



### EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UN POLIPÉPTIDO DEL HONGO BASIDIOMICETO *Bjerkandera adusta* CON ACTIVIDAD DE EXPANSINA.

Irán Tapia Vázquez\*\*\*, Jorge Luis Folch Mallol\*\* y Ernesto Ortiz Suri\*.

\*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,

Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México, [erne@ibt.unam.mx](mailto:erne@ibt.unam.mx)

\*\*Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos,

\*\*\* Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62209, México, [jordifo@gmail.com](mailto:jordifo@gmail.com)

Palabras clave: expansina, *Bjerkandera adusta*, expresión heteróloga.

**Introducción.** En plantas se ha descubierto una nueva clase de proteínas llamadas expansinas. (1).

Se ha propuesto que las expansinas romperían los puentes de hidrógeno que se encuentran entre los filamentos de celulosa, o entre la celulosa y otros polisacáridos, a través de un mecanismo no enzimático, favoreciendo el movimiento entre las fibras de celulosa, el relajamiento de la pared celular y el crecimiento celular (2).

Para la obtención de biocombustibles a partir de residuos agrícolas, las expansinas representan una potencial herramienta que permitiría optimizar el proceso de degradación de lignocelulosa, ya que son capaces de relajar la pared celular en condiciones semejantes en las que lo hacen las celulasas.

Hemos identificado un gen del hongo basidiomiceto *Bjerkandera adusta* con similitud a expansinas, cuyo producto de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* demostró actividad, desorganizando fibras de algodón e incrementando la liberación de azúcares al tratar las fibras con endoglucanasas.

Para seguir estudiando este gen es de vital importancia la obtención de anticuerpos que permitan su monitoreo tanto en *B. adusta* como en las levaduras que sobre-expresan la expansina. De especial interés sería la generación de un anticuerpo capaz de neutralizar la actividad de esta proteína, que permitiría estudiar su relevancia en el metabolismo y crecimiento de *B. adusta*. Como parte de este proyecto integral, estamos involucrados en la expresión heteróloga del polipéptido de *B. adusta* con actividad de expansina, en células de *E. coli*. El objetivo de este trabajo es obtener la proteína pura para utilizarla como antígeno para la generación de los anticuerpos que la reconozcan específicamente.

**Metodología.** La metodología experimental estará basada en el sistema de expresión heteróloga de proteínas pequeñas descrito anteriormente en nuestro grupo (3). Brevemente, la secuencia codificante para el polipéptido de *B. adusta* con actividad de expansina es reamplificada y se le introducen durante el PCR, los sitios de restricción adecuados para su clonación en el vector de expresión más una secuencia codificante para el sitio de reconocimiento de la proteasa Factor Xa en el extremo

amino-terminal de la expansina. El gen amplificado es clonado en pBluescriptKS(+) (Stratagene) y entonces subclonado al vector pQE30 (vector de expresión, QIAGEN) mediante los sitios de restricción introducidos anteriormente. La expresión se lleva a cabo en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* al inducir el cultivo con IPTG. La proteína de interés es expresada en cuerpos de inclusión. El diseño de la construcción genera una proteína recombinante fusionada a una cola de histidinas que permiten su purificación por columna de afinidad de Ni-NTA. Posteriormente la cola de histidinas es eliminada por proteólisis con el Factor Xa, para evitar que interfiera en el proceso de generación de los anticuerpos anti-expansina.

**Resultados y discusión.** Hasta el momento hemos sido capaces de amplificar la secuencia de *B. adusta* por PCR e introducirle los sitios relativos a la subclonación, la purificación y la proteólisis descritos en la Metodología. Clonamos el producto de PCR puro en el vector pBluescriptKS(+), verificamos su secuencia y liberamos la construcción con las enzimas *ad hoc* para clonarlo en el vector pQE30.

**Conclusiones.** El gen codificante para el polipéptido de fusión His6-Expansina está listo para ser expresado. En este Congreso esperamos reportar los resultados finales de la expresión heteróloga.

**Agradecimiento.** Proyecto es financiado por el programa de apoyo a Investigadores Nacionales para el fortalecimiento de actividades de tutoría y asesoría de estudiantes de nivel licenciatura del CONACyT (proyecto 3345).

#### Bibliografía.

1. Cosgrove DJ. (1989). Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta*. 177: 121-130.
2. McQueen-Mason SJ, Cosgrove DJ. (1995). Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* 107 (1): 87-100.
3. Estrada G, Garcia BI, Schiavon E, Ortiz E, Cestele S, Wanke E, Possani LD, Corzo G. (2007). Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin Cssl: heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1770(8):1161-1168.