

Minería genómica aplicada para la búsqueda de nuevas enzimas con actividad halogenasa en cepas nativas de *Streptomyces*

Florencia Cavallaro¹; Sofía Zeballos²; Valentina Croce²; María Inés Siri²; Victoria Giorgi¹; Agustina Vila¹; César Iglesias^{1,2}

1. Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, DQO-DEPBIO, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

2. Laboratorio de Microbiología Molecular, Área Microbiología, DEPBIO, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

fcavallaro@fq.edu.uy

INTRODUCCIÓN

Muchos compuestos halogenados se utilizan como intermediarios en la síntesis de compuestos bioactivos en las industrias química, farmacéutica, etc. Sin embargo, para la halogenación son necesarios reactivos de alto costo, perjudiciales para el medio ambiente (1). La halogenación biocatalítica se lleva a cabo mediante enzimas halogenasas que pueden clasificarse según su mecanismo catalítico, este trabajo se centró en halogenasas flavina dependientes, que reaccionan mediante una vía electrofílica aceptando moléculas que presentan el núcleo indólico en su estructura (2).

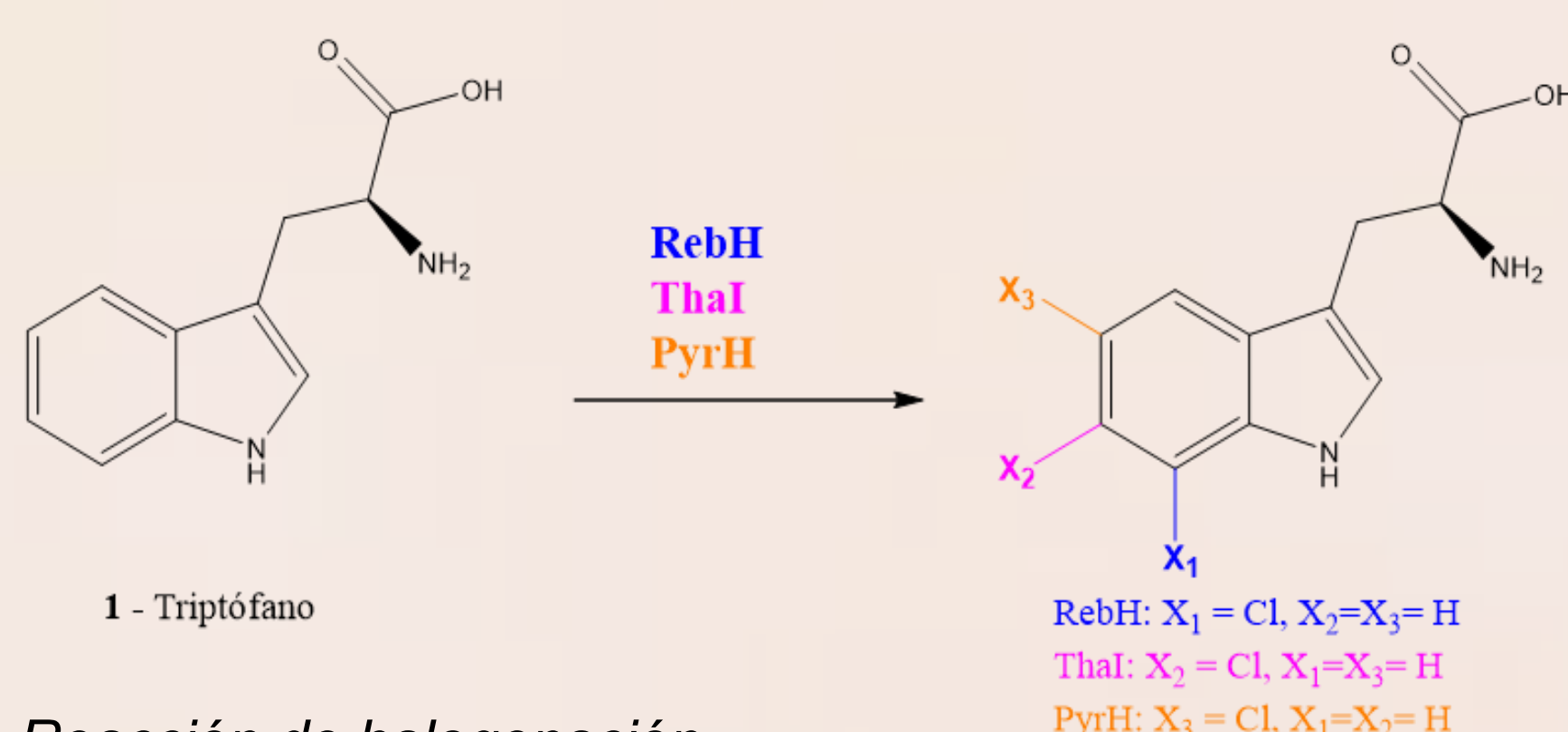


Fig 1. Reacción de halogenación

