

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS
QUE SE UNEN A AMP_c DE LA BACTERIA *Cellulomonas
flavigena*"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ ROBERTO RIVERA HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

Dr. LUIS MIGUEL SALGADO RODRÍGUEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010.

**BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. H.73589

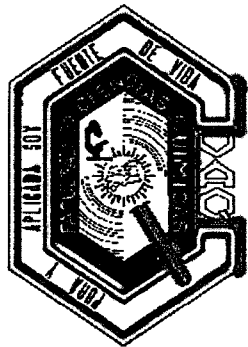
No. Título _____

Clas. T5

616.39

R622i

Faint, illegible text or markings, possibly bleed-through from the reverse side of the page.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE PROTEÍNAS QUE SE UNEN A AMP_c DE
LA BACTERIA *Cellulomonas flavigena*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ ROBERTO RIVERA HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

Dr. LUIS MIGUEL SALGADO RODRÍGUEZ

SINODALES

Dr. LUIS MIGUEL SALGADO RODRÍGUEZ _____
DIRECTOR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO _____
SINODAL

Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO _____
SINODAL

M. en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA _____
SINODAL

ÍNDICE GENERAL.

Contenido.	Página.
ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.	iv
RESUMEN.	
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	3
II.1 La celulosa.	3
II.2 Importancia ecológica e industrial de la celulosa.	6
II.3 Las celulasas.	7
II.4 Las celulasas en la industria	10
II.5 Microorganismos productores de celulasas.	11
II.6 Regulación por AMP cíclico.	14
III. HIPÓTESIS.	18
IV. OBJETIVOS.	19
IV.1 Objetivo general.	19
IV.2 Objetivos específicos.	19
V. METODOLOGÍA.	20
V.1 Materiales.	20
V.2 Métodos.	20
V.2.1 Microorganismo y condiciones de cultivo.	20
V.2.2 Obtención del extracto crudo.	21
V.2.3 Columna de afinidad de AMP cíclico.	21
V.2.4 Métodos electroforéticos.	22
V.2.5 Preparación de la muestra para electroforesis en segunda dimensión.	22
V.2.6 Electroforesis en dos dimensiones.	22
V.2.7 Tinción de Coomasie.	23
V.2.8 Tinción con plata.	23
V.2.9 Método de Bradford.	23
VI. RESULTADOS.	24

VI.1 Obtención del extracto crudo.	24
VI.2 Purificación de las proteínas de <i>Cellulomonas flavigena</i> con la capacidad de unirse al AMPc,	24
VI.3 Caracterización de las proteínas de unión a AMPc.	27
VI.4 Electroforesis en dos dimensiones.	28
VII. DISCUSIÓN.	30
VIII. CONCLUSIONES.	33
IX. BIBLIOGRAFÍA.	34

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro.		Página.
1	Proceso de purificación de proteínas de unión a AMPc.	26

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura.		Página
1	Microfotografía, fibrillas de celulosa en unión con lignina.	3
2	Cadenas de celulosa unidas entre sí por puentes de hidrogeno y uniones intra moleculares.	5
3	Degradación de un fragmento hipotético de celulosa.	9
4	Producción de celulasas por <i>Cellulomonas flavigena</i> creciendo en bagazo de caña.	16
5	Efecto del AMP cíclico sobre cultivos de <i>Cellulomonas flavigena</i> en bagazo de caña.	17
6	Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras, extracto Crudo.	24
7	Perfil de elusión de las proteínas de <i>Cellulomonas flavigena</i> a través de una columna de Bio-gel A (agarosa).	25
8	Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras, Proteínas recuperadas de la columna de afinidad AMP cíclico – agarosa	27
9	Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras. Tinción con plata.	28
10	Proteínas intracelulares de <i>Cellulomonas flavigena</i> con afinidad a AMP cíclico. Electroforesis en dos dimensiones.	29
11	Modelo de la proteína producto del gen <i>celR1</i> por ESyPred3D ExpASy proteomics server.	31

RESUMEN.

La celulosa es un polisacárido constituido por moléculas de glucosa, es degradada por una gran cantidad de bacterias y hongos, por medio de la producción de enzimas llamadas celulasas. Las celulasas degradan la celulosa transformándola en glucosa y azúcares solubles. *Cellulomonas flavigena* es una bacteria Gram positiva, que al crecer en bagazo de caña produce celulasas extracelulares fácilmente recuperables del medio de cultivo. Las celulasas son usadas en industrias como la textil, la papelera y en fabricación de detergentes. Estudios previos indican la importancia del AMP cíclico (AMPc) en la regulación de la expresión genética de estas enzimas. En *Cellulomonas flavigena* se desconoce el papel del AMPc en la regulación de las celulasas. La síntesis de las celulasas pudiera regularse por una proteína de 38 Kda producto del gen *celR1* que se une a AMPc. En este estudio se trata de caracterizar por medio de electroforesis y electroforesis en segunda dimensión, las proteínas de unión a AMPc purificadas a través de una columna de afinidad de AMPc unido a agarosa, específicamente la proteína producto del gen *celR1*. Se recuperaron 34.5978 mg de proteínas con capacidad de unirse al AMP cíclico. Esto es un 3.11 % de la proteína inicial presente en el extracto crudo. Se identificó la proteína *celR1* como una proteína de 38 Kda, con un pI de 9.7. La homología de esta proteína con otras de unión a ADN y su capacidad de unirse al AMPc, muestra que pudieran formar parte de la regulación de la síntesis de las celulasas en *Cellulomonas flavigena*.

I. INTRODUCCIÓN.

La biomasa de las plantas es la fuente de carbono más abundante de la naturaleza y el componente mayoritario de esta biomasa es la celulosa. La celulosa es el polisacárido más abundante en la tierra. La celulosa es un polímero lineal compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces β -1-4 glucosídicos. A pesar de su estructura química simple la celulosa es un sustrato muy complejo y heterogéneo. En la naturaleza la celulosa es degradada por una gran cantidad de bacterias y hongos. Estos organismos degradan la celulosa por medio de enzimas llamadas celulasas. Las celulasas son enzimas hidrolíticas que degradan la celulosa y la transforman en glucosa y azúcares solubles. Se requiere la acción secuencial y combinada de varias actividades enzimáticas para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa. Las celulasas microbianas son usadas en industrias como la textil, la papelera y en la industria de los detergentes. La biomasa hemicelulósica es abundante en forma de desechos agrícolas y forestales como: paja de trigo, bagazo de caña y desperdicios de maíz. Hay muchos organismos conocidos por su capacidad celulolítica. La mayoría de los microorganismos sintetizan diferentes complejos enzimáticos para la degradación de la biomasa celulósica. Todos estos microorganismos se encuentran en lugares donde hay una acumulación de desechos celulósicos y generalmente se encuentran en poblaciones mixtas, que actúan sinérgicamente para lograr la degradación completa del sustrato. Las bacterias del género *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides* y *Acetivibrio*, todos anaeróbicos, se han especializado en organizar un complejo multienzimático, llamado celulosoma. Las bacterias aerobias y los hongos sintetizan enzimas extracelulares que se unen a sus sustratos individualmente. La bacteria aerobia Gram positiva *Cellulomonas flavigena* secreta una amplia gama de enzimas que actuando sinérgicamente son capaces de degradar la celulosa. Los degradadores de celulosa aerobios, como *Cellulomonas flavigena*, también ofrecen la ventaja de producir enzimas extracelulares que son fácilmente recuperables del medio de cultivo aumentando con esto el rendimiento en los procesos de su obtención. *Cellulomonas flavigena* es capaz de crecer muchos residuos agrícolas y en medios minerales, y puede producir una gran cantidad

de celulasas y otras enzimas para llevar a cabo la degradación de la celulosa. Los microorganismos productores de celulasas pueden expresar diferentes enzimas dependiendo de las condiciones de cultivo en las que se encuentren. Los mecanismos por los cuales se regula la expresión de las celulasas son variables de un microorganismo a otro. También un mismo microorganismo crecido en diferentes fuentes de carbono expresa diferentes enzimas. En el caso de *Cellulomonas flavigena*, se ha visto que se puede inducir la expresión de sus celulasas al crecerla en bagazo de caña y otros residuos agrícolas o medios con celulosa. El bagazo de caña en el caso de *Cellulomonas flavigena* es el mejor inductor que se conoce, de la expresión de celulasas. La síntesis de las celulasas puede ser reprimida por la adición de glucosa y otros sustratos fácilmente metabolizables. La represión de las celulasas por la glucosa es una represión catabólica mediada por El adenosin monofosfato cíclico (AMP cíclico). El AMP cíclico es un nucleótido que es generado por la enzima adenilato ciclasa, la cual es una enzima localizada en la membrana celular. Se sabe que el AMP cíclico regula genes relacionados con la utilización de fuentes de carbono distintas a la glucosa. Esto mediante la unión del AMP cíclico con la proteína CAP (Catabolite Activator Protein o CRP catabolite repressor protein). El complejo AMPc-CAP interactúa con secuencias específicas en el ADN, recluta a la maquinaria basal de transcripción y de esta forma regula la expresión de los genes relacionados con la utilización de fuentes de carbono distintas a la glucosa. Aunque en otros organismos ya se ha demostrado este efecto de represión catabólica y el papel importante que tiene el AMPc en la regulación del metabolismo, en *Cellulomonas flavaigena* esto aun no ha sido estudiado. En *Cellulomonas flavaigena* existe una proteína de 36 KDa la cual es codificada por el gen *celR1*, esta proteína pudiera ser una proteína que regule la expresión de las celulasas por medio de su unión a AMPc. Este estudio tiene como objetivo analizar las proteínas de *Cellulomonas flavigena* que tiene la capacidad para unirse al AMPc, también demostrar la unión de la proteína *celR1* al AMPc y como forman parte del mecanismo de regulación de síntesis de las celulasas.

II. ANTECEDENTES.

II.1 La celulosa.

