

Expresión y caracterización de una L-asparaginasa sin actividad secundaria de glutaminasa de *Streptomyces scabrissporus*.

Ricardo Rodríguez Vargas^{1,2}, Andrés Zárate Romero², Alejandro Huerta Saquero².

¹ Departamento de Microbiología, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, Zona Playitas, C. P. 22860 Apdo. Postal 360. ² Departamento de Bionanotecnología, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Autónoma de México, Carretera Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, Zona Playitas, C.P. 22860 Apdo. Postal 14.
ricardo@cicese.edu.mx

Palabras clave: L-asparaginasa, S. scabrissporus, glutaminasa

Introducción. La L-asparaginasa es una enzima de interés biotecnológico debido a que se utiliza como un tratamiento estándar contra la Leucemia Linfocítica Aguda (LLA). No obstante, las dos fuentes de la enzima (*Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi*) actualmente disponibles para tratamiento presentan efectos secundarios adversos como reacciones inmunogénicas por su origen bacteriano y problemas asociados a la actividad secundaria de glutaminasa (1). Es por ello que en la actualidad se han realizado análisis bioinformáticos para la búsqueda de nuevas fuentes de L-asparaginasa como la de *S. scabrissporus* la cual posee un bajo perfil inmunogénico, afinidad por el sustrato (asparagina) y no posee actividad secundaria de glutaminasa (2). El objetivo de este trabajo es la producción recombinante de la L-asparaginasa de *S. scabrissporus* y la caracterización cinética de la enzima.

Metodología. La L-asparaginasa de *S. scabrissporus* fue clonada en el plásmido pJET (Thermo Fisher) y después subclonada en el plásmido pET28a el cual se utilizó para transformar células competentes BL21(DE3) de *E. coli*. La proteína fue purificada con una columna de afinidad a níquel (HisTrap, Cytiva) con eluciones ascendentes de Imizadol (20, 50, 100, 300 y 500 mM), las fracciones obtenidas fueron observadas en geles de poliacrilamida al 12%. Los ensayos de cinética enzimática se realizaron utilizando buffer de carbonatos pH 10, 0.1 M y el sustrato utilizado fue L-asparagina y L-glutamina.

Resultados. Como se puede observar en la figura 1, en los carriles 7-10 se observan las bandas de 35kDa correspondiente a la asparaginasa de *S. scabrissporus*. La enzima obtenida fue utilizada para realizar cinéticas enzimáticas y determinar los parámetros cinéticos utilizando el modelo de Michaelis-Menten (tabla 1). Además, se verificó la actividad específica de la enzima por el sustrato L-asparagina encontrando que en presencia de L-glutamina (figura 2), la enzima no presentó actividad en tiempos de hasta 1 hora.

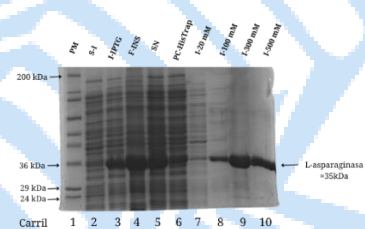


Fig. 1. Purificación de la L-asparaginasa de *S. scabrissporus*. Gel de poliacrilamida al 12%.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la L-asparaginasa

Enzima	Vmax (μM)	Km (mM)	R ²
L-asparaginasa	0.01395±0.0011	7.91±1.40	0.976

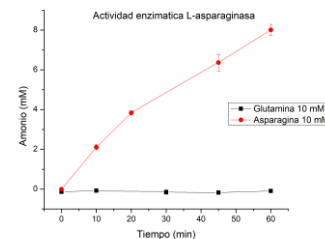


Fig. 2. Ensayos de actividad enzimática usando L-asparagina y L-glutamina como sustrato.

Conclusiones. Los resultados obtenidos comprueban la purificación de la asparaginasa recombinante de *S. scabrissporus*, al igual que se pudo demostrar la actividad específica por el sustrato asparagina y su nula actividad secundaria de glutaminasa.

Agradecimiento. Al apoyo de CICESE y CNyN donde se realizó el trabajo experimental y la beca otorgada por el CONACyT.

Bibliografía.

1. Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. J. B. C. J. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. Blood cancer journal, 7(6), e577-e577.
2. González-Torres, I., Perez-Rueda, E., Evangelista-Martínez, Z., Zárate-Romero, A., Moreno-Enríquez, A., & Huerta-Saquero, A. (2020). Identification of L-asparaginases from Streptomyces strains with competitive activity and immunogenic profiles: a bioinformatic approach. PeerJ, 8, e10276.