



EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS EN LA PROTEÓLISIS DE LA DEXTRANSACARASA (DsrS) RECOMBINANTE

Erika Mellado, Clarita Olvera, Agustín López-Munguía. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología-UNAM, Apdo. Postal 510-3. CP 62271. Cuernavaca, Morelos. México. Fax: (777) 3 11 49 03.

emellado@ibt.unam.mx

Palabras clave: Dextranasa, Proteólisis, Inhibidores de proteasas.

Introducción. La dextranasa (DsrS) EC 2.4.1.5 es una glucosiltransferasa producida por *L. mesenteroides* B512F que cataliza la transferencia de un residuo de glucosa, proveniente de la sacarosa, hacia cadenas de glucosa o bien a otras moléculas aceptoras teniendo como productos principales la síntesis de polímero dextrana o glucooligosacaridos respectivamente(1). La dextrana es un polímero de gran importancia a nivel industrial por su aplicación en el área clínica (sustituto de plasma sanguíneo), farmacéutica (fármacos conjugados con dextrana) y alimentos (espesante), entre otras (2).

La DsrS nativa tiene un PM de 170 KDa y como consecuencia de un fenómeno proteolítico se derivan otras formas activas de menor peso molecular, ya reportadas en la literatura. Debido a lo anterior la caracterización cinética de la DsrS es inexacta, mostrando un comportamiento cinético variable y poca reproducibilidad de resultados (3).

El objetivo de este trabajo es estudiar el proceso de degradación proteolítica de la DsrS recombinante en presencia de inhibidores de proteasas.

Metodología. El gen *dsrS* que codifica para la dextranasa (DsrS) se clonó en el vector de expresión pBAD/TOPO[®] ThioFusion[™]. La DsrS recombinante se expresó en la cepa *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Para determinar el efecto de los inhibidores de proteasas sobre la proteólisis de la DsrS recombinante se empleó el cóctel de inhibidores de proteasas Complete[®] (inhibidores de Serinproteasas, Metaloproteasas y Cisteinproteasas) y Pepstatin[®] (Inhibidor de Aspártico proteasas) de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. Los resultados fueron analizados mediante geles de acrilamida teñidos con comassie y zimogramas.

Resultados y discusión. Se llevó a cabo la expresión de la DsrS recombinante mostrando un PM de ≈200 KDa la cual presenta un patrón proteolítico similar al ya reportado para la enzima nativa.

Con la finalidad de determinar el efecto de los inhibidores de proteasas en la proteólisis de la DsrS recombinante se realizaron ensayos adicionando dichos inhibidores durante el proceso de producción y extracción de la enzima recombinante. Al analizar los resultados no se observaron diferencias en el número de formas activas derivadas de la proteólisis de la DsrS recombinante (Figura 1) en presencia o ausencia de los inhibidores de proteasas. Con lo anterior observamos que los inhibidores de proteasas no afectan a las enzimas o al proceso (autodegradación) que sufre la DsrS recombinante.

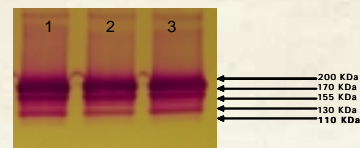


Figura 1. Efecto de los inhibidores de proteasas en la proteólisis de la DsrS. Los ensayos se realizaron inmediatamente después de extraer la proteína. 1) DsrS control. 2) DsrS con inhibidores de proteasas durante la fermentación. 3) DsrS con inhibidores de proteasas durante la fermentación y extracción.

Con la finalidad de determinar si el pH ejerce algún efecto en la actividad de los inhibidores de proteasas se realizaron ensayos variando el pH del extracto enzimático (4.8-6.8) en presencia de ambos inhibidores (Pepstatin[®] y Complete[®]). Al analizar estos resultados no se observaron cambios en el patrón proteolítico de la DsrS recombinante (Figura 2).

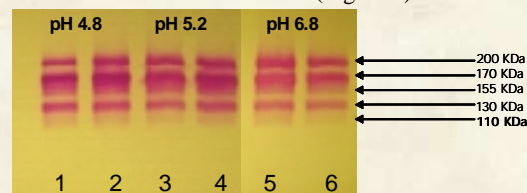


Figura 2. Efecto del pH y los inhibidores de proteasas en la DsrS. Los ensayos se realizaron inmediatamente después de extraer la proteína. 1 y 2) DsrS sin y con inhibidores de proteasas respectivamente. 3 y 4) DsrS sin y con inhibidores de proteasas respectivamente. 5 y 6) DsrS sin y con inhibidores de proteasas respectivamente. No se observan diferencias en la proteólisis.

Dado lo anterior determinamos que el pH no tiene efecto alguno en la actividad de los inhibidores de proteasas, así como en la proteólisis de la DsrS recombinante.

Conclusiones. La DsrS recombinante presenta fenómeno proteolítico similar al ya reportado para la enzima nativa, lo que demuestra que la proteólisis de la DsrS es independiente del fondo genético.

Los inhibidores de serino, metalo, cistein y aspártico proteasas (Complete y Pepstatin) no ejercen efecto alguno sobre la actividad proteolítica en la DsrS recombinante, así como los cambios de pH. Dado lo anterior surge la hipótesis de un fenómeno autoproteolítico en la DsrS. Actualmente estudiamos la proteólisis de la DsrS identificando las formas activas y no activas a través de anticuerpos anti-DsrS.

Agradecimientos. Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo de CONACYT Beca No. 184853. Agradecemos a M. en C. Ma. Elena Rodríguez por el apoyo técnico.

Bibliografía.

- 1.- Fernández J. 2003. Tesis de Maestría. IBT-UNAM.
- 2.- Monchois, V, Willemont, R, Monsan P. 1998. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS*. (23) 131-151.
- 3.- Sánchez, M, Alagón, A, Rodríguez-Sotrés, R, y López-Munguía A. 1999. Proteolytic processing of dextranases of *Leuconostoc mesenteroides*. *FEMS*. (181) 25-30.