PLA2 es complicada, teniendo en cuenta la peculiar naturaleza tanto de la enzima como de sus sustratos anfífilicos.

Desde el punto de vista aplicado, la observación de estos datos muestra que la enzimología en medio no acuoso supone una vía simple para la hidrólisis selectiva de mezclas de fosfolípidos (por ejemplo, hidrólisis de PC en presencia de PE y PS) con escalas de tiempos razonables y con las ventajas añadidas de la fácil eliminación de los disolventes y la separación y posible reutilización de los biocatalizadores.

3.1.6. Reutilización e inmovilización de la enzima

Una de las ventajas inherentes a la utilización de enzimas suspendidas en forma particulada en medios monofásicos *cuasi* anhidros, debido a su estabilidad en el medio de reacción, es la posibilidad de ser reutilizadas (después de filtradas, lavadas con un disolvente apolar anhidro y secadas a vacío). La ppPLA2 en estas condiciones se mostró activa después de varias reutilizaciones sin una pérdida significativa en su capacidad catalítica. Por otro lado, la inmovilización de PLA2 sobre bolitas de vidrio de poro controlado supuso un aumento en la velocidad de hidrólisis de unas 4 veces con respecto a la actividad de la enzima suspendida en forma particulada. Dado que en un disolvente orgánico las propiedades del soporte pueden influir en la actividad catalítica de la enzima adsorbida (Adlercreutz 1991), esta mayor actividad de la enzima inmovilizada puede

atribuirse tanto al incremento de la actividad del agua (recuérdese que el soporte es hidrofílico) como a la disminución de los problemas de difusión interna del biocatalizador inmovilizado.

3.2. ACTIVIDAD SINTÉTICA (ACILANTE) DE PLA2 EN MEDIO ORGÁNICO MONOFÁSICO

Los resultados previos, en particular la marcada inhibición observada para la reacción de hidrólisis a concentraciones moderadamente altas de sustrato y especialmente la severa inhibición que genera el producto LPC, llevan lógicamente a reconsiderar las condiciones experimentales de síntesis de PC mediada por PLA2 suspendida en un medio de reacción monofásico anhidro empleadas previamente por otros autores, y que como se mencionó anteriormente no son en absoluto satisfactorias en términos de rendimiento de reacción (Pernas *et al.*, 1990). Por ello, se realizó un análisis sistemático de la influencia de una serie de variables con el objeto de comprender mejor los requerimientos de la actividad acilante de la PLA2 para diseñar las condiciones que mejoren ésta en términos de velocidad y rendimiento de reacción.

3.2.1. Efecto de la concentración de LPC

El inserto de la Figura 3.6A muestra, a modo de ejemplo, las cinéticas de esterificación de ácido oleico y LPC catalizadas por ppPLA2 en tolueno anhidro, para varias concentraciones de lisofosfolípido. Como puede apreciarse, las reacciones proceden en todos los casos lentamente, aunque a mucha menor velocidad en los casos de concentraciones de LPC moderadas y altas. En experimentos control en los que no se añadió enzima no se detectó formación de PC ni en los tiempos más largos de incubación. De nuevo, cuando se representó la velocidad inicial de síntesis de fosfolípido en función de la concentración de LPC (a concentración constante de ácido oleico) se obtuvo una curva acampanada con un máximo de actividad alrededor de 7 mM de LPC (Figura 3.6A), la cual muestra cómo la actividad acilante de la ppPLA2 está fuertemente inhibida por la concentración del, ahora sustrato, lisofosfolípido.

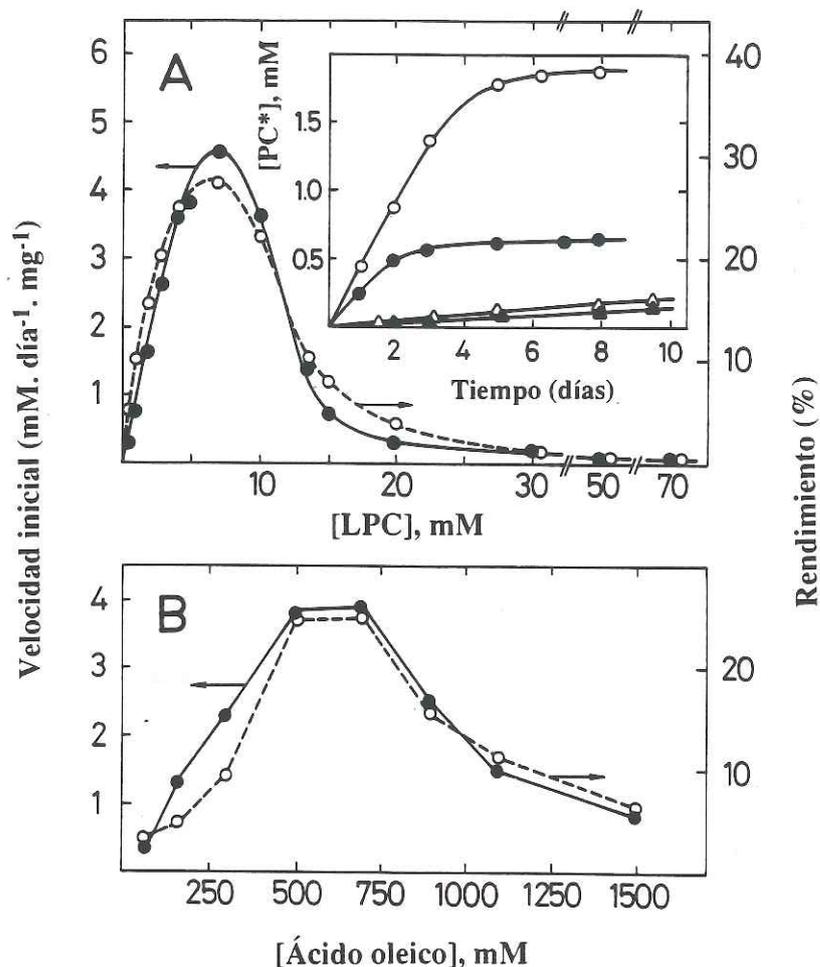


Figura 3.6. (A) Variación de la velocidad inicial de esterificación de LPC y ácido oleico por la ppPLA2 con la concentración del sustrato LPC en tolueno anhidro. La concentración del ácido oleico fue de 500 mM. El inserto muestra, a modo de ejemplo, las cinéticas de acilación para algunas concentraciones diferentes de LPC: (●) 3; (○) 7; (Δ) 30; y (▲) 70 mM. PC* simboliza la fosfatidilcolina sintetizada. (B) Dependencia de la velocidad inicial de acilación con la concentración de ácido oleico. La concentración de LPC fue 5 mM.

De nuevo no resulta sorprendente que los intentos por ajustar los datos a mecanismos de inhibición complejos sugieran la participación de varias moléculas de sustrato (LPC en este caso). Por otro lado, en estas experiencias el rendimiento de la conversión después de períodos largos de incubación (ocho días) refleja también un comportamiento acampanado frente a la concentración de LPC (por ejemplo, alrededor

del 1% para 70 mM de LPC). Esto no es sorprendente dado que a elevadas concentraciones de LPC las reacciones de esterificación se encuentran muy impedidas cinéticamente y lejos del equilibrio incluso tras una semana de incubación (lo que se comprobó en experiencias adicionales con muestras incubadas durante más de un mes). Sin embargo, en condiciones óptimas de síntesis (LPC 7 mM y ácido oleico 500 mM) se obtuvo fácilmente rendimientos de alrededor del 27%, que mejoran ampliamente los obtenidos por Pernas *et al.*, (1990), de tan sólo un 1.3 % usando también una PLA2 de páncreas porcino suspendida en el mismo disolvente de reacción.

Debido a la relativa semejanza estructural entre PC y LPC, se podría extender, para el caso de la inhibición por LPC en la reacción de esterificación, el razonamiento expuesto anteriormente para la inhibición por PC en la reacción de hidrólisis, aunque en el caso de la acilación el evento catalítico en sí es lógicamente aún más complicado ya que requiere la correcta disposición y coincidencia de ambas moléculas de sustrato (LPC y ácido graso) en la cavidad donde se ubica el centro activo de la enzima. Así, también podría pensarse en la existencia de una tendencia a formar agregados entre la LPC (con o sin ácidos grasos) y residuos de proteína situados en las proximidades de la entrada a la cavidad catalítica, y además la constante dieléctrica del tolueno anhidro es todavía menor que la del cloroformo presaturado, lo que podría potenciar aún más estas interacciones entre los residuos proteicos y la cabeza polar de los lisosfosfolípidos.

Una explicación plausible para este fenómeno global de inhibición podría buscarse ambiciosamente, en la naturaleza peculiar tanto de la enzima como de los sustratos. De hecho, se ha demostrado en base a datos cristalográficos (Thunnissen *et al.*, 1990; White *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1991), la existencia en PLA2s de distintas fuentes de un "estrecho" canal hidrofóbico que flanquea el acceso de los sustratos hacia el sitio catalítico que contiene el Ca^{2+} , situación que debe esperarse que se mantenga en el medio orgánico *cuasi*-anhidro debido a la rigidez conformacional y a las evidencias de integridad del centro catalítico en estos entornos obtenidos con otras enzimas (Fitzpatrick *et al.*, 1993). Podría sugerirse que, a concentraciones de sustrato moderadas o altas, la acumulación de moléculas de sustrato compitiendo entre ellas por la entrada en el canal (o impidiendo la salida del producto) podría generar un decrecimiento efectivo de la velocidad de reacción. Además, la rigidez de la proteína en el ambiente anhidro puede imponer restricciones geométricas estrictas para la entrada productiva de los sustratos en orientación adecuada a través del canal hidrofóbico.

3.2.2. Efecto de la concentración de ácido graso

También se optimizaron las condiciones con respecto a la concentración de ácido graso, utilizando para ello ácido oleico (Figura 3.6B). Se obtuvo un rango óptimo de concentraciones, entre 500 y 700 mM. Cuando se usó ácido oleico puro como medio de

reacción no se detectó síntesis de PC. Además, la reacción es reversible como se demostró por adición de una pequeña cantidad de ácido oleico radiactivo (un 1% de la concentración total de ácido) a muestras que se encontraban ya en el equilibrio (conteniendo LPC 7 mM y ácido oleico 500 mM, después de 10 días de incubación) obteniéndose como resultado la aparición de PC marcada radiactivamente, detectada después de la separación de lípidos en TLC y posterior autorradiografía de la placa, comprobándose además por HPLC que la concentración total de PC antes y después de la incubación con el oleico radiactivo no se mostraba incrementada.

3.2.3. Efecto de la temperatura

Debido en parte a los pocos estudios existentes acerca de la temperatura óptima para la catálisis enzimática en medios predominantemente no acuosos (ver Khemelnitsky *et al.*, 1988 y Garza-Ramos *et al.*, 1990) y en parte a nuestra propia experiencia en la reacción hidrolítica, se pasó a estudiar el efecto de la temperatura de incubación en la reacción de acilación de LPC mediada por ppPLA2. Como puede verse en la Figura 3.7, se encontró un óptimo de temperatura alrededor de 50°C. Sin embargo, llevar a cabo las reacciones a esta temperatura no supuso una mejora significativa del rendimiento máximo respecto al rendimiento obtenido a temperatura ambiente, por lo que en general, se trabajó a temperatura ambiente con objeto de minimizar posibles evaporaciones de los medios de reacción.

