

CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE N-GLICOSILACIÓN DE UNA LACASA DE *Pycnoporus sanguineus*

Odón Vite Vallejo¹, Vanessa Hernández², Elba Villegas Villarreal¹, Laura A. Palomares² y Jorge Luis Folch Mallol¹. 1. Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad # 1001 Col. Lomas de Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. e-mail: odonvite@yahoo.com.mx, ovv@ibt.unam.mx.

Palabras clave: *Glicosilación, lacasas, S. cerevisiae.*

Introducción. Una modificación postraduccional importante para las proteínas que van a ser secretadas es la glicosilación. Esta se puede definir como la adición de glicanos a las proteínas que se sintetizan en retículo endoplásmico. El hongo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*, produce la glicoproteína lacasa. Las lacasas se encuentran dentro del grupo de las fenol-oxidasas y también pertenecen al grupo de enzimas multicobre. A su vez, están relacionadas con la degradación de la lignina además de ser enzimas capaces de degradar compuestos de tipo aromáticos como fenoles y compuestos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos. Al ser de interés biotecnológico se ha intentado producir estas enzimas a gran escala. Sin embargo los problemas principales para lograr este objetivo es que la expresión heteróloga de estas proteínas no ha sido muy exitosa debido posiblemente al alto nivel de glicosilación que presentan estas enzimas al ser producidas en *S. cerevisiae*.

El objetivo de este trabajo es la caracterización bioquímica y conocer el perfil de glicosilación de la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, además de obtener cepas mutantes en *S. cerevisiae* capaces de expresar eficientemente lacasas del hongo *P. sanguineus*.

Metodología. Se creció *Pycnoporus sanguineus* por 7 días en medio Bran Flakes, tiempo en el cual se sabe que se expresa la lacasa. La lacasa se purificó por cromatografía de intercambio iónico. La columna utilizada fue Hi trap Q de sefarsa de intercambio aniónico fuerte. Además, se determinó la cantidad de lacasa producida a los 7 días del cultivo. Para la determinación de la actividad de la lacasa se utilizó como sustrato ABTS. Con la proteína pura, se realizaron digestiones con N-glicosidasa F y exoglicosidasa para determinar el patrón de glicosilación de la lacasa por HPLC. Se realizó una genoteca de cDNA utilizando el kit Creator™ SMART™ cDNA Library Construction, para obtener el gen de la lacasa para clonarlo en *S. cerevisiae*. Por otra parte se realizará la mutación del gen *mnn1* de *S. cerevisiae* el cual se sabe que es el responsable de la hipermanosilación de las enzimas producidas en este microorganismo. Se cuantificará la lacasa producida por esta cepa mutante, además, de caracterizar el perfil de glicosilación.

Resultados y Discusión. Los resultados demuestran que la actividad específica de la lacasa nativa fue de 468 U/ mg

con el medio Bran Flakes como medio inductor. Por otra parte, Baldrian en el 2005, reporta la Km para diferentes lacasas haciendo el promedio de dichos datos y dando un rango de 36 hasta 770 micromolar con ABTS. La Km de la lacasa de *P. sanguineus* con ABTS fue de 234 micromolar. También este valor de Km entra dentro de los parámetros ya reportados. La Vmax fue de 4.36 $\mu\text{molar}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. La kcat fue de 1932.62 seg^{-1} . La mayoría de los glicanos que contiene la enzima corresponden a estructuras altamente manosiladas, ya que digestiones con manosidasa resultaron en la desaparición de varios picos en los respectivos cromatogramas. Las estructuras del árbol de glicosilación corresponden a las siguientes estructuras: N2M5 con el 49%, N2M8 con un 18%, N2M7 con un 11% y N2M9 corresponde a un 5%. Estas estructuras se pueden comparar con las estructuras generadas en los diferentes pasos que se dan del RE al Golgi de eucariontes. En la figura 1 se ilustra la estructura mayoritaria encontrada.

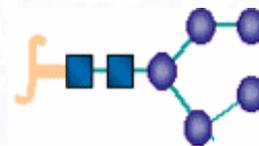


Fig1.- Estructura correspondiente a N2M5.

Por otra parte, ya se cuenta con el producto de PCR con el cual se realizará la mutación del gen *mnn1*. Además, hemos clonado ya el gen de esta lacasa, por lo que se sintetizarán oligonucleótidos para amplificar el gen de la lacasa de la genoteca de cDNA y subclonarlo en *S. cerevisiae* para la expresión heteróloga de la enzima.

Conclusiones. Bran Flakes es un buen inductor de lacasas. Se purificó la enzima con sólo 3 pasos. Se elucidó el perfil de N-glicosilación de la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, se determinó la Km y se está por obtener la mutante en *S. cerevisiae* para la expresión heteróloga de la lacasa.

Bibliografía. Eggert C., Temp U., and Ericsson K. "The liginolytic system of the with rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of laccase" *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. **62**(4): 1151-1158.

Baldrian P. "Fungal laccases-occurrence and properties". 2005. **30**: 215-242.