

**CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACION Y  
DESARROLLO A.C.**

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE ISOENZIMAS DE  
TREHALOSA 6-FOSFATO SINTASA DE PLANTAS DE *Selaginella*  
*lepidophylla* TOTALMENTE HIDRATADAS

POR

JORGE ALBERTO MARQUEZ ESCALANTE

---

TESIS APROBADA POR LA

DIRECCION DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

HERMOSILLO, SONORA.

ABRIL DEL 2003

## DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

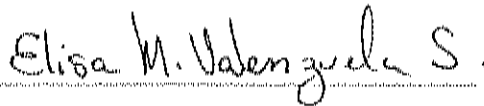
La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director (a) de la tesis.

---

Dr. Alfonso Gardea Béjar  
Director General

## APROBACION

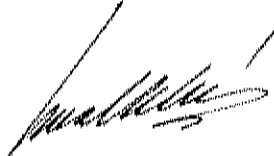
Los miembros del comité designado para revisar la tesis del I.Q. Jorge Alberto Márquez Escalante, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto  
Director de Tesis



Dra. Luz Vázquez Moreno



Dra. Ana María Calderón de la Barca Cota

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., así como también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico y material para la realización de este trabajo.

A la Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto, por permitirme participar en esta investigación, quien con su apoyo académico y moral formó el criterio para mi desarrollo personal y profesional. Además, por brindarme su confianza y conocer parte de su familia consolidando una buena amistad durante todos estos años, *¡¡La recordare siempre!!*

A la M.C. Ciria Guadalupe Soto, por la asesoría académica y técnica, sin la cual no sería posible la realización de esta tesis. También, por el apoyo moral y compartir los buenos y malos momentos, así como de ocio durante estos años, *¡¡Muchas gracias!!*

Al comité de tesis integrado por la Dra. Luz Vázquez Moreno, Dr. Eleazar Martínez Barajas y Dra. Ana María Calderón de la Barca, sus sugerencias enriquecieron este trabajo.

Al Departamento de Ciencias de los Alimentos, en particular a Soco, Cuquis, Gaby, Ana María, Panchito y personal de microbiología por las facilidades de equipo y buen trato.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal: Dr. Miguel Ángel, Oly Briseño, Brenda, Gerardo y *Mary Claus* (María Luisa) por la disposición de equipo y cortesía de siempre.

Al personal de docencia, biblioteca, mantenimiento y cómputo en particular a la Dra. Ana María Calderón, Ana *Ishabel*, Luis Conde, Gerardo Reyna, Fernando, Magda, Martín Peralta, Don José, Don Lino, Don Román, Quintana, Gustavo, Doño del autobús y al guardia Francisco Ríos.

A mis compañeros y amigos del CIAD con los cuales compartí penas, alegrías y reuniones de trabajo hasta altas horas de la noche o de la mañana dependiendo de la profundidad del tema.

Los fenómenos a los cuales me refiero son: *Ray* (Raymundo Soto), *Hiana-Banana*, *Chore/Pinky/Fotosintetica/Dumbo/Yaquecita* (Claudia Iñiguez), *LuzMa* (De Regil), *Pocchaco* (Katia Pérez), *Angie*, *Perro* (Felipe Aleman), *Lyzzie* (Lyssia Castellanos), Haydé, Sayda, René, Saúl, Ricardo, Enrique, *Las Sapitos* (Chayito y Anita) y *Cachetes* (Rocio Córdova).

También, a *Ale/Alita* (Alejandra Rodríguez), *Bellota/Pues por eso* (Yeren Escobedo), *Cony Ingracia/Betty Bu* (Consuelo Corrales), *Emperatriz bombón* (Araceli Serna), *Furby/Baby Pashona* (Nidia Caceres), *Boca de pescadito/El inútil* (Héctor Ayala), *Joven Alberto/El puras fallas* (Juan Pable Valenzuela) y en especial a *Tatanya* (Tania Lucero) por ser mi tía adoptiva durante la maestría. Sin ellos, no tendría sabor el caldo aunque se calentó de más.

## DEDICATORIA

- ✧ Por quien estoy aquí: a Dios.
- ✧ A mi Madre *Lupita* Escalante Tamayo, quien removió piedras por mí y me enseñó a trabajar siguiendo adelante pese a todo..... ¡¡TE AMO!!.
- ✧ A mis hermanos Ramses y Lilian, así como a toda mi familia, quienes creyeron en mí y siempre me apoyaron. También con cariño a mi tía Ana.....¡¡LOS AMO!!.
- ✧ Por quienes han puesto su confianza en mí: Dra. Elisa y M.C. Ciria.
- ✧ A *¿?, ¿?, ¿?, ¿?, ¿?, ¿?, ¿? y ¿?*, quienes me ayudaron a crecer y entender que lo mejor es el presente, a todos ellos;

No digas que te despides;  
 pero siempre, en tu interior,  
 di a todos aquello que veas:  
 ¡Adiós!

A las quejas, a las risas,  
 al pájaro, a la canción,  
 a todo aquello que escuches:  
 ¡Adiós!

A los seres, a las cosas,  
 al amor, como al dolor,  
 a todo aquello que sientas:  
 ¡Adiós!

No lo sabes, vas de prisa.  
 -No inquieras: ¿adónde voy?-  
 Resígnate y di en silencio:  
 ¡Adiós!

*Luis G. Urbina.*

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS .....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Trehalosa.....	3
Mecanismos de Protección.....	4
Presencia en Organismos.....	5
Trehalosa en animales.....	5
Trehalosa en plantas.....	7
Trehalosa en microorganismos.....	8
Biosíntesis y degradación de trehalosa.....	9
Complejo trehalosa sintasa/fosfatasa.....	11
Genes <i>TPS</i> y <i>TPP</i> en plantas.....	12
Planta <i>Selaginella lepidophylla</i> .....	13
Trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) de plantas de <i>Selaginella lepidophylla</i> ..	15
MATERIALES Y METODOS.....	18
Materiales.....	18
Materia prima.....	18
Extracción y purificación de isoenzimas de trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) de <i>S. lepidophylla</i> .....	18
Ensayo de actividad.....	20

	Pagina
Análisis electroforético.....	20
Electroforesis en Condiciones Nativas (PAGE) y en Condiciones Desnaturalizantes y Reductoras (SDS-PAGE).....	20
Isoelectroenfoque (IEF).....	21
Electroforesis en Dos Dimensiones (2D).....	22
Determinación de masa molecular nativa.....	23
Cuantificación de proteína.....	23
Efecto del pH y temperatura.....	23
RESULTADOS.....	25
Purificación de TPS.....	25
Análisis electroforético en dos dimensiones.....	28
Cromatografía de intercambio iónico.....	37
Cromatografía de exclusión molecular.....	40
Caracterización de las isoenzimas.....	49
pH Optimo.....	49
Estabilidad al pH.....	53
Temperatura Optima.....	54
Estabilidad a la Temperatura.....	54
CONCLUSIONES.....	56
RECOMENDACIONES.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	58



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Función de la trehalosa en la protección de las membranas durante la deshidratación e hidratación.....	6
2	Biosíntesis y degradación de trehalosa.....	10
3	Modelo propuesto para la función de la biosíntesis de trehalosa en plantas.....	14
4	Cromatograma de intercambio iónico representativo de la purificación de TPS de <i>S. lepidophylla</i> .....	17
5	Cromatograma de afinidad con ión metálico inmovilizado (IMAC, DPA-Ni) del extracto crudo de <i>S. lepidophylla</i> .....	26
6	Electroforesis nativa de la TPS obtenida por IMAC.....	29
7	Isoelectroenfoque de la TPS obtenida por IMAC.....	30
8	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras de la TPS obtenida por IMAC.....	31
9	Primera dimensión, electroforesis nativa de la TPS obtenida por IMAC.....	32
10	Segunda dimensión, electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras de las bandas del gel nativo de la primera dimensión....	34
11	Isoelectroenfoque de las bandas del gel nativo de la primera dimensión.....	36
12	Cromatograma de intercambio iónico de la TPS obtenida por IMAC.....	38
13	Electroforesis nativa de la TPS obtenida por cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharosa de flujo rápido).....	41

Figura		Página
14	Filtración en gel del extracto crudo de <i>S. lepidophylla</i> .....	42
15	Filtración en gel de la fracción A del extracto crudo.....	44
16	Electroforesis nativa de la fracción A.....	45
17	Filtración en gel de la TPS obtenida por intercambio iónico.....	46
18	Filtración en gel de la fracción B del extracto crudo.....	47
19	Electroforesis nativa de la fracción B .....	48
20	Filtración en gel de la fracción C del extracto crudo.....	50
21	Electroforesis nativa de la fracción C .....	51
22	pH óptimo de las isoenzimas de TPS obtenidas por intercambio iónico a las concentraciones de sal indicadas.....	52
23	Temperatura óptima de las isoenzimas de TPS obtenidas por intercambio iónico a las concentraciones de sal indicadas.....	55

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Purificación de TPS de plantas de <i>Selaginella lepidophylla</i> totalmente hidratadas.....	27
2	Separación de isoenzimas de TPS de plantas de <i>Selaginella lepidophylla</i> totalmente hidratadas.....	35
3	Posibles modelos estequiométricos para los complejos de TPS de <i>S. lepidophylla</i> .....	39

## RESUMEN

En este estudio se purificó y caracterizó a las isoenzimas de trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) de plantas de *Selaginella lepidophylla* totalmente hidratadas. 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-Sepharosa 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 frente a la temperatura.

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. A su vez, por electroforesis en gel de poliacrilamida nativa se encontraron complejos de 660, 440 y 200 kDa, mientras que por electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras se demostró que las isoenzimas están formadas por subunidades de 115, 75 y 50 kDa. Además, cada isoenzima mostró puntos isoeléctricos de 4.83, 4.69 y 4.55.

Se encontró que las tres isoenzimas mostraron pH óptimos de 5, 5.5, 6.5, 7 y 9, y en cuanto a la estabilidad al pH todas las isoenzimas son estables en un intervalo de pH de 5-11. Por su parte, las temperaturas óptimas de la 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.

## INTRODUCCION

Los organismos pueden adaptarse a condiciones ambientales extremas como lo son la sequía, la salinidad, la deshidratación por congelamiento, el calor, etc., 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 (García *et al.*, 1997). Entre los osmoprotectores se encuentran: compuestos cuaternarios de amonio como glicina betaina y dimetilsulfoniopropionato; aminoácidos como prolina y  $\beta$ -alanina; polioles como manitol; y azúcares como trehalosa y sacarosa (Nuccio *et al.*, 1999). De estos osmoprotectores, actualmente, el de mayor interés es la trehalosa.