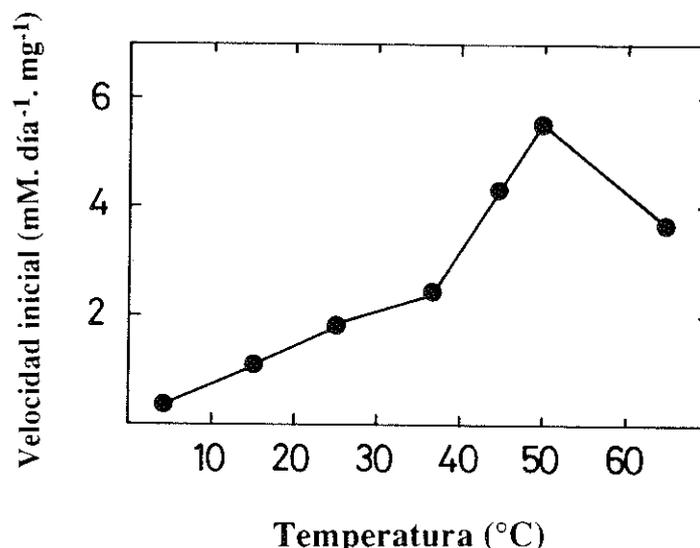


Figura 3.7. Efecto de la temperatura de incubación sobre la velocidad inicial de esterificación de LPC y ácido oleico catalizada por ppPLA2 en tolueno anhidro. Las concentraciones de LPC y ácido oleico fueron 5 y 315 mM, respectivamente.

3.2.4. Efecto de los disolventes orgánicos

Dado el conocido efecto de la naturaleza del disolvente sobre la velocidad de reacción en medios orgánicos en general, se comprobó la actividad acilante de la PLA2 en distintos disolventes orgánicos anhidros tanto miscibles como inmiscibles con el agua. Los resultados que aparecen en la Tabla 3.II muestran cómo las velocidades de reacción más elevadas (y también los mayores rendimientos, datos no mostrados) se alcanzan en los hidrocarburos aromáticos, de acuerdo con los datos previos de Pernas *et al.*, (1990). Sin embargo, en contraste con sus resultados, la PLA2 también demostró ser activa en otros muchos disolventes (incluido el cloroformo) al optimizar las condiciones de reacción.

Tabla 3.II: Velocidad inicial de esterificación entre LPC y ácido oleico mediada por ppPLA2 en medios orgánicos monofásicos^a.

	log P	mM·día ⁻¹ ·mg ⁻¹
<i>n</i> -Octano	4.50	0.88
Tolueno	2.50	4.50
Benceno	2.00	1.86
Cloroformo	1.97	0.31
Eter isopropílico	1.90	0.14
Alcohol <i>tert</i> -amílico	1.30	0.12
Eter etílico	0.85	0.42
Acetato de etilo	0.68	0.20
Tetrahidrofurano	0.49	0.14
Acetonitrilo	-0.33	0.00
Dioxano	-1.10	0.17

^aCondiciones: todos los disolventes fueron anhidros (ver Materiales y Métodos). Las concentraciones de LPC y ácido oleico fueron 7 y 500 mM, respectivamente.

Como cabría esperar, el descenso de actividad enzimática se correlaciona razonablemente con el aumento de la polaridad del disolvente (Zaks & Klivanov, 1988a).

Cabe decir además que la presaturación del tolueno con agua aumentó la velocidad de esterificación a costa de disminuir el rendimiento, lo que podría explicarse debido a que el agua es un producto de la reacción que desplazaría el equilibrio desfavorablemente. Es digno de resaltar que en benceno anhidro se obtuvo el mayor rendimiento, que llegó a ser de hasta un 35%.

3.2.5. Efecto de la longitud de cadena y del grado de insaturación del ácido graso

Como última variable del estudio de la capacidad de acilación de la ppPLA2 se consideró variar la naturaleza del ácido graso incorporado. Con este propósito, se ensayaron bajo las condiciones óptimas descritas anteriormente ácidos grasos saturados que diferían en la longitud de su cadena hidrocarbonada, así como ácidos grasos con la misma longitud de cadena pero distinto grado de insaturación. Los resultados en términos de velocidades de esterificación se resumen en la Figura 3.8. Curiosamente, para la serie saturada la velocidad de esterificación se redujo drásticamente con el incremento de la longitud de cadena del ácido graso, siendo casi despreciable para el ácido esteárico. Sin embargo, para esta misma longitud de cadena la introducción de una única insaturación (ácido oleico) convirtió al ácido graso en un sustrato mucho más competente. Un posterior incremento del número de insaturaciones (ácidos linoleico y linoléico) no condujo a un cambio significativo en la velocidad de esterificación. Finalmente, cuando se usó como sustrato el éster etílico del ácido palmítico en lugar del propio ácido palmítico no hubo síntesis detectable de PC después de varios días de incubación.

Estos resultados parecen consistentes con la interpretación de que durante la acilación deberían coincidir las moléculas de LPC y de ácido graso en la cavidad de la enzima en el momento de la catálisis, por lo que puede ser lógico pensar que cuanto más corta sea la cadena de ácido graso con mayor facilidad podría darse la coincidencia (espacio-temporal) con la LPC y por ende la catálisis, lo que parece verse apoyado por los datos experimentales (Figura 3.8). De hecho, la velocidad de esterificación para el ácido esteárico fue extremadamente lenta, lo que podría explicarse en base a su longitud y flexibilidad de cadena que podrían dificultar un cómodo desplazamiento a través del canal hidrofóbico que precede a la maquinaria catalítica del centro activo. En este sentido, la introducción de una o más insaturaciones en la molécula de ácido graso, al aportar mayor rigidez o inflexibilidad, podría esperarse que redujese las restricciones estéricas de paso a través del canal y potenciase la velocidad de síntesis, como de hecho parece ser el caso (Figura 3.8).

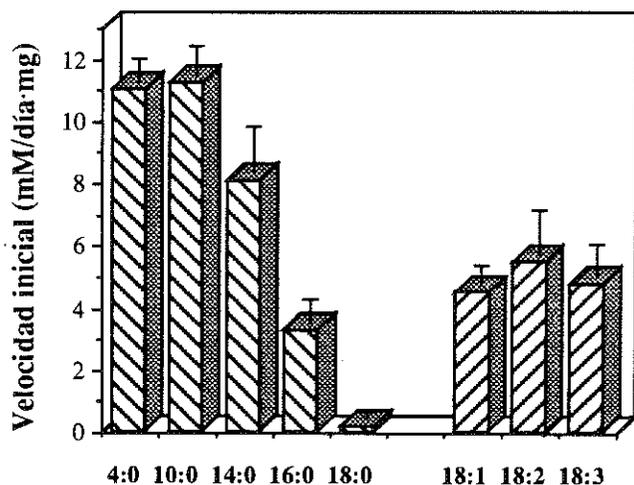


Figura 3.8. Comparación de las velocidades iniciales de acilación de LPC catalizada por ppPLA2 en tolueno anhidro para diferentes ácidos grasos saturados e insaturados: ácido butírico (4:0); ácido cáprico (10:0); ácido mirístico (14:0); ácido palmítico (16:0); ácido esteárico (18:0); ácido oleico (18:1); ácido linoleico (18:2); y ácido linolénico (18:3). La concentración de LPC usada fue 7 mM y la de los ácidos grasos 500 mM.

Finalmente, merece la pena un breve comentario en lo referente a los rendimientos de reacción. Una visión comparativa de los intentos de síntesis de PC mediada por PLA2 deja entrever la dificultad de esta reacción: así, el rendimiento máximo de síntesis para ppPLA2 en micelas reversas de AOT se situó en el 6% (Na *et al.*, 1990) y en un sistema de enzima en suspensión en el 1.3% (Pernas *et al.*, 1990) (en este último caso, la concentración de LPC utilizada para obtener el rendimiento máximo fue de 70 mM en tolueno anhidro). En nuestro caso, el rendimiento máximo llegó a ser del 35%, lo que supone un incremento de 6 y 27 veces con respecto a los sistemas micelar y heterogéneo, respectivamente. Ya ha sido explícitamente comentado con anterioridad (Na *et al.*, 1990), que las esterificaciones y transesterificaciones mediadas por PLA2 no son tan fáciles como la conversión de triglicéridos mediada por lipasas. Esta diferencia podría deberse no sólo a la restricción estérica impuesta por el canal de acceso al centro catalítico de la fosfolipasa, sino también a las diferencias del mecanismo general de catálisis que tienen ambos tipos de enzimas (Waite 1985 y 1987), ya que en el caso de las lipasas el centro catalítico contiene una serina reactiva que no forma parte del centro activo de las fosfolipasas. El presente trabajo muestra hasta qué punto puede ser contraproducente intentar aliviar estas dificultades (como por ejemplo, en este caso, un aumento indiscriminado de la concentración de sustrato con objeto de desplazar el

equilibrio de la reacción en el sentido de la síntesis) sin un análisis sistemático del comportamiento de la enzima.

Por otro lado, en cuanto a una posible relevancia fisiológica de la capacidad acilante de la PLA2, dado que las PLA2s celulares operan en las superficies de las membranas donde la actividad del agua puede estar localmente disminuida, la cuestión de si bajo ciertas condiciones estas enzimas pueden ciertamente catalizar reacciones de transacilación permanece abierta. En cualquier caso, esta aproximación experimental en medios con bajo contenido en agua también podría extenderse en el futuro a la evaluación de la capacidad sintética (acilante o transacilante) de otras enzimas, capaces de llevar a cabo síntesis de fosfolípidos independiente de CoA y ATP (Gross & Sobel, 1982; Kramer & Deykin, 1983).

3.3. ACTIVACIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS

En los últimos años se han realizado grandes esfuerzos encaminados a aumentar la actividad enzimática en medios orgánicos, de los que cabe destacar la modificación química, la inmovilización, la ingeniería de proteínas y la ingeniería del medio. Recientemente, se ha abierto una nueva vía para potenciar la actividad biocatalítica en estos medios conocida como impresión molecular. La impresión molecular que se propone en este trabajo para enzimas lipolíticas se basa en la combinación de dos aspectos importantes, por un lado los cambios conformacionales (que implican un incremento de la accesibilidad del sustrato y la inducción de una red catalítica más competente) asociados a la activación de estas enzimas en interfases lípido/agua, y por otro la rigidez conformacional drásticamente exaltada que exhiben las proteínas en medios con bajo contenido en agua.

3.3.1. Activación de PLA2

Se comenzó por investigar la posibilidad de activar enzimas lipolíticas aplicando la estrategia de impresión molecular a la PLA2, para ambas actividades enzimáticas (desacilante y acilante) caracterizadas previamente en medio no acuoso. Para la impresión, la enzima se incubó en medio acuoso previo a la congelación y liofilización (ver Materiales y métodos) con anfífilos de variada naturaleza.

En un rastreo preliminar, se ensayaron diferentes detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos, así como fosfolípidos sustrato tanto naturales como sintéticos, de los que se tuvo que confirmar la solubilidad en los disolventes de lavado con objeto de eliminar las moléculas molde en este proceso y con ello asegurarnos de su ausencia en el medio orgánico de reacción. Para el caso de la actividad desacilante, la Figura 3.9A muestra, a modo de ejemplo, el gran incremento en la velocidad de reacción

para la hidrólisis de PC en cloroformo presaturado (reacción modelo) cuando se usó la ppPLA2 impresa en presencia de LPC o *n*-octil- β -D-glucopiranosido (*n*-OG) con relación a las correspondientes preparaciones de enzima control incubado previamente en agua en ausencia de detergente alguno en el medio.

