



CLONACIÓN DE UNA PROTEASA ALCALINA DE *Aspergillus nidulans* Y EXPRESIÓN EN *Pichia pastoris*

Denise Castro y Amelia Farrés, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, Circuito de la Investigación s/n. Conj. "E", Lab. 312, Cd. Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F. Fax: 56 22 53 09, farres@servidor.unam.mx

Palabras clave: proteasa alcalina, Aspergillus nidulans, Pichia pastoris.

Introducción. En el grupo de trabajo se caracterizó la actividad lipasa/esterasa de una enzima termoalcalófila con posible aplicación en biocatálisis (1). La secuenciación del amino terminal de esta proteína permitió identificarla como una proteasa alcalina de *Aspergillus nidulans* producto del gen *prtA* (2). Comparando la secuencia del gen con las reportadas en las bases de datos se encontró que la enzima pertenece a las serín proteasas del tipo subtilasa, las cuales presentan una amplia especificidad de sustrato incluyendo la actividad esterasa, amidasa y elastasa. La mayoría de las subtilasas son sintetizadas como pre-pro-enzimas, subsecuentemente trasladadas a través de la membrana celular vía el pre-péptido (o péptido señal), y finalmente activadas por eliminación del pro-péptido (3).

El objetivo de este trabajo fue clonar la proteasa alcalina (propéptido y madura) de *Aspergillus nidulans* y analizar su expresión en *Pichia pastoris*.

Metodología. A partir de la secuencia reportada en GenBank se diseñaron primers específicos para amplificar por PCR el gen *prtA* de la proteasa alcalina (propéptido y madura) empleando como templado DNA extraído de una biblioteca de cDNA de *Aspergillus nidulans*. Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector pPICZ α y subclonaron en *E. coli* DH5 α para su propagación y en *Pichia pastoris* para la expresión de la enzima. La selección de las clonas de *Pichia pastoris* se realizó en medio sólido YPD+tributirina 1% adicionando en la tapa de la caja 100 μ L de metanol cada 24 horas para la inducción de la enzima. Las clonas y el control negativo fueron cultivadas en medio BMGY a 30°C y 250 rpm, hasta alcanzar una D.O._{600nm} = 2-6 y se transfirieron al medio BMMY para inducción. La expresión de la enzima se analizó por determinación de la actividad esterasa empleando el α -naftil acetato como sustrato y se confirmó por western-blot. Se caracterizó la actividad enzimática del extracto sobre ésteres de *p*-nitrofenilo, triacilglicéridos y proteínas.

Resultados y discusión. Los productos de PCR obtenidos correspondieron a los pesos esperados para la amplificación del gen de la preproenzima (1200 pb) y para la enzima madura (900 pb). La secuenciación de estos confirmó que pertenecían al gen *prtA*. Se analizó la expresión de la enzima recombinante en diez clonas con el propéptido y 12 con la madura. De las clonas que se analizaron con el propéptido ninguna mostró actividad esterasa, sin embargo en el caso de las clonas de la enzima madura, once mostraron actividad

esterasa, de las cuales se eligieron tres (PM-1, PM-3 y PM-4) por ser las que presentaron mayor actividad. El control no mostró actividad esterasa en líquido. Con este resultado se demuestra que no es necesaria la región propéptido de la enzima para la expresión funcional, lo cual difiere con lo reportado por otros autores (4). Al realizar el ensayo de western blot empleando anticuerpos específicos para la cola de histidinas, se observó que la proteína recombinante producida por las tres clonas presentó un peso molecular de aproximadamente 36 kDa y en el control no se encontró a la proteína (Fig 1). Al analizar la actividad sobre sustratos de diferente naturaleza se observó una preferencia por ésteres de cadena corta y actividad sobre triacilglicéridos, colágeno y elastina.

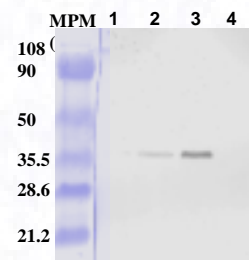


Fig. 1. Inmunodetección con anticuerpos Anti-His (C-term). MPM, marcador de peso molecular, 1, PM-1, 2, PM-3, 3, PM-4, 4, control.

Conclusiones. Se clonó la proteasa alcalina del gen *prtA*, en *Pichia pastoris* y se demostró que es posible expresar el gen de la enzima madura en forma activa sin la secuencia propéptido de la proteína.

Agradecimiento. Al CONACYT por la beca 154527 otorgada para la realización de este proyecto.

Bibliografía.

- Peña, C. (2001). Producción, purificación y caracterización bioquímica de una enzima con actividad lipolítica en *Aspergillus nidulans*. Tesis de Maestría. UNAM.
- Castro, D. (2005). Actividad de esterasa de la proteasa alcalina de *Aspergillus nidulans* PW1. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. SMBB. Mérida, septiembre.
- Sienze, R. y Leunissen, J. (1997). Subtilasas: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* 6: 501-523.
- Porres, J.M., Benito, M.J. y Lei X.L. (2002). Funcional expresión of keratinase (*kerA*) gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.* 24:631-636.