En este trabajo se presenta el análisis por minería genómica en cepas nativas para la búsqueda de nuevas halogenasas aplicables a la funcionalización de compuestos indólicos de interés. La búsqueda fue realizada en 12 cepas elegidas por su potencial biosintético a partir de una colección de 235 cepas de *Streptomyces* aisladas de suelo en Uruguay y se realizó ingeniería de proteínas para lograr la estabilización del sitio activo, para que las mismas acepten otro tipo de sustratos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Se obtuvieron sistemas activos para las halogenasas nativas encontradas tras el análisis genómico.
- Se seleccionaron las halogenasas MAI2274 y MAI2321 las cuales presentan diferente regioselectividad para la halogenación del Triptófano.
- Se está trabajando en el estudio computacional de variantes de estas enzimas para mejorar su actividad frente a triptamina.
- Se construirán los mutantes seleccionados para cada enzima y se ensayarán frente a la triptamina como sustrato.

REFERENCIAS

- Frese, M., Guzowska, P. H., Voß, H., & Sewald, N. (2014). Regioselective enzymatic halogenation of substituted tryptophan derivatives using the FAD-dependent halogenase RebH. *ChemCatChem*, 6(5), 1270–1276. <https://doi.org/10.1002/cctc.201301090>
- Crowe, C., Molyneux, S., Sharma, S. V., Zhang, Y., Gkotsi, D. S., Connaris, H., & Goss, R. J. M. (2021). Halogenases: A palette of emerging opportunities for synthetic biology-synthetic chemistry and C-H functionalisation. *Chemical Society Reviews*, 50(17), 9443–9481. <https://doi.org/10.1039/d0cs01551b>