La celulosa es un polisacárido constituido por moléculas de glucosa, cientos o miles de unidades de glucosa forman este polímero lineal, por medio de enlaces β 1-4 glucosídicos. Se encuentra, casi exclusivamente, en las plantas aunque también se encuentra en algunas bacterias (Béguin y col., 1994). La celulosa es el componente más abundante en la biomasa vegetal, a pesar de las diferencias en la composición de la pared celular comprende entre el 35 y el 50 % del peso seco de la planta y en algunos casos se encuentra en estado casi puro (como en el algodón). En la mayoría de los casos la celulosa se encuentra junto con otros biopolímeros estructurales formando parte de la pared celular vegetal, principalmente con la xilana, la lignina (20 al 35 % del peso seco de la planta), las hemicelulosas (5 al 30 % del peso seco de las plantas) y las pectinas (Figura1).



Figura 1. Microfotografía, fibrillas de celulosa en unión con lignina (zonas esféricas) y hemicelulosa (Himmel, 2009).

Una característica importante de la celulosa es su estructura cristalina. En la naturaleza la celulosa es sintetizada, individualmente en cadenas lineales de residuos de glucosa (moléculas individuales de celulosa), unidos por medio de enlaces β 1-4 glucosídicos (Barrera-Islas, 2005). Una vez que han sido sintetizadas las cadenas de celulosa, son objeto de un auto ensamblado en el lugar de la biosíntesis; existen pruebas que indican que las hemicelulosas que están asociadas regulan este proceso de ensamblado (Atalla, y col., 1993). Aproximadamente 30 moléculas individuales de celulosa se ensamblan para dar lugar a unidades mayores conocidas como fibrillas elementales, que a su vez se unen entre sí formando microfibrillas y estas al unirse forman las fibras de celulosa. La forma en que las cadenas individuales se unen entre sí en las fibrillas primarias ha sido deducida en gran parte por difracción de rayos X, y se han hecho modelos estructurales calculando la energía conformacional mínima para las uniones de las fibrillas. Los modelos de unión entre las moléculas individuales de celulosa son una fuente considerable de controversia incluso en temas como la orientación (paralelas en forma horizontal o en forma vertical) de las cadenas adyacentes (Koyama, y col. 1997). No importando hacia donde se encuentren orientadas las moléculas de celulosa, las cadenas de este polímero se unen entre sí por medio de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares (Figura 2). Esta unión altamente ordenada forma dominios cristalinos que son interrumpidos por regiones amorfas (Béguin y col., 1994; Barrera-Islas, 2005). Cadenas adyacentes se unen unas a otras y se mantienen juntas formando un polímero muy fuerte. A pesar de que la fuerza de los puentes de hidrógeno es relativamente débil su efecto total en los muchos residuos que permiten superponer una cadena a otra es lo que le da gran resistencia a la celulosa (Pizzi, y col., 1985).

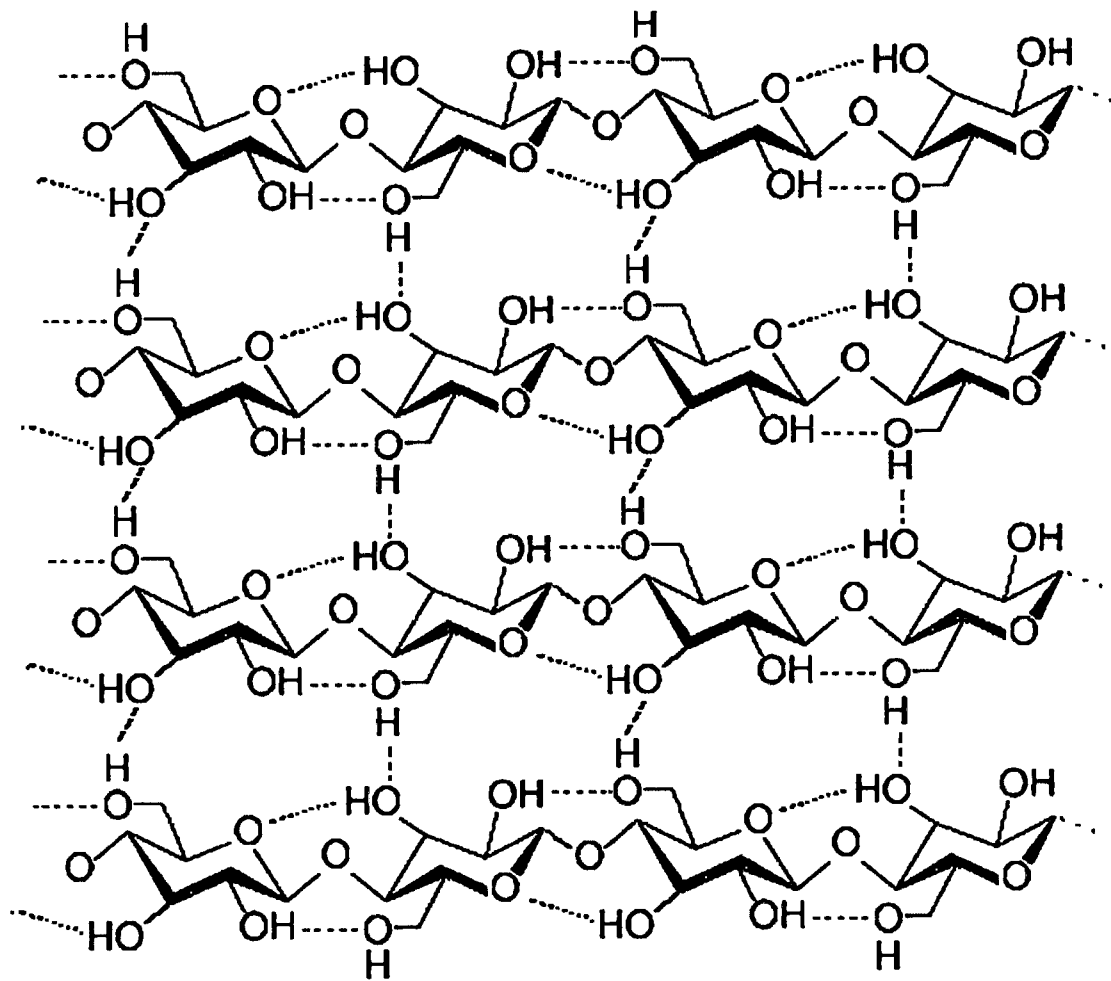


Figura 2. Cadenas de celulosa unidas entre sí por puentes de hidrógeno y uniones intra moleculares (Taylor, 2008).

La naturaleza cristalina de la celulosa implica una estructura ordenada en la que todos los átomos están fijos en posiciones discretas con respecto a otros. Una característica importante de la naturaleza cristalina de la celulosa es que las moléculas individuales de este polímero están lo suficientemente cerca unas de otras como para evitar la penetración de enzimas. Aunque las fibrillas de celulosa se encuentren principalmente ordenadas en dominios cristalinos estos dominios son interrumpidos por regiones amorfas. El grado de cristalinidad en la celulosa es variable pero en términos generales puede hablarse de un orden de distribución, en el cual hay zonas puramente cristalinas y puramente amorfas (Marchessault, y col., 1957). Además de las regiones cristalinas y amorfas en la celulosa hay irregularidades tales como: torceduras de las microfibrillas, vacíos de la superficie (microporos), y capilares (Blouin, y col., 1970.). Al tener estas irregularidades una fibra de celulosa es capaz de cubrir una extensión de terreno mucho mayor de la que cubriría una fibra sin ningún defecto. Los poros y capilares en la celulosa son en algunos casos tan grandes que permiten la entrada de agua (promoviendo una mayor hidratación) y a veces de algunas enzimas celolíticas (Stone, y col., 1968; Stone, y col., 1969).

II.2 Importancia ecológica e industrial de la celulosa.

La biomasa de las plantas es la fuente de materia orgánica más grande de la tierra, la vida en la tierra depende de las plantas. La celulosa es el principal componente de los organismos vegetales, esto hace que la producción de la biomasa vegetal sea principalmente biomasa hemicelulósica. La celulosa es parte crucial del ciclo del carbono en conjunto con los organismos degradadores presentes en el suelo y en el tracto digestivo de algunos animales. Por lo tanto la utilización de la celulosa por los microorganismos es una de las mayores corrientes de flujo de materiales en la biosfera y es de interés en el análisis del flujo del carbono a escalas globales y locales. La utilización de la celulosa en los rumiantes (con la ayuda de los microorganismos), es la fuente principal de su dieta. La industria ganadera basada en estos rumiantes es una fuente de alimentación para las sociedades humanas y también es base de la industria curtidora. La celulosa es también utilizada para procesos fermentativos tales

como el compostaje. La celulosa es vital en las industrias alimentarias, la textil y la papelera, y existe en ellas gran interés en alternativas que brinden mejores rendimientos en el procesamiento de la celulosa. El uso de biomasa hemicelulósica como combustible ha despertado también gran interés, siendo probadas diversas alternativas en este campo desde la síntesis de biocombustibles a partir de derivados vegetales hasta procesos de fermentación en varias etapas para obtener combustibles como el etanol (Himmel, 2009). La biomasa hemicelulósica es, entonces, la mayor fuente sostenible de materiales, combustibles y alimentos para la humanidad por su bajo costo y abundancia (Lynd, y col., 1999). Una estrategia prometedora para la utilización de la biomasa hemicelulósica que puede ser aplicada en todos los campos consiste en la producción de enzimas celulolíticas, la hidrólisis de la biomasa puede hacer más fácil su uso principalmente en la obtención de biocombustibles donde los azúcares resultantes de la hidrólisis serían fácilmente fermentados. El proceso de sacarificación de la materia orgánica puede ser conseguido por la acción de un microorganismo o un consorcio de microorganismos dando una reducción importante de costos en comparación con hidrólisis por agentes químicos tales como los ácidos. La obtención directa de las enzimas celulolíticas daría aun más ventajas a los procesos siempre y cuando estas fueran obtenidas de un microorganismo que permitiera un rendimiento suficiente (Lynd, y col., 1999.).

II.3 Las celulasas.

