



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS QUE SE UNEN A AMPc DE LA BACTERIA *Cellulomonas flavigena*.

J. Roberto Rivera Hernández³, Rosalía Reynoso-Camacho¹, Teresa Ponce Noyola², Luis M. Salgado³

¹Posgrado en alimentos, Facultad de Química, UAQ; ²CINVESTAV-IPN, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. ³CICATA-IPN, Cerro Blanco 141, Col. Colinas del Cimatarío, 76090 Querétaro, Qro. Tel. 442-2291291, e-mail: msalgador@ipn.mx;

Palabras clave: *Celulasas, AMPc y Regulación.*

Introducción. La celulosa es un polímero lineal compuesto de unidades de glucosa, unidas por enlaces β -1-4 glucosídicos, y es el componente mayoritario en la biomasa de las plantas. La celulosa es degradada por muchos microorganismos presentes en el suelo y en el tracto digestivo de los animales. Estos microorganismos degradan la celulosa a través de enzimas con actividad de celulasa que la degradan transformándola en glucosa (1). Existe un gran interés en las celulasas microbianas debido a que son utilizadas en el procesamiento de alimentos y en industrias como la textil y la papelera. También existe un gran interés en la producción de energía (Biocombustible) a partir de la biomasa hemicelulósica particularmente por su bajo costo y abundancia. Aunque las celulasas son enzimas de gran interés para la industria, aun no se conocen a fondo los mecanismos de regulación de la biosíntesis de estas enzimas. Entre los microorganismos productores de celulasas uno de los que ofrecen una mejor producción y más ventajas es *Cellulomonas flavigena*. Se tienen evidencias de que el AMPc regula positivamente la síntesis de estas enzimas en *Cellulomonas flavigena* y que la proteína celR forma parte del mecanismo de regulación (2). En este trabajo analizamos las proteínas de *Cellulomonas flavigena* que se unen al AMPc, utilizando cromatografía de afinidad y electroforesis en dos dimensiones. Iniciamos la identificación de ellas mediante análisis tipo Western y su caracterización mediante espectrometría de masas.

Metodología. El extracto crudo se obtuvo de un cultivo de *Cellulomonas flavigena*, el cual se liso con lisozima (0.15 mg/ml). Se hizo pasar el extracto crudo a través de una columna de Bio-Gel A agarosa (Bio-Rad, 151-0740) para retirar las impurezas y posteriormente la muestra se pasó por una columna de Agarosa-AMPc (A0144, Sigma). Las proteínas que se unen a AMPc se analizaron por electroforesis en 2D. Para el Western blot se utilizó un anticuerpo que reconoce la secuencia TACERGMREGLGDG de la proteína celR de *C. flavigena*. La caracterización inicial de las proteínas se está haciendo mediante espectrometría de masas.

Resultados y discusión. El extracto crudo se pasó a través de una columna de Bio-Gel A agarosa para eliminar las proteínas que se tienen afinidad natural por la agarosa. Posteriormente se usó una columna de afinidad de 200 μ l de AMPc unido a agarosa, y se hizo pasar 1 ml del eluido de la columna anterior. La columna fue previamente equilibrada con buffer A (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4). La columna se lavó en 2.5 ml de urea 6 M en buffer A con el fin de recuperar las proteínas que se unieron específicamente. Este resultó ser un buen método de separación ya que se pudo recuperar la mayor parte de las proteínas que se unen a AMPc a partir de extractos crudos de *Cellulomonas flavigena*. Las proteínas se concentraron mediante precipitación con 0.5 ml ácido tricloroacético al 100%. Las proteínas fueron analizadas mediante SDS-PAGE y, posteriormente, caracterizadas mediante electroforesis en dos dimensiones. El producto del gen *celR* fue reconocido mediante Western blot, y se reconoce una banda de alrededor de 54 kD.

Conclusiones. La separación por medio de columna de afinidad resultó ser un buen método para separar las proteínas de unión a AMPc. La unión a AMPc del producto del gen *celR* y la homología de que tiene con represores de la familia Lac de *E. coli* demuestra que regula positivamente la expresión de celulasas por medio de la vía de AMPc.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por el CONACYT, México (Ref. 45678-Z, TP), SIP del IPN (Ref. 20090947, LMS).

Bibliografía.

1. Béguin, P., Aubert J. P. 1994. The Biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 12-58.
2. Gutiérrez-Nava, A., Herrera-Herrera, J.A., Mayorga-Reyes, L., Salgado, L.M., Ponce-Noyola T. 2003. Expresión and characterization of the *celcflB* gene from *Cellulomonas flavigena* encoding an endo-beta-1,4-gluconase. *Curr. Microbiol.* 47(5):359-363.
3. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.