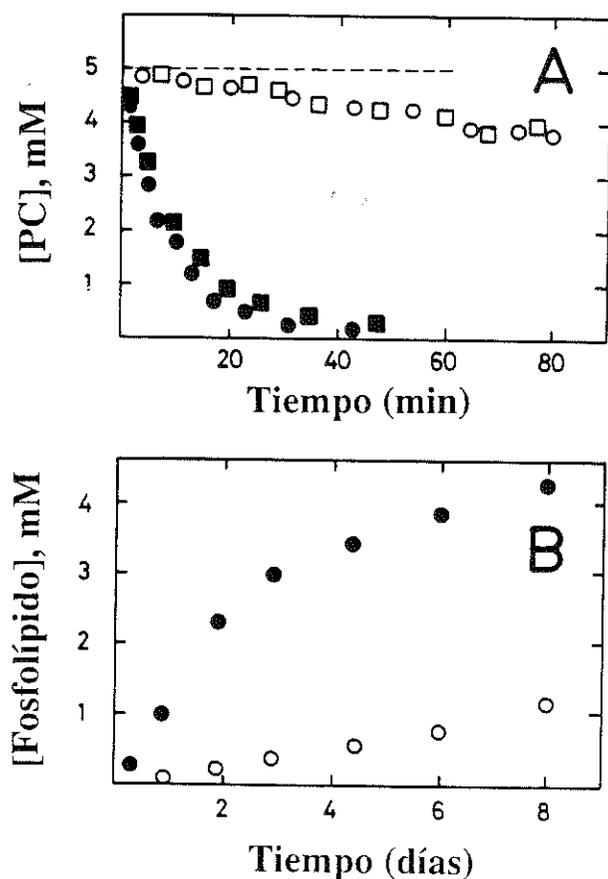


Figura 3.9. Comparación del efecto de la impresión molecular en las cinéticas de las reacciones de desacilación y acilación catalizadas por ppPLA2 en medio no orgánico. (A) Hidrólisis de PC (5 mM) en cloroformo presaturado con agua usando enzima no impresa (símbolos vacíos, diferentes experimentos) y enzima impresa con LPC 3 mM (●) o con *n*-OG 40 mM (■). (B) Síntesis de fosfatidilcolina mediada por ppPLA2 a partir de LPC 30 mM y ácido oleico 500 mM en tolueno anhidro, usando la enzima no impresa (○) o impresa con LPC 3 mM (●). Deliberadamente en este caso, dado que el anfífilo molde empleado era también sustrato de la reacción no fue requerido el proceso de lavado para eliminar la molécula impresora.

Por lo que respecta a la reacción de acilación, se examinaron las consecuencias de la impresión de la ppPLA2 en la síntesis de fosfatidilcolina usando la esterificación de LPC y ácido oleico en tolueno anhidro como reacción modelo. Esta reacción, como se ha visto, está fuertemente inhibida para concentraciones de LPC moderadas y altas, hecho que al menos parcialmente puede deberse a ese acceso restringido del sustrato al centro activo de la enzima a través del estrecho canal hidrofóbico al que se ha hecho referencia anteriormente. La Figura 3.9B muestra cómo esta inhibición puede aliviarse significativamente usando la ppPLA2 impresa con LPC en lugar de la enzima sin tratamiento de impresión previo.

3.3.1.1. Efecto de la concentración de anfífilo

Seguidamente, se investigó la dependencia de la respuesta de la ppPLA2 en medio orgánico a la impresión en función de la concentración de detergente en agua, para la reacción hidrolítica modelo. De acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo, debido a que la activación de las enzimas lipolíticas tiene lugar en presencia de interfases anfífilo/agua, debería observarse un incremento en el factor de activación (FA, definido como la relación de velocidades iniciales en disolvente orgánico para las enzimas impresa y no impresa) al sobrepasarse la cmc. La Figura 3.10A muestra la variación del grado de impresión de la ppPLA2 en función de la concentración de *n*-OG (cmc en el rango de milimolar) en el medio acuoso tamponado, donde puede apreciarse el esperado incremento una vez superado el valor de concentración correspondiente a la cmc. Este efecto, en cambio, no pudo apreciarse en el caso en que se usó como molécula impresora la LPC (Figura 3.10B) ya que su cmc se sitúa en el rango de micromolar, aunque la activación encontrada fue también saturable a concentraciones suficientemente por encima de la cmc. Una inspección más detallada de la curva sigmoide obtenida para el *n*-OG revela una capacidad nada despreciable de los monómeros de detergente para imprimir la enzima. No es extraño que esto ocurra ya que los monómeros del anfífilo podrían unirse al sitio activo de la enzima pudiendo de alguna forma "ajustar" su conformación de un modo similar a lo que ocurre con las proteasas impresas con un inhibidor competitivo (Russell & Klibanov, 1988; Ståhl *et al.*, 1990 y 1991), aunque de cualquier forma la activación (impresión) observada a concentraciones premicelares es claramente menor que la producida cuando las interfases están presentes.

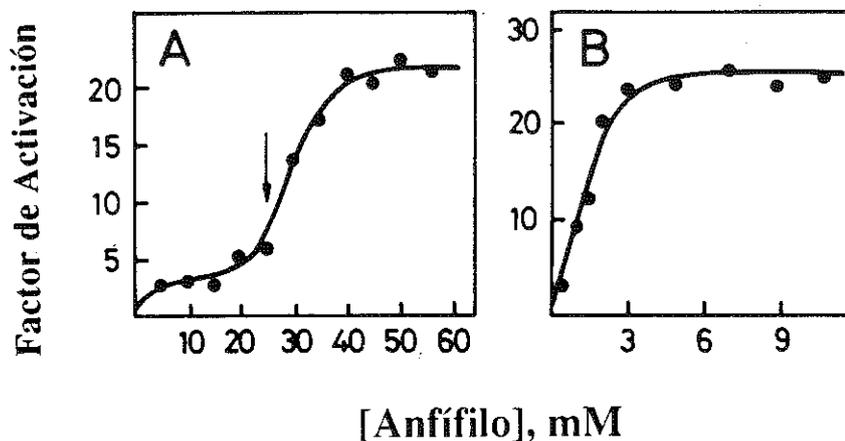


Figura 3.10. Variación de la respuesta de impresión de la ppPLA2 con la concentración en la disolución acuosa de anfífilos-molde no hidrolizables: (A) n-OG, y (B) LPC. La flecha indica el valor de la cmc. La reacción modelo seguida para el cálculo de las activaciones en medio no acuoso fue la hidrólisis de PC 5 mM en cloroformo presaturado.

Para seguir profundizando en el estudio de este fenómeno se utilizaron como moléculas impresoras sustratos hidrolizables por la PLA2, organizados como micelas o como liposomas. La Figura 3.11 muestra la dependencia del factor de activación con la concentración de fosfolípido en el tampón acuoso, tanto en el caso de micelas formadas por la diheptanoil fosfatidilcolina (nótese el incremento en la activación a partir de la cmc) como de pequeñas vesículas unilamelares (SUV) de PC. En estos casos, se comprobó por HPLC la composición de fosfolípidos en el disolvente anhidro de lavado, encontrándose no sólo sustratos sino también productos de la hidrólisis, lo cual verificaba que la enzima había sido literalmente congelada mientras se encontraba actuando macroscópicamente sobre el sustrato. Así, se puede proponer razonablemente que la conformación de la fosfolipasa impresa puede corresponder a, o estar estrechamente relacionada con la de la enzima "cogida en el acto". A este respecto, es interesante destacar que la enzima mostró un cambio conformacional en su espectro de dicroísmo circular al incubarla con SUV (2 mM en PC) en las mismas condiciones que se usaron en su impresión (Figura 2.2), lo que podría correlacionarse con la unión de la enzima a la interfase lipídica. Por otra parte, ya que la ppPLA2 sólo presenta un residuo de triptófano en su secuencia y que éste se halla situado en la zona de unión a la interfase lipídica, se registró la anisotropía de fluorescencia (r) del Trp de la ppPLA2 en disolución en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de fosfolípido, observándose un aumento de los valores de este parámetro similar al del FA de la Figura 3.11 para el mismo rango de concentraciones de PC.

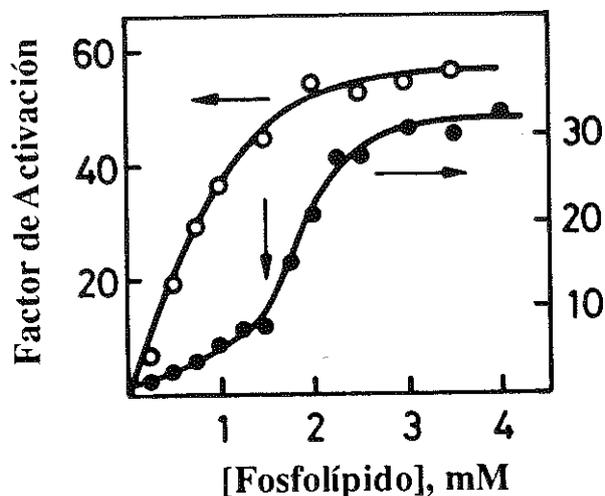


Figura 3.11. Variación de la respuesta de impresión de la ppPLA2 con la concentración de anfífilos-molde hidrolizables: SUV de PC (○) y micelas de diheptanoil PC (●). La flecha vertical indica el valor de la cmc para la diheptanoil PC. En este caso la reacción modelo para el cálculo de las activaciones en el medio orgánico también fue la hidrólisis de PC 5 mM en cloroformo presaturado.

3.3.1.2. Optimización de la molécula impresora y de la calidad interfacial

Debido a que los sustratos de la reacción catalizada por la enzima se habían revelado como las mejores moléculas impresoras, se pasó a variar la naturaleza y forma de agregación de estas moléculas. Así, se comprobó que las vesículas de PCs naturales o de mezclas de PCs puras (L-DMPC:L-DOPC relación molar 1:1) resultaron más eficientes que las formadas por una sola especie pura (ver Figura 3.12). Este comportamiento podría justificarse en base a los conocimientos actuales de que la activación de la ppPLA2 está estrechamente vinculada a la microheterogeneidad topológica de la matriz lipídica de la membrana (Mouritsen & Biltonen, 1993), es decir, que la penetración (y consiguiente actividad) de la enzima en la interfase parece facilitada por imperfecciones (por ejemplo mal emparejamiento de los fosfolípidos que enfrentan sus cadenas hidrocarbonadas en la bicapa) o por formación de dominios lipídicos. Por otro lado, cuando se imprimió la ppPLA2 con SUV de L-DPPC (enantiómero sustrato de la enzima) o D-DPPC (no sustrato) se encontraron claras diferencias en los valores del factor de activación observados, siendo el valor del FA para el enantiómero que no es sustrato de la enzima de únicamente 4-5 (Figura 3.12).

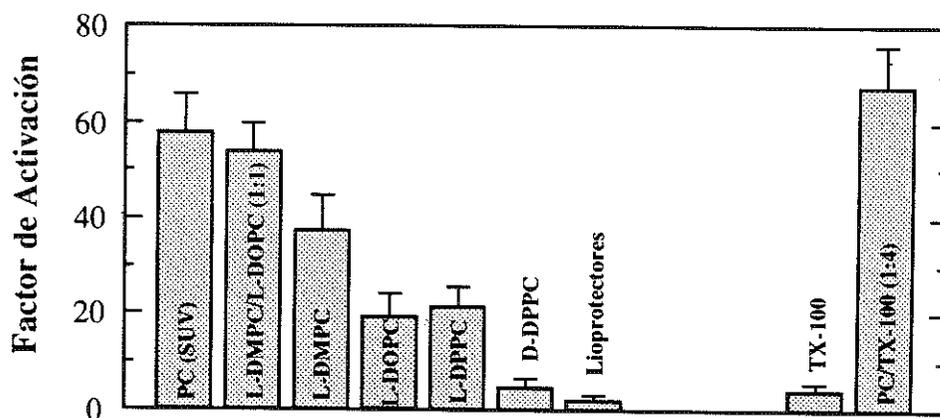


Figura 3.12. Dependencia del Factor de Activación de la ppPLA2 con la composición de las vesículas en el tampón previo a la liofilización. En todos los casos la concentración de fosfolípido fue de 2 mM. Los lioprotectores usados fueron lactosa (10 mM) o sorbitol (100 mM). También se incluye el incremento de activación obtenido al añadir PC sustrato (2 mM) a micelas del Triton X-100 (8 mM).