La degradación de la celulosa es común en la naturaleza y se lleva a cabo por las celulasas, que son producidas por una gran variedad de bacterias y hongos. Las celulasas son enzimas que convierten los sustratos celulósicos en azúcares solubles como celobiosa, glucosa y oligosacáridos. Los organismos que convierten los sustratos hemicelulósicos en azúcares solubles como la celobiosa lo hacen por medio de la acción concertada de sus enzimas (Béguin y col., 1987). Estas enzimas son clasificadas por sus propiedades estructurales y son producidas por muchos microorganismos para llevar a cabo la degradación de la pared celular de las plantas. La actividad de estas celulasas es hidrolizar el

enlace β -1-4 glucosídico entre dos o más carbohidratos, o entre carbohidratos y moléculas que no sean carbohidratos (Henrissat y col., 1998). El proceso de degradación de la celulosa requiere de la acción sinérgica de tres actividades enzimáticas (Figura 3), para llevar a cabo su hidrólisis completa hasta glucosa (Sánchez-Herrera y col., 2007; Cuellar-Cruz, 2003; Ovando-Chacón y col., 2005).

Endo- β -1,4-glucanasas (1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4): actúan azarosamente en las regiones internas de la celulosa, convirtiendo las cadenas largas en oligosacaridos.

Exoglucanasas (celodextrinas EC. 3.2.1.74 y celobiohidrolasas 3.2.1.91): remueven unidades de glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas) a partir del extremo no reductor de la cadena de celulosa.

β -glucosidasas (EC. 3.2.1.21): estas degradan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa. La producción de esta enzima puede determinar la velocidad de sacarificación del material.

La producción de celulosas por parte de los microorganismos está sujeta a represión catabólica e inhibición por producto final. Esto hace que las endo y exo glucanasas sean inhibidas. En este contexto es muy importante la velocidad de producción de la β -glucosidasa ya que esto determinara en gran medida la hidrólisis de la celulosa (Wood, 1975; Mandels, 1982; Mullings, 1985).

La celulosa es un sustrato muy complejo tiene regiones con diferentes grados de cristalinidad, entrelazados con xilana, hemicelulosa, pectinas y lignina. Los microorganismos producen multiples enzimas no solo celulasas para lograr la degradación de la biomasa de las plantas (Warren, 1996.).

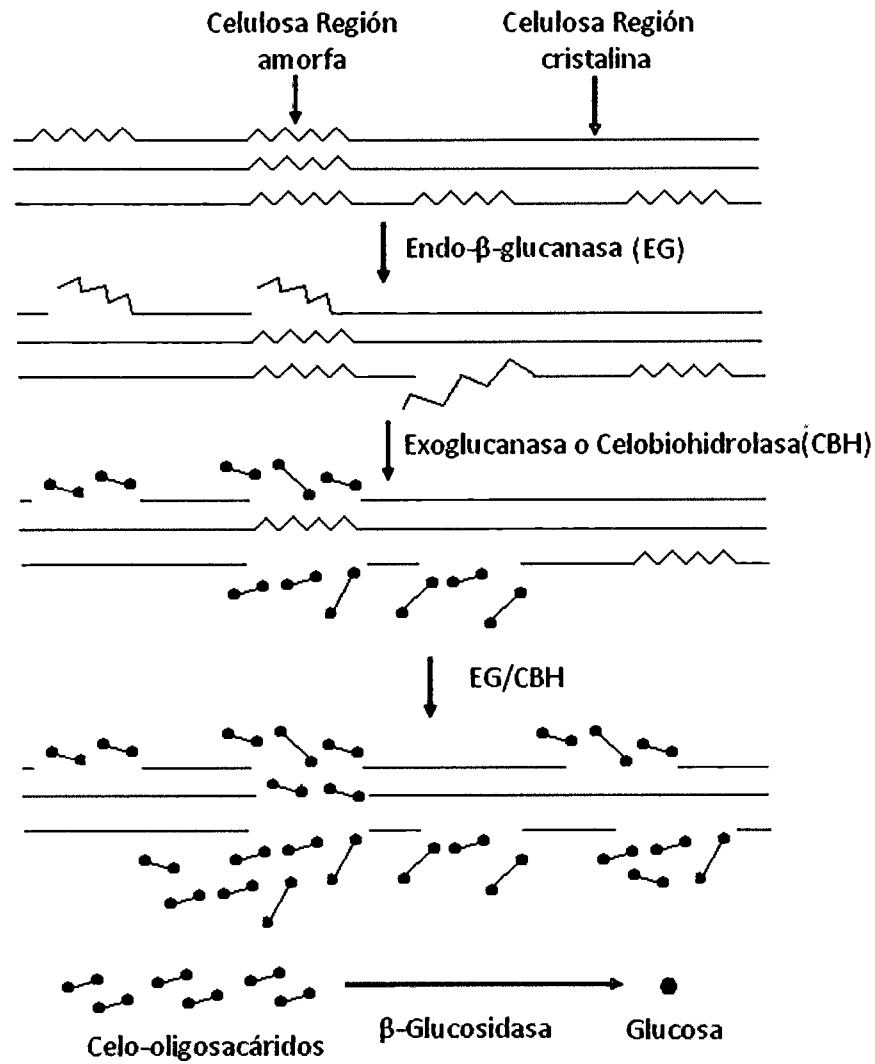


Figura 3. Degradación de un fragmento hipotético de celulosa (Montenecourt, y col., 1979).

La naturaleza insoluble de la celulosa presenta un reto mayor para los sistemas enzimáticos que la degradan. Muy frecuentemente las celulasas tienen, aparte del sitio catalítico, un dominio de unión a carbohidratos. Este sitio de unión a carbohidratos le permite unirse a la celulosa y presumiblemente facilita su hidrólisis. Las celulasas no son simplemente una aglomeración de enzimas endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, cada microorganismo ha adaptado un mecanismo diferente para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa. Por ejemplo los hongos filamentosos y Ascomycetes tienen la capacidad de penetrar en los sustratos de celulosa por medio de hifas lo que a menudo hace que sus enzimas se encuentren confinadas en estas estructuras (Lynd, y col., 2002; Eriksson, y col., 1990.). La producción de celulasas libres al medio externo ya sea con o sin dominio de unión a carbohidratos es suficiente para llevar a cabo la hidrólisis completa de la celulosa, la acción concertada de los diferentes tipos de celulasas lleva a la hidrólisis completa del sustrato. En estos casos estaríamos hablando de sistemas enzimáticos que no forman complejos de alto peso molecular (celulosomas). Algunos microorganismos al estar en competencia con otros y tener una cantidad limitada de ATP para la síntesis de celulasas han desarrollado sistemas de complejos que les permiten tener un mayor acceso en estas condiciones a la celulosa.

II.4 Las celulasas en la industria.

Las celulasas son producidas por una gran cantidad de bacterias y hongos. Las celulasas han sido investigadas para sus aplicaciones industriales desde principio de los años 80, primeramente para su uso en la industria de los alimentos y posteriormente para su uso en industrias de lavandería, textil y papelera. En la industria textil las celulasas son usadas para el desteñido de la mezclilla, al entrar en acción sobre esta tela retiran el color azul índigo y dan un acabado desteñido. Tradicionalmente este acabado se conseguía con un lavado con piedra pómez (Stone wash), pero una pequeña cantidad de enzimas puede sustituir a varios kilos de piedras. Las celulasas también tienen la ventaja de que producen menos daño a la tela durante este tratamiento y menos desgaste de los equipos. El tratamiento con enzimas ha dado la posibilidad de nuevos

acabados para la tela vaquera, aumentando el número de tratamientos de acabado. También en la industria de la lavandería las celulasas han tenido gran importancia ya que se añaden a los detergentes para degradar las microfibrillas y separarlas de las fibras principales devolviendo a las prendas una superficie suave y su color original.

En la industria alimentaria las celulasas se usan para la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras y la filtración de mostos. También se usan para lograr la hidrólisis de materiales lignocelulósicos para mejorar la digestión de los rumiantes (Van Soest, 1994).

II.5 Microorganismos productores de celulasas.

Hay muchos organismos conocidos por su capacidad celulolítica. Dentro de estos podemos encontrar bacterias, algas, protozoarios y hongos (Dekker y col., 1976). Todos estos microorganismos se encuentran en lugares donde hay una acumulación de desechos celulósicos y generalmente se encuentran en poblaciones mixtas, las cuales actúan sinérgicamente para lograr la degradación completa del sustrato (Béguin y col., 1994).

Los hongos son los microorganismos celulolíticos más ampliamente estudiados. Dentro de las especies con actividad celulolítica se encuentran algunos hongos del género *Mucor* y muchas especies de Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes (Lynd y col., 2002). Sin embargo, durante las últimas décadas se han estudiado un gran número de especies bacterianas, las cuales sintetizan celulasas de características similares a las fúngicas. Las bacterias con actividad celulolítica pueden dividirse en dos grupos: 1) anaerobios fermentativos, como *Clostridium*, *Ruminococcus*, y *Caldicellulosiruptor* entre los Gram positivos, y *Butyrivibrio* y *Acetivibrio* entre los Gram negativos. 2) bacterias aerobias Gram positivas como *Cellulomonas* y *Thermobifida*.

De manera general, los microorganismos anaerobios, utilizan sistemas complejos llamados polixelulosomas para degradar la celulosa, aunque hay

excepciones. Estas estructuras pueden encontrarse extracelularmente o bien unidas a la superficie de la célula (Schwarz, 2001). Aparentemente, estas especies crecen mejor cuando están en contacto con el sustrato y en algunos casos esto es obligado.

Los degradadores aerobios, tanto bacterianos como fúngicos, producen enzimas extracelulares para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa (Rapp y col., 1991; Schwarz, 2001). Aunque ocasionalmente pueden encontrarse complejos en la superficie celular (Bond y col., 1989; Wachinger, y col., 1989). El contacto físico con el sustrato parece no ser necesario para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa (Lynd y col., 2002).

Los degradadores aerobios de celulosa como *Cellulomonas*, usan la producción de enzimas extracelulares para la obtención de la glucosa. Estas enzimas son recuperables a partir del medio de cultivo. El genero *Cellulomonas* ha sido ampliamente estudiado debido a su gran capacidad celulolítica y xilanolítica. Las bacterias de este genero son capaces en su mayoría de sintetizar xilanasas, celulasas, amilasas y β - xilosidasas. El genero *Cellulomonas* comprende siete especies de las cuales las mas estudiadas son *C. fimi*, *C. uda* y *C. flavigena*. Entre estas *C. flavigena* es productora de una amplia gama de enzimas capaces de degradar la celulosa a través de su acción concertada (Khanna y col., 1993; Chaudhary y col., 1997).

