

Purificación y Caracterización de Isoenzimas de Trehalosa 6-fosfato Sintasa de Plantas de *Selaginella lepidophylla* Totalmente Hidratadas

Márquez-Escalante, J. A., Figueroa-Soto, C.G., Vázquez-Moreno, L., Calderón de la Barca, A.M. y Valenzuela-Soto, E.M.

trabajo de tesis de maestría del primer autor, realizado en la Coordinación de Ciencia de los Alimentos

Los organismos pueden adaptarse a condiciones ambientales extremas como sequía, salinidad, congelación o calor, empleando diversos mecanismos de defensa. Uno de estos mecanismos es la capacidad de sintetizar y acumular solutos no tóxicos (osmoprotectores o solutos compatibles) en el citoplasma de las células. Entre los osmoprotectores se encuentran: glicina betaina, prolina, β -alanina, manitol, trehalosa y sacarosa. De estos osmoprotectores, uno de los de mayor interés es la trehalosa.

La trehalosa protege las estructuras biológicas del daño contra la desecación, el frío, altas temperaturas, choque térmico y otros tipos de estrés. Se ha propuesto que la trehalosa protege a los organismos contra los diferentes tipos de estrés antes mencionados, porque estabiliza a las enzimas, proteínas y membranas deshidratadas. De acuerdo con esto, existe un gran interés en los mecanismos de síntesis y regulación de trehalosa.

Ahora bien, a excepción de las llamadas plantas de resurrección que pueden sobrevivir a la deshidratación total y otras condiciones extremas, no se ha detectado la acumulación de trehalosa en plantas superiores. En la última década se ha trabajado en la introducción por ingeniería genética, de la síntesis de trehalosa en dichas plantas, buscando aumentar la capacidad de crecimiento bajo condiciones de estrés. Un buen modelo para el estudio de las enzimas de síntesis de trehalosa es *Selaginella lepidophylla*. Esta es una planta de resurrección que crece en varios estados de México y se sabe, es una planta que acumula altas concentraciones de trehalosa en condiciones de estrés.

Con la idea de caracterizar la enzima de *S. lepidophylla*, los objetivos de este trabajo fueron purificar a homogeneidad la trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS), demostrar la existencia de isoenzimas, establecer un esquema para su purificación y estudiar algunas de sus propiedades bioquímicas que ayuden a entender su relevancia fisiológica.

La purificación de la TPS se llevó a cabo a través de cromatografía de afinidad con ión metálico inmovilizado (IMAC) en una matriz Novarosa DPA. La separación de las isoenzimas se hizo por medio de cromatografía de intercambio iónico en Q-Sefarosa Fast-Flow utilizando un gradiente de 0.5 a 1 M de KCl. La pureza de la TPS se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas y bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras.

La masa molecular nativa se determinó por cromatografía de filtración en gel utilizando un equipo de cromatografía líquida de baja presión y por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida. También, se estimó el punto isoeléctrico de las isoenzimas mediante isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida en un intervalo de pH de 4-6.5. Finalmente, se determinó el pH óptimo y estabilidad de las isoenzimas al pH, así como la temperatura óptima y estabilidad al calor.

La trehalosa 6-fosfato sintasa de *S. lepidophylla* se purificó a homogeneidad electroforética aparente obteniendo una actividad total de 2.12 U y una actividad específica de 3.36 U/mg de proteína, representando una recuperación del 42% y 196 veces de purificación.

Mediante cromatografía de intercambio iónico se aislaron tres isoenzimas de trehalosa 6-fosfato sintasa, las cuales se separaron de la matriz a diferente fuerza iónica cada una, la primera requirió de 0.35, la segunda de 0.7 y la tercera de 1 M de KCl. A través de cromatografía de filtración en gel se determinó que la TPS forma complejos de 595, 410 y 224 kDa.

Se realizó una electroforesis en dos dimensiones para estudiar estos complejos y poder determinar la existencia de formas diferentes con actividad de TPS. En la primera dimensión se hizo una electroforesis, en gel de poliacrilamida nativa y se encontraron complejos de 660, 440 y 200 kDa. En la segunda dimensión se corrió una electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras de cada una de las bandas encontradas en el gel nativo, encontrando que las tres bandas están formadas por subunidades de 115, 75 y 50 kDa. Además, se hizo un isoelectroenfoco de cada banda del gel nativo, obteniendo puntos isoeléctricos de 4.83, 4.69 y 4.55. Estos datos en conjunto, nos permiten concluir que la enzima está presente en tres formas diferentes en la planta de *S. lepidophylla*. Las tres isoenzimas mostraron pH óptimos de 5, 5.5, 6.5, 7 y 9, y fueron estables en un intervalo de pH de 5-11.

Por su parte, las temperaturas óptimas de las isoenzimas eluidas a 0.35, 0.7 y 1 M de KCl fueron de 45°, 55° y 25°C, respectivamente. Por último, la isoenzima eluida a 0.35 M de KCl no fue estable en un intervalo de temperatura de 20° a 60°C. En contraste, la TPS eluida a 0.7 M de KCl fue estable en este mismo intervalo de temperaturas, mientras que la eluida a 1 M de KCl fue estable a temperaturas de 50° a 60°C.

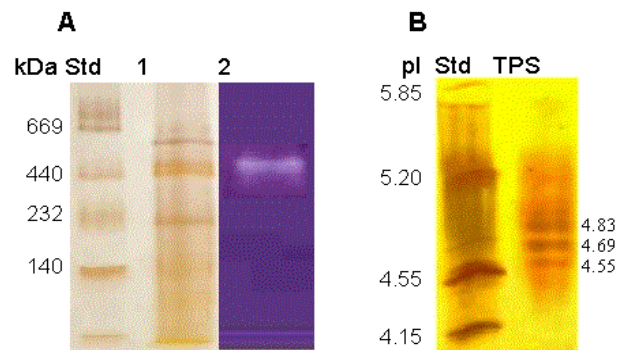


Figura 1 A) Electroforesis nativa de Trehalosa 6-fosfato sintasa, carril 1 enzima teñida por plata, carril 2 teñido por actividad. B) Isoelectroenfoco de la TPS, tinción con plata.