AGRADECIMIENTOS

RESULTADOS

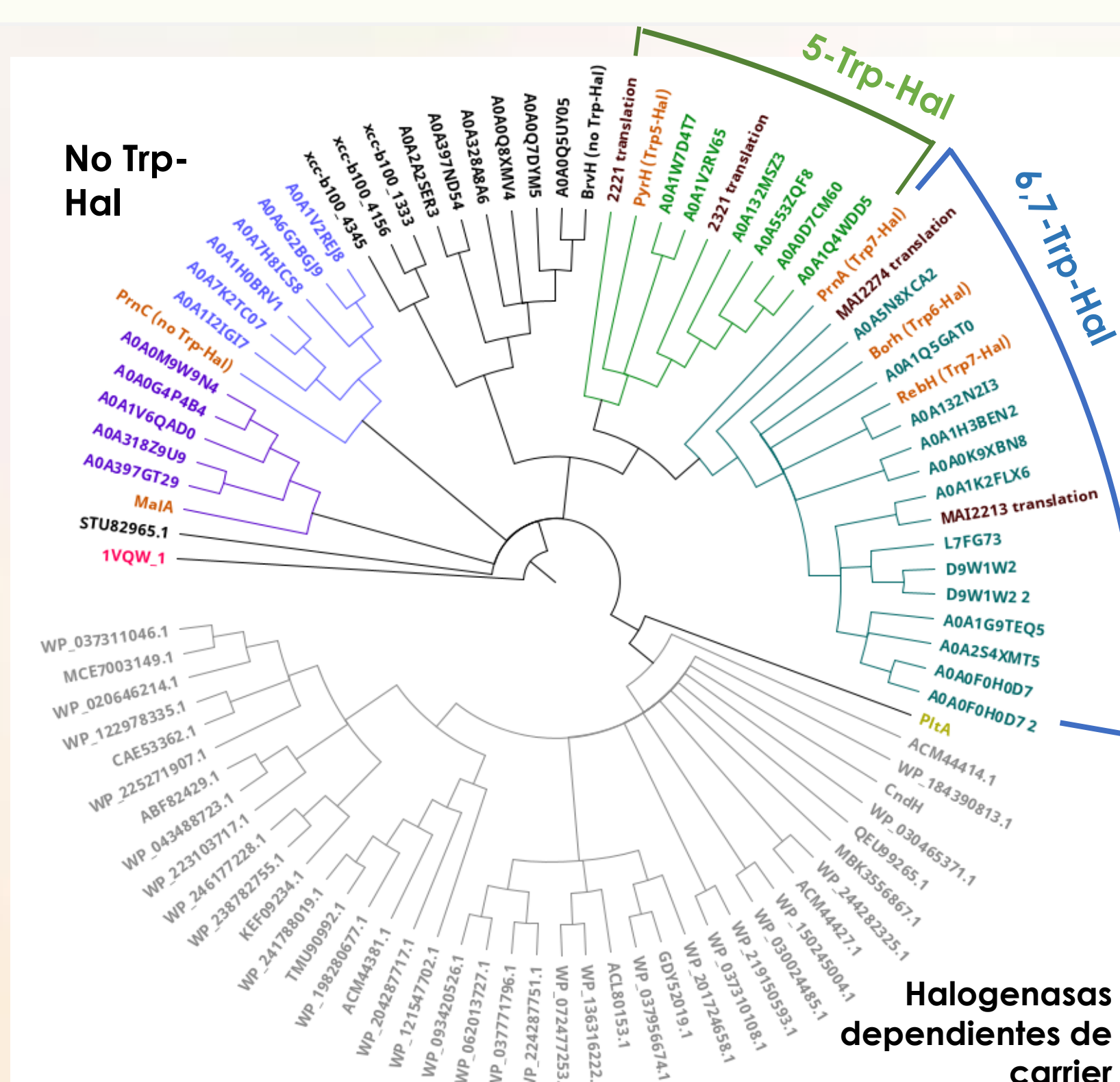


Fig 2. Árbol filogenético