La trehalosa estabiliza a las enzimas, proteínas y membranas deshidratadas (Crowe *et al.*, 1996). Así también, protege las estructuras biológicas del daño contra la desecación, el frío, altas temperaturas, choque térmico y otros tipos de estrés (Noubhani *et al.*, 2000; Argüelles, 1994). Por lo que se ha enfatizado en el estudio de la síntesis de trehalosa.

El estudio de las enzimas involucradas en la acumulación de trehalosa se ha realizado principalmente en microorganismos, pero poco es lo que se conoce de ellas en plantas. Actualmente, se sabe que en levaduras y bacterias la trehalosa es sintetizada en dos pasos enzimáticos: primero, la trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) cataliza la condensación de UDP-glucosa y glucosa 6-fosfato, para formar trehalosa 6-fosfato; enseguida, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP) defosforila a la trehalosa 6-fosfato para formar trehalosa más fosfato inorgánico (Kong *et al.*, 2001; Hottiger *et al.*, 1987). De estas enzimas se conocen genes que la codifican, la masa molecular nativa y las subunidades que la conforman, así como su secuencia de aminoácidos y características cinéticas (Singer & Linquist, 1998; Hohmann *et al.*, 1996; Panek *et al.*, 1987).

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 (Pilon-Smits *et al.*, 1998). Sin embargo, en algunas plantas superiores se han identificado los genes de síntesis de trehalosa, lo que sugiere que tienen la capacidad de acumular este azúcar (Goddijn & Semeekens, 1998).

En la última década se ha trabajado en la introducción de la síntesis de trehalosa en plantas superiores buscando poder aumentar la capacidad de crecimiento bajo condiciones de estrés (Cushman & Bohnert, 2000). Entre estos trabajos se encuentran la obtención de plantas transgénicas de tabaco y arroz que tienen tolerancia al estrés hídrico, salino y osmótico (Garg *et al.*, 2002; Pilon-Smits *et al.*, 1998). Sin embargo, a la fecha no se ha publicado la purificación ni caracterización de las enzimas de la síntesis de trehalosa en plantas.

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 (Abundiz-Bonilla & Tejero-Díez, 1990).

En un trabajo previo, realizamos la purificación de la enzima trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) de *S. lepidophylla*. Como resultado de dicha investigación, estimamos su masa molecular nativa, punto isoeléctrico y el número y peso molecular de las subunidades que la conforman, así como el efecto de algunos azúcares, osmolitos y sales sobre la actividad de la enzima (Márquez-Escalante, 2000).

Con la idea de lograr una caracterización más amplia de la enzima de *S. lepidophylla*, los objetivos de este trabajo fueron purificar a homogeneidad la TPS, demostrar la existencia y establecer un esquema de purificación para las isoenzimas de TPS así como estudiar algunas de sus propiedades bioquímicas que puedan ayudar a entender su relevancia fisiológica.

## ANTECEDENTES

Los organismos pueden adaptarse a ciertas condiciones ambientales como lo son sequía, salinidad o altas temperaturas, modificando la estructura de sus proteínas. Estas alteraciones aumentan la capacidad intrínseca de las macromoléculas para ser estables y funcionales bajo condiciones extremas (Crowe *et al.*, 1998). En otros organismos, la adaptación al estrés se presenta mediante la acumulación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (osmolitos) en el citoplasma. Estos compuestos no son tóxicos con respecto a los procesos metabólicos, porque no alteran a las proteínas, sino por el contrario les permiten mantener su conformación y funcionalidad durante el estrés (Crowe *et al.*, 1998; McCue & Hanson, 1990).

Entre los osmolitos que se acumulan en los organismos se tiene a los azúcares, aminoácidos, polioles y metilaminas. Entre los polioles se encuentran el sorbitol, manitol, arabitol y glicerol; entre los aminoácidos se cuentan la prolina y la glicina betaína; y entre los azúcares están sacarosa y trehalosa (Yancey, *et al.*, 1982). Además, algunos compuestos considerados osmolitos también se consideran osmoprotectores, entre ellos están: el glicerol, la sacarosa y la trehalosa. La trehalosa se ha considerado como el mejor osmoprotector ya que estudios *in vitro* han demostrado que estabiliza la estructura de membranas y proteínas en estado anhidro (Colaço *et al.*, 1992; Carpenter & Crowe, 1989; Crowe & Crowe, 1984).

### Trehalosa

La trehalosa (O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\beta$ 1)- $\alpha$ -D-glucopiranososa) es un dímero de dos moléculas de glucosa unidas a través de sus grupos reductores (Paiva & Panek, 1996). Inicialmente se pensó que la trehalosa solo era un carbohidrato de reserva (Ribeiro *et al.*, 1994), pero actualmente también se ha descrito como un osmoprotector



contra el estrés por metales pesados, anoxia, altas y bajas temperaturas, así como respuesta al choque térmico (Chen *et al.*, 2002; Bonini *et al.*, 1995; Hottiger *et al.*, 1987; Oda *et al.*, 1986). También, se reconoce como osmoprotector contra el estrés osmótico, oxidativo e hídrico (Pereira *et al.*, 2001; Bullifent *et al.*, 2001; Hazell *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1996; Gadd *et al.*, 1987).

### **Mecanismos de Protección**

Se ha propuesto que el mecanismo de protección de la trehalosa es a través de la estabilización de las proteínas y lípidos de las membranas durante períodos de sequía extrema y choque térmico. Existen dos teorías para explicar la estabilización de proteínas en presencia de trehalosa cuando estas se deshidratan, la primera teoría es la del "estado vítrio", la cual dice que las soluciones que contienen trehalosa experimentan una transformación vítria, como resultado se tiene una fase amorfa continua en donde se reduce el movimiento molecular y la degradación de proteínas. La segunda teoría es la de "sustitución de agua", donde los polioles (como trehalosa) pueden reemplazar el agua de hidratación de las macromoléculas formando múltiples puentes de hidrógeno y de esta manera mantener la estructura secundaria de las proteínas (Crowe *et al.*, 1998; Roser & Colaço, 1993).

Estas teorías definen la estabilización de proteínas en ambiente libre de agua (deshidratación) pero no explican totalmente la termoestabilización y termoactivación en soluciones acuosas. Por lo que se sustenta la idea de que la trehalosa estabiliza a las proteínas debido a su influencia sobre su estado de hidratación en solución. De lo anterior, la termoestabilización puede explicarse en términos de la reducción del número de puentes de hidrógeno entre las proteínas y las moléculas de agua en la presencia de polioles. A esta teoría se le llamó "pérdida de la capacidad de formar puentes de hidrógeno" de los medios acuosos (Carninci *et al.*, 1998).

De lo anterior, la trehalosa puede considerarse como un agente que reduce la hidratación de proteínas en solución y disminuye la capacidad de formar puentes de hidrógeno con el agua. Adicionalmente, en estado seco puede ser un agente reemplazante de agua o formar un estado vítrio (Carninci et al., 1998).

Con respecto a las membranas, la trehalosa es uno de los azúcares más eficientes en mantener a los lípidos en fase fluida en ausencia de agua. Al igual que con las proteínas, la trehalosa forma puentes de hidrógeno con las cabezas polares de los lípidos. Esto evita la fusión, la separación de fase, la ruptura y desagregación de las membranas durante la hidratación (Fig. 1), por eso la trehalosa preserva la viabilidad celular (Guo *et al.*, 2000; Crowe *et al.*, 1998; Roser & Colaço, 1993).

### **Presencia en Organismos**

La trehalosa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza desde microorganismos tales como hongos, bacterias y levaduras (Ferreira & Panek, 1993; Boos *et al.*, 1990; Lillie & Pringle, 1980) hasta insectos, nemátodos, crustáceos y plantas de resurrección (Crowe & Crowe, 2000; Paiva & Panek, 1996). En cada uno de estos organismos la trehalosa desempeña una función diferente.

Trehalosa en animales. En insectos, la trehalosa se encuentra en la sangre como fuente de energía (Kato *et al.*, 1996). En invertebrados como el nemátodo *Ditylenchus dipsaci* y el embrión del camarón *Artemia salina*, la acumulación de este azúcar les permite mantenerse en estado deshidratado durante meses y una vez que se encuentran en agua pueden rehidratarse sin sufrir ningún daño (Roser, 1991).

Ciertos organismos primitivos que sintetizan trehalosa sobreviven a la deshidratación extrema por años, aún cuando su agua corporal sea menor al 2% de su peso. Asimismo, tienen la habilidad de reiniciar su actividad biológica cuando entran en contacto con el agua, a este fenómeno se le llama anhidrobiosis. Los organismos

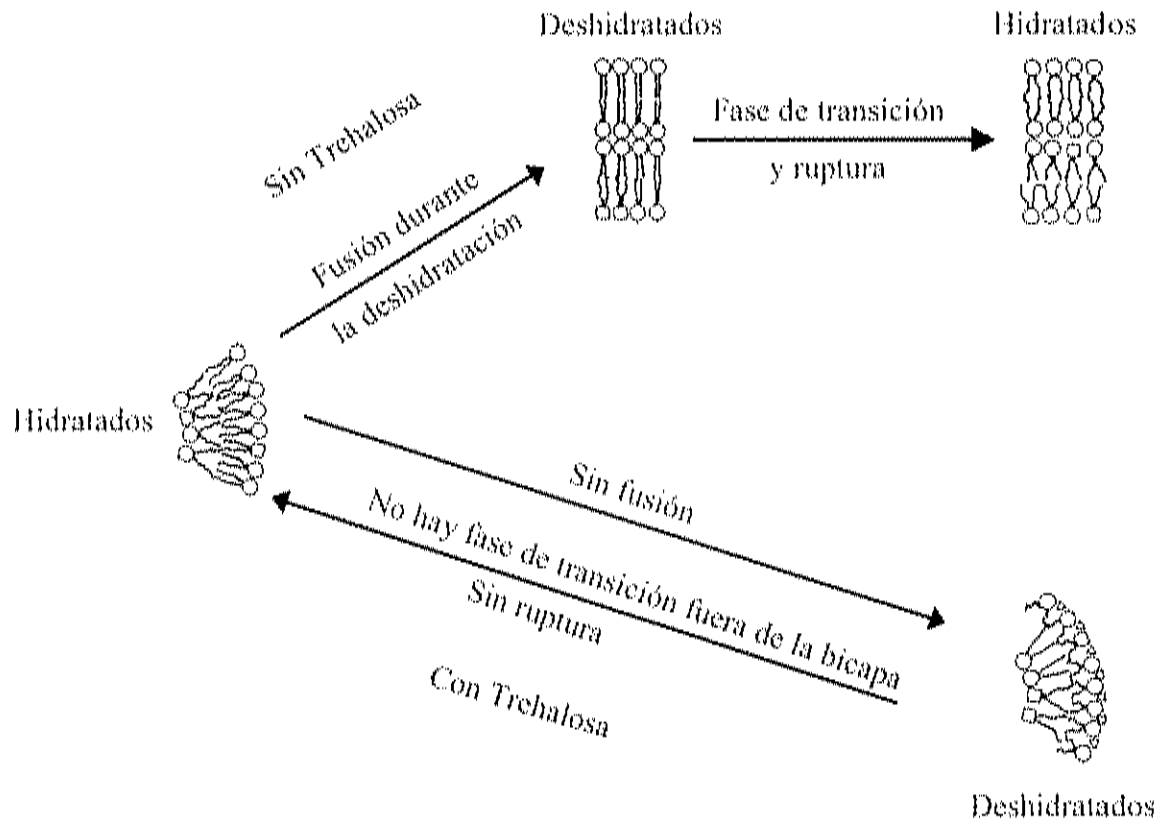


Figura 1. Función de la trehalosa en la protección de las membranas durante la deshidratación e hidratación. La trehalosa (triángulos) se une entre los lípidos en los liposomas evitando la fusión y cambio de fase (Crowe *et al.*, 1998).

anhidrobióticos subsisten a temperaturas extremas, al vacío y a altas dosis de radiación ionizante (Weisburd, 1988).

