



INGENIERÍA DE UNA PEROXIGENASA FÚNGICA CON POTENCIAL EN LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Joaquín Ramírez-Ramírez^a, Javier Martín-Díaz^b, Nina Pastor^c, Miguel Alcalde^b, Marcela Ayala^{a*}

^aDepartamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001 Colonia Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México

^bDepartment of Biocatalysis, Institute of Catalysis, CSIC, 28049, Madrid, Spain

^cCentro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, UAEM, Av. Universidad 1001 Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, México

Palabras clave: ingeniería de proteínas, dinámica molecular, acoplamiento molecular

Introducción. Las peroxigenasas inespecíficas (UPO) son proteínas hemo-tiolato exclusivas de hongos, capaces de catalizar la transferencia de oxígeno del peróxido de hidrógeno a una gran diversidad de moléculas orgánicas (1), incluyendo los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) (2). Estas enzimas tienen un gran potencial biotecnológico, ya que tienen requerimientos simples —y ambientalmente amigables— de reacción. Las UPO tienen un canal de acceso del sustrato desde el seno de la solución hasta el grupo hemo, donde ocurre la transferencia de oxígeno (**Figura 1**). Uno de los factores moleculares que determinan la capacidad oxidante de las UPO es la forma, tamaño y composición de este canal (3,4).

En este trabajo, combinamos herramientas teórico-computacionales con mutagénesis sitio-dirigida para estudiar el papel de residuos específicos en la modulación de la actividad de una UPO con PAH.

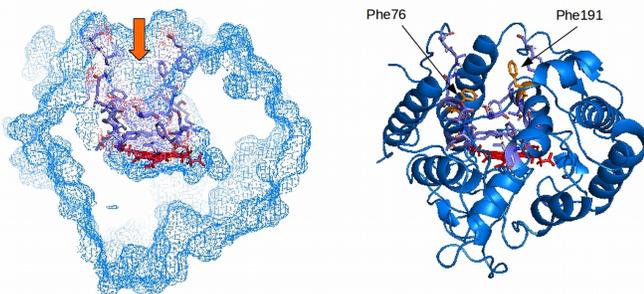


Figura 1. Canal de acceso de la UPO (variante PaDa-I). El grupo hemo se señala en rojo y los residuos Phe76 y Phe191 —seleccionados para la mutagénesis sitio-dirigida— se marcan en naranja.

Metodología. Se realizaron estudios de dinámica molecular (MD) de la variante PaDa-I de la UPO de *Agrocybe aegerita* (5) y de las mutantes F76A, F76L y F191A, así como acoplamientos moleculares (Mdock) con los PAH naftaleno, antraceno y fenantreno. Las variantes se expresaron heterológicamente en *S. cerevisiae*, se purificaron y caracterizaron cinéticamente con sustratos estándar de actividad peroxigenasa y se determinó el número de recambio total (TTN) con los PAH mencionados.

Resultados. Mediante una inspección visual de la estructura de la UPO (PaDa-I) se identificaron dos residuos de Phe que están orientados hacia el interior del canal de acceso del sustrato. En la MD, la Phe76 tiene poco movimiento y podría participar únicamente confiriéndole forma al canal, mientras que la Phe191 tiene una naturaleza más dinámica y podría modular el acceso de los sustratos. Los MDock indican que la variante F76L tiene una mejor interacción con los sustratos, ya que tiene una cadena lateral menos voluminosa en esa posición pero no tan pequeña como la variante F76A, en la que se observa una nueva cavidad que podría ser un sitio de interacción que compite con la cavidad donde se encuentra el hemo.

Las variantes mostraron una eficiencia catalítica entre 3-4 veces mayor que la enzima parental con naftaleno. De acuerdo con los TTN para naftaleno, antraceno y fenantreno, la eficiencia está relacionada con el tamaño y complejidad de los sustratos. Así, a mayor tamaño de sustrato el TTN disminuye y solo se observaron diferencias significativas entre las variantes en el caso del antraceno, donde la variante F76L presentó una mejoría de ~150% con respecto a la enzima parental.

Conclusiones. Mediante una estrategia de ingeniería de proteínas, combinando herramientas computacionales y experimentales, fue posible obtener variantes mejoradas de un biocatalizador capaz de hidroxilar compuestos de naturaleza poliaromática.

Agradecimientos. A la Biól. Rosa Román (IBt), Fernando González (IBt) y la Dra. Patricia Molina (CSIC); proyectos LANCAD-UNAM-DGTIC-293: SC16-1-S-24, SC15-1-S-29 y SC14-1-S-93; PAPIIT IN209116 y IN214619; a Conacyt por la beca de doctorado de J. Ramírez.

Bibliografía.

- Hofrichter M & Ullrich R (2014) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19: 116-125.
- Aranda E, Ullrich R & Hofrichter M (2010) *Biodegradation* 21: 267-281.
- Piontek K et al. (2013) *J. Biol. Chem.* 288: 34767-34776.
- Ramírez-Escudero M et al. (2018) *ACS Chem. Biol.* 13: 3259-3268.
- Molina-Espeja P et al. (2014) *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 3496-3507.