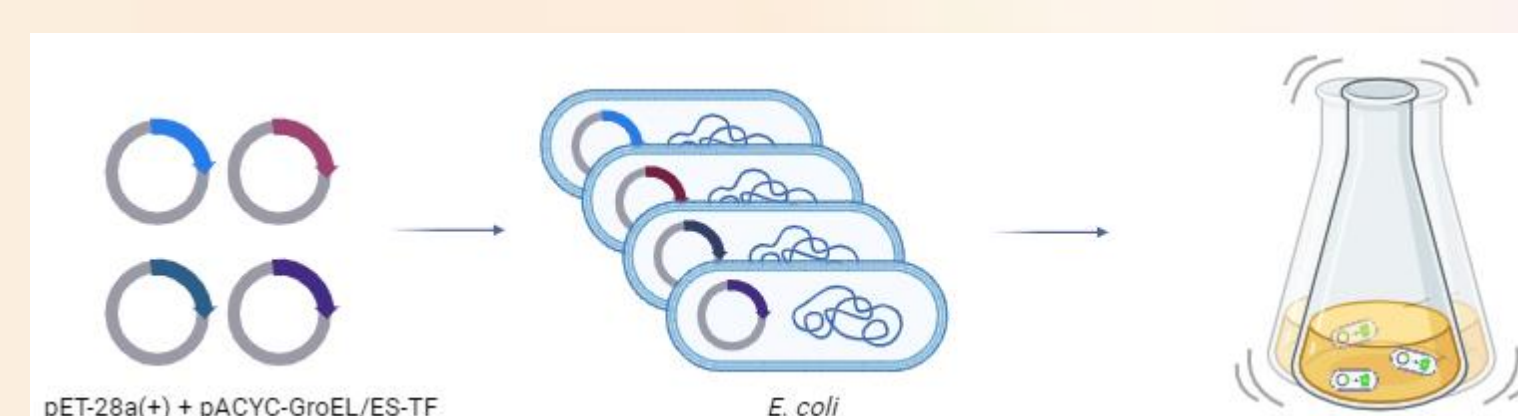
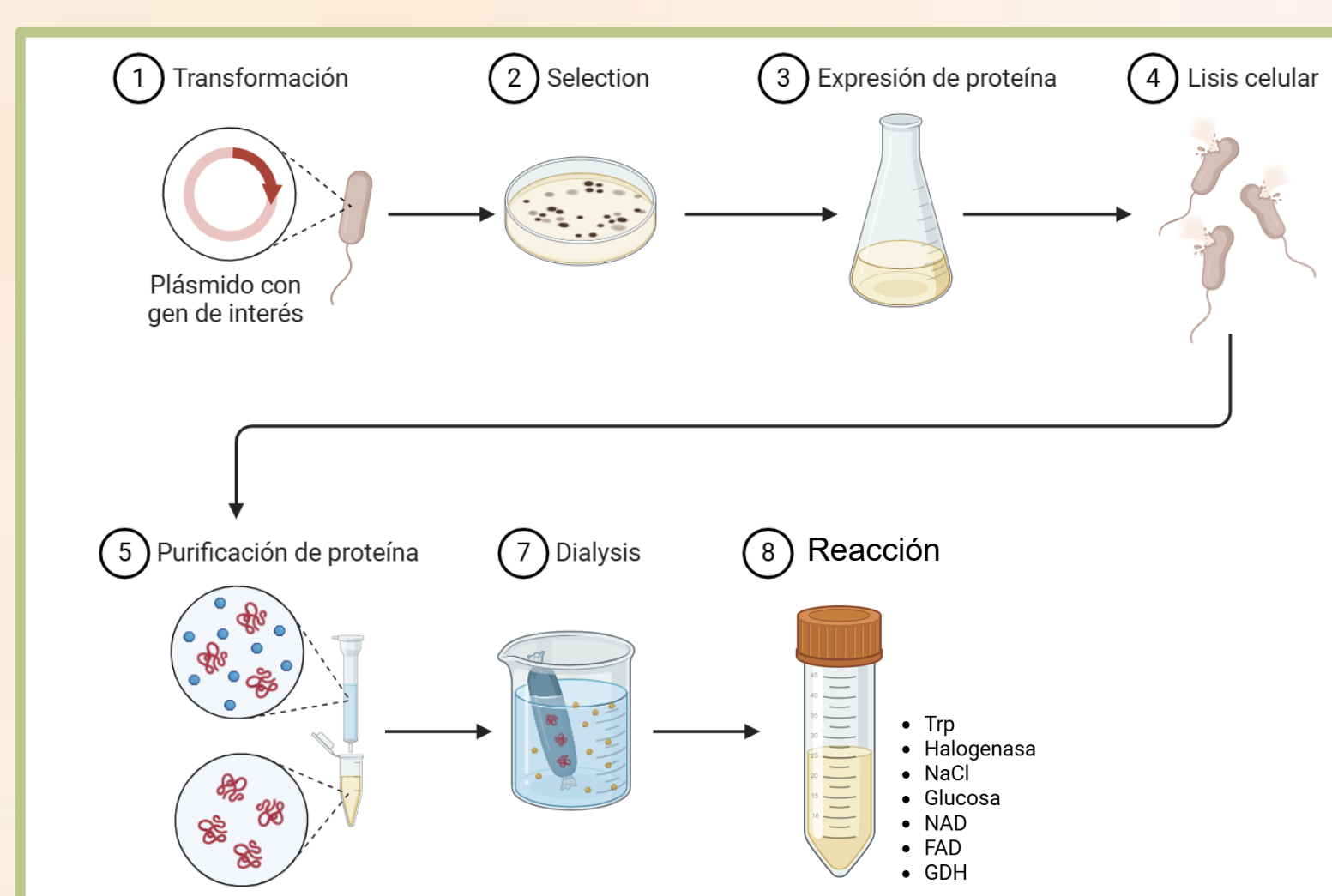