Los animales superiores no son capaces de sintetizar trehalosa, sin embargo, se han investigado los efectos de la aplicación y síntesis transgénica de este azúcar en células de mamíferos. Ejemplos de estas investigaciones son la evaluación biológica de células de riñón humano y células de ratón expuestas a la deshidratación (Guo, *et al.*, 2000; García de Castro & Tunnacliffe, 2000). Estas células expresaron los genes de las enzimas de síntesis de trehalosa de *Escherichia coli*. Asimismo, se ha evaluado el efecto de la trehalosa en islotes pancreáticos almacenados a bajas temperaturas (Beattie *et al.*, 1997). Los resultados de estos trabajos mostraron que la trehalosa les confiere a las células de mamíferos osmotolerancia y protección contra la deshidratación y el congelamiento.

Trehalosa en plantas. Las plantas superiores como *Carex brumescens* (Lippmann, 1912), *Botrychium lunaria* (Kandler & Senser, 1965), *Fagus silvatica* (Oesch & Maier, 1967), *Ophioglossum vulgatum* (Löhr, 1968), *Sporobolus stapfianus* (Albini *et al.*, 1994), *Solanum flabellifolia* (Roessner *et al.*, 2000) y frutos maduros de *Apiceae*, acumulan trehalosa (Drennan *et al.*, 1993). No obstante, muchos de estos estudios son discutibles debido a los métodos de detección y a la posible contaminación con trehalosa proveniente de la interacción con microorganismos o insectos (Müller *et al.*, 2001).

En varias plantas superiores se ha demostrado la presencia de genes de las enzimas para sintetizar trehalosa, sin embargo, no se ha detectado su acumulación (Müller *et al.*, 1999). Este fenómeno se ha tratado de explicar en términos de diferencias en la actividad de las enzimas de síntesis *versus* las enzimas de degradación, es decir, se especula que las enzimas de degradación presentan mayor actividad que las de síntesis.

Recientemente en *Arabidopsis thaliana* se ha logrado cuantificar pequeñas cantidades de trehalosa mediante la inhibición de trehalasa, la enzima que degrada a la trehalosa (Müller *et al.*, 1999). De igual forma, en plantas transgénicas de tabaco y arroz

se ha encontrado acumulación de trehalosa al inhibir dicha enzima (Goddijn *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1997). La expresión de trehalasa en plantas superiores se realiza constitutivamente, por lo que una alta actividad de esta enzima podría explicar la ausencia de trehalosa (Müller *et al.*, 1995). Por todo esto, se ha propuesto que la síntesis de trehalosa puede llevarse a cabo en las plantas superiores (Müller *et al.*, 1999).

No obstante, la trehalosa se acumula en grandes cantidades en algunas plantas inferiores, como las llamadas plantas de resurrección (Adams *et al.*, 1990). Estas plantas son tolerantes a la deshidratación extrema y tienen como característica iniciar nuevamente sus funciones biológicas al ser hidratadas (Platt *et al.*, 1993). Las plantas de resurrección que acumulan trehalosa son *Myrothamnus flabellifolius*, *Tortula ruralis* y *Selaginella lepidophylla*, donde el género *Selaginella* produce al menos tres veces más trehalosa que *Myrothamnus* (Drennan *et al.*, 1993).

Trehalosa en microorganismos. Las bacterias *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, *Pimelobacter* y *Neurospora crassa* acumulan trehalosa durante el estrés por calor. La trehalosa acumulada en estas bacterias es importante para evitar la acción hidrolítica de las proteínas cuando se incrementa la temperatura (Kato *et al.*, 1996; Nakada *et al.*, 1996; Nishimoto *et al.*, 1996a; Bonini *et al.*, 1995). En los géneros *Micobacteria* y *Corinebacteria*, la trehalosa es un componente estructural de la pared celular en forma de diferentes tipos de uniones con los glicolípidos, que a su vez se unen a los peptidoglicanos de la pared celular (Pan & Elbein, 1996).

Por su parte *E. coli* utiliza a la trehalosa de dos formas, como fuente de carbono (Hengge-Aronis *et al.*, 1991) y también la acumula como osmoprotector en respuesta a estrés osmótico (McDougall *et al.*, 1993). En la bacteria *Hansenula polymorpha* la acumulación de trehalosa se relaciona con la adaptación al crecimiento a altas temperaturas (Reinders *et al.*, 1999), mientras que en *Schizosaccharomyces pombe* la acumulación de trehalosa es importante en la tolerancia a altas temperaturas y al choque térmico (Soto *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1997; De Virgilio *et al.*, 1990).

En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha considerado a la trehalosa como una reserva de energía cuando disminuye la disponibilidad de otros carbohidratos, por ejemplo, durante la adaptación a la respiración, esporulación y germinación de esporas (Lillje & Pringle, 1980). En esta levadura la trehalosa juega también un papel importante cuando el crecimiento se ve reducido por el déficit de nitrógeno, fósforo y azufre. Asimismo, se ha encontrado que en esta especie existe una correlación entre la biosíntesis de trehalosa y la resistencia al calor, al frío, al choque térmico y a los estreses hídrico y oxidativo (Pereira *et al.*, 2001; Hazell *et al.*, 1997; De Virgilio *et al.*, 1994; Hottiger *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 1994; Gadd *et al.*, 1987).

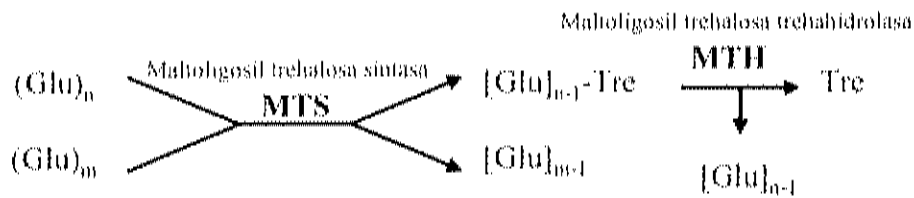
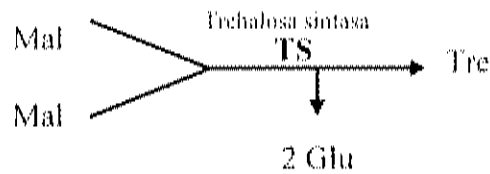
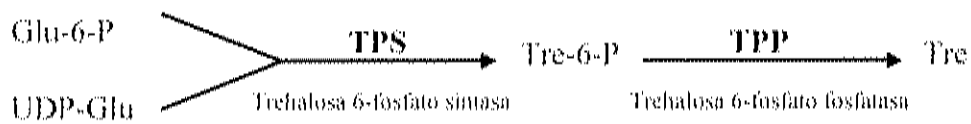
Debido a la importancia fisiológica de la acumulación de trehalosa para algunos microorganismos, se han realizado numerosos estudios sobre las condiciones en las cuales se acumula y el papel que puede tener en el organismo. Esto ha permitido detallar las rutas de biosíntesis de trehalosa en estos microorganismos.

#### Biosíntesis y degradación de trehalosa

Actualmente se han descrito tres rutas de biosíntesis de trehalosa de acuerdo al organismo en estudio. La biosíntesis de trehalosa en *Arrobacter* se lleva a cabo en dos pasos enzimáticos (Fig. 2A). En el primero, la maltooligosil trehalosa sintasa (MTS) realiza una transglicosilación intramolecular de un maltooligosacárido para producir maltooligosil trehalosa. En el segundo paso, la maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (MTH) hidroliza el producto maltooligosil trehalosa a un maltooligosacárido y trehalosa (Nakada, *et al.*, 1995). A su vez, la biosíntesis de trehalosa en *Rhizobia* (Fig. 2B) se lleva a cabo mediante la trehalosa sintasa (TS) que hidroliza a la maltosa en moléculas de glucosa y trehalosa (Streeter & Bhagwat, 1999).

La ruta más conocida se ha descrito tanto en la bacteria *E. coli* como en la levadura *S. cerevisiae* (Fig. 2C). Esta vía se lleva a cabo en dos etapas: en la primera, la trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) cataliza la condensación de UDP-glucosa y glucosa 6-

## Biosíntesis de trehalosa

A) en *Artró bacter*:B) en *Rhizobia*:C) en *E. coli* y *S. cerevisiae*:

## Degradación de trehalosa

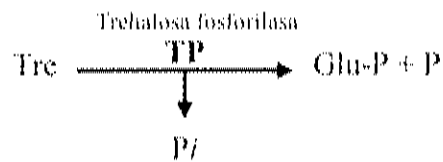
D) en *Euglena gracilis*, *Pichia fermentans* y cianobacterias:E) en *Bacillus popilliae*, plantas, bacterias, levaduras, insectos y mamíferos:

Figura 2. Biosíntesis y degradación de trehalosa. Trehalosa (Tre); glucosa (Glu); maltoligosacaridos [Glu]<sub>x</sub>; maltosa (Mal), ( Müller, 2001).

fosfato, para formar trehalosa 6-fosfato. En la segunda, la trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP) defosforila a la trehalosa 6-fosfato a trehalosa y fosfato inorgánico (De Silva-Udawatta & Cannon, 2001; Kaasen & Ström, 1994; McDougall *et al.*, 1993).

Dependiendo del organismo, hay diferentes enzimas que hidrolizan a la trehalosa. En *Euglena gracilis*, *Pichia fermentans* y cianobacterias (Fig. 2D), la enzima reversible trehalasa fosforilasa (TP) degrada a la trehalosa a moléculas de glucosa 1-fosfato y glucosa (Porchia *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2001). Otras enzimas como la trehalosa hidrolasa (TH) y la trehalasa (T) hidrolizan a la trehalosa a glucosa (Fig. 2E). La trehalosa hidrolasa se encuentra en algunos microorganismos como *Bacillus popilliae* (Porchia *et al.*, 1999). En cambio, la trehalasa se encuentra distribuida en plantas, hongos, bacterias, levaduras, insectos y mamíferos (Aeschbacher *et al.*, 1999; Asano *et al.*, 1996).