Los resultados anteriores sugieren una correlación muy interesante entre la "calidad" de una vesícula de fosfolípido como sustrato para la enzima y su capacidad impresora. Parece evidente que la mera presencia de una interfase lípido/agua o en general anfífilo/agua no es condición suficiente para obtener una impresión razonable sino que se deberá tener en cuenta la calidad interfacial del anfífilo. De hecho, al añadir a micelas de Triton X-100 (actuando como "diluyente neutro") una pequeña proporción de PC (porcentaje molar del 20%) se consiguió un considerable aumento del valor del FA, incluso mayor que el obtenido imprimiendo con SUV de PC a la misma concentración molar de fosfolípido (Figura 3.12). A este respecto, es tentador asociar la modesta impresión que se obtiene con micelas de Triton X-100 sólo y el incremento notable de activación al añadirle PC a las micelas, con los dos pasos propuestos por Peters *et al.* (1992) para explicar la activación de la ppPLA2 en disolución. Estos autores postulan un cambio de conformación inicial cuando la enzima se une a una interfase micelar de un diluyente no sustrato, y la adquisición de una conformación catalíticamente activa (formada por una extensa red de puentes de hidrógeno) cuando se une a la interfase que contiene un sustrato o inhibidor competitivo (ver Figura 1.5a). De acuerdo con esto, ha

la interfase y la unión de un inhibidor al centro catalítico de la enzima dispuesta en una interfase son dos procesos distinguibles e incluso independientes (Maliwal *et al.*, 1994), lo que hace sugerir a estos autores que el efecto primario de unión de la enzima a una interfase aumenta su afinidad intrínseca hacia ligandos que se unen directamente al centro catalítico. Lo que en nuestro caso podría traducirse en que la unión de la PLA2 a las micelas de Triton X-100 (que actuaría, por su mayor concentración molar, a modo de "diluyente" interfacial) aumentaría la afinidad de la enzima por la PC, observándose un FA mayor en las muestras impresas con micelas de Triton X-100:PC (4:1) (Figura 3.12 derecha) que en las impresas únicamente con SUV de PC (Figura 3.12 izquierda), aún a pesar de que como se ha indicado, en ambas muestras la concentración molar en fosfolípido es la misma.

3.3.2. Activación de lipasas

El siguiente paso consistió en investigar la generalidad del fenómeno de la impresión molecular de enzimas lipolíticas basada en activación interfacial. Para ello, se analizó la capacidad de varias lipasas para ser impresas, de forma similar a como se había hecho con la ppPLA2, usando distintas reacciones de esterificación en disolventes apolares anhidros, como reacciones modelo para los ensayos no acuosos. En las reacciones se utilizaron ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados y alcoholes alifáticos primarios y secundarios de cadena mediana, alicíclicos y aromáticos, algunas relativamente impedidas, con objeto de evaluar mejor la activación generada por la impresión molecular; de hecho, al ensayar reacciones de esterificación con lipasa pancreática porcina (ppL) control e impresa, se verificó que para un alcohol dado, el factor de activación obtenido con un ácido de cadena corta fue menor que para ácidos de cadena más larga (resultados no mostrados). La Figura 3.13 muestra ejemplos representativos del marcado incremento en la velocidad de síntesis de varios ésteres obtenido por impresión de ppL con *n*-OG, con respecto a su control no impreso (nótese en algunos casos la actividad enormemente exaltada de la lipasa activada en comparación con la velocidad prácticamente marginal de su correspondiente control, sin que ello implique necesariamente un comportamiento anómalo de las muestras no impresas ya que los controles llegaron a producir rendimientos de más del 90% tras 75 horas de incubación). En el caso particular de un alcohol relativamente impedido estéricamente como podría ser el alcohol bencílico (Figura 3.13C), se alcanzó un valor de FA de casi dos órdenes de magnitud.

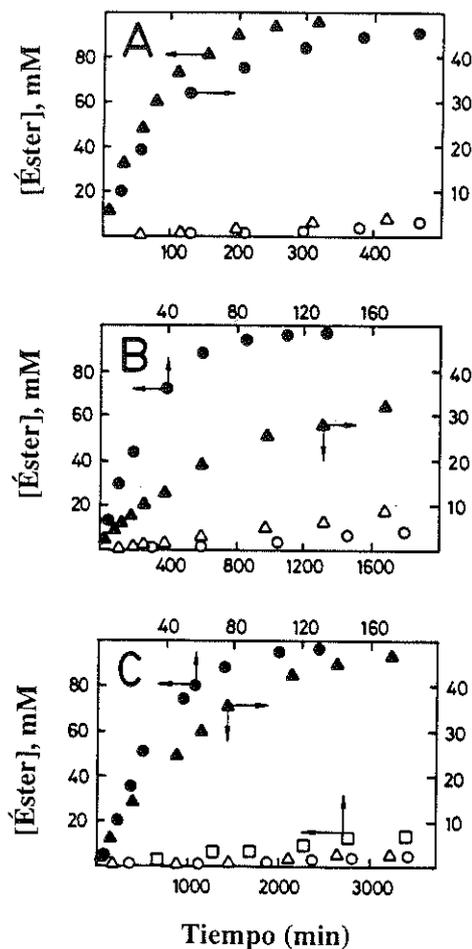


Figura 3.13. Comparación de cinéticas de esterificación entre distintos alcoholes y ácidos grasos en medio orgánico catalizadas por ppL no impresa (símbolos vacíos) e impresa con n-OG 40 mM (símbolos rellenos). (A) Ácido esteárico (50 mM) y *1*-hexanol (100 mM) en tolueno anhidro (círculos); ácido oleico y *1*-hexanol (ambos 100 mM) en *n*-hexano anhidro (triángulos). Concentración de ppL 10 mg/mL. (B) Esterificación de ácido oleico con *1*-pentanol (círculos) o 2-pentanol (triángulos), (todos 100 mM) en *n*-hexano anhidro. Concentración de ppL 25 mg/mL. (C) Esterificación de ácido oleico y alcohol bencílico (círculos) o ciclohexanol (triángulos), (todos 100 mM) en *n*-hexano. Concentración de ppL 25 mg/mL. Para comparar, se muestra la cinética de esterificación entre ácido oleico y alcohol bencílico en las mismas condiciones, pero catalizada por la misma cantidad de ppL inmovilizada sobre bolitas de vidrio de poro controlado (□).

Merece ser destacado que la ppL impresa, en forma particulada, al ser ensayada en la esterificación de alcohol bencílico con ácido oleico en *n*-hexano anhidro, se mostró significativamente más activa que la misma cantidad de enzima no impresa pero inmovilizada (y por tanto monodispersa) sobre un soporte poroso (ver Figura 3.13C). Este resultado elimina la posibilidad de un efecto inespecífico de las moléculas impresoras actuando meramente como "espaciadores" de las enzimas en el momento de la liofilización.

Además de en las reacciones de esterificación, la ppL impresa también exhibió una notoria potenciación de su velocidad de reacción con relación a la enzima no impresa, al ensayar una reacción modelo de transesterificación (entre tripalmitina y ácido oleico) en *n*-hexano anhidro (resultados no mostrados).

Cuando se utilizaron otros anfífilos para imprimir la ppL (aparte del n-OG, el cual resultó ser una de las mejores moléculas impresoras) o mezclas de éstos, rutinariamente a concentraciones moderadamente por encima de sus respectivas cmc, se comprobó que la respuesta de activación de la lipasa puede ser generada por una variada selección de anfífilos (Figura 3.14), aunque no parece inmediato racionalizar la selectividad observada en términos de naturaleza o carga de las interfases.

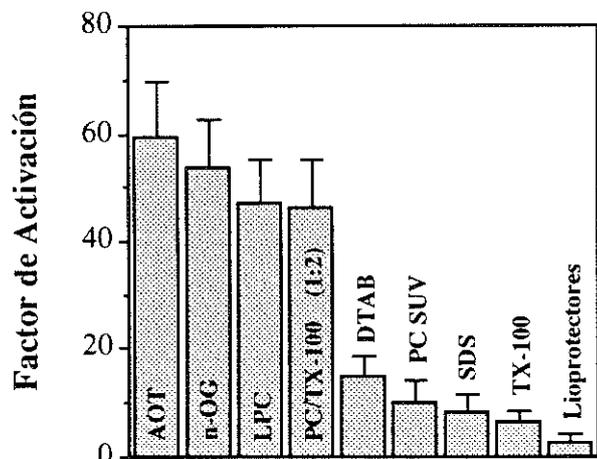


Figura 3.14. Optimización del anfífilo impresor para la ppL. La concentración de los anfífilos en el tampón acuoso fue 5, 40, 3, 2, 20, 2, 13 y 6 mM para AOT, n-OG, LPC, fosfolípido en micelas mixtas de PC, DTAB, SUV de PC, SDS, y TX-100, respectivamente. La reacción modelo seguida en disolvente orgánico fue la esterificación de ácido oleico y *I*-hexanol (ambos a 100 mM) en *n*-hexano, siendo la concentración de ppL en todos los casos de 10 mg/mL. También se incluye el resultado de la incorporación de distintos lioprotectores al tampón de liofilización, como la sacarosa o el sorbitol (ambos al 2 %).

Una vez comprobado el efecto de la impresión molecular de la ppL con varios detergentes o mezclas lípido-detergente, se seleccionaron algunos de ellos para extender el estudio a otras lipasas cuyas estructuras cristalográficas eran conocidas. Así, se demostró que las lipasas de *Rhizomucor miehei* (RmL), de *Candida rugosa* (CrL) y de *Geotricum candidum* (GcL) también podían ser activadas con diferentes anfífilos, aunque exhibiendo diferentes preferencias por éstos (Figura 3.15).

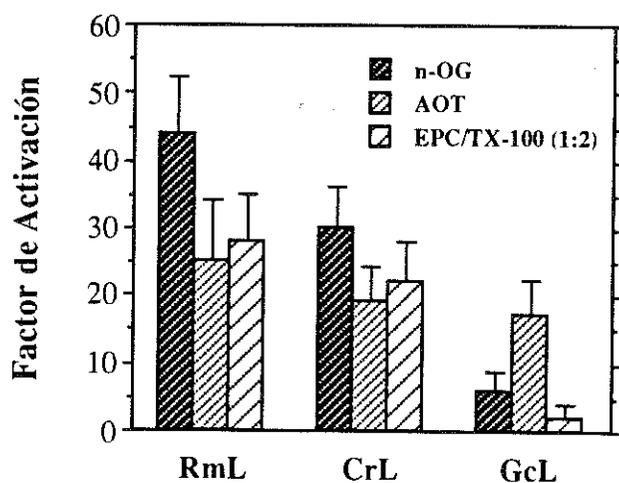


Figura 3.15. Comparación de la activación generada en las lipasas RmL, CrL y GcL por distintos anfífilos. Las concentraciones de los anfífilos en el tampón acuoso fueron de 5, 40 y 2 mM para el AOT, el n-OG y fosfolípido en micelas mixtas de PC/TX-100, respectivamente. La reacción modelo seguida fue la esterificación de ácido oleico y *l*-hexanol (ambos a 100 mM) en *n*-hexano excepto en el caso de GcL donde el disolvente de reacción fue *iso*-octano. Las concentraciones de enzima en polvo utilizadas fueron 60, 10 y 20 mg/mL para RmL, CrL y GcL, respectivamente.