Fig 3. Sistema de expresión optimizado para E.coli

Se optimizaron las condiciones de expresión de las enzimas (medio LB, 25°C post inducción. 150 rpm, 24 hs)



Las condiciones de reacción son: Trp 2mM, NaCl 10mM, Glucosa 20%, NAD y FAD 2mM, GDH 2 UE/mL.

Mediante alineamiento de secuencia múltiple se realizó el estudio de motivos conservados, donde se puede predecir que las cepas MAI2213 y MAI2274 pertenecen al grupo de las Trp7-Hal, mientras que las cepas 2221 y 2321 pertenecen al grupo de las Trp6-Hal (Ver Figura 2 y Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de motivos conservados

Cepa	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Regioselectividad predicha
2221	ATFSTV	HPFER-QATQ	HYHGFEEAYS	Trp5-Hal
2321	ATFSTV	HPFER-QRAQ	YYHGFESYS	Trp5-hal
MAI2213	ATVFN	HPFGL	YYGNFEEFRN FWTNGSYY	Trp6-Hal
MAI2274	ATVFN	HPFGL	YYGNFEEFRN FWTNGSYY	Trp6-Hal

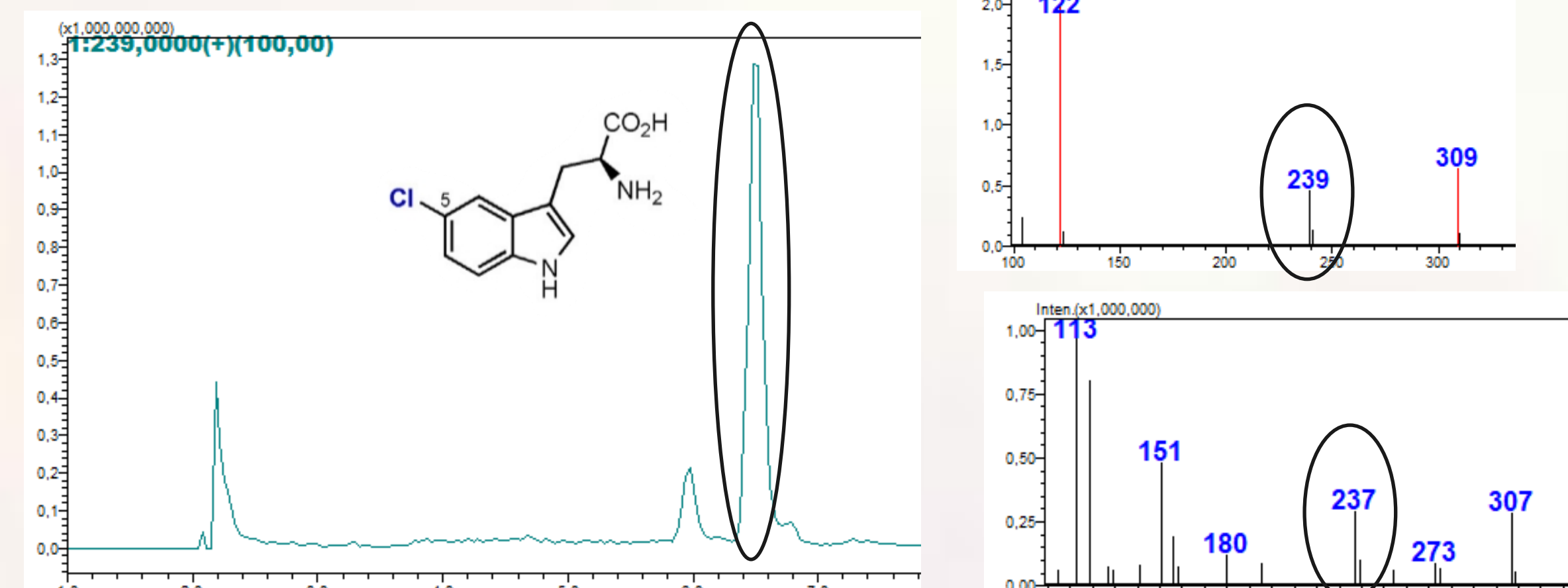


Fig 4. Espectro HPLC-MS de muestra 2231, se observan los iones $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$ del producto clorado (m/z 239 y 237).