En *E. coli*, se encuentran tres trehalasas: la amilotrehalasa (en citoplasma), la cual degrada a la trehalosa libre cuando hay baja osmolaridad; las trehalasas periplasmática y citoplasmática, las cuales actúan cuando aumenta la osmolaridad (Boos *et al.*, 1990; Boos *et al.*, 1987). En *Saccharomyces cerevisiae*, la trehalosa puede ser hidrolizada por tres trehalasas: la trehalasa neutra (actividad máxima a pH 7.0) que se localiza en el citosol, otra llamada Nth2 y la trehalasa ácida (actividad máxima a pH 4.5) las cuales se localizan en la vacuola (Zähringer *et al.*, 1997; Kopp *et al.*, 1993; Londesborough & Varimo, 1984).

#### Complejo trehalosa sintasa/fosfatasa

En *S. cerevisiae*, la biosíntesis de trehalosa se efectúa a través de un complejo de alto peso molecular formado por cuatro proteínas llamado complejo trehalosa sintasa/fosfatasa, que tiene las actividades de trehalosa 6-fosfato sintasa y trehalosa 6-fosfato fosfatasa (Thevelein & Hohmann, 1995). Los genes que codifican para las proteínas del complejo se han clonado y secuenciado estableciéndose que el gene *TPS1*



codifica para una proteína de 56 kDa con actividad de sintasa (Bell *et al.*, 1992). A su vez, el gene *TPS2* codifica para una proteína de 100 kDa con actividad de fosfatasa (De Virgilio *et al.*, 1993) y los genes *TSL1* y *TPS3* codifican para una proteína de 123 kDa con función regulatoria (Bell *et al.*, 1998; Vuorio *et al.*, 1993). La asociación de la proteína de 123 kDa con el complejo trehalosa sintasa/fosfatasa se da bajo ciertas condiciones de crecimiento. La expresión del gene *TPS3* es constante en las fases logarítmica y estacionaria, mientras que el gene *TSL1* disminuye su expresión en esta última fase (Singer & Linnquist, 1998; Reinders *et al.*, 1997).

En *E. coli* el operon *otsBA* se ha secuenciado y codifica para proteínas con actividad de sintasa y fosfatasa (Giæver *et al.*, 1998). El gene *otsB* codifica para una proteína de 29.1 kDa (trehalosa-6-fosfato sintasa) y el gene *otsA* para una proteína de 53 kDa (trehalosa-6-fosfato fosfatasa). La proteína OtsA tiene algunas secuencias similares a las proteínas TPS, TPP y TPS3 (TSL1) de *S. cerevisiae*, mientras que la proteína OtsB sólo a TPP. Sin embargo, a diferencia del complejo trehalosa sintasa/fosfatasa de *S. cerevisiae*, las proteínas OtsA y OtsB no se asocian para sintetizar trehalosa (Kaasen *et al.*, 1994; Mc Dougall *et al.*, 1993).

#### Genes *TPS* y *TPP* en plantas

Recientemente se han identificado en plantas genes homólogos a los genes de la biosíntesis de trehalosa de levadura y *E. coli*. Los genes homólogos de *TPS* y *TPP* se han encontrado en tabaco, arroz (*Oryza sativa*), *Solanium tuberosum*, *Gossypium hirsutum*, *S. lepidophylla* y *A. thaliana* (Müller *et al.*). En *A. thaliana*, se han identificado cuatro genes homólogos de *TPS* y cuatro homólogos de *TPP*. De estos genes, un homólogo de *TPS* (Eastmond *et al.*, 2002; Blázquez *et al.*, 1998) y dos homólogos de *TPP* (Vogel *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 1998) presentan actividad de sintasa y fosfatasa respectivamente. En *S. lepidophylla* el gene *TPSL1* codifica para una proteína con actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa (Zentella *et al.*, 2000).

Actualmente, se ha sugerido que la función de la biosíntesis de trehalosa en plantas puede ser similar a la observada en levaduras y bacterias, donde la trehalosa 6-fosfato podría controlar la actividad de hexocinasas para regular la señal de inducción de glucosa (Peixoto & Panek, 1999). De esta manera, la biosíntesis de trehalosa implicaría la regulación del metabolismo de carbohidratos (Müller *et al.*, 1999). En este sentido, se ha propuesto un modelo en el cual la biosíntesis de trehalosa actúa como un regulador en el llenado de grano y se le relaciona con procesos de desarrollo en órganos de demanda (Fig. 3). De acuerdo a este modelo, la trehalosa 6-fosfato y la trehalosa podrían sintetizarse cuando se presente un exceso de UDP-Glucosa y glucosa 6-fosfato. La trehalosa 6-fosfato podría inhibir a la hexocinasa y reducir de esta forma la entrada de glucosa a la glucólisis si los resultados obtenidos en levaduras son extrapolados a plantas (Müller, 2001).

No obstante la relevancia que tiene la biosíntesis de trehalosa para el crecimiento y desarrollo de las plantas, a la fecha no se han caracterizado las enzimas que constituyen esta ruta. Un modelo conveniente para el estudio de estas enzimas es la planta *S. lepidophylla* porque acumula altas concentraciones de trehalosa durante períodos de sequía extrema (Adams *et al.*, 1990). En base a lo anterior recientemente se realizó un estudio de la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) en esta planta (Márquez-Escalante, 2000).

#### Planta *Selaginella lepidophylla*

La planta *S. lepidophylla* entra en dormancia durante períodos de sequía y revive cuando dispone de agua. Durante períodos de sequía extrema los niveles de trehalosa en las hojas alcanzan hasta un 20% de su peso seco. Además, la trehalosa constituye el 80% de los carbohidratos solubles, por lo que esta planta es uno de los organismos con más alto contenido de trehalosa (Adams, *et al.*, 1990). Esta planta puede ser criopreservada en nitrógeno líquido y al descongelarse revive normalmente, como también sobrevive al

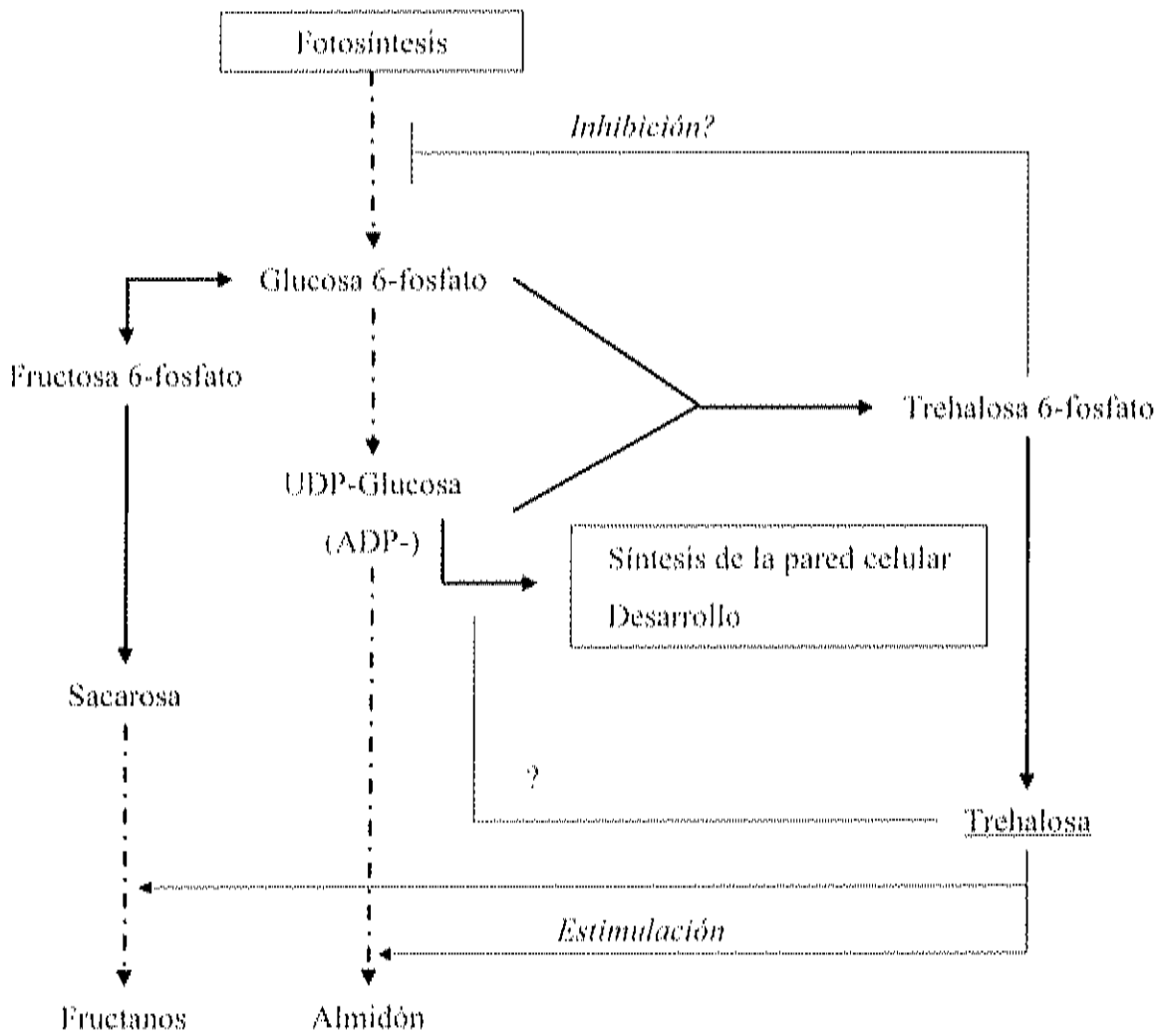


Figura 3. Modelo propuesto para la función de la biosíntesis de trehalosa en plantas (Müller, 2001).

vacío extremo, calor hasta 100°C o altas dosis de radiación ionizante sin sufrir daño (Platt *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 1990; Gadd, *et al.*, 1987).

La planta *S. lepidophylla* forma una roseta (macolla), con raíces sólo en la base, de 1.4 a 1.8 mm de ancho y 1.7 a 2.1 mm de largo. Se encuentra ampliamente distribuida en México (Baja California, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tampico, Zacatecas, Sinaloa, Sonora, Durango, Nayarit, Morelos, Estado de México, Puebla y Oaxaca) y sur de Estados Unidos. Normalmente crece de 1380 a 1840 m de altitud, en afloramientos de roca ígnea expuesta y menos frecuente en taludes de tierra, en forma expuesta o sombreada. La vegetación donde se encuentra es el bosque tropical caducifolio, bosque mixto con enebro e incluso en encinares en la Cuenca del Balsas (Abundiz-Bonilla y Tejero-Diez, 1990).

#### Trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) de la planta *S. lepidophylla*

En un trabajo previo purificamos la trehalosa 6-fosfato sintasa de plantas de *S. lepidophylla* totalmente hidratadas mediante cromatografía de intercambio iónico (Márquez-Escalante, 2000). Se encontró que la enzima tiene una masa molecular nativa de 440 kDa y un punto isoeléctrico de 5.2. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras de la TPS reveló que está conformada por subunidades de 112, 78 y 47 kDa. Zentella *et al.* (1999), encontraron que el gene *TSL1* de *S. lepidophylla* codifica para una proteína de 109 kDa que tiene actividad de TPS. Por lo tanto, relacionando la información sobre la enzima y los datos de biología molecular, concluimos que posiblemente la banda de 112 kDa era la TPS.

En el trabajo antes citado, se estudió el efecto de la presencia y concentración de KCl, NaCl, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y CaCl<sub>2</sub> sobre la actividad de TPS. El KCl tuvo un efecto activador sobre la enzima, mientras que CaCl<sub>2</sub>, NaCl y Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> la inhibieron. También, se estudió el efecto de diferentes osmolitos sobre la actividad de la enzima, encontrando que el sorbitol inhibe a la TPS, mientras que prolina y trehalosa la activaron. Además, se probó

el efecto de glucosa, fructosa y trehalosa sobre la TPS. Se obtuvo que la glucosa y fructosa activaron a la TPS, mientras que la trehalosa la activó ligeramente.

La cromatografía de intercambio iónico empleada para purificar a la TPS de *S. lepidophylla* mostró varios picos de actividad bien definidos que eluyen a diferentes concentraciones de KCl (Fig. 4). Esto muestra que la enzima tiene diferencias en carga eléctrica, este comportamiento cromatográfico sugiere la presencia de isoenzimas (Márquez-Escalante, 2000).

Las isoenzimas son formas múltiples de una enzima que cataliza la misma reacción pero diferentes una de otras en la secuencia de aminoácidos, afinidad por los substratos,  $V_{max}$  y/o propiedades reguladoras (Nelson & Cox, 2000). Las isoenzimas pueden presentarse en una sola especie de organismo e incluso en una sola célula (Lehninger, 1980). La expresión de isoenzimas se como respuesta a diversos factores como lo son: cambios de temperatura, agentes infecciosos, daño mecánico y tratamiento con hormonas (Steele & Fry, 2000; Botha *et al.*, 1992).

En general se ha propuesto que las isoenzimas se expresan como respuesta de adaptación de los organismos o células al medio ambiente y para proteger su biofuncionalidad (Steele & Fry, 2000). En base a la información expuesta, planteamos la siguiente hipótesis; la enzima trehalosa 6-fosfato sintasa se encuentra en *S. lepidophylla* en diferentes formas, las cuales pueden explicar la capacidad que tiene esta planta de sobrevivir a las condiciones extremas bajo las cuales crece en la naturaleza. Para comprobar esta hipótesis propusimos como objetivo general purificar a homogeneidad a la trehalosa 6-fosfato sintasa y demostrar la existencia de isoenzimas mediante técnicas cromatográficas y electrofóreticas.

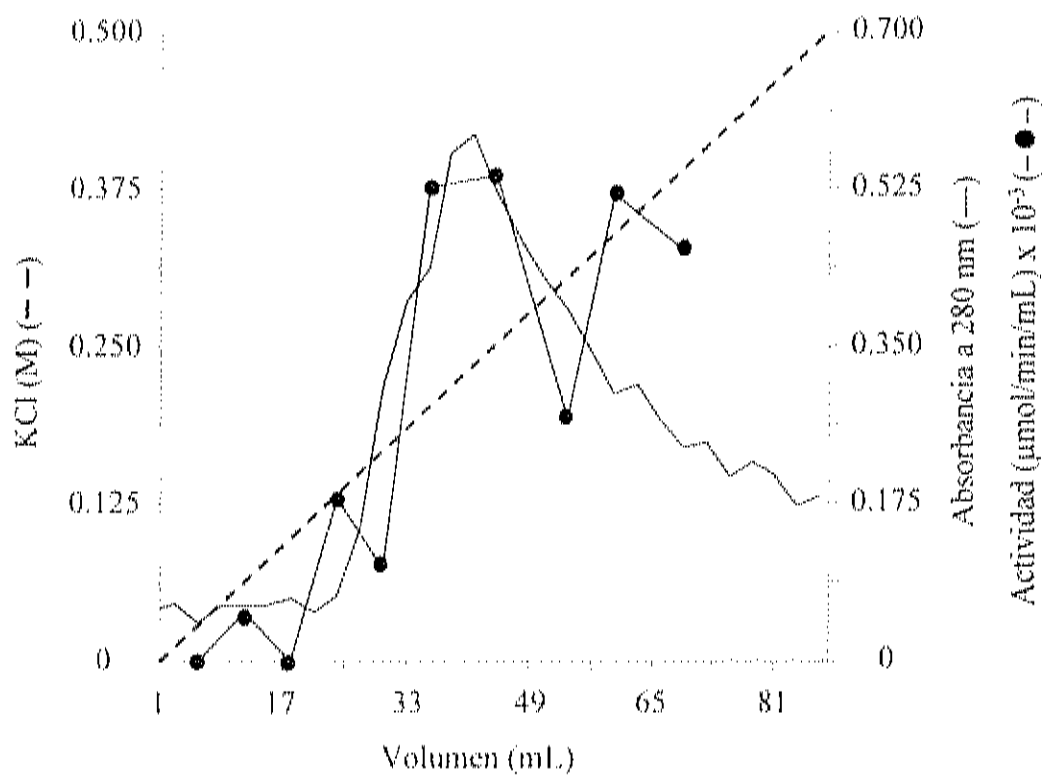


Figura 4. Cromatograma de intercambio iónico representativo de la purificación de TPS de *S. lepidophylla*. Absorbancia a 280 nm (—); actividad de TPS (-●-); gradiente de KCl (---), (Márquez-Escalante, 2000).

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

Se utilizaron reactivos de grado analítico de Merck (R.F. Germany), J.T. Baker (división Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., Edo. de México, México) y Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo, USA). Las enzimas y sustratos empleados se adquirieron de esta última compañía. Los geles nativos y de punto isoelectrico al igual que los marcadores nativos de masa molecular, se compraron de Amersham Bioscience (Uppsala, Suecia). Los marcadores preteñidos para SDS-PAGE se obtuvieron de BIO-RAD (Richmond, Ca. USA).

### Materia prima

Se utilizaron plantas de *Selaginella lepidophylla* procedentes de los estados de Morelos y México. Las plantas de *S. lepidophylla* se hidrataron por 24 h y se seleccionaron 100 g de hojas con el mejor estado de hidratación.

### Extracción y purificación de isoenzimas de trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) de

#### *S. lepidophylla*

Las hojas se homogenizaron en 200 mL de buffer trizma-base 0.1 M, pH 8.0, el cual contenía EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, PMSF 1 mM, β- mercaptoetanol 2 mM y 80 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas como son: AEBSF, bestatina, pepstatina A, E-64, leupeptina y 1,10-fenantrolina (Sigma) (buffer A).

El homogenizado se filtró a través de 6 capas de gasa y se centrifugó a  $39,200 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 1 h. La fracción sobrenadante se saturó al 35% con sulfato de amonio y se centrifugó a  $39,200 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 min. El sobrenadante obtenido se saturó al 75% con sulfato de amonio y se centrifugó bajo las mismas condiciones. El precipitado resultante se resuspendió en buffer trizma-base 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, PMSF 1 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM (buffer B). La muestra resuspendida se desaló mediante cromatografía de filtración en gel en una columna con Sefadex G-75, la cual se equilibró y eluyó con buffer B.

El eluato se aplicó a una columna con 10 mL de la matriz *Novarosa* DPA, que consiste en agarosa la cual tiene unida en forma covalente el quelante picolil amino (DPA) que es el soporte del metal Ni, el cual interacciona con las histidinas de las proteínas. A esta técnica se le denomina cromatografía por afinidad con ión metálico inmovilizado (IMAC). La columna con *Novarose* DPA-Ni fue equilibrada con buffer trizma-base 10 mM (pH 8.0), que incluía KCl 0.5 M,  $\text{MgCl}_2$  50 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, acetato de sodio 500 mM y glicerol al 10% (buffer C). Posteriormente, la columna se lavó con buffer C y consecutivamente la enzima se eluyó con el buffer C más Imidazol 5 mM.

A las fracciones colectadas se les midió absorbancia a 280 nm y actividad de TPS. Las fracciones con actividad enzimática se unieron, desalaron y concentraron por centrifugación a  $3020 \times g$  hasta el 20% su volumen original. La muestra concentrada del paso anterior se aplicó a una columna de intercambio iónico de Q-Sefarosa de flujo rápido (2 mL de cama) equilibrada con buffer B. Posteriormente, la columna se lavó con el mismo buffer B adicionado con 0.05 M de KCl y subsecuentemente, las isoformas de TPS se eluyeron con un gradiente de 0.05 a 1 M de KCl en buffer B.

De nuevo, a las fracciones colectadas se les determinó absorbancia a 280 nm y actividad de TPS. Las fracciones con actividad de TPS se agruparon de acuerdo a la concentración de KCl a la cual eluyeron. Finalmente, a las muestras obtenidas se les agregó glicerol al 15%, almacenándose a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.



### Ensayo de actividad

El ensayo de actividad de TPS cuantifica la cantidad de UDP formado mediante dos reacciones acopladas. En la primera reacción, la mezcla contenía HEPES-KOH 50 mM (pH 7.1), UDP-glucosa 5 mM, glucosa-6-fosfato 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 12.5 mM y 50 µL de muestra a un volumen final de 0.4 mL. Se incubó a 37°C por 30 min y la reacción se detuvo incubando la mezcla a 100°C, en baño de agua, por 5 min. Las muestras se enfriaron durante 10 min a 4°C y se centrifugaron a 1500 x g por 10 seg (Hottiger *et al.*, 1997).

En la segunda, el UDP formado se acopla a la reacción de la piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa. 200 µL de la mezcla anterior se llevaron a un volumen final de 0.5 mL que contenía buffer HEPES-KOH 0.14 M (pH 7.6), fosfoenol piruvato 2 mM, NADH 0.3 mM, láctico deshidrogenasa (5 U), piruvato cinasa (5 U). Se midió la oxidación de NADH por la disminución en el coeficiente de extinción a 340 nm. El ensayo fue de 3 min a temperatura ambiente (Hottiger *et al.*, 1997).