Recientemente, se ha publicado la estructura tridimensional de una CrL cristalizada en ausencia de inhibidor alguno, correspondiente aparentemente a una conformación "abierta" o activada de la enzima, lo cual se ha atribuido a la presencia de un porcentaje relativamente elevado de disolvente orgánico en el medio de cristalización (Grochulski *et al.*, 1993). Más recientemente todavía, este grupo de investigación ha conseguido cristalizar y resolver la estructura de una forma "cerrada" de esta misma lipasa, lo que ha permitido comprobar que la diferencia principal entre ambas conformaciones de la enzima es una rotación de la solapa que cubre la entrada al centro activo de casi 90°, pasando de estar dispuesta sobre la superficie de la proteína a extenderse casi perpendicularmente a

ésta (Grochulski *et al.*, 1994). En este sentido, es tentador pensar que los resultados que aquí se presentan de CrL activada y no activada puedan corresponder a dos estados conformacionales distintos de la enzima en polvo: uno (control) presumiblemente "cerrado" obtenido por liofilización de la enzima desde un tampón en ausencia de anfífilo alguno, y otro (impreso) probablemente "abierto" obtenido por liofilización desde una disolución micelar. Merecen destacarse, por otra parte, los bajos valores de FA obtenidos para la GcL en comparación con los proporcionados por otras lipasas parecen consistentes con la consabida dificultad para "abrir" su solapa y poder cristalizar la enzima en su conformación activada (Schrag *et al.*, 1991 y Schrag & Cygler, 1993). Así, la GcL impresa que aquí se presenta podría presumiblemente representar la primera forma manejable activada (no cristalizada), de esta enzima. Por lo que respecta a la RmL, también son fácilmente asignables las formas no activada y activada con el modelo de activación interfacial propuesto para esta enzima en base a su estructura nativa (Brady *et al.*, 1990) y su estructura cristalizada en presencia de inhibidores (Brzozowski *et al.*, 1991; Derewenda *et al.*, 1992). Finalmente, en el caso de lipasas pancreáticas también se han mostrado diferencias conformacionales entre la enzima cristalizada como un complejo lipasa-procolipasa libre en disolución (van Tilbeurgh *et al.*, 1992) y en el mismo complejo pero cocrystalizada en presencia de micelas mixtas de fosfatidilcolina y sales biliares. Estas diferencias implican también cambios en la disposición de la solapa que permiten la unión de un fosfolípido al centro activo de la enzima; además de interactuar con la procolipasa, la solapa abierta provoca cambios conformacionales en el centro activo que contribuyen a crear el conocido "agujero" oxianiónico (van Tilbeurgh *et al.*, 1993). En nuestro caso, se podría pensar que no se requiere la presencia de esta procolipasa para obtener la forma activada de la enzima (posiblemente con su solapa abierta) debido a que su presencia sólo es inexcusable en el caso de que estén presentes sales biliares en el medio.

Finalmente, con respecto a la influencia de la impresión molecular sobre la enantioselectividad de las lipasas, se verificó, usando una reacción modelo de esterificación mediada por CrL entre L- o D-mentol y ácido láurico en *iso*-octano, previamente descrita por Lokotsch *et al.* (1989), que la enzima impresa con n-OG experimentó un considerable incremento de actividad hacia el isómero L- (isómero preferido por la enzima) sin pérdida apreciable de su enantiodiscriminación.

3.3.3. ¿Activación interfacial o lioprotección enzimática?

Se ha documentado ampliamente que la utilización de ciertos aditivos (lioprotectores) a los tampones de liofilización permite en general reducir o prevenir el grado de desnaturalización enzimática en el proceso de liofilización (para una revisión reciente, ver Arakawa *et al.*, 1993). Este hecho ha sido aprovechado recientemente por

diversos grupos para lograr potenciar la actividad de varias enzimas (incluidas lipasas) en medios orgánicos (Lamare *et al.*, 1992; Adlercreutz, 1993; Dabulis & Klivanov, 1993). Aunque el fenómeno general de lioprotección, más bien inespecífico, no puede ser totalmente descartado en nuestro protocolo de impresión molecular para enzimas lipolíticas, se diseñaron una serie de experiencias encaminadas a reafirmar que la principal contribución a la activación observada implica realmente la adquisición de una conformación de la enzima permanentemente activada mientras no se exponga la proteína al efecto "flexibilizante" del agua. En este sentido, cuando las enzimas se liofilizaron en presencia de lioprotectores tales como lactosa, sacarosa o sorbitol (lioprotectores comúnmente usados en la bibliografía), no se observaron incrementos significativos en la velocidad de reacción en el caso de la ppPLA2 para las reacciones modelo antes descritas (hidrólisis o síntesis), y en el caso de la síntesis de ésteres catalizada por ppL se incrementó la velocidad de reacción tan sólo entre 2 y 3 veces lo que se encuentra en el rango de valores alcanzado por otras lipasas (Lamare *et al.*, 1992; Adlercreutz, 1993; Dabulis & Klivanov, 1993).

Además, con el objeto de diferenciar los posibles procesos de lioprotección y de impresión molecular basada en la activación interfacial de enzimas lipolíticas, se comprobó el efecto de esta metodología en enzimas que no sufriesen proceso de activación interfacial alguno, como podrían ser las proteasas. Con este objeto, se ensayó en α -quimotripsina y subtilisina una reacción modelo de transesterificación entre el éster etílico de un N-acetil aminoácido y el 1-butanol en *n*-octano anhidro (Fulcrand *et al.*, 1991), comprobándose que las proteasas no pudieron ser activadas en las condiciones óptimas de impresión para las enzimas lipolíticas.

También cabe recordar en este momento que el efecto de activación por impresión de la ppPLA2 con los enantiómeros L- y D-DPPC muestra claras diferencias entre ellos (Figura 3.12), aunque es de esperar, evidentemente, que el efecto inespecífico de lioprotección de ambas moléculas fuera totalmente indistinguible.

Por otro lado, aunque las enzimas impresas mantuvieron su actividad después de semanas de almacenamiento en seco a 4°C, la "memoria" inducida por la impresión molecular fue completamente eliminada por contacto con el agua: cuando ambas muestras de ppPLA2 control e impresa, después de haber sido lavadas exhaustivamente con un disolvente anhidro, se redisolvieron en un tampón apropiado a 4°C *en ausencia de anfifilos*, se volvieron a liofilizar y se ensayaron en medio orgánico, exhibieron prácticamente idéntica actividad, lo cual puede ser fácilmente explicado por una "pérdida" de la conformación inducida, causada por el disolvente acuoso. Este último resultado también se comprobó de forma similar en el caso de la ppL.

Alternativamente, se diseñó una experiencia concreta en la que se pudiese demostrar que la "memoria" de ligando inducida en la enzima, podía ser borrada gradualmente por la presencia de agua en el medio orgánico de incubación de la proteína.

Así, al ir incrementando progresivamente el contenido de agua en el medio de reacción, la mayor flexibilidad conformacional permitida a la enzima podría traducirse en una pérdida de memoria. Para ello se escogió deliberadamente una reacción hidrolítica catalizada por la ppL en un medio orgánico miscible con agua, como es la hidrólisis de trioleína en *iso*-propanol. El hecho de elegir una reacción hidrolítica se debe, entre otras razones, a que en el caso de usar las reacciones sintéticas modelo para lipasas, como el agua es un producto de la reacción, se hubiese podido afectar desfavorablemente el equilibrio de la reacción. La Figura 3.16 muestra la disminución de los valores de FA para la reacción modelo consecuentemente con el aumento del porcentaje de agua en el medio de reacción.

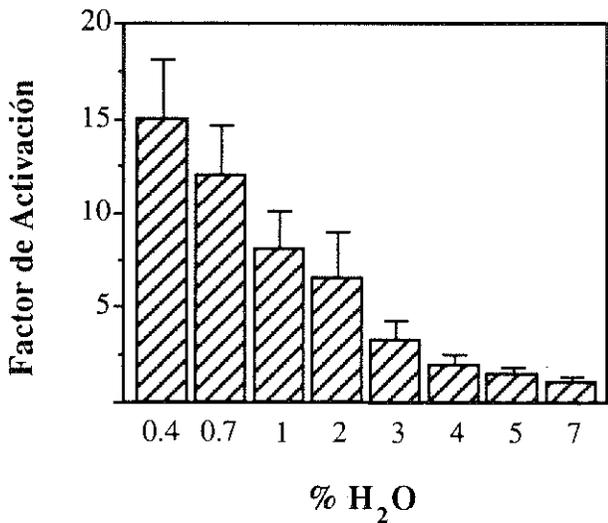


Figura 3.16. Eliminación de la "memoria" inducida por las micelas de n-OG en la ppL, en función del porcentaje de agua en el medio de reacción. La reacción modelo seguida fue la hidrólisis de trioleína (10 mM) en *iso*-propanol. La concentración de lipasa (ppL) en polvo utilizada fue de 20 mg/mL.

3.3.4. Inducción de actividad fosfolipasa en lipasas

Recientemente se ha descrito (Hjorth *et al.*, 1993) la presencia de actividad fosfolipasa en una lipasa pancreática de cobaya (guinea pig, gpL) que estructuralmente presenta una diferencia importante con respecto a su homóloga ppL y a otras lipasas pancreáticas de mamíferos. Esta variación radica en que presenta una solapa truncada o "mini-solapa" que convierte a su centro activo en permanentemente accesible al medio. Como diferencia funcional, esta lipasa además de mostrar actividad fosfolipasa no

presenta activación interfacial. Todo ello nos llevó a comprobar el efecto de nuestra estrategia de impresión molecular sobre esta enzima tan peculiar. Significativamente y como cabría esperar de acuerdo a nuestra hipótesis de trabajo, la impresión de gpL con n-OG en condiciones óptimas dió un valor de FA claramente menor que en el caso de la ppL, cuando ambas lipasas se ensayaron en la esterificación de ácido oleico y 1-hexanol en *n*-hexano anhidro (datos no mostrados). Más aún, cuando se ensayó la actividad de la gpL en la hidrólisis de fosfolípidos (Figura 3.17), se pudo apreciar una ligera activación de la enzima impresa, probablemente debida a un reajuste inducido, más competente, de la red catalítica del centro activo. De hecho, dada la reducida dimensión, casi testimonial, de esta mini-solapa, se ha apuntado que ésta no debería jugar un papel esencial con respecto a la actividad fosfolipasa de la enzima (Carrière *et al.*, 1994).

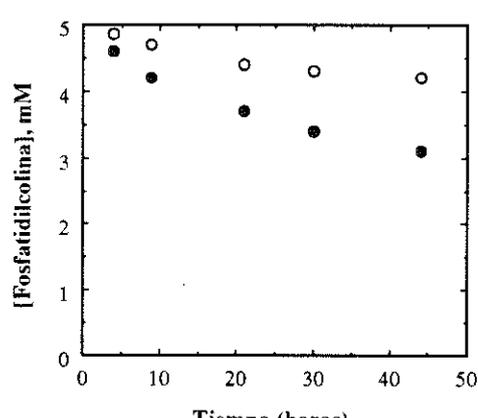


Figura 3.17. Comparación de las cinéticas de la reacción de hidrólisis de PC (en cloroformo presaturado) catalizada por gpL no impresa (○), e impresa con n-OG 40 mM (●). La muestra enzimática (5 mg/mL) se optimizó en un tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5 NaCl 0.15 M previo a la liofilización.

Con estas premisas se pensó, con prospección de futuro, en la posibilidad de inducir en otras lipasas actividades típicamente fosfolipasa. Así, con lipasas activadas por impresión con detergentes o con lisofosfatidilcolina, producto de la reacción hidrolítica ensayada, se han podido obtener excelentes activaciones. La Figura 3.18 muestra, a modo de ejemplo, las cinéticas de la reacción modelo de hidrólisis de fosfatidilcolina en cloroformo presaturado catalizada por dos lipasas distintas, la ppL y una lipasa de *Rhizopus delemar*, donde puede observarse la activación (espectacular en el caso de la RdL) obtenida respecto a las enzimas control. En este ejemplo, se podrían justificar parcialmente los largos tiempos de incubación precisados en base a las

diferencias que muestran ambos tipos de enzimas (lipasas y fosfolipasas) en sus mecanismos de reacción, como se ha expuesto anteriormente, y en la topología de su maquinaria catalítica.