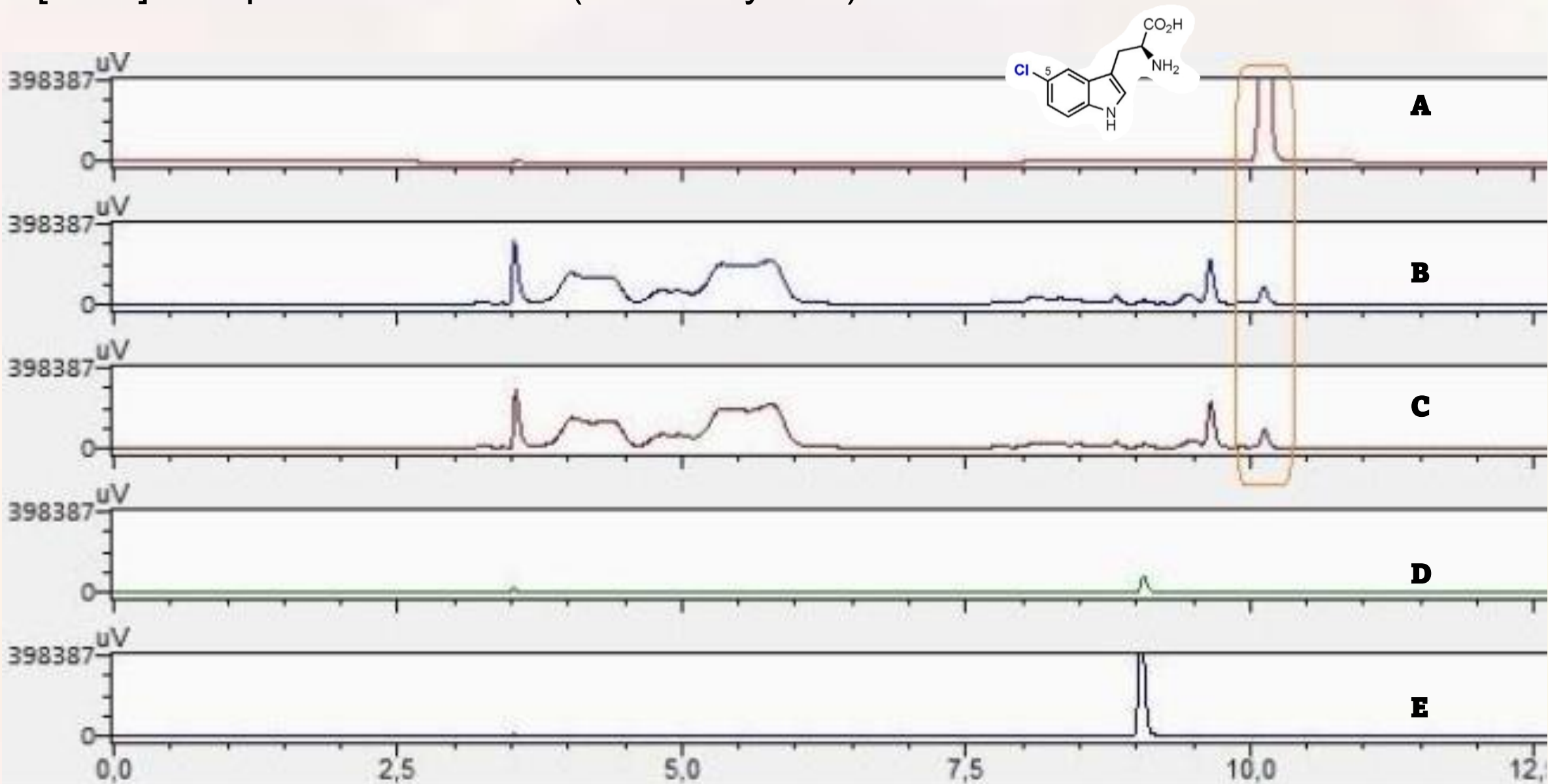


Fig 5. Biotransformación de triptófano con la cepa MAI2231 donde A: Estándar 5-Cl-L-Trp (1 mg/mL), B y C: Crudos de reacción, D: Control negativo y E: Estándar Trp (100 ng/mL). Se señala como los picos de producto en B y C