Las celulasas están sujetas a regulación metabólica. Esta regulación se lleva a cabo por tres mecanismos distintos: inducción, inhibición y represión (Stewart y col., 1976; Goksoyr y col., 1980). La biosíntesis de glucanasas varía dependiendo del organismo, un inductor que produce la máxima actividad glucanolítica en algunas especies, puede ser el inhibidor en otras.

Se conoce poco sobre los mecanismos moleculares de regulación de los genes involucrados en la producción de celulasas. Los primeros estudios al respecto, fueron hechos mediante ensayos de Northern Blot, al crecer *C. fimi* en carboximetil celulosa. En estos estudios se identificaron los mRNA de tres

celulasas correspondientes a los genes *CenA*, *CenB* y *Cex*. Sin embargo, cuando se creció *C. fimi* en glicerol únicamente se lograron detectar los mRNA de *CenA* y *CenB*, con lo cual se concluyó que la regulación de estos genes está sujeta a la fuente de carbono proporcionada a *C. fimi* (Greenberg y col., 1987 a; b). Otro tipo de regulación es la represión por catabólito, en la cual se requieren grandes cantidades de AMPc para lograr la producción de enzimas. Un ejemplo de esto es *Cryptococcus albidus*, que posee una secuencia de 15 pb río arriba del gen que codifica para la β -xilanasas y puede estar formando parte de una secuencia regulatoria por AMPc (Morosoli y col., 1989). Se ha estudiado también la represión catabólica del gen *xyn1* por medio de ensayos de Northern blot, en los que se demostró que la expresión de este gen está mediada por un represor catabólico, la proteína Cre-1.

En *Cellulomonas flavigena* se han realizado estudios sobre la regulación y síntesis de xilanasas, y se ha encontrado que existe una expresión tanto de xilanasas y celulasas al crecer este microorganismo en bagazo de caña. Esto indica que estos dos sistemas enzimáticos y su regulación están muy relacionados entre sí. Al iniciar el estudio molecular del sistema regulatorio de *Cellulomonas flavigena*, los primeros trabajos han sido para aislar y caracterizar tres genes, *celcflA* (Herrera-Herrera, 1999), *xyncflA* (Mayorga, 2002) y *celcflB* (Gutiérrez-Nava, 2003). Río arriba de este último gen se encuentra una secuencia que codifica para una proteína de 36 kDa que sea probablemente represora.

Cellulomonas flavigena es un microorganismo ampliamente estudiado tiene una gran capacidad para la bio - conversión de desechos agrícolas a proteína unicelular. Se cuenta con la cepa *Cellulomonas flavigena* (CDBB-531) la cual es capaz de producir tanto celulasas como xilanasas al crecer en cualquier residuo agrícola aunque el mejor inductor del sistema de celulasas y xilanasas es el bagazo de caña. A partir de esta cepa bacteriana se obtuvo a la mutante *Cellulomonas flavigena* (PN-120) que es una cepa súper productora capaz de producir 2 veces más celulasas y 4 veces más xilanasas que la cepa silvestre.

II.6 Regulación por AMP cíclico.

La mayoría de los microorganismos sintetizan diferentes complejos enzimáticos en función de sus condiciones de crecimiento. La regulación de estos complejos enzimáticos es distinta entre los diferentes organismos. A pesar de la falta de conocimientos sobre los mecanismos usados para regular la biosíntesis de estas enzimas, se demostró, que para la mayoría de las bacterias analizadas, la expresión de estos genes se rige de acuerdo a la fuente de carbono y probablemente exista involucrado un mecanismo de inducción. Además, la expresión de estas enzimas es fácilmente reprimida en presencia de fuentes de carbono de fácil asimilación como la glucosa, la xilosa y la celobiosa (Bisaria y col., 1989; Juhász, y col. 2005; Suto y col., 2001).

El efecto de represión catabólica es un fenómeno común que afecta la expresión de los promotores bacterianos. Se ha visto que la síntesis de celulasas en bacterias y hongos está sujeta a la represión catabólica (Fennington y col., 1984). La represión catabólica es provocada por la glucosa cuando un microorganismo es crecido en un medio con dos fuentes de carbono y puede ser explicada por la regulación dada por el complejo CAP-AMP cíclico.

El Adenosín monofosfato cíclico (AMP cíclico) es un nucleótido que funciona como segundo mensajero en varios procesos biológicos. Es un derivado del adenosín trifosfato (ATP). Este nucleótido cíclico se forma mediante la acción de la enzima Adenilato Ciclasa la cual usa ATP como sustrato y lo convierte a AMP cíclico haciendo un puente 3'-5' fosfodiéster. Los niveles de AMP cíclico están inversamente relacionados con los niveles de glucosa. Esto puede explicarse de manera sencilla ya que la base para este efecto radica en la proteína IIA^{Glc} la cual se desfosforila cuando entra la glucosa a la célula y estimula la adenilato ciclasa. Cuando no existe glucosa entrando a la célula y la proteína se encuentra fosforilada, la actividad de la adenilato ciclasa decae (Lewin y col., 1996). La enzima adenilato ciclasa es generada por la expresión del gen *cya*. Estudios fisiológicos proporcionan indicios de que los niveles de expresión de

cya son negativamente controlados por el complejo CAP-AMP cíclico. Las células requieren de un control estricto de la expresión del gen *cya*, ya que se ha demostrado en *E. coli* que un aumento de seis veces en los niveles de expresión de este gen es mortal para este microorganismo.

Cuando el transporte de glucosa a la célula es bajo se promueve la expresión del gen *cya* que codifica para la adenilato ciclasa. Esta enzima convierte el ATP a AMP cíclico. El AMP cíclico se une a la proteína CAP (Catabolite Activator Protein o CRP catabolite repressor protein) que, en *E. coli*, es un dímero de dos subunidades idénticas de 22.5 KDa que se encuentra continuamente expresado en las células. Este complejo interacciona con el ADN en una secuencia consenso para CAP, y esta secuencia es un pentámero muy conservado TGTGA. Una vez que el complejo interactúa con el ADN este permite que se una la polimerasa y se inicie la transcripción de aquellos genes que están involucrados en el uso de fuentes de carbono distintas a la glucosa (como los del operon *lac*).

Lógicamente la presencia de glucosa en el medio provoca que no se active la adenilato ciclasa y que no exista suficiente AMP cíclico como para que interaccione con la proteína CAP. Por tanto la adición de AMP cíclico al medio reanuda la biosíntesis de enzimas catabólicas (lo cual sucede en pruebas hechas con mutantes *cya*⁽⁻⁾)(Lewin y col., 1996).

Se tiene aun poco conocimiento en cuanto a la posible función de los nucleótidos cíclicos en la síntesis de celulasas. Sin embargo ha habido estudios que han indicado la importancia del AMP cíclico en la regulación de la expresión de estos genes (Fennington y col., 1984).

En *Cellulomonas flavigena* se sabe que la producción de celulasas está fuertemente condicionada al medio donde crece siendo el mayor inductor de su inductor de su expresión el bagazo de caña (Ponce-Noyola y de la Torre, 2001; Sanchez-Herrera y col., 2007). Al crecer a *Cellulomonas flavigena* en un medio con bagazo de caña como fuente de carbono, hay una gran expresión de

celulasas. Sin embargo al agregar glucosa a estos medios de cultivo la actividad de las celulasas cae reflejando que dejan de producirse hasta que la glucosa en el medio desaparece (Herrera-Herrera y col., 2009).

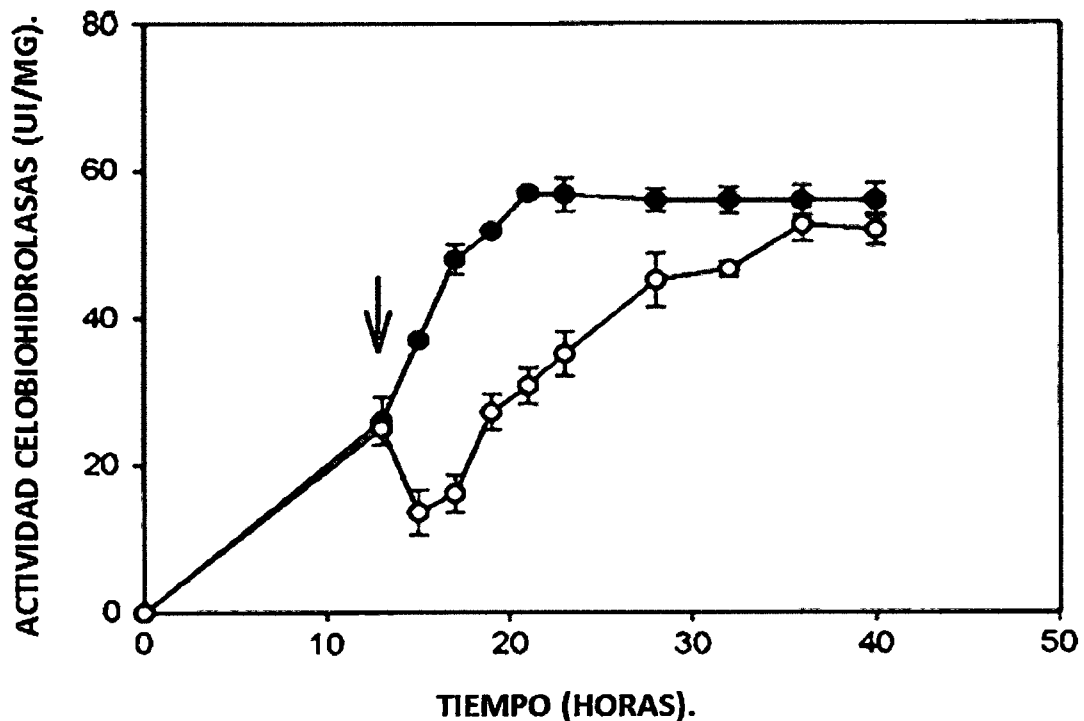


Figura 4. Producción de celulasas por *Cellulomonas flavigena* creciendo en bagazo de caña. (●) cultivo control, (○): con glucosa añadida a las 13 horas de crecimiento (Modificado del original de Herrera-Herrera y col, 2009).