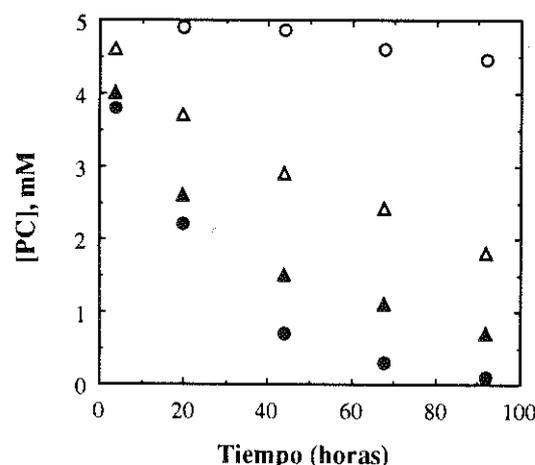
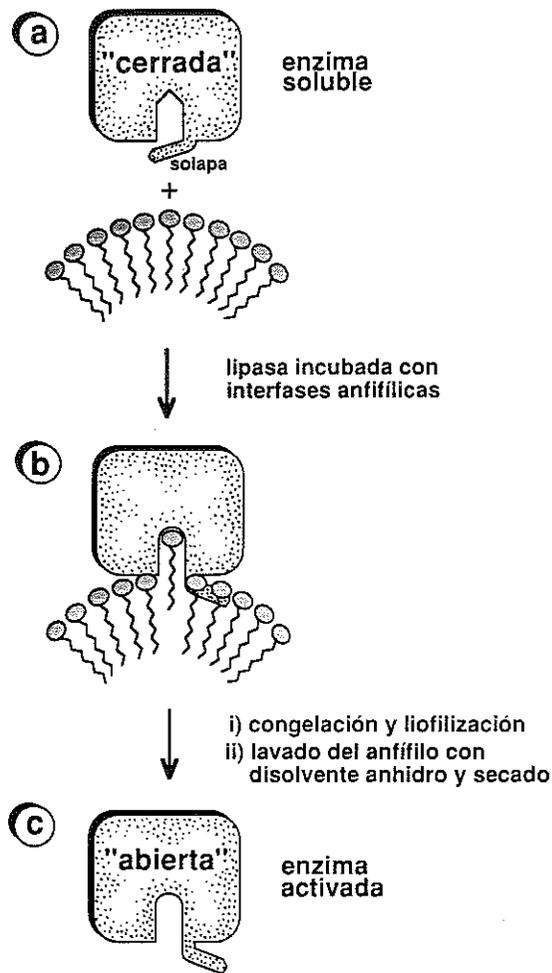


Figura. 3.18. Comparación de la activación generada en las lipasas RdL y ppL (ambas a 30 mg/mL) por dos anfífilos distintos, LPC (3 mM) y n-OG (40 mM), respectivamente, para la hidrólisis de fosfatidilcolina en cloroformo presaturado. (O) RdL no impresa; (●) RdL impresa con LPC 3 mM; (Δ) ppL no impresa y (▲) ppL impresa con n-OG 40 mM.

3.3.5. ¿En qué se basa la activación de enzimas lipolíticas?

Tomados globalmente, todos estos resultados apoyan la hipótesis inicial de que la estrategia de impresión molecular basada en la activación interfacial de enzimas lipolíticas, pueda consistir en la inducción y retención permanente en ambientes anhidros de una conformación activada ("atrapada" cinéticamente) presumiblemente similar a la adquirida en su activación interfacial en medio acuoso. Se puede especular razonablemente que este fenómeno podría implicar dos tipos distintos de cambios en las enzimas lipolíticas: i) una reducción de las restricciones de accesibilidad que puedan encontrar los sustratos en las enzimas no impresas, derivada del desplazamiento de la solapa en el caso de las lipasas, o de un presumible reordenamiento del canal hidrofóbico de entrada al centro catalítico en el caso de la PLA2; y ii) un ajuste, inducido por ligando (anfífilo), de la red catalítica del centro activo para dar lugar en la enzima impresa a una topología más competente y productiva en relación a la enzima no impresa. Obviamente, la contribución de cada factor a la impresión debería depender de la naturaleza y particularidades tanto de las enzimas lipolíticas como de los anfífilos usados

como molde. El Esquema 3.2 ilustra gráficamente la estrategia de impresión molecular propuesta.



Esquema 3.2. Ilustración esquemática de la estrategia general de impresión molecular basada en la activación interfacial de enzimas lipolíticas particularizada para el caso de una lipasa típica. Se muestran los hipotéticos cambios conformacionales (que implican tanto a la solapa como a la red catalítica) sufridos por una lipasa en disolución incubada en presencia de interfaces anfífilas en medio acuoso. En a) y b) la enzima se encuentra en solución acuosa pero en distinta conformación. En c) la enzima se halla impresa en una conformación "abierta", siendo por tanto una lipasa activada, utilizable en ambientes no acuosos.

En conclusión, la impresión molecular basada en activación interfacial (IMAI) representa una aproximación racional a la ingeniería de las enzimas lipolíticas en ambientes no acuosos, nueva y prometedora. Es versátil, proporciona en condiciones óptimas una notoria potenciación de la actividad catalítica y parece que puede extenderse a otras enzimas (se dispone ya de resultados alentadores con otras lipasas de estructura tridimensional todavía no resuelta). A pesar de que obviamente esta metodología merece una exploración más a fondo con vistas a evaluar todo su potencial, estos resultados permiten vislumbrar numerosas implicaciones potencialmente importantes tanto desde un punto de vista básico como aplicado. En primer lugar, la estrategia que se plantea supone una metodología sencilla para disponer de una forma manejable de enzimas lipolíticas en una conformación activada; recientemente se ha propuesto que pueden usarse cristales de enzimas entrecruzadas (principalmente proteasas) como biocatalizadores robustos en ambientes tanto acuosos como no acuosos (St. Clair & Navia, 1992). Asumiendo que esta metodología en el futuro pudiese ampliarse al caso de las lipasas para obtener cristales entrecruzados de formas activadas de éstas, la aproximación que se propone en este trabajo ofrece mayor simplicidad y rapidez en la generación de muestras activadas y manejables, para uso en medios de bajo contenido acuoso. Por otro lado, puede considerarse una aproximación interesante dentro de la ingeniería del medio de reacción (complementaria a la ingeniería de proteínas) que permite extender la especificidad de las lipasas (especialmente para los sustratos grandes) en ambientes con poca agua, al ensanchar el área de acceso al centro activo por desplazamiento de solapa; cabe destacar que este objetivo (ampliar la especificidad para sustratos grandes) se ha conseguido en el caso de la lactato deshidrogenasa por ingeniería de proteínas, mediante un ensanchamiento de la vacuola catalítica de la enzima (Wilks *et al.*, 1992). En el caso de lipasas, la estrategia que se presenta podría representar una opción cómoda para generar enzimas más eficientes hacia sustratos voluminosos insolubles en agua, siempre que se utilicen en medios no acuosos. En este contexto, podría ser también factible extender la estrategia de la impresión molecular a otros tipos de enzimas con lóbulos móviles o lazos flexibles (Kempner, 1993) en las que se conozca que el control de la actividad pueda depender de "deformaciones estructurales" que involucren a estas estructuras.

Incluso cabe la posibilidad de que la IMAI estimule y sirva de guía para la aplicación a otras proteínas asociadas a membranas (no necesariamente lipasas), lo que constituye una posibilidad excitante dado el gran repertorio de enzimas conocidas que actúan en las interfases lípido/agua.

Finalmente, los resultados sugieren que las lipasas pueden haberse estado utilizando en la mayoría de los casos por debajo de sus posibilidades en las aplicaciones biotecnológicas no acuosas. Teniendo en cuenta el alcance de su uso [alrededor de la cuarta parte del total de enzimas usadas a nivel industrial son lipasas (Harwood, 1989;

Faber & Franssen, 1993)], especialmente en medios de bajo contenido acuoso, y la continua ampliación del espectro de enzimas tanto naturales como recombinantes, las oportunidades que brinda la impresión molecular basada en la activación interfacial (opcionalmente en sinergismo con la ingeniería de proteínas) deberían ser convenientemente explotadas y encauzadas hacia el futuro.

4. Conclusiones

En primer lugar, se ha explorado por primera vez, de una forma sistemática, el comportamiento de la fosfolipasa A₂ de páncreas porcino (ppPLA₂) en medios orgánicos monofásicos con bajo contenido en agua. Se ha investigado cómo pueden modular las actividades tanto desacilante como acilante de la enzima un número determinado de variables, encontrándose varios resultados interesantes e inesperados, entre los que cabe destacar como más relevantes, para la ppPLA₂ en un entorno con agua restringida, los siguientes: (i) es severamente inhibida por moderadas concentraciones de fosfolípidos sustrato y producto, lo que tiene implicaciones importantes, particularmente concernientes a su actividad sintética; (ii) exhibe una notable alteración de su selectividad hacia la cabeza polar de los sustratos con relación a la que muestra en los medios acuosos; y (iii) presenta una discriminación exquisita entre ácidos grasos de distinta longitud de cadena y grado de insaturación cuando los esterifica con LPC. Además, estos resultados se han utilizado para optimizar la eficacia sintética de la enzima en medio no acuoso obteniéndose un incremento del rendimiento en la síntesis de PC de cerca de treinta veces con respecto a los datos aportados previamente por otros grupos.

En segundo lugar, se ha desarrollado una estrategia innovadora, que denominamos impresión molecular de enzimas lipolíticas basada en activación interfacial (IMAI), para la optimización racional de estas enzimas en medios no acuosos. Esta estrategia explota de forma combinada (i) la conocida exaltación de la rigidez conformacional de las proteínas en medios anhidros y (ii) los cambios conformacionales, entérminos de incremento de la accesibilidad de sustrato y de inducción de una red catalítica más competente, asociados a la activación de la enzima en las interfases lípido/agua, para generar formas manejables y activadas (atrapadas cinéticamente) de las enzimas lipolíticas. Los resultados obtenidos con diferentes lipasas, racionalizados en base su conocimiento estructural actual, muestran que la IMAI representa un método sencillo y

versátil para producir biocatalizadores notablemente más eficientes, que pueden llegar a generar, en condiciones óptimas, potenciaciones de la velocidad enzimática de hasta dos órdenes de magnitud. Por otro lado, este protocolo parece potencialmente aplicable a un vasto repertorio de enzimas. Además, la aplicación de esta estrategia puede producir un considerable beneficio práctico teniendo en cuenta la gran profusión del uso de lipasas (posiblemente infrautilizadas en muchos casos) para aplicaciones biotecnológicas en numerosas bioconversiones en medios no acuosos, incluyendo las catálisis en fluidos supercríticos y en fase gaseosa.

5. Bibliografía

- ADLERCREUTZ, P. (1991). On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. *Eur. J. Biochem.* **199**, 609-614.
- ADLERCREUTZ, P. (1993). Activation of enzymes in organic media at low water activity by polyols and saccharides. *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 144-148.
- AFFLECK, R., XU, Z.-F., SUZAWA, V., FOCHT, K., CLARK, D. S. & DORDICK, J. S. (1992). Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1100-1104.
- ANFINSEN, C. B. & SCHERAGA, H. A. (1975). Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Protein Chem.* **29**, 205-301.
- ANDERSSON, L. I., O'SHANNESY D. J. & MOSBACH, K. (1990). Molecular recognition in synthetic polymers: preparation of chiral stationary phases by molecular imprinting of amino acid amides. *J. Chromatogr.* **513**, 167-179.
- ARAKAWA, T., PRESTRELSKI, S. J., KENNEY, W. C. & CARPENTER, J. F. (1993). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **10**, 1-28.
- ARNOLD, F. H. (1993a). Protein engineering for unusual environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**, 450-455.
- ARNOLD, F. H. (1993b). Engineering proteins for nonnatural environments. *FASEB J.* **7**, 744-749.
- BAÑO, M. C., BRACO, L. & ABAD, C. (1988). New high-performance liquid chromatography-based methodology for monitoring the conformational transitions of self-associating hydrophobic peptides, incorporated into liposomes. *J. Chromatogr.* **458**, 105-116.