### Análisis electroforético

#### **Electroforesis en Condiciones Nativas (PAGE) y en Condiciones Desnaturalizantes y Reductoras (SDS-PAGE)**

La pureza de la enzima se corroboró por electroforesis en geles al 6% y de gradiente 4-15% de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE). Mientras que el número y masa molecular de las subunidades se determinó por electroforesis en gel en gradiente de 4-15% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), ambas electroforesis de acuerdo a Laemmli (1970).

Los geles en gradiente de 4-15% de poliacrilamida se corrieron en un equipo PhastSystem (técnica No. 130, Pharmacia LKB) y las bandas se detectaron con plata de acuerdo a las condiciones del fabricante (técnica No. 210, Manual de PhastSystem ). En tanto los geles al 6% de poliacrilamida se corrieron en un dispositivo Mini-PROTEIN II Cell (BIO-RAD) y las bandas se tiñeron con plata de acuerdo a Wray (1981).

Los marcadores de peso molecular nativo utilizados fueron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), lactato deshidrogenasa (140 kDa) y albumina (66 kDa) (Amersham Bioscience). Se utilizaron marcadores preteñidos para SDS-PAGE los cuales fueron una mezcla de proteínas recombinantes de alta pureza (BIO-RAD) cuyos masas fueron: 250, 150, 100, 37, 75, 50, 25, 15 y 10 kDa.

### **Isoelectroenfoque (IEF)**

El punto isoeléctrico se determinó por isoelectroenfoque (IEF) en geles de poliacrilamida con un intervalo de pH de 3 a 9 y de 4 a 6.5. Estos geles también se corrieron en un equipo PhastSystem siguiendo la técnica No. 100 y las bandas se detectaron con plata de acuerdo a las condiciones del fabricante.

Los marcadores de punto isoeléctrico de intervalo amplio (pH 3-9) fueron: amilogucosidasa (pI 3.5), rojo de metilo (pI 3.75), inhibidor de tripsina de soya (pI 4.55),  $\beta$ -lactoglobulina A (pI 5.2), anhidrasa carbónica B de bovino (pI 5.85), anhidrasa carbónica B de humano (pI 6.55), mioglobulina ácida de caballo (pI 5.85), mioglobulina básica de caballo (pI 7.35), lectina ácida de lenteja (pI 8.15), lectina media de lenteja (pI 8.45), lectina básica de lenteja (pI 8.65) y tripsinógeno (pI 9.3) (Amersham Bioscience).

A su vez, los marcadores de punto isoeléctrico de intervalo corto (pH 4-6.5) fueron: pepsinógeno (pI 2.8), amilogucosidada (pI 3.5), rojo de metilo (pI 3.75), manitol (pI 4.15), inhibidor de tripsina de soya (pI 4.55),  $\beta$ -lactoglobulina A (pI 5.2), anhidrasa carbónica B de bovino (pI 5.85) y anhidrasa carbónica B de humano (pI 6.55) (Amersham Bioscience).

### **Electroforesis en Dos Dimensiones (2D)**

El número y masa molecular de las subunidades, así como el punto isoeléctrico de las isoenzimas se estimaron por electroforesis en dos dimensiones, separándolas primero por peso molecular nativo y posteriormente por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) e isoelectroenfoque (IEF).

Para la corrida en la primera dimensión se empleó enzima eluida de la columna de DPA-Ni, las proteínas se separaron por PAGE en gel al 4% de poliacrilamida (Laemmli, 1970) utilizando un equipo Mini-PROTEIN II Cell (BIO-RAD). Para la segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), las bandas se tñieron con solución de Coomassie Blue R 0.1%, metanol 50% y ácido acético 20%.

Cada una de las bandas obtenidas se cortaron y se realizó la extracción de las proteínas modificando la técnica descrita por Matsudaira (1993). A continuación se describe brevemente la técnica. Paso 1) las bandas del gel se cortaron y colocaron en tubos Eppendorf los cuales contenían 1 mL de Tris 50 mM, pH 9.0, SDS 2% y triton-100X al 1%; 2) los tubos se centrifugaron a 11900 x g a 4°C por 10 min; y 3) los geles se retiraron de la solución y nuevamente se centrifugaron a 11900 x g a 4°C por 3 min para remover el material insoluble.

Los sobrenadantes obtenidos en el paso anterior se concentraron a 11900 x g a 4°C hasta un volumen final de 250  $\mu$ L. Posteriormente, las muestras para electroforesis se prepararon añadiendo buffer muestra 5X SDS (trizma base 0.4 M, glicerol 25%, SDS 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 50% y azul de bromofenol 5%). Finalmente, el SDS-PAGE se corrió en las condiciones ya descritas.

Para la segunda dimensión con IEF el gel nativo se tiñó con cobre (Manual de instrucciones de BIO-RAD, No. 161-0470) y la separación de las enzimas se realizó siguiendo el procedimiento de Matsudaira descrito anteriormente, sólo que ahora se sustituyó el SDS al 2% por acetonitrilo al 20%. Las condiciones de corrida del gel y marcadores de punto isoeléctrico fueron los descritos con anterioridad.

#### Determinación de masa molecular nativa

La masa molecular nativa de las isoenzimas se determinó por cromatografía líquida de baja presión (FPLC) en una columna de exclusión molecular Superdex 200 HR (Amersham Bioscience). La columna se equilibró y eluyó con buffer B, aplicándole 500  $\mu$ L de muestra a un flujo de 0.3 mL/min. Las proteínas para calibración de la columna fueron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa) y aldolasa (158 kDa), las cuales se adquirieron en Amersham Bioscience.

#### Cuantificación de proteína

La concentración de proteína en cada etapa de purificación se cuantificó por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

#### Efecto del pH y temperatura

Para determinar el efecto del pH y temperatura sobre las isoenzimas se emplearon las muestra obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico, las cuales se desalaron a través de diálisis contra buffer B durante 12 h en membranas de 12-14 kDa de poro. En algunos casos las muestras se desalaron por centrifugación (3,020 x g) en centricones con membrana de 10 kDa.

El pH óptimo de las isoenzimas se analizó en un intervalo de pH de 5 a 11. La actividad enzimática se midió a diferentes pHs, para realizar esto es en la primera parte del ensayo de actividad, descrito anteriormente, se utilizaron los buffers: MES 50 mM (pH 5-6.5); HEPES-KOH 50 mM (pH 7-8.5); y Glicina-KOH 50 mM (pH 9-11).

La estabilidad de las isoenzimas al pH también se realizó en el mismo intervalo de pH. Las isoenzimas se incubaron a una fuerza iónica de 100 mM de buffer a los pH antes mencionados durante 1 h (en ausencia de sustratos), inmediatamente después se efectuó el ensayo de actividad descrito con anterioridad. Ambos tratamientos se hicieron a condiciones saturantes de sustrato y a temperatura ambiente.

La temperatura óptima y la estabilidad de las isoenzimas a la temperatura se determinó a 25°, 30°, 37°, 42°, 45°, 50°, 55° y 60°C. Para la temperatura óptima se modificó la temperatura de incubación en la primera parte del ensayo antes descrito. En cuanto a la estabilidad a la temperatura, las isoenzimas en ausencia de buffer de incubación y de sustratos se incubaron a las diferentes temperaturas durante 1 h para posteriormente hacer el ensayo de actividad.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Purificación de TPS

La enzima trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) se purificó a partir de plantas de *S. lepidophylla* completamente hidratadas, mediante un solo paso de purificación, utilizando cromatografía de afinidad con ión metálico inmovilizado (IMAC). Las histidinas expuestas constituyentes de la TPS, interaccionan con el ión níquel (Ni), que está inmovilizado en una matriz de agarosa con un brazo del quelante picolil amino (DPA) (Porath *et al.*, 1983).

El cromatograma de una purificación típica se muestra en la figura 5, en donde la enzima eluye a una concentración de 5 mM de imidazol (fracción B) y representó el 0.2 % de proteína y un 75% de la actividad aplicada a la columna. Con este paso cromatográfico se logró obtener una actividad total de 2.12 U y una actividad específica de 3.36 U/mg de proteína, la cual representó una recuperación del 42% y 196 veces de purificación (Tabla I).

Con este esquema de purificación se logró recuperar una mayor actividad total y específica de la TPS con respecto a los trabajos en levaduras. Por ejemplo Vandercammen *et al.* (1989), encontraron para la TPS de levadura de pan, valores de 0.8 U de actividad total y 1.1 U/mg de proteína de actividad específica. Londesborough *et al.* (1991), encontraron para la TPS de levadura de cerveza, 0.11 U de actividad total y actividad específica de 1.72 U/mg de proteína.

En cambio, en la purificación de TPS del hongo *D. Discoldeum*, Killick (1979) obtuvo valores más altos de actividad total (7.1 U) y actividad específica (6.1 U/mg de proteína) que los nuestros. Sin embargo, en todos los estudios publicados a la fecha, se requirió de un mayor número de pasos de purificación. Por esto la metodología diseñada en este trabajo para la purificación de la TPS de *S. lepidophylla*, es más sencilla.

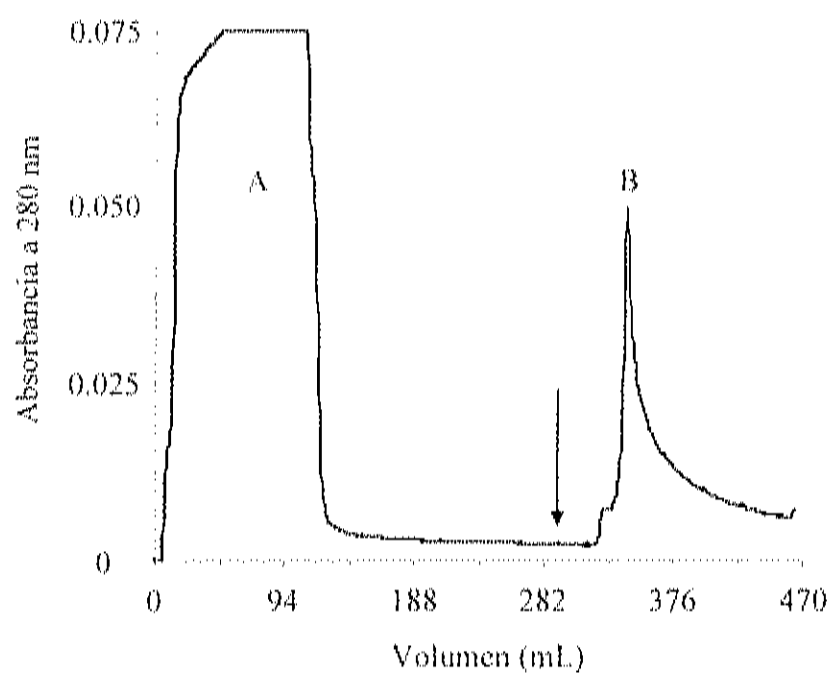


Figura 5. Cromatograma de afinidad con ión metálico inmovilizado (IMAC, DPA-Ni) del extracto crudo de *S. lepidophylla*. Fracción A.- proteína no enlazada a la columna; fracción B.- proteína con actividad de TPS. La flecha señala el punto de aplicación de buffer C más 5 mM de imidazol.