Pero si a un cultivo de *Cellulomonas flavigena* igualmente crecido en bagazo de caña como fuente de carbono se le agrega AMP cíclico o análogos como el 8-Br- AMPc (que es un análogo resistente a las fosfodiesterasas, y su acción es mas prolongada) la actividad enzimática aumenta, incluso si el medio tiene glucosa la actividad de las celulasas permanece. Esto nos dice que el AMP cíclico está fuertemente relacionado con la expresión de las celulasas.

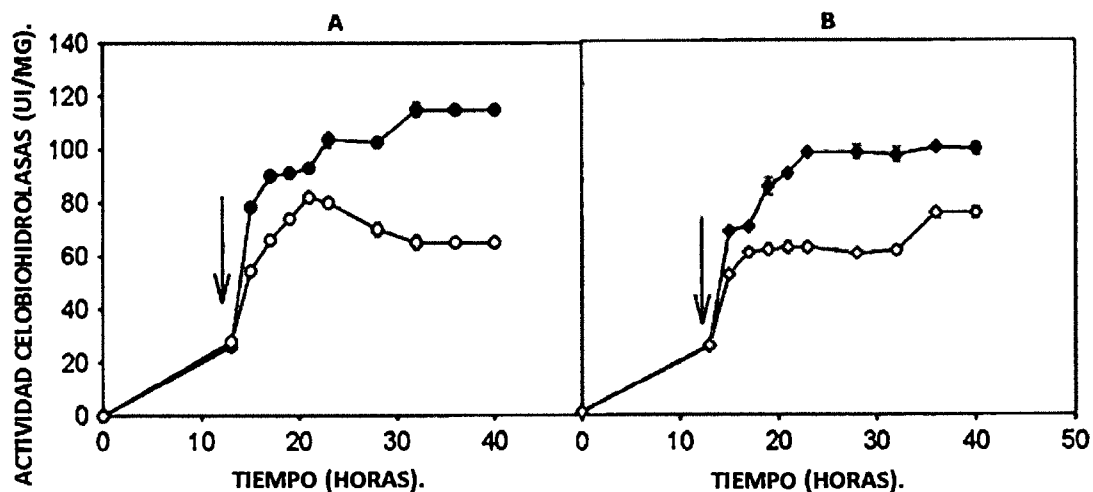


Figura 5. Efecto del AMP cíclico sobre cultivos de *Cellulomonas flavigena* en bagazo de caña. A (●) 0.05 mM de Br-AMPc, (○) 0.05 M de AMP. B (◆) 10 mM de glucosa + 0.05 Br-AMP cíclico, (◇) 10 mM de glucosa + 0.05 AMP cíclico (Modificado del original de Herrera-Herrera y col, 2009).

Muy probablemente este efecto se relacione con una proteína que se encuentra arriba del gen *celA*, la cual es producto del gen *celR1*. El producto del gen *celR1* es una proteína ha sido identificado como una proteína de 38 kDa, la cual tiene dominios de unión al ADN hélice-giro-hélice y tiene una homología del 75 % con los represores de la familia *lacl* (Herrera-Herrera y col, 2009).

III. HIPÓTESIS.

La síntesis de celulasas está regulada en *Cellulomonas flavigena*. La regulación está mediada por el AMPc y la proteína *celR1* forma parte del mecanismo de regulación de la síntesis de celulasas

IV. OBJETIVOS.

IV.1 Objetivo general.

Analizar las proteínas de *Cellulomonas flavigena* que tiene la capacidad para unirse al AMPc.

IV.2 Objetivos específicos.

- Purificar las proteínas de *Cellulomonas flavigena* con la capacidad de unirse al AMPc.
- Analizar las proteínas purificadas mediante electroforesis y electroforesis en segunda dimensión.

V. METODOLOGÍA.

V.1 Materiales.

Matraces Earlenmeyer de 500 ml.

Filtro de fibra de vidrio.

Tubos Falcon 50 ml.

Tubos Eppendorf.

Agitador orbital.

Cámara Mini PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad).

Cámara Protean IEF Cell (Bio Rad).

Microcentrífuga.

Espectrofotómetro UV/VIS.

V.2 Métodos.

V.2.1 Microorganismo y condiciones de cultivo.

La cepa bacteriana utilizada fue *Cellulomonas flavigena* PN-120 (Ponce-Noyola y de la Torre, 1995) de la colección microbiana del CINVESTAV. Los cultivos fueron crecidos en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio mineral. Medio mineral (g/l): Cloruro de sodio (NaCl) 5.5 g, Sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) 2.5 g, Fosfatos *PO₄ 3.5 g, Cloruro de calcio (CaCl₂) 0.1 g, Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄ 7H₂O) 0.1 g. el medio mineral fue adicionado con 10 µg de biotina y 1 µg de tiamina, y como fuente de carbono bagazo de caña pretratado alcalinamente (Ponce-Noyola y de la Torre, 1993). La solución de fosfatos se preparó mediante la neutralización del ácido fosfórico al 85 % con hidróxido de potasio (KOH) en escamas (de la Torre, 1982). El pH final del medio fue de 7.2. Los cultivos fueron incubados a 37 °C y 150 rpm por 24 hrs.

V.2.2 Obtención del extracto crudo.

Con un filtro de fibra de vidrio (MFS, Dublin, Ca.) se filtraron 100 ml de cultivo de *Cellulomonas flavigena* para retirar los restos de bagazo de caña. El cultivo filtrado se centrifugó a 4 °C, 9000 rpm por 40 minutos. El paquete celular obtenido fue resuspendido con solución fisiológica (PBS) pH 7.4, y se centrifugó a 4 °C, 9000 rpm por 20 minutos. Esto se realizó en tres ocasiones con el fin de obtener el paquete celular sin impurezas. Solución fisiológica (PBS): Cloruro de sodio (NaCl) 8 g, Cloruro de potasio (KCl) 0.2 g, Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 1.44 g, Fosfato de potasio dibásico (KH_2PO_4) 0.24 g, agregar 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 con ácido clorhídrico (HCl) o Hidróxido de sodio (NaOH), Aforar a 1 L con agua destilada. Finalmente el paquete celular se resuspendió en un volumen final de 30 ml de PBS y se añadieron 15 mg de lisozima (Research Organics, USA). Se incubó a 37 °C por 30 minutos o hasta que el cultivo adquiriera mayor viscosidad. Esta solución se centrifugó a 4 °C, 9000 rpm por 40 minutos. El sobrenadante se recuperó y fue llamado extracto crudo.

V.2.3 Columna de afinidad de AMP cíclico.

Previamente a la columna de afinidad el extracto crudo se pasó por una columna de filtración en gel de agarosa (Bio-Gel A, 151-0750) de 2x10 cm empacada a 7 cm de cama, con el fin de retirar impurezas que se pudieran unir a la agarosa en el siguiente paso. Se colocaron 200 μl de resina de afinidad (A0144 de Sigma) de AMPc unido a agarosa, en 1 ml de extracto de proteína durante 1 hora. La resina fue previamente equilibrada con PBS, pH 7.4, con el fin de mantener la columna en condiciones óptimas de separación y mantener las proteínas en un pH apropiado. La resina se separó por medio de centrifugación 4 °C, 3000 rpm por 20 minutos. Se hicieron 3 lavados a la resina con PBS pH 7.4, para retirar cualquier proteína que se hubiera unido inespecíficamente, se centrifugó a 4 °C, 3000 rpm por 20 minutos para separar la resina. Se colocó la resina en 10 ml de solución Urea (6 M): 360.42 g de Urea por litro en PBS pH 7.4, por 2 horas, para separar las proteínas de unión a AMP

cíclico. Se centrifugó a 4 °C, 3000 rpm por 20 minutos y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas fueron precipitadas mezclando 10 ml del sobrenadante con 1 ml de ácido tricloroacético al 100%: 1g de ácido tricloroacético en un mililitro de agua destilada, y dejando incubar toda la noche a 4 °C. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 4 °C, 5000 rpm por 15 minutos y lavado tres veces con acetona a -20 °C. También se dió un lavado con etanol frío para remover las trazas de ácido tricloroacético.

V.2.4 Métodos electroforéticos.

La purificación de las proteínas fue seguida mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %, con un gel de concentración al 3 %, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). La electroforesis se realizó a 150 V por 120 minutos, en una cámara Mini PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad). Los resultados del gel se visualizaron por medio de tinción de Coomasie.

V.2.5 Preparación de la muestra para electroforesis en segunda dimensión.

El precipitado de proteínas se disolvió en 200 µl de buffer de rehidratación (Bio-Rad 2-D Rehydration/Sample Buffer 1), y se pasó por una columna MicroBio-spin Tris Chromatography Columns (Bio-Rad), previamente tratada con buffer de rehidratación. La muestra fue centrifugada a 4 °C, 5000 rpm por 5 minutos. Cada tira de pH fue cargada con 200 µg de proteína del precipitado disuelta en un volumen final de 185 µl en buffer de rehidratación.

V.2.6 Electroforesis en dos dimensiones.

La solución de proteína fue cargada en un gel con gradiente de pH de 4-7 (BIO-RAD). El isoelectroenfoco se realizó a 4 ° C en una cámara Protean IEF Cell (Bio Rad) con un gradiente de voltaje de 0 a 250 V en 30 minutos, 250 a 8000 V en 2.5 h, de 8000 a 20000 V en 2 h y 500 V por una hora. La separación en 2da dimensión se llevó a cabo en la cámara PROTEAN de Bio-Rad. La electroforesis

se realizó a 150 V y 10 mA. Los resultados del gel se visualizaron por medio de tinción de Coomasie.

V.2.7 Tinción de Coomasie.

El gel se coloca en solución para teñir (colorante azul de Coomasie G-250 al 0.2 % en metanol al 50 %) por 45 minutos. Posteriormente el gel se coloca en solución para desteñir (Metanol al 50 %) por 30 minutos y se cambia la solución tantas veces como sea necesario.

V.2.8 Tinción con plata.

