



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA CICLOGUCANOTRANSFERASA TERMÓFILA OPTIMIZADA MEDIANTE INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

Marco Gómez-Cortés, Verónica Rodríguez-Celestino, Alejandra Mancilla-Margalli, Agustín López-Munguía, Hugo Serrano-Posada*, Sara Centeno-Leija* Laboratorio de Agrobiotecnología, Universidad de Colima, Libramiento los limones-Loma de Juárez, Colima, CP 28629. hserrano0@ucol.mx; scenteno0@ucol.mx

Almidón; Ciclodextrinas; Extremozimas

INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos derivados del almidón, apreciadas en la industria farmacéutica. Se sintetizan industrialmente mediante el uso de cicloglucanotransferasas (CGTasas), en procesos que generalmente requieren enzimas termorresistentes. Recientemente, caracterizamos una nueva CGTasa termófila (CldC1) relacionada con el género *Caldanaerobacter*, la cual presentó modesta actividad de ciclación (1). La estructura cristalográfica de CldC1 sugirió que la baja actividad de ciclación obedece a la influencia de los residuos Ser²⁰⁰/Phe²¹⁶/Met²⁸¹ del sitio activo, que podrían estar aumentando el tiempo de residencia del sustrato, favoreciendo su hidrólisis. En este trabajo se presenta la caracterización bioquímica de la triple mutante S200G/F216Y/M281F de CldC1, para generar un biocatalizador productor de CDs, termorresistente y optimizado.

METODOLOGÍA

Diseño de la triple mutante: Coot, Chimera y CCP4mg. Docking con β -CD: Swiss-Dock/AutoDock, YASARA. Se produjo la triple mutante de forma recombinante mediante un gen sintético en el sistema pET/*Escherichia coli* BL21 y se purificó por afinidad/exclusión molecular en un FPLC AKTA Pure 25 M1 (GE Healthcare). El peso molecular y la estructura cuaternaria se determinaron por DLS. Se midió la actividad β -CGTasa (fenoltaleína) e hidrólisis (DNS) y se cuantificaron los productos (HPLC y HPAEC-PAD). La cristalización de la triple mutante se realizó con las matrices de cristalización de Hampton Research (Crystal Screen I y II, Index I y II, Crystal Screen Cryo y PEG/Ion Screen) y Rigaku (Wizard I, II, III y IV).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó Ingeniería de Proteínas de diseño racional a partir de la estructura cristalográfica de CldC1 a 1.67 Å de resolución. Así, observamos en la arquitectura del sitio activo los residuos Ser²⁰⁰/Phe²¹⁶/Met²⁸¹, que podrían estar rigidizando el posicionamiento y formación de CDs (Fig. 1), por lo que diseñamos una triple mutante S200G/F216Y/M281F (CldC1-TM), con el objetivo de optimizar racionalmente a CldC1 para la producción de CDs.

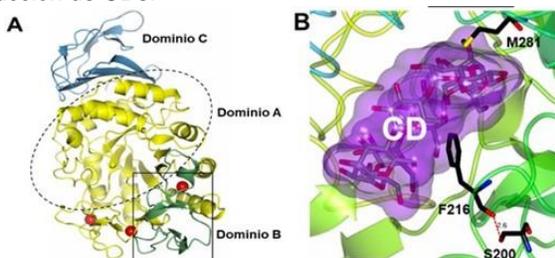


Figura 1. (A) Estructura cristalográfica de CldC1. (B) Sitio activo de CldC1 en presencia de β -CD, en donde se observan los residuos Ser²⁰⁰ (subsitio -6), Met²⁸¹ (subsitio +2) y Phe²¹⁶.

Posteriormente, se obtuvo la forma CldC1-TM recombinante y se purificó a homogeneidad. De acuerdo con ensayos acoplados SEC-DLS, CldC1-TM presenta un peso molecular de 58.49 kDa, que corresponde al monómero (Fig. 2).

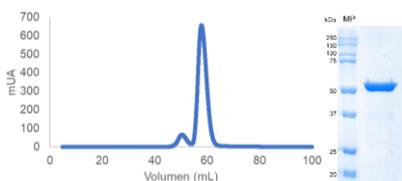


Figura 2. Purificación de CldC1-TM y gel SDS-PAGE de la fracción purificada.

Los ensayos cinéticos con 3 y 4% de almidón a 70°C y pH 4, revelaron que la triple mutante CldC1-TM, presenta una velocidad específica de formación de β -CDs, 1.3 veces menor a la de CldC1 (16.11 y 20.98 U/mg, respectivamente). Sin embargo, CldC1 hidroliza por competo a las β -CDs formadas, a una velocidad de 12 U/mg, mientras que CldC1-TM deja intacto el producto, produciendo 6 veces más β -CDs que su forma nativa (Fig. 3A).

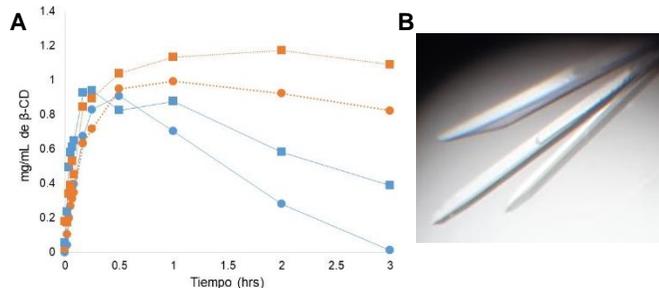


Figura 3. (A) Perfil cinético de producción de β -CDs por CldC1 (azul); CldC1-TM (naranja) a 70°C, pH 4 con 3% de almidón (círculos) y 4% (cuadros) de almidón. (B) Cristales de CldC1-TM obtenidos por el método de cristalización *microbatch* a 18 °C.

Finalmente, con el objetivo de profundizar en el estudio de la relación estructura-función entre la forma nativa CldC1 y la triple mutante CldC1-TM, se cristalizó CldC1-TM a una concentración de 10 mg/mL, utilizando gotas de 1 + 1 μ L y el Crystal Screen I (Hampton Research), condición 18 (Fig. 3B).

CONCLUSIONES

Se mejoró 6 veces el rendimiento de producción de β -CDs con una CGTasa termófila mutante, CldC1-TM, optimizada mediante Ingeniería de Proteínas de diseño racional. Lo anterior abre un nicho de oportunidad para continuar ensayos de producción a escala piloto para su aplicación industrial.

AGRADECIMIENTOS

SCL y HSP agradecen al CONAcYT por el apoyo a los proyectos INFR-280608 y CB-285001. A los Biól. Verónica Rodríguez-Celestino y Julio Navarro-Bautista por el apoyo técnico.

BIBLIOGRAFÍA.

[1] Centeno-Leija S, López-Munguía A; Posso-Dradá J; Virgen-Ortiz R; Guerra Y; Rudiño-Piñera E; Serrano-Posada H. Discovery and Structural Insights of a Novel Group of Thermophilic Three-domain Cyclodextrin Glycosyltransferases. En preparación para The Journal of Biological Chemistry. [2] Dalmia B et al., (1995) Biotechnol Bioeng.47: 575-584. [3] Miller, G. (1959). Analytical biochemistry. 31:426:428. [4] Goel A et al., (1995). Starke. 47:399-400.