Tabla 1. Purificación de TPS de plantas de *Selaginella lepidophylla* totalmente hidratadas.

Pasos de Purificación	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U) <sup>1</sup>	Actividad Específica (U/mg de proteína)	Purificación (veces)	Recuperación (%)
Extracción crudo <sup>2</sup>	294.21	5.06	0.0171	1.0	100
Desalado (Sefadex G75)	59.77	2.83	0.0473	2.7	56
DPA-Ni (5mM de Imidazol )	0.63	2.12	3.3650	196.8	42

<sup>1</sup>U es la cantidad de enzima requerida para la conversión de 1  $\mu$ mol de NADH/NAD/min.

<sup>2</sup>A partir de 100 g de hoja de plantas de *S. lepidophylla* totalmente hidratadas.



La electroforesis nativa de la enzima obtenida de la columna de DPA-Ni mostró tres bandas de proteína de aproximadamente 660, 440, y 200 kDa, en donde la banda de 440 kDa parece ser un doblete (Fig. 6). Al analizar esta muestra por isoelectroenfoque en un gel de pH amplio de 3-9, se obtuvo una banda gruesa alrededor de pH 5. Por lo que repetimos el isoelectroenfoque empleando ahora un gel de intervalo de pH 4-6.5 para definir mejor el pH de dicha banda. Este gel mostró tres bandas de proteína a pHs de 4.83, 4.69 y 4.55 (Fig. 7).

El análisis de esta muestra por electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras, mostró varias bandas con pesos moleculares de 115, 61, 49 y 42 kDa (Fig. 8). Este resultado varía ligeramente en el número y masa molecular de las bandas con respecto al estudio anterior (Márquez-Escalante, 2000). Estas diferencias se deben en parte a las modificaciones en las condiciones de corrida de los geles, al porcentaje de poliacrilamida y al tipo de geles utilizados, lo que permitió una mayor definición de las bandas.

Estos datos en conjunto sugieren que la enzima está formando agregados de TPS o bien la presencia de otras proteínas. Adicionalmente, sabemos que la banda de 440 kDa presenta actividad de TPS comprobada por la realización de un zimograma (dato mostrado en antecedentes). Por esto se llevó a cabo un análisis electrofóretico en dos dimensiones para verificar si todas las proteínas están relacionadas con la TPS.

#### Análisis electrofóretico en dos dimensiones

En la primera dimensión, se realizó una corrida electrofóretica bajo condiciones nativas de la enzima obtenida de DPA-Ni, la cual mostró tres bandas de 660, 440 y 200 kDa (Fig. 9). Cada una de las bandas se cortó y separó del gel de poliacrilamida mediante el procedimiento descrito en materiales y métodos. Las proteínas eluidas de estas bandas fueron analizadas en una segunda electroforesis bajo condiciones: desnaturizantes y reductoras; y por isoelectroenfoque.

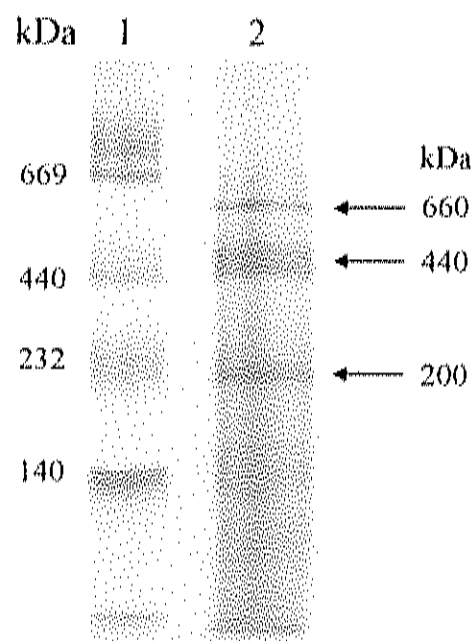


Figura 6. Electroforesis nativa de la TPS obtenida por IMAC. PhastGel en gradiente de 4-15% de poliacrilamida teñido con plata; línea 1) marcadores de masa molecular; línea 2) TPS.

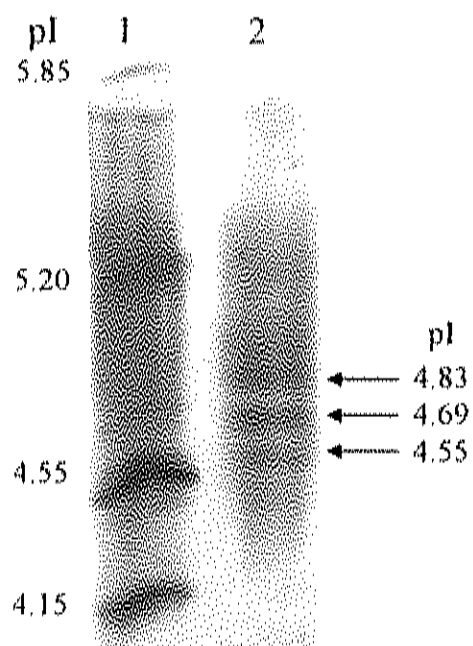


Figura 7. Isoelectroenfoque de la TPS obtenida por IMAC. PhastGel de pH 4-6.5 teñido con plata; línea 1) marcadores de punto isoelectrónico; línea 2) TPS.

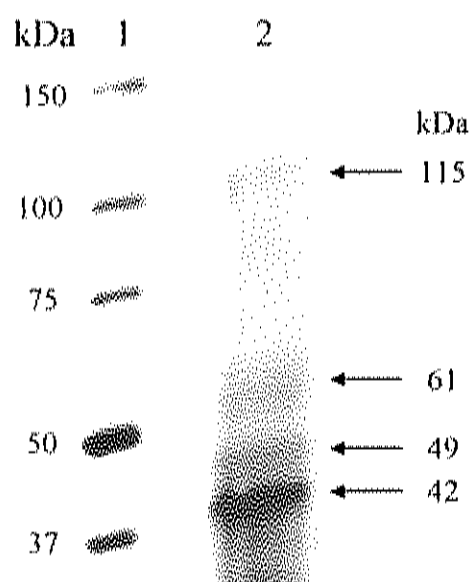


Figura 8. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras de la TPS obtenida por IMAC. PhastGel en gradiente de 4-15% de poliacrilamida teñido con plata; línea 1) marcadores de masa molecular; línea 2) TPS.

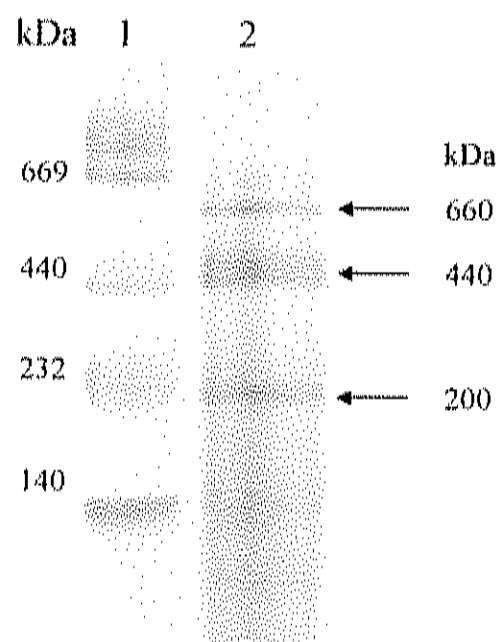


Figura 9. Primera dimensión, electroforesis nativa de la TPS obtenida por IMAC. Gel al 4% de poliacrilamida teñido con Coomassie; línea 1) marcadores de masa molecular; línea 2) TPS.

En la segunda dimensión con SDS-PAGE de las proteínas eluidas de las bandas de 660, 440 y 200 kDa se obtuvo en los tres casos un patrón con subunidades de 115, 67 y 50 kDa (Fig. 10). Sólo la proteína eluida a 200 kDa presentó una banda adicional de 37 kDa, la cual posiblemente sea producto de degradación, ya que existen reportes de que la TPS de levaduras es muy susceptible a autodegradación (Londesborough *et al.*, 1991). En base a estos resultados podemos afirmar que las tres bandas encontradas bajo condiciones nativas están relacionadas con la actividad de TPS.

De acuerdo a los resultados, la posible relación estequiométrica para la TPS de 660 kDa, sería de: a) tres subunidades de 115 kDa, tres de 67 kDa y dos de 50 kDa formando un complejo de 8 subunidades; b) otra posibilidad sería de tres subunidades de 115 kDa, tres de 67 kDa y una subunidad de 50 kDa, dándonos como resultado un complejo de 7 subunidades. Por otro lado, para la enzima de 440 kDa estaría conformada por: a) dos subunidades de 115, 67 y 50 kDa, constituyendo un complejo de 6 subunidades; o bien b) dos subunidades de 115 kDa, dos de 67 kDa, y una de 50 kDa, formando complejos de 5 subunidades. Finalmente, la proteína de 200 kDa consistiría de una subunidad de 115, 67 y 50 kDa (Tabla 2).

En la segunda dimensión con isoelectroenfoque de las proteínas eluidas de las bandas de 440 y 200 kDa, se observó una banda de pI 4.55 para la proteína de 200 kDa y dos bandas de pI 4.69 y 4.55 para la proteína de 440 kDa (Fig. 11). Por lo tanto, se confirma que las dos bandas (440 y 200 kDa) están relacionadas a la actividad de TPS. Los valores de punto isoelectrico encontrados para la TPS de *S. lepidophylla* son ácidos al igual que los de otras enzimas que sintetizan trehalosa tales como: MTS de *Arthrobacter* sp. Q36 (Nakada *et al.*, 1995) con pI de 4.1; TS de *Pimelobacter* sp. R48 (Nishimoto *et al.*, 1996a) y *Thermus Aquaticus* (Nishimoto *et al.*, 1996b), ambas con pI de 4.6.

