



El papel de la N- glicosilación sobre la actividad y termoestabilidad de la lacasa del hongo *P sanguineus*.

Odón Vite-Vallejo¹, Hector G. Ayala-Castro², Brenda Valderrama², Edgar Dantán-González¹, Laura A. Palomares-Aguilera² y Jorge L. Folch-Mallol¹. 1.- Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM. 2.- Instituto de Biotecnología UNAM. Av. Universidad #1001 Col. Lomas de Chamilpa. CP 62210. Cuernavaca, Morelos, México. Tel: 3297057. Fax: 3297030. e-Mail: odonvite@yahoo.com.mx.
Palabras clave: Lacasa, N-glicosilación, actividad.

INTRODUCCIÓN: La glicosilación es una modificación postraduccional importante para las proteínas o enzimas que van a ser secretadas o que se encuentran dentro de la vía secretora en retículo endoplásmico o Aparato de Golgi. Se ha demostrado que este proceso está muy relacionado con la actividad y estructura de las proteínas (1). Las lacasas son proteínas glicosiladas y son secretadas. En los hongos, las lacasas participan principalmente en la degradación de la lignina de la madera de los árboles. Estas enzimas pertenecen al grupo de las fenol oxidasas, multicobre y azul oxidasas. A nivel industrial estas enzimas se han utilizado en procesos como el biopulpeo del papel, decoloración de colorantes textiles, etc (2).

El objetivo principal de este estudio es conocer si la glicosilación de la lacasa del hongo *P. sanguineus* influye en las propiedades de la enzima (actividad, termoestabilidad, pH óptimo y parámetros cinéticos).

MATERIALES Y MÉTODOS: Para la purificación de la lacasa se utilizaron varios pasos cromatográficos en forma seriada (interacción hidrofóbica, intercambiadores aniónicos y catiónicos, exclusión molecular y ultrafiltración). La pureza de la proteína en cada paso de purificación se determinó utilizando geles de SDS-PAGE al 10%. Posteriormente, la lacasa pura fue desglicosilada utilizando la enzima E1 de *C. meningosepticum* específica para el corte de oligomonómeros de manosa. Esta enzima permite cortar los glicanos sin necesidad de desnaturalizar la proteína. La desglicosilación de la enzima se determinó mediante SDS-PAGE. Con la proteína desglicosilada, se procedió a determinar la termoestabilidad de la enzima utilizando temperaturas desde 20 hasta 70 °C por 3 horas. Como control se utilizó la proteína glicosilada. Los parámetros cinéticos de la proteína se realizaron con ABTS, guaiacol, siringaldazina y *o*-dianisidina a diferentes concentraciones. El pH óptimo de la enzima nativa y desglicosilada se determinó de pH 3-10. Para la obtención del perfil de glicosilación de la enzima, los glicanos fueron digeridos con la enzima PNGasaF la cual es específica para la digestión de glicanos. Los glicanos fueron marcados con un fluoróforo (2AB) y posteriormente el perfil de glicanos se determinó por HPLC. Posteriormente se realizaron digestiones con manosidasa, hexosaminidasa, fucosidasa y galactosidasa para determinar si los glicanos son susceptibles a la digestión de dichas enzimas.

RESULTADOS: La purificación de la lacasa fue del 43% utilizando la serie de columnas cromatográficas mencionadas anteriormente. El peso molecular de la lacasa fue de 68 kDa. La actividad específica de la enzima fue de 69 U/mg. Con la enzima ya desglicosilada, se determinó la termoestabilidad de la enzima. El resultado indica que la enzima es menos termoestable cuando ya fue desglicosilada. Por otra parte, el pH óptimo de la enzima nativa fue de 4, mientras que para la enzima desglicosilada fue de 4 a 4.5. A su vez, un efecto en la disminución de la actividad se observó a pH's ácidos (3-6), con la enzima desglicosilada. Respecto a la afinidad de la lacasa nativa y desglicosilada (K_m), solamente con *o*-dianisidina se observó un cambio significativo. Respecto al perfil de glicosilación de la lacasa, la enzima fue susceptible a la digestión con manosidasa, por lo que con el cromatograma obtenido se determinó que la enzima posee estructuras que van desde 5 hasta 9 moléculas de manosa.

CONCLUSIONES: Se purificó la lacasa de *P. sanguineus* a homogeneidad obteniéndose hasta 69 U/mg de proteína. Se determinó que la glicosilación está relacionada estrechamente tanto en la termoestabilidad, pH óptimo y respecto a los parámetros cinéticos solamente para *o*-dianisidina. Estos datos indican que la glicosilación es un proceso importante en la conformación de la proteína e inclusive para la entrada de los sustratos al sitio activo. El perfil de glicosilación de la lacasa corresponde a estructuras similares a las reportadas para otros hongos basidiomicetos.

AGRADECIMIENTOS: A CONACYT por la beca de doctorado otorgada para la elaboración del proyecto de tesis doctoral (# de beca 181671). A la M. en C., V. Hernández por su apoyo técnico en el análisis del perfil de glicosilación.

BIBLIOGRAFÍA

1. - Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., y Watson J.D. (2002). Biología molecular de la célula. Tercera Edición. Editorial OMEGA.
2. - Baldrian P. "Fungal laccases-occurrence and properties". 2005. **30**: 215-242.