



IDENTIFICACION INMUNOLOGICA DE UNA ESTERASA DE *Aspergillus nidulans* INVOLUCRADA EN LA BIOSINTESIS DE UN PRECURSOR DE AFLATOXINAS.

Carolina Peña Montes, Idalia Flores Arguello, Felipe Cruz García y Amelia Farrés González Saravia.
Facultad de Química. Depto. Alimentos y Biotecnología. Conjunto "E". Laboratorio 312. 04510, Ciudad Universitaria.
UNAM. México, D.F. Tel: 56 22 53 05. Fax.: 56 22 53 09. E-mail: farres@servidor.unam.mx.

Palabras clave: esterasa, *Aspergillus nidulans*, esterigmatocistina, inmunoensayo.

Introducción. La esterasa StcI forma parte de la vía de biosíntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans*, el cual es un precursor de aflatoxinas. Existe poca información de las enzimas involucradas en esta vía de biosíntesis, las cuales pueden ser blanco para el diseño de nuevos fármacos contra aspergillosis. Se ha reportado únicamente en *A. nidulans* una secuencia putativa del gen StcI (1). Nosotros hemos clonado expresado y caracterizado la enzima (2), pero no tenemos información sobre la expresión de esta enzima por *A. nidulans*.

El presente trabajo se centra en la identificación inmunológica de la esterasa mediante péptidos diseñados a partir del conocimiento de la secuencia de la misma, y de la determinación de su actividad en extractos celulares del hongo crecido en diferentes medios y condiciones de producción de esterigmatocistina.

Metodología. *Producción de anticuerpos.* A partir de la secuencia de la enzima se diseñaron secuencias de péptidos que pueden generar antigenicidad. Los péptidos fueron sintetizados y se utilizaron para la generación de anticuerpos. *Evaluación de la especificidad de anticuerpos.* La especificidad de los anticuerpos se probó utilizando la enzima StcI clonada en *P. pastoris*. Se evaluaron diferentes concentraciones de suero. *Crecimiento de A. nidulans en diferentes medios y condiciones de producción de esterigmatocistina.* Se probaron 3 medios y condiciones de producción de esterigmatocistina ya reportados (3-5) y la producción en un medio mínimo (6).

Obtención del extracto celular de A. nidulans. El micelio fue colectado, congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -70°C, posteriormente fue pulverizado y resuspendido en amortiguador de fosfatos, pH 7.5 con DTT, NaCl y cocktail de proteasas.

Inmunoblot. Se realizaron geles SDS-PAGE al 10% (7) y se transfirieron a membranas de PVDF para inmunoblot realizado con la técnica de Towbin (8)

Zimograma. Se realizaron geles SDS-PAGE al 10% (7) y se evaluó la actividad *in situ* con α -naftilacetato.

Resultados y discusión. Los experimentos realizados mostraron que los anticuerpos generados tienen una alta especificidad por la enzima StcI recombinante, dado que se pudo detectar la enzima aun con diluciones de 1:40,000 del anticuerpo.

Dentro de las diferentes condiciones de producción de esterigmatocistina, el extracto celular del hongo crecido en

los medios que contienen avena (5), jarabe de maíz (YEC) (4) y el medio mínimo optimizado para producción de lipasa, mostró actividad de esterasa. Los inmunoblots realizados con estos extractos, identificaron una banda tenue de proteína correspondiente al peso molecular esperado para la proteína StcI (30kDa).

Conclusiones. El anticuerpo Anti-StcI generado es específico para la proteína StcI. De los extractos celulares obtenidos de los medios evaluados, en la avena se observa más claramente la banda con un peso molecular de 30 kDa. La enzima identificada puede purificarse con cromatografía de afinidad, secuenciarse y caracterizarse a fin de comparar sus propiedades con las de la enzima recombinante. También se pueden realizar experimentos de inmunolocalización a fin de elucidar dónde se lleva a cabo la biosíntesis de esta vía.

Bibliografía.

1. Brown DW. *et. al.* (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20; 93(4):1418-22.
2. Peña M. C. y Farrés A. (2005). Clonación y estudio de la expresión de una esterasa de *aspergillus nidulans* involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina. *XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* SMBB. Merida, septiembre 2005.
3. Bennett, JW; Henderberg, A. y Grossman K. (1989). Sterigmatocystin production on complex and defined substrates. *Mycopathologia*; 105(1):35-8.
4. Keller, NP; Kantz, NJ y Adams, TH. (1994). *Aspergillus nidulans* verA is required for production of the mycotoxin sterigmatocystin. *Appl Environ Microbiol*; 60(5):1444-50.
5. Kelkar, HS; Keller, NP y Adams, TH. (1996). *Aspergillus nidulans* stcP encodes an O-methyltransferase that is required for sterigmatocystin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*; 62(11):4296-8.
6. Kafer, E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv Genet*; 19:33-131.
7. Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage. *Nature*; 227:680-5.
8. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*; 76:4350-4.