



MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA β -LACTOGLOBULINA BOVINA PARA CORROBORAR LA INTERACCIÓN DE LOS GRUPOS ϵ -AMINO DE LA LISINA CON LA β -GALACTOSIDASA.

Tatiana Catalán-Ramírez¹, Elizabeth Del Moral-Ramírez², Judith Jiménez-Guzmán², Gloria Saab-Rincón³ y Mariano García-Garibay^{1,2}

¹Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa; ²Departamento de Ciencias de la Alimentación, UAM-Lerma. ³Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, IBT, UNAM. e-mail: mgarcia@correo.ler.uam.mx

Palabras clave: β -lactoglobulina, β -galactosidasa, mutagénesis dirigida.

Introducción La actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (β -gal) aumenta en presencia de β -lactoglobulina (β -lg) y este efecto activador se debe a la unión entre la enzima y la proteína [1]. Estudios *in silico* de las interacciones han sugerido que la Lys¹³⁸ y la Lys⁴⁷ podrían estar involucradas en el mecanismo de interacción y por lo tanto en el de activación de la enzima [2]. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo la mutagénesis dirigida para substituir las lisinas 47, 69, 70, 138 y 141 de la β -lg bovina para comprobar su papel en la interacción de la β -lg con la β -gal así como en su activación.

Metodología. Se generaron mutantes de β -lg substituyendo las Lys (47,69, 70, 69-70, 138, 141 y 138-141). Se modelaron las mutantes y se compararon con la β -lg nativa para evaluar los posibles cambios estructurales. La capacidad activadora de las mutantes se determinó midiendo la actividad de β -gal en presencia de ellas y comparándola con la obtenida en presencia de β -lg nativa o comercial. Las interacciones entre las mutantes y la β -gal se determinaron por cromatografía de afinidad [1].

Resultados. Los modelos obtenidos de las mutantes mostraron que la substitución de las Lys modifica significativamente las estructuras con respecto a la β -lg nativa, por lo que las diferencias en activación o interacción tendrían que ser debidas a los aa substituidos.

Para determinar el papel de las diferentes Lys en la activación de la enzima se midió la actividad de β -gal en presencia de las diferentes mutantes (Fig. 1). Se comparó la capacidad de activación de las diferentes proteínas (Tabla 1) y se observó que tanto la β -lg nativa como la comercial y las mutantes sustituidas en las lisinas 47, 69, 70 y 69-70 activan a la β -gal en el rango del 100%, sugiriendo que los aminoácidos responsables de la activación siguen activos en estas mutantes. Las mutantes sencillas 138 o 141 activan a la β -gal en 50%, mientras que en la mutante doble 138-141 se perdió completamente la capacidad activadora, sugiriendo que son estas Lys las responsables del efecto activador.

La capacidad de interacción entre las proteínas y la β -gal se determinó inmovilizándolas en una columna y determinando la actividad específica (AE) de una solución de β -gal antes y después de interactuar con la

columna. Si no hubiera interacción, o si ésta fuera inespecífica, la AE no cambiaría, mientras que una interacción específica provocaría una disminución de la AE. La cromatografía de afinidad demostró que la β -lg nativa y las mutantes sencillas 47, 69, 70 y la doble 69-70 disminuyen su AE, demostrando que mantienen su capacidad de interactuar con la β -gal. Al probar las mutantes sencillas 138, 141 y la doble 138-141 la AE no mostró ningún cambio, demostrando que la substitución de estos aminoácidos impidió la interacción entre la β -lg y la β -gal.

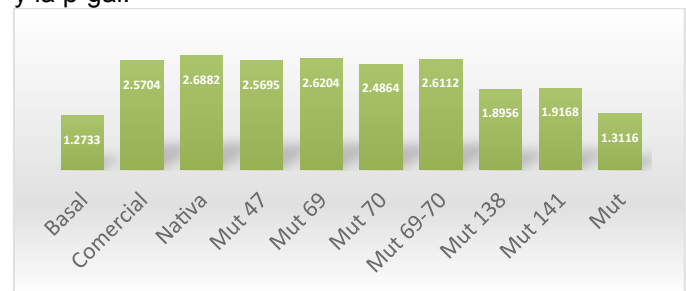


Fig.1. Actividad de la β -gal en presencia de las diferentes mutantes

Tabla 1. Activación de la β -gal por las mutantes.

	Vo	% Activación
Basal	1.2733	100
Comercial	2.5704	201.8691589
Nativa	2.6882	211.12071
Mut 47	2.5695	201.7984764
Mut 69	2.6204	205.7959632
Mut 70	2.4864	195.2721275
Mut 69-70	2.6112	205.0734312
Mut 138	1.8956	148.8730071
Mut 141	1.9168	150.5379722
Mut 138-141	1.3116	103.0079321

Conclusiones. La mutación de las Lys 138 y 141 de la β -lg disminuye tanto su capacidad activadora de la β -gal como su capacidad para unirse a la enzima, por lo que es evidente que estos residuos son fundamentales en el mecanismo de activación de la enzima.

Bibliografía.

1. Jiménez-Guzmán J., Sarabia-Leos C., Cruz-Guerrero A., Rodríguez-Serrano G., Lopez-Munguía A., Gomez-Ruiz L., García-Garibay M., (2006). *Int. Dairy J.* 16(10):1169-11732.
2. Del Moral-Ramírez, E., Domínguez-Rodríguez, L., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez Serrano, G. M., Gracia-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. y Jiménez-Guzmán, J. (2008) *J. Agric. Food Chem.*, 56: 5859-5863.