

EFECTO DE LA SUBSTITUCION DEL ION CATALITICO Y MODIFICACION QUIMICA DE LA SUPERFICIE, SOBRE LAS PROPIEDADES CATALITICAS DE UNA FOSFOTRIESTERASA BACTERIANA.

M. Moreno-Gudiño*, L. Perezgasga, L. Sánchez-Sánchez y R. Vázquez-Duhalt. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad #2001 Col. Chamilpa. Apdo. Postal 510-3 C.P. 62250 Cuernavaca, Mor. México. Tel. (777)329-1619 Fax: (777)317-2388. *Email: mmoreno@ibt.unam.mx

Palabras clave: Fosfotriesterasa, catálisis, modificación química

Introducción. Los organofosforados (OPs) son los insecticidas químicos más utilizados en la actualidad. Las hidrolasas de OPs o fosfotriesterasas (FTE) son enzimas que se encuentran distribuidas a lo largo de la escala filogenética. La fosfotriesterasa de *Flavobacterium sp* ATCC 27551 es capaz de hidrolizar una gran variedad de compuestos OP. La FTE (72kDa), codificada por el gen *opd* de origen plasmídico, es un dímero con dos subunidades idénticas cada una de 336 residuos de aminoácidos que se pliegan como barriles (β/α)₈. El sitio activo contiene dos iones zinc, coordinados por 5 aminoácidos: His55, His57, His201, His230 y Asp301 (1). Los iones de zinc se pueden intercambiar por Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} y Mn^{2+} . La enzima sustituida con cobalto es la más activa para la degradación de diferentes insecticidas, pero también es la más sensible ante los agentes quelantes (2). En el presente trabajo, clonamos el gen *opd* sin el péptido señal, en el vector pET24a (Novagen) para sobreexpresar a la FTE, en presencia de zinc. Preparamos la apoenzima para reemplazar el ion zinc por cobalto, comprobando que con esta sustitución, obteníamos una enzima más activa. Con el fin de aumentar la estabilidad de la FTE- Co^{2+} , ante diferentes quelantes, modificamos químicamente la superficie de la enzima. Determinamos los parámetros cinéticos y la estabilidad de todas las formas obtenidas (FTE- Zn^{2+} , FTE- Zn^{2+} PEGilada, FTE- Co^{2+} y FTE- Co^{2+} PEGilada) en presencia de diferentes insecticidas y agentes quelantes.

Metodología. Se purificó el plásmido en el que está codificado el gen *opd* a partir de una colonia de *Flavobacterium sp* ATCC27551 y se amplificó el gen por PCR, utilizando oligonucleótidos con sitios de restricción. Se indujo la producción de la proteína en *E. coli* y se purificó utilizando una columna HisTrap (Amersham Biosciences) de 1 mL precargada con níquel; se corroboró la eficiencia de la purificación por medio de una electroforesis SDS-PAGE. Para llevar a cabo la modificación química de la Zn^{2+} -FTE y Co^{2+} -FTE, se utilizó metoxipolietilenglicol (mPEG) de 5kD activado con cloruro cianúrico. Se midió la actividad y estabilidad de las cuatro especies de la FTE: Zn^{2+} -FTE, Co^{2+} -FTE, mPEG- Zn^{2+} -FTE y mPEG- Co^{2+} -FTE ante el quelante orto-fenantrolina.

Resultados y discusión. Se obtuvieron 5mg de proteína pura a partir de un litro de cultivo de *E. coli*. La

sustitución del zinc por cobalto, da como resultado una enzima más activa y también más estable ante el quelante orto-fenantrolina. Para el caso de la Zn^{2+} -FTE, la pegilación contribuye a aumentar la estabilidad de la enzima, ya que su inactivación en presencia de 2 mM de orto-fenantrolina, es más rápida que la de la especie pegilada. Este resultado es opuesto a lo que observamos para la Co^{2+} -FTE.



Fig. 1. La proteína eluye a una concentración de imidazol de 300mM. Los carriles 1 y 2 corresponden al extracto total inducido sin purificar, 3: sin inducir, 4: marcador de PM.

Tabla 1. Actividad específica e inactivación en presencia de quelante, de la FTE nativa y de la FTE modificada.

Preparación enzimática	Actividad específica (mU/mg proteína)	Constante de inactivación (k_{in} , min^{-1})
Apo-enzima	0	----
Zn ²⁺ -FTE	484	- 0.1885
PEG-Zn ²⁺ -FTE	81	- 0.0275
Co ²⁺ -FTE	576	- 0.0027
PEG-Co ²⁺ -FTE	165	- 0.0545

Conclusiones. Hemos logrado montar un protocolo de expresión y purificación de la FTE que nos permite obtener cantidades suficientes de enzima para la obtención de la apoenzima, la sustitución del ion catalítico, la pegilación y los ensayos con agentes quelantes.

Agradecimiento. CONACyT 59497, Biól. Rosa Román, Dra. Marcela Ayala, Unidad de Síntesis-IBT, UNAM.

Bibliografía. (1) Masson, P., Josse, D., Lockridge, O., Vigué, N., Taupin, C., Buhler, C. (1998). Enzymes hydrolyzing organophosphates as potential catalytic scavengers against organophosphate poisoning. *J. Physiology* 92, 357-362. (2) Omburo, GA, Kuo, JM, Mullins, LS and Raushel, FM (1992) Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (19): 13278-13283.