

## ESTUDIOS SOBRE LA EXPRESION HETEROLOGA DE LA CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago*

Alejandro Sánchez-Flores, Brenda Valderrama y Rafael Vázquez-Duhalt, Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 510-3 Cuernavaca, Morelos, México.

brenda@ibt.unam.mx

Palabras clave: *peroxidasa, levadura, E. coli*

**Introducción.** La cloroperoxidasa de *C. fumago* es una hemoproteína versátil con altas actividades de peroxidasa, de halogenasa, de oxigenasa y de catalasa. La actividad de peroxidasa ha sido explotada exitosamente en la oxidación selectiva de compuestos azufrados del diesel generando procesos alternativos a los tradicionales para la desulfuración de fracciones de petróleo (1,2). En contraste, los compuestos polinúcleo-aromáticos son exclusivamente halogenados aún bajo las condiciones de reacción óptimas para la reacción de peroxidación (2). Esta propiedad de la cloroperoxidasa es inevitable, ya que se requiere adicionar halógenos en la mezcla de reacción. Los compuestos halogenados en general son indeseables desde el punto de vista ambiental y limitan la utilización de la cloroperoxidasa como catalizador. Una solución atractiva sería generar variantes de cloroperoxidasa con diferentes relaciones de las actividades peroxidasa y halogenasa. La única fuente de ésta enzima es el hongo *Caldariomyces fumago* y hasta la fecha no ha podido ser producida en un sistema recombinante, por lo cuál no existe un sistema de expresión que permita la selección de variantes con diferente función.

En este trabajo presentamos los resultados que hemos obtenido para la obtención de un sistema de expresión recombinante para la cloroperoxidasa de *C. fumago*.

**Metodología.** Los procedimientos de biología molecular se llevaron a cabo de acuerdo a protocolos convencionales (3). Las inmunodetecciones se realizaron utilizando anticuerpos policlonales específicos contra la cadena polipeptídica de la cloroperoxidasa.

**Resultados y Discusión.** Partimos del aislamiento de la clona genómica del gene *cpo* de *C. fumago*. La cloroperoxidasa sufre cuatro pasos de procesamiento durante su maduración en el hongo: pierde el péptido líder, pierde 55 residuos del extremo carboxilo, se glicosila e incorpora el grupo hemo. No se sabe el orden en que suceden estos procesos ni si ocurren espontáneamente o son asistidos. Inicialmente tomamos dos diferentes variantes de la clona genómica para expresar en *E. coli*, una comprendiendo la secuencia completa incluyendo su codón de término natural y otra hasta el sitio de procesamiento del extremo carboxilo incluyendo un nuevo codón de término. Experimentos de inducción e inmunodetección demostraron

que en *E. coli* solamente se producen cantidades significativas de la proteína codificada por la clona larga, lo que indica que los 55 residuos del extremo carboxilo son indispensables para la producción heteróloga de ésta proteína. La apoproteína expresada en *E. coli* no se pliega ni se ensambla correctamente, probablemente por la ausencia de glicosilación, un proceso celular exclusivo de eucariotes. En consecuencia, intentamos la expresión para la clona larga de cloroperoxidasa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para esto se subclonó el gene que codifica para la proteína larga sin su péptido líder y se insertó en fase con un péptido líder de *K. lactis* en el vector de expresión comercial pYEX1. Cultivos de *S. cerevisiae* transformados con esta construcción expresaron pequeñas cantidades de la cloroperoxidasa recombinante en el sobrenadante. Aún no podemos discriminar si la proteína detectada se procesa en ambos extremos pero no se glicosila o si se glicosila y no se procesa en el carboxilo. De cualquier manera parece que no se ensambla, ya que no detectamos la señal espectrofotométrica característica de la cloroperoxidasa madura aunque sabemos que si se pliega ya que no recuperamos proteína en cuerpos de inclusión.

**Conclusiones.** Aunque hemos avanzado en la producción de apocloroperoxidasa recombinante en *E. coli* y levadura, aún queda pendiente el modificar nuestras variantes para llevarlas hasta el ensamblaje productivo. Una alternativa que exploraremos es el uso de otro péptido líder.

**Agradecimientos.** A Marcela Ayala, Juan Castro y Rosana Sánchez por su asesoría. A Raunel Tinoco y Rosa Román por su asistencia técnica. Al Instituto Mexicano del Petróleo por su financiamiento IMP-FIES 48-110-VI

### Bibliografía.

1. Ayala, M., Tinoco, R., Hernández, V., Bremauntz, P., y Vázquez-Duhalt, R. (1998) *Fuel Process. Technol.* 57:101-111.
2. Ayala, M., Robledo, N.R., López-Munguía, A., y Vázquez-Duhalt, R. (2000) *Environ. Sci. Technol.* 34:2804-2809
3. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (1999) En: *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley & Sons, Inc.