Fijar en ácido acético 10% por 30 minutos. Solución fijadora: 10 ml de ácido acético (10 %) aforar a 100 ml con agua HPLC. Lavar dos veces con agua HPLC por 1 minuto. Colocar en la solución de nitrato de plata por 20 a 30 minutos. Solución de nitrato de plata: 0.1 g de nitrato de plata (0.1 %) y 100 µl de formaldehído al 37 % aforar a 100 ml con agua HPLC. Agregar el formaldehído antes de usar. Un lavado de un minuto con agua HPLC. Colocar en la solución reveladora hasta que aparezcan las bandas. Solución reveladora: 2.5 g de carbonato de sodio, 0.0002g de tiosulfito de sodio y 100 µl de formaldehído al 37 %, aforar a 100 ml con agua HPLC. Agregar el formaldehído antes de usar. Detener la reacción agregando la solución de Glicina-EDTA. Solución de Glicina-EDTA: 2 g de glicina y 0.5 g de EDTA, aforar a 100 ml con agua HPLC. Conservar en ácido acético 1 %.

V.2.9 Método de Bradford.

Se usó el método de Bradford (Bradford, 1976) para la cuantificación de las proteínas durante el proceso de purificación. La curva estándar se realizó con albúmina de suero bovino (BSA). Se usó el reactivo de Bradford de Bio-Rad de acuerdo a lo especificado para el procedimiento de microensayo. Se leyó la absorbancia a 595 nm.

VI. RESULTADOS.

VI.1 Obtención del extracto crudo.

El extracto celular de *Cellulomonas flavigena*, crecida en un medio mineral con bagazo de caña como fuente de carbono, posee proteínas que se unen a AMPc (Tabla 1). Como sabemos las proteínas de unión a AMPc son proteínas intracelulares por lo cual para llevar a cabo su purificación fue necesario romper la célula. Spiridonov y col. (1999) realizaron un procedimiento similar para la obtención de la proteína celR de *Thermomonospora fusca* y Barrera-Islas, y col. (2005) utilizaron lizosima para la obtención de las proteínas intracelulares de *Cellulomonas flavigena*. De los diferentes métodos de lisis existentes se optó por la lizosima por que en la literatura este método ha dado los mejores resultados en la lisis de *Cellulomonas flavigena* (Barrera-Islas, y col., 2005; Cuellar-Cruz, 2003). La lisis fue llevada a cabo y el extracto era rico en proteínas (Figura 6). El patrón de lisis fue observado por medio de SDS-PAGE.

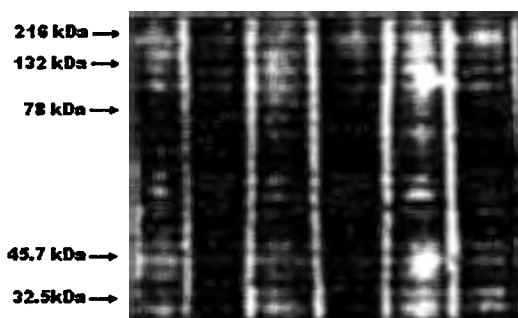


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras. Muestras del extracto crudo a diferentes concentraciones (Carril 1: marcador, Carriles 2, 4 y 6 20 mg de proteínas, Carriles 3 y 5 10 mg de proteínas).

VI.2 Purificación de las proteínas de *Cellulomonas flavigena* con la capacidad de unirse al AMPc.

Las proteínas de unión a AMPc fueron purificadas mediante dos pasos de cromatografía primeramente mediante una columna de Bio-gel A (agarosa) con

el fin de retirar las proteínas que se unieran a la agarosa. Las proteínas fueron eluidas con solución fisiológica obteniendo un pico principal de proteínas. Las fracciones 2, 3 y 4 fueron las que contenían más proteína, la cantidad de proteína en las fracciones se evaluó por el método de Bradford (Figura 7). Las muestras con la mayor cantidad de proteína fueron recolectadas y combinadas. Después del paso de purificación por medio de la columna de Bio-gel A, se procedió a la separación de las proteínas con una columna de afinidad (A0144 de Sigma) de AMPc unido a agarosa.

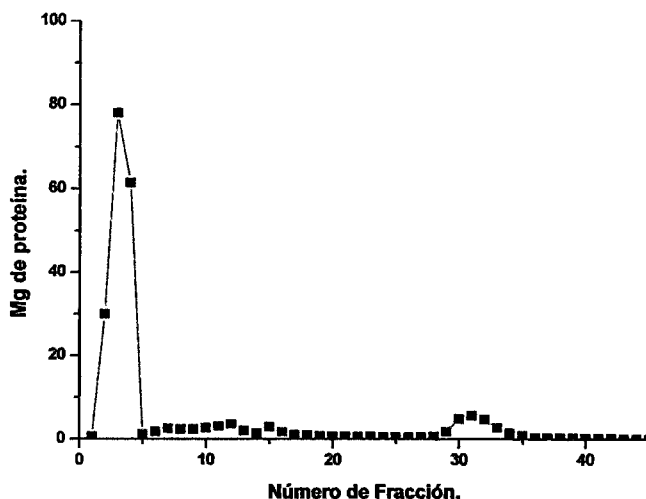


Figura 7.- Perfil de elución de las proteínas de *Cellulomonas flavigena* a través de una columna de Bio-gel A (agarosa).

Los 10 ml de extracto de proteína provenientes de las fracciones 2, 3 y 4 fueron tratados con 2 ml de resina de AMP cíclico – agarosa (A0144 de Sigma) previamente equilibrada con solución fisiológica (PBS) a 25 °C. La resina se puso en contacto con el extracto proteico por 2 horas. Después de esto la resina se separó del sobrenadante por medio de centrifugación a 3,500 RPM. La resina fue lavada con solución fisiológica (PBS) y resuspendida en 5 ml de solución de urea 6 M por 3 horas para separar las proteínas de unión a AMP cíclico. La proteína fue separada del sobrenadante por medio de centrifugación a 3,500 RPM recuperando el sobrenadante. Finalmente el volumen fue completado a 10 ml con solución fisiológica (PBS) y se agregó un mililitro de ácido tricloroacético (TCA; Merck) e incubado a 4 °C por toda la noche. El precipitado fue colectado

por centrifugación a 10,000 x g por 15 minutos a 4 °C y lavado tres veces con acetona a -20 °C y una vez más con etanol frío para remover las trazas de ácido tricloroacético.

El proceso de purificación fue seguido mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 8) y se determinó el contenido de proteínas mediante el método de Bradford. Este proceso de purificación de las proteínas con capacidad de unirse al AMP cíclico, logro recuperar primeramente 12.153 mg de proteína. Esto es un 3.11 % de la proteína inicial presente en el extracto. Se observó que durante el primer paso de purificación se perdía gran cantidad de proteína del extracto inicial por lo cual se decidió omitir este paso. Una vez modificado el proceso de purificación se recuperaron 34.7978 mg de proteína con capacidad de unirse al AMP cíclico, lo cual representa un 8.86 % de la proteína inicial en el extracto. El proceso de purificación se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Proceso de purificación de proteínas de unión a AMPc.

Proceso de Purificación de proteínas de unión a AMPc.	mg/ml de proteínas.	mg Totales de proteínas.
Muestra 1		
Extracto Crudo	78.0613	390.3456
Columna Bio-Gel A	17.9179	179.179
Columna AMPc	607.75	12.153
Muestra 2		
Extracto Crudo	78.0613	390.3456
Columna Bio-Gel A	Se omitió	Se omitió
Columna AMPc	1729.89	34.5978

Como puede verse el proceso de purificación mejoró considerablemente aunque la recuperación de estas proteínas se ve afectada por su rápida degradación.

VI.3 Caracterización de las proteínas de unión a AMPc.

Las muestras obtenidas de todos los pasos de la purificación fueron corridas en una electroforesis SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 6 el extracto crudo era rico en proteínas y con un buen patrón de lisis. Las muestras de la columna de afinidad mostraron que existen varias proteínas con capacidad para unirse al AMPc. Existe una banda aproximadamente a 38 kDa, la cual pudiera ser la proteína *celR1* ya que en la literatura se ha visto que la proteína *celR* ha sido descrita con un peso de aproximadamente 41 kDa en *Thermomonospora fusca* (Spiridonov, y Col., 1999) y en *Cellulomonas flavigena* se describe como una proteína de 38 kDa (Herrera-Herrera, y Col., 2009).

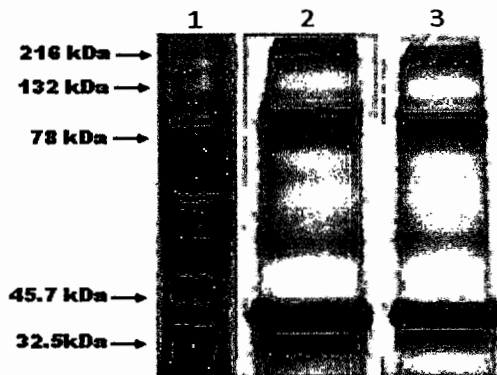


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras. Carril 1 Extracto Crudo, Carriles 2 y 3 Proteínas recuperadas de la columna de afinidad AMP cíclico – agarosa (A0144 de Sigma)

Cabe señalar que el gel fue teñido con azul de Coomasie. Adicionalmente a la banda de aproximadamente 38 kDa pueden observarse bandas definidas aproximadamente a 216, 100 y 32 kDa y otras con menor definición a 120, 70 y 50 kDa. Es necesario recordar que la proteína CAP (Catabolite Activator Protein o CRP catabolite repressor protein) de *E. coli* fue descrita como un dímero de dos subunidades idénticas de 22.5 kDa que se encuentra continuamente expresado en las células. Sin embargo ya que estas células fueron crecidas en bagazo de caña esta proteína debe estar expresada en mayor medida.

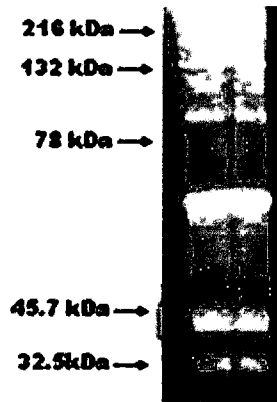


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras. Tinción con plata de proteínas recuperadas de la columna de afinidad AMP cíclico – agarosa (A0144 de Sigma).

