

EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESION DE pFGE SOBRE LA EFICIENCIA CATALITICA DE UNA SULFATASA RECOMBINANTE PARA SU POSIBLE USO EN BIORREMEDIACION DE AGUAS.

Christian Alejandro Gómez Alonzo¹, Carlos Cueto Castro², Pablo Josué Flores Juárez², Samuel Enrique Cruz Franco², Pablo Segura Gomez², **Jesús Fernando Guerrero Rodríguez²**.

(1) Universidad de Guadalajara, CULAGOS (2) Centro Nacional de Estudios de Bioprocesos Aplicados, CENEBA S.A. de C.V., Lagos de Moreno Jalisco c.p. 47410. biomoljfg@gmail.com

Palabras clave: Sulfatasas, catálisis, Biorremediación

Introducción. Los sulfatos son desechos industriales que provienen de la fabricación del papel, minería y de las actividades agroindustriales(1). Actualmente los procesos de biorremediación con bacterias se utilizan para disminuir las concentraciones de sulfatos en el agua(2), sin embargo, en el proceso se obtiene sulfuro el cual es tóxico y difícil de eliminar. Las sulfatasas son una familia de enzimas con capacidad de hidrolizar ésteres de sulfatos a sulfatos de hidrógeno que son menos reactivos y tóxicos (3), por lo que pueden ser empleadas para el tratamiento de aguas contaminadas con sulfatos. La actividad biológica de las sulfatasas es activada por la enzima Formylglycine-generating enzyme (FGE), la cual es inhibida por una proteína paróloga, la pFGE, bloqueando así la actividad catalítica de las sulfatasas(4). En el presente trabajo se pretende silenciar la expresión de pFGE para obtener una sulfatasa recombinante con una mayor eficiencia catalítica para su posible uso en biorremediación.

Metodología. Se generó una línea celular transgénica (CHO-S) mediante lipofección que expresa una sulfatasa recombinante y la proteína verde fluorescente (GFP) ambas controladas bajo el mismo promotor. La expresión y cuantificación de la sulfatasa recombinante fue analizada mediante un ensayo ELISA. Se diseñaron y sintetizaron 4 siRNA complementarios al gen que codifica para pFGE "SUMF2". El efecto del silenciamiento de SUMF2 sobre la eficiencia catalítica de la sulfatasa se analizará mediante expresión génica y proteica. La enzima será purificada mediante intercambio iónico y su eficiencia catalítica se analizará mediante un ensayo con aguas sulfatadas en biorreactor.

Resultados. Se logró generar 15 clones de células CHO-S transgénicas que expresan una sulfatasa recombinante y GFP de manera estable. El análisis de la expresión de la sulfatasa recombinante en las diferentes clonas fue observada indirectamente mediante la fluorescencia emitida por GFP (Fig. 1). Se identificó (Fig. 2) y cuantifico (Tabla 1) la expresión de la sulfatasa excretada al medio por las células, mediante el ensayo ELISA. Los siRNAs diseñados fueron específicos a SUMF2.



Fig. 1. Células CHO-S que expresan una sulfatasa recombinante y GFP.

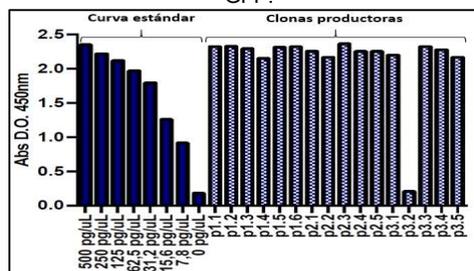


Fig. 2. Ensayo tipo ELISA específico a sulfatasa. Se identificó la expresión de la sulfatasa recombinante excretada al medio de cultivo.

Tabla 1. Cuantificación de la sulfatasa recombinante en medio de cultivo.

Clona	ng/mL	Clona	ng/mL	Clona	ng/mL
p1.1	292.8	p1.6	1700.8	p2.5	1581.4
p1.2	1119.0	p2.1	835.3	p3.1	683.4
p1.3	2370.9	p2.2	1650.2	p3.3	801.8
p1.4	2544.8	p2.3	1974.5	p3.4	1519.6
p1.5	468.3	p2.4	1583.6	p3.5	1762.5

Conclusiones. Se logró expresar la sulfatasa recombinante con obtención de rendimientos promedio de 1392.6 ng/mL por clona en condiciones estables. Se seleccionarán las clonas p1.3 y p1.4 para los siguientes ensayos.

Bibliografía.

1. Graniel-Castro E., Pacheco-Medina A.; Coronado-Peraza V. 2009. *Ingeniería*. vol. 13, núm. 1, pp 49-58:1665-529X
2. Pacheco-Aguilar J., Maldonado-Vega M., Peña-Cabriales J. 2012. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 28 (3) 195-201
3. Saber A., Tafazzoli M., Mortazavian S., James E. 2018. *J Environ Manage.* Vol. 207, 276-291. 10.1016/j.jenvman.2017.11.039
4. Appel M., Bertozzi C. 2015. *ACS Chem Biol.* 10(1): 72-84. 10.1021/cb500897w