tienen el mismo tiempo de retención que el estándar A.

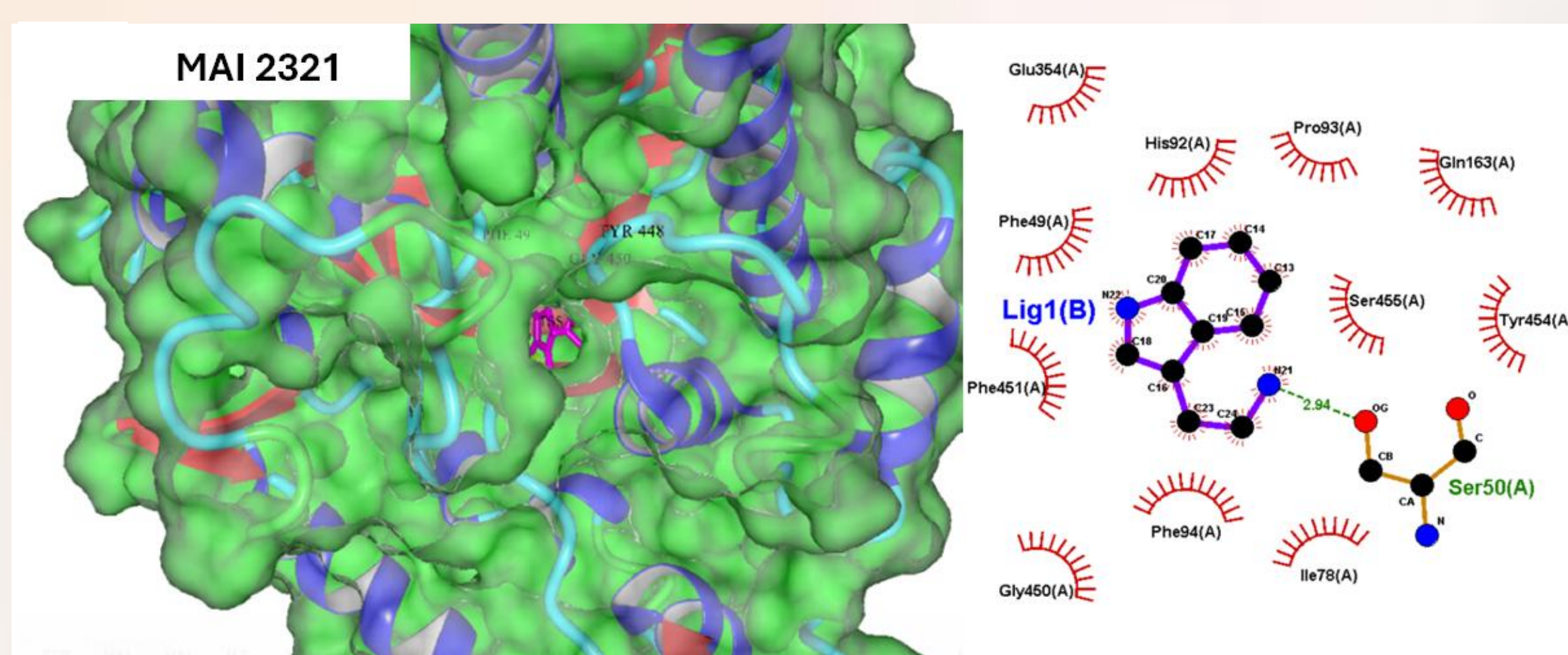


Figura 6. Imágenes de docking de Triptamina en la halogenasa MAI2321. Se observan los aminoácidos del sitio activo que se seleccionaron para realizar mutagénesis dirigida.