- BARLOW, P. N.; LISTER, M. D.; SIGLER, P. D. & DENNIS, E. A. (1988). Probing the role of substrate conformation in phospholipase A₂ action on aggregated phospholipids using constrained phosphatidylcholine analogs. *J. Biol. Chem.* **263**, 12954-12958.
- BELL, J. D. & BILTONEN, R. L. (1989). The temporal sequence of events in the activation of phospholipase A₂ by lipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **264**, 12194-12200.
- BERG, O. G., YU, B.-Z., ROGERS, J. & JAIN, M.K. (1991). Interfacial catalysis by phospholipase A₂: determination of the interfacial kinetic rate constants. *Biochemistry* **30**, 7283-7297.
- BHAT, M., MUELLER-HARVEY, I., SUMNER, I. G. & GOODENOUGH, P. W. (1993a). Simplified methods for the synthesis of 2-hexadecanoylthio-1-ethylphosphorylcholine and for the determination of phospholipase A₂ activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1166**, 244-250.
- BHAT, M., PICKERSGILL, R. W., PERRY, B. N., BROWN, R. A., JONES, S. T., MUELLER-HARVEY, I., SUMNER, I. G. & GOODENOUGH, P. W. (1993b). Modification of head-group selectivity of porcine pancreatic phospholipase A₂ by protein engineering. *Biochemistry* **32**, 12203-12208.
- BLINKOVSKY, A. M., MARTIN, B. D. & DORDICK, J. S. (1992). Enzymology in monophasic organic media. *Curr. Opin. Biotechnol.* **3**, 124-129.
- BLOW, D. (1991). Lipases reach the surface. *Nature* **351**, 444-445.
- BRACO, L., DABULIS, K & KLIBANOV, A. M. (1990). Production of abiotic receptors by molecular imprinting of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 274-277.
- BRACO, L., DARÓS, J. A. & DE LA GUARDIA, M. (1992). Enzymatic flow injection analysis in nonaqueous media. *Anal. Chem.* **64**, 129-133.
- BRADY, L., BRZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S., DODSON, E., DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J. P., CHRISTIANSEN, L., HUGE-JENSEN, B., NORSKOV, L., THIM, L. & MENGE, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**, 767-770.
- BRZOWSKI, A. M., DEREWENDA, U., DEREWENDA, Z.S., DODSON, G.G., LAWSON, D. M., TURKENBURG, J. P., BJORKLING, F., HUGE-JENSEN, B., PATKAR, S. A. & THIM, L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**, 491-494.
- BURKE, P. A., GRIFFIN, R. G. & KLIBANOV, A. M. (1992). Solid-state NMR assessment of enzyme active center structure under nonaqueous conditions. *J. Biol. Chem.* **267**, 20057-20064.

- BURKE, P. A., SMITH, S. O., BCHOVCHIN, W. W. & KLIVANOV, A. M. (1989). Demonstration of structural integrity of an enzyme in organic solvent by solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8290-8291.
- CAMBILLAU, C. & VAN TILBEURGH, H. (1993). Structure of hydrolases: lipases and cellulases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 885-895.
- CARRIÈRE, F., THIRSTRUP, K., BOEL, E., VERGER, R. & THIM, L. (1994). Structure-function relationships in naturally occurring mutants of pancreatic lipase. *Protein Eng.* **7**, 563-569.
- CHATTOPADHYAY, A. & LONDON, E. (1984). Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Anal. Biochem.* **139**, 408-412.
- CHIN, J. T., WHEELER, S. L. & KLIBANOV, A. M. (1994). On protein solubility in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 140-145.
- DASTOLI, F. R., MUSTO, N. A. & PRICE, S. (1966). Reactivity of active sites of chymotrypsin suspended in an organic medium. *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 44-47.
- DASTOLI, F. R. & PRICE, S. (1967a). Catalysis by xanthine oxidase suspended in organic media. *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 163-165.
- DASTOLI, F. R. & PRICE, S. (1967b). Further studies on xanthine oxidase in non-polar media. *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 289-291.
- DABULIS, K. & KLIBANOV, A. M. (1993). Molecular imprinting of proteins and other macromolecules resulting in the new adsorbents. *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 176-185.
- DABULIS, K. & KLIBANOV, A. M. (1993). Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 566-571.
- DATTA, G., PARVATHANATHAN, P. S., RAO, U. R. K. & DENIZ, K. U. (1992). Reverse micelles of dipalmitoyl phosphatidylcholine in chloroform and their interactions with dapsone. *Physiol. Chem. Phys. NMR* **24**, 51-61.
- DEREWENDA, U., BRZOZOWSKI, A. M., LAWSON, D. M. & DEREWENDA, Z. S. (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in triglyceride lipase. *Biochemistry* **31**, 1532-1541.
- DEREWENDA, Z. S. & SHARP, A. M. (1993). News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 20-25.
- DODSON, G. G., LAWSON, D. M. & WINKLER, F. K. (1992). Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. *Faraday Discuss.* **93**, 1-11.

- DORDICK, J. S. (1991a). En *Applied Biocatalysis* (Blanch, H. W. & Clark, D. S., Eds.) Marcel Dekker, New York, Vol.1, pp.1-51.
- DORDICK, J. S. (1991b). Non-aqueous enzymology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**, 401-407.
- DUPUREUR, C. M., YU, B.-Z., JAIN, M. K., NOEL, J. P., DENG, T., LI, Y., BYEON, I.-J. & TSAI, M.-D. (1992). Phospholipase A₂ engineering. Structural and functional roles of highly conserved active site residues tyrosine-52 and tyrosine-73. *Biochemistry* **31**, 6402-6413.
- EXTON, J. H. (1994). Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 26-42.
- FABER, K. & FRANSSEN, M. C. R. (1993). Prospects for the increased application of biocatalyst in organics transformations. *TIBTECH.* **11**, 461-470.
- FERSHT, A. (1985). En *Enzyme structure and mechanism* (W. H. Freeman and Co.) New York, 2nd ed.
- FITZPATRICK, P. A. & KLIBANOV, A. M. (1991). How can the solvent affect enzyme enantioselectivity? *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 3166-3171.
- FITZPATRICK, P. A., RINGE, D. & KLIBANOV, A. M. (1994). X-ray crystal structure of cross-linked subtilisin Carlsberg in water vs. acetonitrile. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 675-581.
- FITZPATRICK, P. A., STEINMETZ, A. C. U., RINGE, D. & KLIBANOV, A. M. (1993). Enzyme crystal structure in a neat organic solvent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8653-8657.
- FULCRAND, V., JACQUIER, R., LAZARO, R. & VIALLEFONT, P. (1991). Enzymatic peptide synthesis in organic solvent mediated by gels of copolymerized acrylic derivatives of α -chymotrypsin and polyoxyethylene. *Int. J. Peptide Protein Res.* **38**, 273-277.
- GARZA-RAMOS, G., DARSZON, A., TUENA DE GOMEZ-PUYOU, M. & GOMEZ-PUYOU, A. (1990). Enzyme catalysis in organic solvents with low water content at high temperatures: the ATPase of submitochondrial particles. *Biochemistry* **29**, 751-757.
- GARZA-RAMOS, G., FERNANDEZ-VELASCO, A., TUENA DE GOMEZ-PUYOU, M. & GOMEZ-PUYOU, A. (1992). En *Biomolecules in Organic Solvents* (Gómez-Puyou, A., Ed.) CRC Press. Boca Raton, pp.114-131.
- GORMAN, L. A. S. & DORDICK, J. S. (1992). Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 392-397.

- GHOMASHCHI, F., YU, B.-Z., BERG, O., JAIN, M. K. & GELB, M. H. (1991). Interfacial catalysis by phospholipase A₂: substrate specificity in vesicles. *Biochemistry* **30**, 7318-7329.
- GLASER, K. B., MOBILIO, D., CHANG, J. Y. & SENKO, N. (1993). Phospholipase A₂ enzymes: regulation and inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 92-98.
- GOLOLOBOV, M. Y., VOYUSHINA, T. L., STEPANOV, V. M. & ADLERCREUTZ, P. (1992). Organic solvent changes the chymotrypsin specificity with respect to nucleophiles. *FEBS Lett.* **3**, 309-312.
- GROCHULSKI, P., LI, Y., SCHRAG, J. D., BOUTHILLIER, F., SMITH, P., HARRISON, D., RUBIN, B. & CYGLER, M. (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12843-12847.
- GROCHULSKI, P., LI, Y., SCHRAG, J. D., & CYGLER, M. (1994). Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* **3**, 82-91.
- GROSS, R. W. & SOBEL, B. E. (1982). Lysophosphatidylcholine metabolism in the rabbit heart. *J. Biol. Chem.* **257**, 6702-6708.
- GUINN, R. M., SKERKER, P. S., KAVANOUGH, P. & CLARK, D. S. (1990). Activity and flexibility of alcohol dehydrogenase in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 303-308.
- GUPTA, M. N. (1992). Enzyme function in organic solvents. *Eur. J. Biochem.* **203**, 25-32.
- HARTSOUGH, D. S. & MERZ, K. M. JR. (1993). Protein dynamics and solvation in aqueous and nonaqueous environments. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6529-6537.
- HARWOOD, J. (1989). The versatility of lipases for industrial uses. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 125-126.
- HJORTH, A., CARRIÈRE, F., CUDREY, C., WÖLDIKE, H., BOEL, E., LAWSON, D. M., FERRATO, F., CABBILLAU, C., DODSON, G. G., THIM, L. & VERGER, R. (1993). A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the Guinea Pig (phospho)lipase. *Biochemistry* **32**, 4702-4707.
- INADA, Y., TAKAHASHI, K., YOSHIMOTO, T., AJIMA, A., MATSUSHIMA, A. & SAITO, Y. (1986). Application of polyethylene glycol-modified enzymes in biotechnological processes: Organic solvent-soluble enzymes. *Trends Biotechnol.* **4**, 190-194.
- JAIN M. K. (1988). *An Introduction to biomembranes*. (John Wiley) New York, p 423.
- JAIN, M. K. & BERG, O. G. (1989). The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A₂ and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting. *Biochim. Biophys. Acta* **1002**, 127-156.

- JAIN, M. K., YU, B. Z. & BERG, O. G. (1993). Relationship of interfacial equilibria to interfacial activation of phospholipase A₂. *Biochemistry* **32**, 11319-11329.
- JUNEJA, L. R., KAZUOKA, T., GOTO, N., YAMANE, T. & SHIMIZU, S. (1989). Conversion of phosphatidylcholine to phosphatidylserine by various phospholipases D in the presence of L- or D-serine. *Biochim. Biophys. Acta.* **1003**, 277-283.
- KEMPNER, E. S. (1993). Movable lobes and flexible loops in proteins: structural deformations that control biochemical activity. *FEBS Lett.* **326**, 4-10.
- KENNEDY, D. F., SLOTBOOM, A. J., DE HAAS, G. H. & CHAPMAN, D. (1990). A Fourier transform infrared spectroscopic (FTIR) study of porcine and bovine pancreatic phospholipase A₂ and their interaction with substrate analogues and transition-state inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 317-326.
- KHMELNITSKY, Y. L., LEVASHOV, A. V., KLYACHKO, N. L. & MARTINEK, K. (1988). Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 710-724.
- KLIBANOV, A. M. (1986). Enzymes that work in organic solvents. *CHEMTECH.* **6**, 354-359.
- KLIBANOV, A. M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 141-144.
- KLIBANOV, A. M. & AHERN, T. J. (1987). En *Protein Engineering* (Oxender, D.L. & Fox, C.F. Eds.) Alan R. Liss, Inc. New York, 213-218.
- KRAMER, R. M. & DEYKIN, D. (1983). Arachidonoyl transacylase in human platelets. *J. Biol. Chem.* **258**, 13806-13811.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAITINEN, H. A. & HARRIS, W. E. (1975). En *Chemical Analysis*, 2nd Ed., McGraw-Hill, New York, pp.361-363.
- LAMARE, S., SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. & LEGOY, M.-D. (1992). Modulation of lipolytic activity and stability by using sugars. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **672**, 171-177.
- LAWSON, D. M., BRZOZOWSKI, A. M. & DODSON, G. G. (1992). Lifting the lid off lipases. *Current Biology* **2**, 473-475.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