La tinción con plata (Figura 9) de las proteínas recuperadas de la columna de afinidad AMP cíclico – agarosa (A0144 de Sigma) no mostro mas proteínas aparte de las ya mencionadas.

VI.4 Electroforesis en dos dimensiones.

Una vez que fueron separadas las proteínas de unión a AMP cíclico se procedió a analizarlas mediante electroforesis en dos dimensiones. Las proteínas intracelulares de *Cellulomonas flavigena* con afinidad a AMP cíclico fueron cargadas en una tira de 11 cm con un gradiente de pH 4-7 (Bio-Rad). La tira fue rehidratada durante toda la noche y el isoelectroenfoque fue corrido a 4 °C. Las proteínas fueron posteriormente corridas en un gel a 12.5 %. Se separaron 27 proteínas. La mayor parte de estas proteínas se encuentran en la región acida entre PH 4-6 (Figura 10).



Figura 10. Proteínas intracelulares de *Cellulomonas flavigena* con afinidad a AMP cíclico. Electroforesis en dos dimensiones en una tira de pH 4-7, en un gel de Acrilamida al 12.5 %.

Muy probablemente alguna de las proteínas cercanas a los 45 kDa., sea el producto del gen *celR1*, sin embargo al ser este el primer trabajo de caracterización de las proteínas de unión a AMP cíclico en *Cellulomonas flavigena* no podríamos saber con certeza cuál de estas proteínas sea *celR1*. Aunque muy probablemente *celR1* sea la proteína que se encuentra en pH 6.5 cercana a los 45 kDa. ya que proteínas homólogas has sido reportadas como proteínas de pH neutro a básico (Tutar, 2008; Gabor, y col., 2006).

VII. DISCUSIÓN.

Cellulomonas flavigena es un microorganismo con gran capacidad de producción de celulasas, cuando se encuentra creciendo en bagazo de caña sin embargo al crecer en glucosa se reprime la expresión de estas enzimas. La represión catabólica por la glucosa es un fenómeno común en la síntesis de celulasas, en algunas bacterias se rige por medio del AMP cíclico (Wood, y Col., 1984). La represión catabólica es provocada por la glucosa cuando un microorganismo es crecido en un medio con dos fuentes de carbono y puede ser explicada por la regulación dada por el complejo CAP-AMP cíclico. Cuando el transporte de glucosa a la célula es bajo se promueve la expresión del gen *cya* que codifica para la adenilato ciclasa. Esta enzima convierte el ATP a AMP cíclico. El AMP cíclico se une a la proteína CRP o CAP (Catabolite Repressor Protein o Catabolite Activator Protein) y este complejo se une a una secuencia consenso cercana al promotor propiciando la expresión de genes relacionados con la utilización de fuentes de carbono diferentes a la glucosa, como lo son los genes de las celulasas.

La producción de celulasas por *Cellulomonas flavigena* es muy dependiente de la fuente de carbono donde se encuentre creciendo. En un medio de cultivo con bagazo de caña como fuente de carbono las celulasas son producidas, pero si a este medio se le añade glucosa la actividad enzimática de las celulasas baja drásticamente, como consecuencia de que dejan de producirse hasta que se ha agotado la glucosa en el medio.

Estudios recientes han demostrado que en *Cellulomonas flavigena* existe un gen llamado *celR1* que codifica para una proteína de aproximadamente 38 kDa. De igual manera se ha demostrado que el ingreso de AMP cíclico exógeno o sus análogos como el 8 Br AMPc al medio, aunque el medio contenga glucosa lleva a la expresión de celulasas, incluso a niveles mayores de los normales. (Herrera-Herrera, y Col., 2009).

Partiendo de esta base se decidió aislar las proteínas de unión a AMP cíclico de la bacteria *Cellulomonas flavigena*, para confirmar la existencia de la proteína

producto del gen *celR1* y su capacidad de unirse al AMP cíclico. El proceso de purificación fue primeramente llevado a cabo mediante una columna de Bio-gel A (agarosa) con el fin de retirar las proteínas que se unieran a la agarosa de esta columna se obtuvieron un 45.9 % de las proteínas presentes en el extracto crudo inicial.

Estas proteínas fueron recuperadas mediante una columna de afinidad AMP cíclico – agarosa (A0144 de Sigma). Al omitir el paso a través de la columna de Bio-gel A (agarosa) se logro mejorar el rendimiento (Tabla 1) de 12.153 mg de proteínas totales (3. 11 % de las proteínas iniciales en el extracto) a 34.7978 mg de proteínas totales (8.86 % de las proteínas iniciales en el extracto). En cuanto a la pureza de las proteínas recuperadas no hay realmente una diferencia significativa entre los dos procesos de purificación. Las muestras obtenidas de todos los pasos de la purificación fueron corridas en una electroforesis SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 8 el extracto crudo era rico en proteínas y con un buen patrón de lisis.

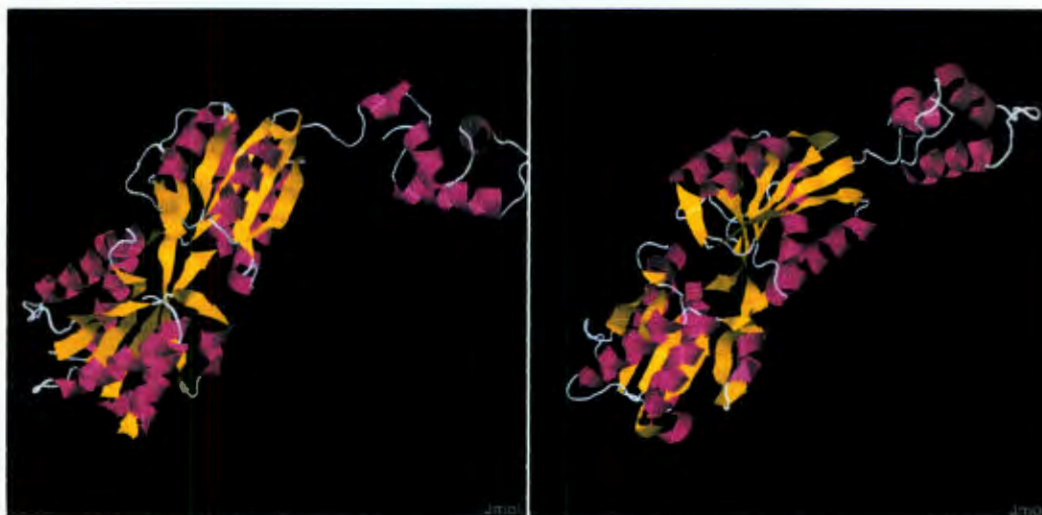


Figura 11. Modelo de la proteína producto del gen *celR1* por ESyPred3D ExpASy proteomics server.

Las muestras de la columna de afinidad mostraron que existen varias proteínas con capacidad para unirse al AMPc. Existe una banda aproximadamente a 38 kDa. La cual pudiera ser *celR1* ya que en la literatura se ha visto que la proteína *celR1* ha sido descrita con un peso de aproximadamente 38 kDa y un punto

isoeléctrico de 9.7 (Herrera-Herrera, y Col., 2009) confirmado por herramientas del ExPASy proteomics server como el ProtParam y el ESyPred3D.

Y, además, en el estudio de Herrera-Herrera, y Col., (2009) se observó que un extracto igual al de este estudio el cual fue sometido a Western Blot reveló una banda de 38 kDa que corresponde a *celR1* y equivale a la banda reportada aquí mediante electroforesis SDS PAGE (Figuras 8 y 9), esto demuestra que la proteína *celR1* se une a AMP cíclico y por su gran homología con los represores de la familia LacI, 77.5 % homólogo con el dominio de unión a ADN hélice-giro-hélice, es de suponerse que esta proteína está participando mediante su unión con el AMP cíclico en el control de la biosíntesis de las celulasas. Es importante mencionar que las proteínas con el dominio hélice-giro-hélice comúnmente son proteínas de unión a ADN y probablemente tengan función reguladora. Una vez que las proteínas de unión a AMP cíclico fueron separadas se analizaron mediante electroforesis en segunda dimensión. Las proteínas intracelulares de *Cellulomonas flavigena* con afinidad a AMP cíclico fueron cargadas en una tira de 11 cm con un gradiente de pH 4-7 para el isoelectroenfoque y posteriormente corridas en un gel a 12.5 %. Se separaron 27 proteínas. La mayor parte de estas proteínas se encuentran en la región ácida entre pH 4-6 (Figura 10). Muy probablemente *celR1* sea la proteína que se encuentra en el extremo de pH 6.5 a 7 cercana a los 45 kDa debido a que su pI teórico es de 9.7 (Herrera-Herrera y col. 2009) y proteínas homologas has sido reportadas como proteínas de pH neutro a básico (Tutar, 2008; Gabor, y col., 2006). Finalmente este trabajo nos lleva a tener más pruebas para demostrar que La síntesis de celulasas está regulada en *Cellulomonas flavigena*. La regulación está mediada por el AMPc y la proteína *celR1* forma parte del mecanismo de regulación de la síntesis de celulasas aunque aun no podemos aseverar cual es exactamente el mecanismo existen razones suficientes para sustentar que *celR* muy probablemente esté implicado. La separación por medio de columna de afinidad resulto ser un buen método para separar las proteínas de unión a AMPc. La unión a AMPc del producto del gen *celR1* 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.

VIII. CONCLUSIONES.

En este estudio se logró purificar las proteínas de *Cellulomonas flavigena* con capacidad de unirse a AMP cíclico lo cual fue comprobado ya que se unieron a una columna de afinidad con AMP cíclico anclado en agarosa.

Las proteínas fueron separadas por medio de electroforesis, una de estas proteínas que aparece en un peso aproximado de 38 kDa es el producto del gen *celR1*.

En la electroforesis de dos dimensiones *celR1* pudiera ser la proteína que se encuentra en el extremo de pH 6.5 a 7 cercana a los 45 kDa debido a que su pI teórico es de 9.7.

