



ESTUDIO TEÓRICO Y EXPERIMENTAL SOBRE EL AUMENTO DE ACTIVIDAD DE LA FOSFOTRIESTERASA DE *Flavobacterium sp* SUBSTITUÍDA CON COBALTO.

Lucía Perezgasga, Sergio Aguila, Martha Moreno-Gudiño y Rafael Vázquez-Duhalt, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mor., 62510, lucia@ibt.unam.mx.

Palabras clave: Catálisis, fosfotriesterasa, QM/MM.

Introducción. La actividad de fosfotriesterasa (FTE) se describió por primera vez en bacterias del suelo en 1979, en la búsqueda de una actividad enzimática que destruyera al plaguicida organofosforado paratión. Posteriormente, se aisló dicha enzima de *Pseudomonas diminuta*. La FTE es una metaloenzima, codificada por el gen *opd*, que tiene dos átomos de Zn^{2+} en el sitio activo, éstos pueden ser substituidos por otros iones divalentes, obteniéndose una enzima más activa (1, 2).

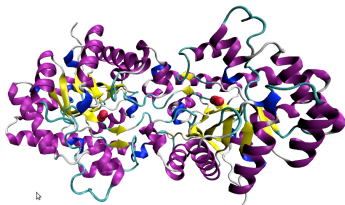


Fig. 1. Estructura tridimensional de la FTE de *Pseudomonas diminuta* (3)

En este trabajo, se clonó el gen *opd* sin péptido señal, en el vector pET24a (Novagen) para sobre expresar a la FTE, en presencia de Zn^{2+} y se preparó la apoenzima para reemplazar el ion Zn^{2+} por Co^{2+} . Se determinaron las constantes cinéticas de las dos especies y se usaron herramientas de simulación molecular de las posibles especies existentes para dar una explicación molecular a las diferencias en actividad entre la FTE- Zn^{2+} y la FTE- Co^{2+} . En la simulación molecular se utilizaron métodos híbridos QMMM, con los cuales se puede simular el sitio activo cuánticamente y el resto de la proteína a través de mecánica molecular.

Metodología. Se purificó el plásmido en el que está codificado el gen *opd* y se amplificó por PCR, utilizando oligonucleótidos con sitios de restricción para clonar de manera direccionada en el plásmido pET24a. Se indujo la producción de la proteína en *E. coli* C41 en presencia de Zn^{2+} y se purificó mediante columnas HisTrap. Se preparó la apoenzima y se cambió el átomo de Zn^{2+} por Co^{2+} . Se determinaron las constantes cinéticas usando paratión metílico como sustrato. En la simulación molecular, se usó el programa Qsite para realizar el método híbrido. Para el cálculo de la zona cuántica se usó la teoría de funcionales de la densidad (DFT) a nivel B3LYP/lacvp* y para el cálculo de la zona de mecánica molecular se utilizó el campo de fuerza opls_2005.

Resultados. Se obtuvieron 5 mg de proteína con un 90% de pureza en un litro de cultivo de *E. coli*. A partir de los datos de actividad específica de cada una de las especies, se obtuvieron las constantes cinéticas mediante el programa "Enzyme Fitter".

Como se puede observar en la Tabla 1, la k_{cat} de la FTE- Co^{2+} es 2.7 veces mayor que la de la FTE- Zn^{2+} y posee el doble de afinidad de la enzima por el sustrato (K_m), lo que indica que la enzima con Co^{2+} es más eficiente (~5 veces) en la degradación del sustrato que la enzima que tiene Zn^{2+} en el sitio activo.

Tabla 1. CONSTANTES CINÉTICAS DE LAS ESPECIES DE FTE.

Enzima	K_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	K_{cat}/K_m
FTE- Zn^{2+}	501.68	203.90	2.5
FTE- Co^{2+}	1347.14	116.82	11.5

Con el fin de determinar la especificidad de las 2 especies de fosfotriesterasa ante diferentes sustratos, se midió la actividad específica de las mismas con 4 plaguicidas organofosforados: paratión metílico, clorpirifos, coumafos y terbufos. La enzima con cobalto presentó una mayor actividad específica que la enzima nativa con todos los plaguicidas ensayados.

Conclusiones. En este trabajo, se obtuvo una enzima más activa mediante la substitución del Zn^{2+} por Co^{2+} , en el sitio activo. Mediante los métodos híbridos, es posible explicar el aumento de actividad de la enzima substituida con Co^{2+} con respecto a la enzima nativa.

Agradecimientos. CONACyT 59497, Biól. Rosa Román, Dra. Marcela Ayala, Mario Caro, Unidad de Síntesis, IBT, UNAM. El análisis computacional fue realizado usando el clúster del Instituto de Biotecnología-UNAM.

Bibliografía.

1. Dumas, D., Caldwell, S.R., Wild, J.R. and Raushel, F.M., 1989. *J. Biol. Chem.* 264, 19659-19665.
2. Omburo, G. A., Kuo, J. M., Mullins, L. S. and Raushel, F. M. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 13278-13283.
3. Benning, M.M., Shim, H., Raushel, F.M., Holden, H.M. (2001) *Biochemistry* 40, 2712-2722.