- LOKOTSCH, W., FRITSCH, K & SYLDATK, C. (1989). Resolution of D,L-menthol by interesterification with triacetin using the free and immobilized lipase of *Candida cylindracea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 467-472.
- LUISI, P. L., GIOMINI, M., PILENI, M. P. & ROBINSON, B. H. (1988) *TitelBiochim. Biophys. Acta* **947**, 209-246.
- MALI WAL, B. P., YU, B.-Z., SZMACINSKI, H., SQUIER, T., VAN BINSBERGEN, J., SLOTBOOM, A. J. & JAIN, M. K. (1994). Functional significance of the conformational dynamics of N-terminal segment of secreted phospholipase A₂ at the interface. *Biochemistry*, **33**, 4509-4516.
- MARTINEK, K., LEVASHOV, A. V., KLYACHKO, N., KHMELNITSKI, Y. & BEREZIN, I. V. (1986). Micellar enzymology. *Eur. J. Biochem.* **155**, 453-468.
- MOURITSEN, O. G. & BILTONEN, R. L. (1993). En *Protein-lipid interactions* (New Comprehensive Biochemistry) **25**, A. Watts, Elsevier, Amsterdam, pp.1-39.
- MOSBACH, K. (1994). Molecular imprinting. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 9-14.
- MUKERJEE, P. & MYSELS, K. J. (1971). En *Critical micelle concentrations of aqueous surfactants systems* (National Bureau of Standards 36, Washington, D.C.).
- NA, A., ERIKSSON, C., ERIKSSON, S.-G., OSTERBERG, E. & HOLMBERG, K. (1990). Synthesis of phosphatidylcholine with (n-3) fatty acids by phospholipase A₂ in microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, 766-770.
- NOEL, J. P., BINGMAN, C. A., DENG, T., DUPUREUR, C. M., HAMILTON, K. J., JIANG, R.-T., KWAK, J.-G., SEK HARUDU, C., SUNDARALINGAM, M. & TSAI, M.-D. (1991). Phospholipase A₂ engineering: X-ray structural and functional evidence for interaction of Lys-56 with substrates. *Biochemistry* **30**, 11801-11811.
- OLLIS, D. L., CHEAH, E., CYGLER, M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., FRANKEN, S. M., HAREL, M., REMINGTON, S. J., SILMAN, I., SCHRAG, J., SUSSMAN, J. L., VERSCHUEREN, K. H. G. & GOLDMAN, A. (1992). The $\alpha\beta$ hidrolase fold. *Protein Eng.* **5**, 197-211.
- OTTOLINA, G., CARREA, G., RIVA, S., SARTORE, L. & VERONESE, F. M. (1992). Effect of the enzyme form on the activity, stability and enantioselectivity of lipoprotein-lipase in toluene. *Biotechnol. Lett.* **14**, 947-952.
- PERNAS, P., OLIVIER, J. L., LEGOY, M. D. & BEREZIAT, G. (1990). Phospholipid synthesis by extracellular phospholipase A₂ in organic solvents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 644-650.
- PETERS, A. R., DEKKER, N., VAN DEN BERG, L., BOELEN, R., KAPTEIN, R., SLOTBOOM, A. & DE HAAS, G. H. (1992). Conformational changes in phospholipase A₂ upon binding to micellar interfaces in the absence and presence of competitive inhibitors. A ¹H and ¹⁵N NMR study. *Biochemistry* **31**, 10024-10030.

- PLUCKTHUN, A. & DENNIS, E. A. (1985). Activation, aggregation, and product inhibition of cobra venom phospholipase A₂ and comparison with other phospholipases. *J. Biol. Chem.* **260**, 11099-11106.
- POOLE, P. L., FINNEY, J. L. (1983). Sequential hydration of a dry globular protein. *Biopolymers* **22**, 255-260.
- RUPLEY, J. A., GRATTON, E. & CARERI, G. (1983). Water and globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **8**, 18-22.
- RUSSELL, A. J., CHATTERJEE, S., RAPANOVICH, I. & GOODWIN, J. G., JR. (1992). En *Biomolecules in Organic Solvents* (Gómez-Puyou, A., Ed.) CRC Press, Boca Raton, pp.91-111.
- RUSSELL, A. J. & KLIBANOV, A. M. (1988). Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents. *J. Biol. Chem.* **263**, 11624-11626.
- RYU, K. & DORDICK, J. S. (1992). How do organic solvents affect peroxidase structure and function? *Biochemistry* **31**, 2588-2598.
- SARDA, L. & DESNUELLE, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en emulsion. *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 513-521.
- SCHRAG, J. D. & CYGLER, M. (1993). 1.8 Å refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. *J. Mol. Biol.* **230**, 575-591.
- SCHRAG, J. D., LI, T., WU, S. & CYGLER, M. (1991). Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351**, 761-764.
- SCHULZ, G. E. & SCHIRMER, R. H. (1979). En *Principles of protein structure*, Chapter 3, Springer-Verlag, New York.
- SCOTT, D. L., WHITE, S. P., BROWNING, J. L., ROSA, J. J., GELB, M. H. & SIGLER, P. B. (1991). Structures of free and inhibited human secretory phospholipase A₂ from inflammatory exudate. *Science* **254**, 1007-1010.
- SCOTT, D. L., WHITE, S. P., OTWINOWSKI, Z., YUAN, W., GELB, M. H. & SIGLER, P. B. (1990). Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science* **250**, 1541-1546.
- SEKHARUDU, C., RAMAKRISHNAN, B., HUANG, B., JIANG, R.-T., DUPUREUR, C. M., TSAI, M.-D. & SUNDARALINGAM, M. (1992). Crystal structure of the Y52F/Y73F double mutant of phospholipase A₂: Increased hydrophobic interactions of the phenyl groups compensate for the disrupted hydrogen bonds of the tyrosines. *Protein Sci.* **1**, 1585-1594.
- SINGER, S. J. (1962). The properties of proteins in non-aqueous solutions. *Adv. Protein Chem.* **17**, 1-68.

- SINGLETON, W. S., GRAY, M. S., BROWN, M. L. & WHITE, J. L. (1965). Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 53-56.
- SMITH, L. C., FAUSTINELLA, F. & CHAN, L. (1992). Lipases: three-dimensional structure and mechanism of action. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2**, 490-496.
- STÅHL, M., JEPPSSON-WISTRAND, U., MANSSON, M.-O. & MOSBACH, K. (1991). Induced stereoselectivity and substrate selectivity of bio-imprinted α -chymotrypsin in anhydrous organic media. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9366-9368.
- STÅHL, M., MANSSON, M.-O. & MOSBACH, K. (1990). The synthesis of a D-amino acid ester in an organic medium with α -chymotrypsin modified by a bio-imprinting procedure. *Biotechnol. Lett.* **12**, 161-166.
- ST. CLAIR, N. L. & NAVIA, M. A. (1992). Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7314-7316.
- SZUHAJ, B. F. (1989). *En Lecithins: sources, manufacture and uses*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL.
- TAWAKI, S. & KLIBANOV, A. M. (1992). Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1882-1884.
- TESTET-LAMANT, V., ARCHAIMBAULT, B., DURAND, J. & RIGAUD, M. (1992). Enzymatic synthesis of structural analogs of PAF-acether by phospholipase D-catalysed transphosphatidylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 347-350.
- THUNNISSEN, M. M. G. M., EISO, A. B., KALK, K. H., DRENTH, J., DIJKSTRA, B. W., KUIPERS, O. P., DIJKMAN, R., DE HAAS, G. H. & VERHEIJ, H. M. (1990). X-ray structure of phospholipase A₂ complexed with a substrate-derived inhibitor. *Nature* **347**, 689-691.
- THUREN, T., VIRTANEN, J. A., VERGER, R. & KINNUNEN, P. K. J. (1987). Hydrolysis of 1-palmitoyl-2-[6-(pyren-1-yl)]hexanoyl-*sn*-glycero-3-phospholipids by phospholipase A₂: effect of the polar head group. *Biochim. Biophys. Acta* **917**, 411-417.
- VAN OORT, M. G., DIJKMAN, R., HILLE, J. D. R. & DE HAAS, G. H. (1985a). Kinetic behavior of porcine pancreatic phospholipase A₂ on zwitterionic and negatively charged single-chain substrates. *Biochemistry* **24**, 7987-7993.
- VAN OORT, M. G., DIJKMAN, R., HILLE, J. D. R. & DE HAAS, G. H. (1985b). Kinetic behavior of porcine pancreatic phospholipase A₂ on zwitterionic and negatively charged double-chain substrates. *Biochemistry* **24**, 7993-7999.

- VAN TILBEURGH, H., EGLOFF, M.-P., MARTINEZ, C., RUGANI, N., VERGER, R. & CABBILLAU, C. (1993). Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* **362**, 814-820.
- VAN TILBEURGH, H., SARDA, L., VERGER, R. & CABBILLAU, C. (1992). Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature* **359**, 159-162.
- VERGER, R., MIERAS, M. C. E. & DE HAAS, G. H. (1973). Action of phospholipase A at interfaces. *J. Biol. Chem.* **248**, 4023-4034.
- VERHEIJ, H. M., SLOTBOOM, A. J. & DE HAAS, G. H. (1981). Structure and function of phospholipase A₂. *Rev. Physiol. Biochem. Pharm.* **91**, 91-203.
- VINCENT, M., DEVEER, A.-M., DE HAAS, G. H., VERHEIJ, H. M. & GALLAY, J. (1993). Stereospecificity of the interaction of porcine pancreatic phospholipase A₂ with micellar and monomeric inhibitors. A time-resolved fluorescence study of tryptophan residue. *Eur. J. Biochem.* **215**, 531-539.
- VLATAKIS, G., ANDERSSON, L. I., MÜLLER, R. & MOSBACH, K. (1993). Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* **361**, 645-647.
- VOLWERK, J. J. & DE HAAS, G. H. (1982). En *Lipid-protein interactions*, vol. I, Wiley-Interscience, New York, pp 69-149.
- WAITE, M. (1985). En *Biochemistry of Lipids and Membranes* (Vance, D. E. & Vance, J. E., Eds.), The Benjamin/Cummings Publ. Co., Inc., Menlo Park, CA, pp.299-324.
- WAITE, M. (1987). En *The phospholipases*, Plenum, New York.
- WARWICKER, J., MUELLER-HARVEY, I., SUMMER, I. & BHAT, K. M. (1994). The activity of porcine pancreatic phospholipase A₂ in 20% alcohol/aqueous solvent, by experiment and electrostatics calculations. *J. Mol. Biol.* **236**, 904-917.
- WESCOTT, C. R. & KLIBANOV, A. M. (1993). Solvent variation inverts substrate specificity of an enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 1629-1631.
- WESCOTT, C. R. & KLIBANOV, A. M. (1994). The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **1206**, 1-9.
- WHITE, S. P., SCOTT, D. L., OTWINOWSKI, Z., GELB, M. H. & SIGLER, P. B. (1990). Crystal structure of cobra-venom phospholipase A₂ in a complex with a transition-state analogue. *Science* **250**, 1560-1563.
- WILKS, H. M., CORTÉS, A., EMERY, D. C., HALSALL, D. J., CLARKE, A. R. & HOLBROOK, J. J. (1992). Opportunities and limits in creating new enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **672**, 80-93.

- ZAKS, A. & KLIBANOV, A. M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science* **224**, 1249-1251.
- ZAKS, A. & KLIBANOV, A. M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3192-3196.
- ZAKS, A. & KLIBANOV, A. M. (1986). Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. water is reversed. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2767-2768.
- ZAKS, A. & KLIBANOV, A. M. (1988a). Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* **263**, 3194-3201.
- ZAKS, A. & KLIBANOV, A. M. (1988b). The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* **263**, 8017-8021.