La síntesis de celulasas en *Cellulomonas flavigena* está regulada. Muy probablemente la unión de la proteína *celR1* con el AMP cíclico regule la expresión de las celulasas.

Son necesarios aún más estudios para aclarar el mecanismo exacto de acción de la proteína *celR1* y el AMP cíclico en la regulación de la síntesis de las celulasas en *Cellulomonas flavigena*.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

Atalla R.H., Hackney J.M., Uhlin I., Thompson N.S. 1993. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *International journal of biological macromolecules*: 15:109-12.

Barrera-Islas, G. A. 2005. Cambios en los parámetros cinéticos de la β -glucosidasa de *Cellulomonas flavigena* PN-120 y caracterización molecular de la enzima silvestre. México, D.F. Centro de investigación y estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencias en la especialidad de Biotecnología. 10-16.

Béguin, P., Aubert J. P. 1994. The Biological degradation of cellulose. *FEMS microbiology reviews*: 13: 12-58.

Béguin, P., Gilkes, N. R., Kilburg, D. G., Miller, R. C. Jr., O'neil, G. P. 1987. Cloning of cellulase genes. *Critical Reviews in Biotechnology*: 6: 129-162.

Bisaria, V.S., Mishra, S., 1989. Regulatory aspects of cellulose biosynthesis and secretion. *Critical Reviews in Biotechnology*: 9:61-103

Blouin, F.A. Martin, L.F., Rowland, S.P. 1970. Gel-Permeation Properties of Cellulose. Part IV: Changes in Pore Structure of Fibrous Cotton Produced by Cross-Linking with Formaldehyd. *Textile Research Journal*: 40: 959-964.

Bond, K., Stutzenberger, F. 1989. A note on the localization of cellulosome formation in *Thermomonospora curvata*. *Journal of applied bacteriology*: 67: 605-609.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*: 72: 248-254

Chaudhary, P., Kumar, N., Deobagkar, D. 1997. The glucanases of *Cellulomonas*. *Biotechnology advances*: 15: 315-331.

Cuellar-Cruz, M. 2003. Identificación de los genes de *Cellulomonas flavigena* que se regulan transcripcionalmente por crecimiento en bagazo de caña. México, D.F. Centro de investigación y estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, Departamento de Bioquímica. Tesis

para obtener el grado de Maestra en ciencias en la especialidad de Bioquímica. 9-22.

Dekker, K. C. B., Richards, G. N. 1976. Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties and mode of action. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*: 32: 278-352.

Eriksson, K. E. L. 1990. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Science and Technology*: 24: 79-101.

Fennington, G., Neubauer, D., Stutzenberger, F. 1984. Cellulase biosynthesis in a catabolite repression-resistant mutant of *Thermomonospora curvata*. *Applied and Environmental Microbiology*. 47: 201-204.

Gábor, K., Veríssimo, C. S., Cyran, B. C., Ter Horst, P., Meijer, N. P., Smidt, H., De Vos, W. M., Van der Oost, J. 2006. Characterization of CprK1, a CRP/FNR-Type Transcriptional Regulator of Halorespiration from *Desulfotobacterium hafniense*. *Journal of bacteriology*: 188: 2604–2613.

Goksoyr, J., Erikser, J. 1980. Cellulases. En: *Microbial Enzymes and bioconversions*. 5ta. Ed., A. H. Rose, Londres, Inglaterra: 283-326.

Greenberg, N. M., Warren, R. A. J., Kilburn, D. J., Miller, Jr. R. C. 1987 a. Regulation and initiation of *cenB* transcripts of *Cellulomonas fimi*. *Journal of bacteriology*: 169: 4674-4677.

Greenberg, N. M., Warren, R. A. J., Kilburn, D. J., Miller, Jr. R. C. 1987 b. Regulation initiation, and termination of the *cenA* and *cex* transcripts of *Cellulomonas fimi*. *Journal of bacteriology*: 169: 646-653.

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-glucanase. *Current microbiology*: 47:359-363

Henrissat, B., Teeri, T.T., Warren, R.A.J. 1998. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Letters*: 425: 352-354.

Herrera-Herrera, J. A., Pérez-Avalos, O., Salgado, L. M., Ponce-Noyola T. 2009. Cyclic AMP regulates the biosynthesis of cellobiohydrolase in *Cellulomonas flavigena* growing in sugar cane bagasse. *Archives of microbiology*: 191: 745-750.

- Herrera-Herrera, J. A., 1999.** Caracterización molecular de un gen que codifica para celobiohidrolasas de *Cellulomonas flavigena*. México, D.F. Centro de investigación y estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, Departamento de Bioquímica. Tesis para obtener el grado de Maestra en ciencias. 12-14.
- Himmel, M. E. 2009.** Corn stover conversion to biofuels: DOE's preparation for readiness in 2012. *Cellulose*: 16:531-534.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L., 2005.** Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*: 40:3519-3525
- Khanna, S. G. 1993.** Regulation, purification and properties of xylanase from *cellulomonas fimi*. *Enzyme and Microbial Technology*: 15:990-995.
- Koyama, M., Helbert, W., Imai, T., Sugiyama, J., Henrissat, B. 1997.** Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 94: 9091-9095.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lewin, B. M., Aguilera-López, A., Casadejesús-Pursals J. 1996.** Genes VII. 1ra. Ed. Reverte. España: 343-346.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. E., Pretorius, I. S. 2002.** Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*: 66: 506-577.
- Lynd, L. R., Wyman, C. E., Gerngross T. U. 1999.** Biocommodity engineering. *Biotechnology progress*: 15: 777-793.
- Mandels, R. 1982.** Cellulases. *Annual Reports on Fermentation Processes*: 5: 35-78.
- Marchessault, R. H., Sundararajan, P. R. 1993.** Cellulose. 1ra. ed., Academic press, New York, N. Y.: 11-95.
- Mayorga, R. L., 2002.** Caracterización y regulación del gen *xynclA* de *Cellulomonas flavigena*. México, D.F. Centro de investigación y estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco. Tesis de Doctorado. 12-15.

- Montenecourth, B. S., Eveleigh, D. E. 1979.** Production and characterization of high yielding mutants of *Tricoderma reesei*. TAPPI: 28: 101.
- Morosoli, R., Dorand, S., Boucher, F. 1989.** Stimulation of xylanases synthesis in *Cryptococcus albidus* by cyclic AMP. FEMS Microbiology Letters: 57: 57-60.
- Mullings, R. 1985.** Measurement of saccharification by cellulases. Enzyme and Microbial Technology: 7: 586-591.
- Ovando-Chacón, S.L., Waliszewski, K.N. 2005.** Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y ciencia 21: 111-120.
- Pizzi, A., Eaton, N.J. 1985.** The Structure of Cellulose by Conformational Analysis. 2. The Cellulose Polymer Chain. Journal of Macromolecular Science: 22:105-137
- Ponce-Noyola T., De la Torre, M. 2001.** Regulation of cellulases and xylanases from a derepressed mutant of *Cellulomonas flavigena* growing on sugar-cane bagasse in continuous culture. Bioresource Technology: 78: 285-291
- Poncé-Noyola T., Perez-Avalos, O., Magaña-Plaza I., De la Torre, M. 1996.** Induction of xylanase and β xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. Applied Microbiology and Biotechnology: 46: 405-409.
- Ponce-Noyola, T. 1992.** Obtención y caracterización de una mutante de *Cellulomonas flavigena* de alta velocidad específica de crecimiento en bagazo de caña. México. ENCB-IPN. Tesis de doctorado. 9-12.
- Rapp, P., Beerman, A. 1991.** Bacterial cellulases. In: Haigler C. H., Weimer P. J. (eds.) Biosynthesis and biodegradation of cellulose. 1ra. Ed. Marcel Dekker Inc., New York, N. Y.: 535-595.
- Sánchez-Herrera, L. M., Ramos-Valdivia, A. C., De la Torre, M., Salgado, L. M., Ponce-Noyola, T. 2007.** Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources. Applied Microbiology and Biotechnology: 77: 589-595.
- Schwarz, W. H. 2001.** The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology: 56: 634- 649.
- Spiridonov, N. A., Wilson, D. B., 1999.** Characterization and Cloning of CelR, a Transcriptional Regulator of Cellulase Genes from *Thermomonospora fusca*. The Journal of Biological Chemistry 274: 13127-13132.

- Stewart, B. J., Leatherwood, J. M. 1976.** Derepressed synthesis of cellulose by Cellulomonas. Journal of bacteriology: 128: 609-615.
- Stone, J. E., Scallan, A. M., Donefer, E., Ahlgren, E. 1969.** Digestibility as a Simple Function of a Molecule of Similar Size to a Cellulase Enzyme. Advances in Chemistry: 95: 219-241.
- Stone, J.E., Scallan, A.M. 1968.** A structural model for the cell wall of water-swollen wood pulp fibres based on their accessibility to macromolecules. Cellulose chemistry and technology: 2: 343-358.
- Suto, M., Tomita, F., 2001.** Induction and catabolite repression mechanism of cellulase in fungi. Journal of Bioscience and Bioengineering: 92:305-311.
- Taylor, N. G. 2008.** Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. The New phytologist: 178(2):239-252.
- Tutar, Y. 2008.** *Syn*, *anti*, and finally both conformations of cyclic AMP are involved in the CRP-dependent transcription initiation mechanism in *E. coli lac* operon. Cell Biochemistry and Function. 26:399-405.
- Van Soest, P. J. 1994.** Nutritional Ecology of the Ruminant, 2da. ed., Cornell University Press, Ithaca, N. Y. 17-19.
- Wachinger, G., Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W. L., Schrempf, H. 1989.** Identification of mycelium-associated cellulose from *Streptomyces reticuli*. Applied and Environmental Microbiology: 55: 2653-2657.
- Warren, R. A. 1996.** Microbial hydrolysis of polysaccharides. Annual review of microbiology. 50:183-212.
- Wood, T. M. 1975.** Properties and mode of action of cellulases. Biotechnology & Bioengineering Symposium: 5: 111- 137.
- Wood, W.E., Neubauer, D.G., Stutzenberger, F.J. 1984.** Cyclic AMP levels during induction and repression of cellulase biosynthesis in *Thermomonospora curvata*. The Journal of Bacteriology: 160:1047-1054.