

EFECTO DE LA POSICIÓN DE UN RESIDUO DE LISINA EN LA ACTIVIDAD CATALITICA DE VARIANTES DE LACASA LAC3

Ariana Adelhy Arteaga Castrejón¹, María del Refugio Trejo Hernández¹, Yasmina Mekmouche², Thierry Tron², Fernando Martínez Morales¹. ¹Laboratorio de Biotecnología Ambiental, CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA, UAEM, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa. C.P. 62209 Cuernavaca, Mor. ²Institut des Sciences Moléculaires, UNIVERSIDAD DE AIX-MARSEILLE, Marsella, Francia. Email: ariac_89@hotmail.com

Palabras clave: Lacasa, variantes, modelo 3D.

Introducción. Las lacasas, son oxidasas azul multicobre, que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos aromáticos así como algunos iones inorgánicos, con la reducción de oxígeno a agua (1). La lacasa LAC3 del basidiomiceto *Trametes sp.* C30 y su variante K0 han sido estudiadas por oxidar compuestos que normalmente no oxidan en presencia de compuestos metálicos (2,3,4). Estas características han sido aprovechadas en diferentes campos como la nanobiotecnología, la cual está emergiendo como una nueva frontera de la biotecnología. En ésta se utilizan a los residuos de aminoácidos que quedan expuestos hacia el medio y que pueden actuar como sitios de unión, e interactuar con grupos disponibles en la superficie de nanopartículas para la síntesis de nanomateriales por medio de reacciones específicas de funcionalización (3). En el presente trabajo se identificaron los sitios en la superficie de K0 a ser mutados colocando un solo residuo de lisina para obtener una colección de variantes Unik's y medir el efecto que tienen dichas mutaciones sobre la actividad catalítica de estas enzimas, para en un futuro aprovechar el mejoramiento de estas en procesos de funcionalización.

Metodología. *Modelo molecular.* Para mapear los aminoácidos sobre la superficie de K0 se generó un modelo tridimensional (3D) por reemplazo con el servidor Swiss Model. Para identificar a los aminoácidos en la superficie de K0 se utilizaron los programas GetArea y PyMOL. *Construcción de mutantes.* Se utilizó el protocolo de Phusion polymerase en donde los productos de PCR son transformados en *E. coli* DH5α. El plásmido es aislado de las colonias positivas y es enviado a secuenciar. *Transformación y producción de la lacasa.* *S. cerevisiae* W303-1a fue transformada con el plásmido mutagénico derivado de pAK145 usando el protocolo de acetato de litio/ ss DNA carrier/ PEG (3). Después de la transformación las células fueron plaqueadas en medio selectivo (MD) que contenían 0.05%(v/v) de guaiacol e incubadas a 30°C durante 3 días y seleccionadas de acuerdo a su actividad volumétrica.

Resultados. Con base al modelo obtenido se identificaron los aminoácidos en superficie, de 492 residuos de aminoácidos que conforman a la lacasa tan solo 114 residuos de aminoácidos se encuentran en la

superficie, de los cuales solo 85 pueden ser mutados. Se seleccionaron aquellos residuos que se encuentran más cercanos al cobre T1 (Tabla 1).

Tabla 1. Distancia (d) en Amstrong (Å) entre el aminoácido de superficie susceptible a ser sustituido por Lys (K) y el Cul.

Aminoácido	Espacio	d (Å)
Valina (V)	269	20
Treonina (T)	270	27
Ácido aspártico (D)	254	44
Ácido aspártico (D)	283	43
Glutamina (Q)	238	17
Ácido aspártico (D)	291	46

En la figura 1 se observa la mutación dentro de la secuencia de aminoácidos de las variantes T270K y D283K, las cuales fueron transformadas en *S. cerevisiae* en donde se obtuvieron clones que mostraron actividad con guaiacol en medio sólido y actividad con ABTS en medio líquido.



Fig.1. A) Secuencia de la mutante T270K y B) Secuencia de la mutante D283K, se puede observar en ambas secuencias que la mutación fue incorporada. C) Clonas (+) de *S. cerevisiae* en MD.

Conclusiones. Se seleccionaron nueve sitios con base a su distancia al sitio de Cul. Hasta el momento ninguna de las mutantes transformadas en *S. cerevisiae* ha perdido su función, por lo que todas han sido capaces de oxidar Guaiacol y ABTS.

Agradecimientos. Al Proyecto ECOS Nord 277027 México-Francia (CONACyT -ANUIES). Beca de doctorado No.296808.

Bibliografía.

- Bertrand, B., Martínez-Morales, F y Trejo-Hernández, M. 2017. *Biotechnol. Prog.* 33, 473-488.
- Klonowska, A et al. 2005. *Enzyme and Microbial Tech.*: 36, 34-41.
- Schneider, L et al. 2015. *Congrès de la Société Chimique de France.*
- Lalaoui, N et al. 2016. *ACS Catal.* 6, 1894-1900.
- Robert, V et al. 2011. *Current Genomics*, 12, 123-129.
- Gietz, R.D. *Yeast Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1163, Cap. 4, 33-44.