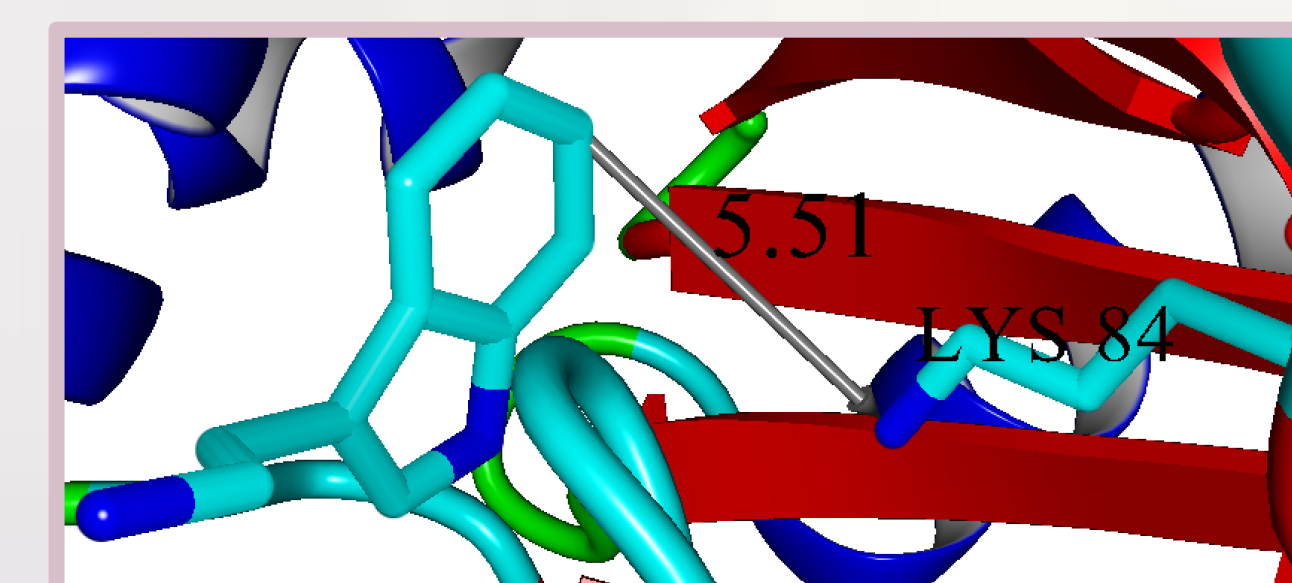


Fig 7. Distancia entre sustrato y AA Lys, muy conservado en la reacción que lleva a cabo la halogenación.

Tabla 2. Análisis de estabilidad de distintas variantes de las halogenasas en estudio utilizando el algoritmo BOLTZ 2

Cepa	Kd (mol/L)	Kd micromol	ΔG kJ/mol	ΔG kcal/mol	Dif ΔG wild type - mutante	Mutación
RebH	1.28E-05	12.82	-27.92	-6.674		no
MAI2274	5.02E-05	50.22	-24.54	-5.865	3.385	no
MAI2321	2.75E-05	27.54	-26.03	-6.221	1.896	no
RebH OS	1.88E-05	18.80	-26.98	-6.447		N470S
MAI2274	2.33E-06	2.33	-32.16	-7.686	7.618	S474Y
MAI2274	1.42E-05	14.18	-27.68	-6.614	3.136	S474D
RebH	1.17E-05	11.68	-28.15	-6.729		S110P
MAI2274	3.11E-05	31.12	-25.73	-6.149	2.428	P115G
MAI2274	1.23E-05	12.32	-28.02	-6.70	-3.48	F116I