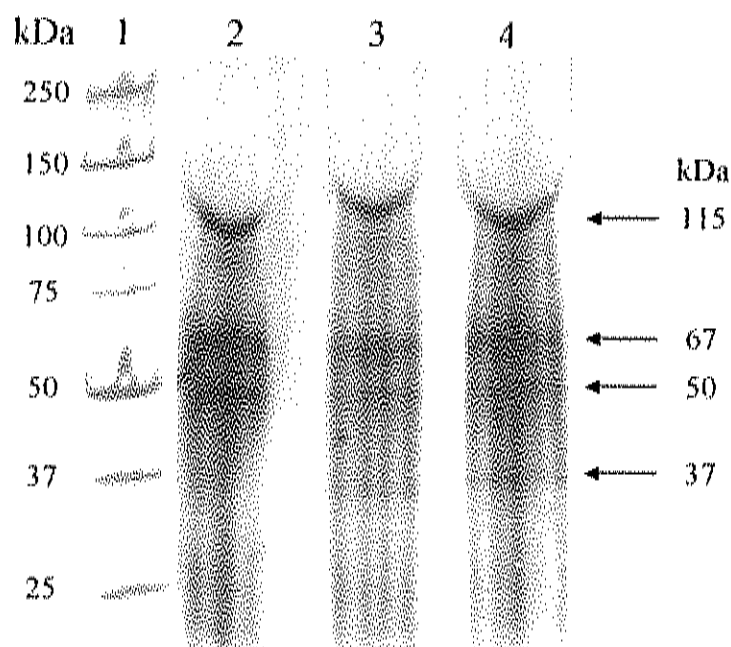


Figura 10. Segunda dimensión, electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras de las bandas del gel nativo de la primera dimensión. PhastGel en gradiente 4-15% de poliacrilamida teñido con plata; línea 1) marcadores de masa molecular; línea 2) banda de 660 kDa; línea 3) banda de 440 kDa; línea 4) banda de 200 kDa.

Tabla 2. Posibles relaciones estequiométricas de los complejos de TPS de *S. lepidophylla*.

	Subunidades de			Masa Molecular Total (kDa)	No. total de subunidades
	115 kDa	67 kDa	50 kDa		
TPS de 660 kDa					
modelo					
a	3	3	2	646	8
b	3	3	1	596	7
TPS de 440 kDa					
modelo					
a	2	2	2	464	6
b	2	2	1	414	5
TPS de 200 kDa					
	1	1	1	232	3



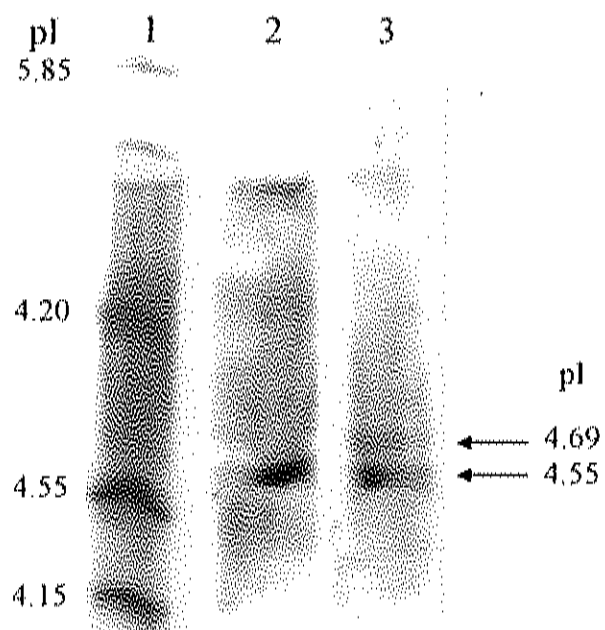


Figura 11. Isoelectroenfoco de las bandas del gel nativo de la primera dimensión. PhastGel de pH 4-6.5 teñido con plata; línea 1) marcadores de pinto isoelectrónico; línea 2) banda de 200 kDa; línea 3) banda de 440 kDa.

Con base a los resultados de la electroforesis en dos dimensiones, establecimos que las tres proteínas eluidas de la columna de DPA-Ni tienen correlación con la actividad de TPS. Por esto, llevamos a cabo una cromatografía de intercambio iónico para aislar a las proteínas por diferencia en carga y una cromatografía de exclusión molecular, para separarlas y determinar sus pesos moleculares.

#### Cromatografía de intercambio iónico

La enzima obtenida de la columna de DPA-Ni se sometió a una cromatografía de intercambio iónico (Q-Sefarosa de flujo rápido) y se eluyó con un gradiente de KCl de 0.05-1 M. Se detectaron tres picos de actividad de TPS a concentraciones de sal de 0.35, 0.7 y 1 M (Fig. 12). Las fracciones de cada pico de actividad se unieron y se les denominó fracción de 0.35 M de KCl, fracción de 0.7 M de KCl y fracción de 1 M de KCl.

Como se muestra en la tabla 3, la fracción de 0.35 M de KCl tuvo una actividad total de 0.2 U y una actividad específica de 1.25 U/mg de proteína, la cual representó una recuperación del 3.1 % y 86 veces de purificación. Para la fracción de 0.7 M de KCl la actividad total fue de 0.18 U y una actividad específica de 3 U/mg de proteína, con una recuperación del 2.8 % y 208 veces de purificación. Por último, la fracción de 1 M de KCl tuvo una actividad total de 0.22 U y una actividad específica de 11 U/mg de proteína, la recuperación fue de 3.4 % y se purificó 763 veces. Estos datos demuestran que la TPS tiene diferentes estados de protonación, ya que la enzima se separa de la columna a distintas concentraciones de KCl, por lo tanto se tienen al menos tres isoenzimas de TPS.

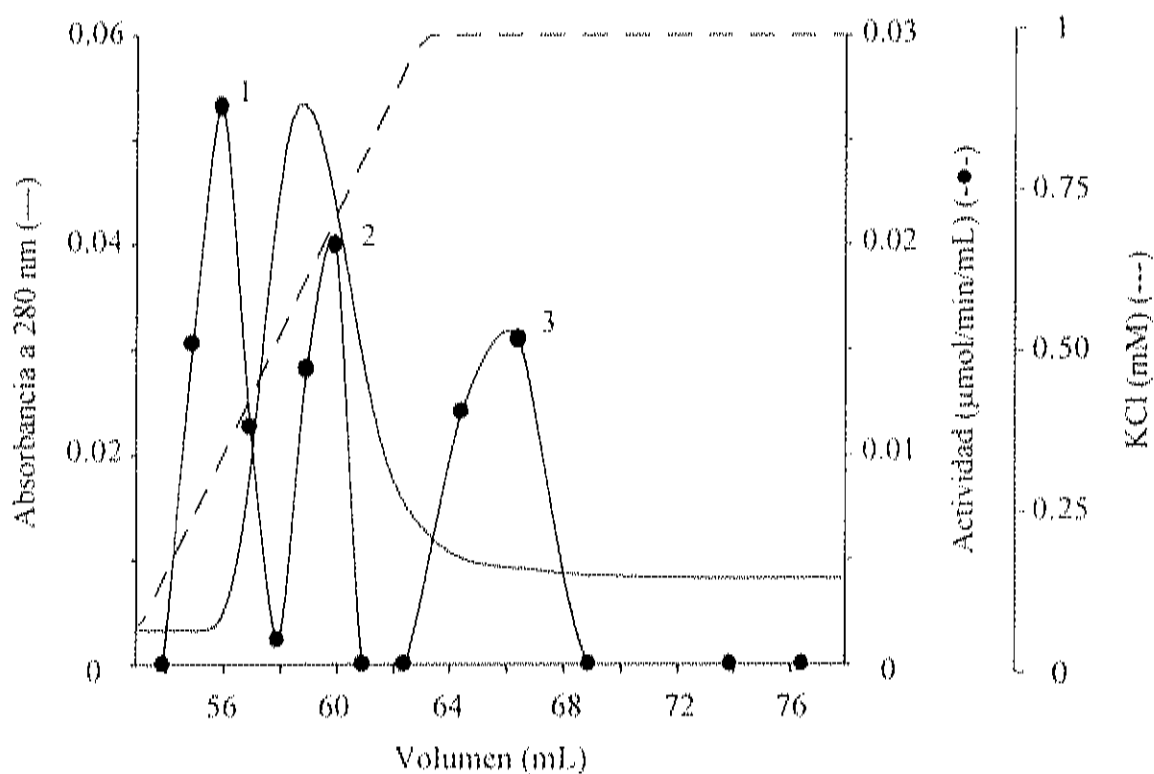


Figura 12. Cromatograma de intercambio iónico de la TPS obtenida por IMAC. Absorbancia a 280 nm (—); gradiente de KCl (- - -); actividad de TPS (-●-); fracción 1) TPS eluida a 0.35 M de KCl; fracción 2) TPS eluida a 0.7 M de KCl; fracción 3) TPS eluida a 1 M de KCl.

Tabla 3. Separación de isoenzimas de TPS de plantas de *Selaginella lepidophylla* totalmente hidratadas.

Q-Sefarosa de flujo rápido (gradiente de KCl)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U) <sup>1</sup>	Actividad Específica (U/mg de proteína)	Purificación (veces)	Recuperación (%)
0.35 M	0.16	0.20	1.25	86.8	3.1
0.70 M	0.06	0.18	3	208.3	2.8
1.00 M	0.02	0.22	11	763.9	3.4

<sup>1</sup>U es la cantidad de enzima requerida para la conversión de 1  $\mu$ mol de NADH/NAD/min.

La electroforesis nativa de las tres fracciones con actividad de TPS obtenidos de intercambio iónico, se muestra en la figura 13. En la línea 2 (0.35 M de KCl) se observó una banda de 440 kDa, mientras que en las líneas 3 y 4 (0.7 M y 1 M de KCl) se obtuvieron nuevamente bandas de 660, 440 y 200 kDa. Estos datos prueban que existen formas diferentes de la enzima y que se asocian en complejos de diferente peso molecular.

La separación de la TPS a diferentes concentraciones de KCl coincide con lo encontrado por Londesborough *et al.*, (1993). De acuerdo a ese estudio la TPS de levadura de pan, eluye de una columna de UDP-glucuronato-agarosa a 0.2 M y 0.4 M de NaCl. Por otra parte de acuerdo a Bell *et al.* (1992), así como a Vandercammen *et al.* (1989), la TPS de *S. cerevisiae* se encuentra formando parte de un complejo enzimático de alto peso molecular.

Este es el primer trabajo donde se demuestra la existencia y separación de isoenzimas de TPS. Adicionalmente, existen publicaciones como la de Londesborough *et al.*, (1993) mencionada en el párrafo anterior y en la cual obtienen dos formas de TPS con diferente estado de protonación. Así también Killick (1979), encontró que la TPS de *D. discoideum* presenta una cinética bimodal que puede deberse a la presencia de múltiples formas de la enzima cinéticamente distintas. Sin embargo, no se ha publicado la purificación de isoenzimas de TPS de estos microorganismos.

#### Cromatografía de exclusión molecular

Se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando un extracto crudo de plantas de *S. lepidophylla* totalmente hidratadas, se obtuvieron tres picos de actividad de TPS a distintos tiempos de retención (Fig. 141). Este comportamiento cromatográfico fue similar al de cromatografía de intercambio iónico en el cual se observaron tres fracciones con actividad.

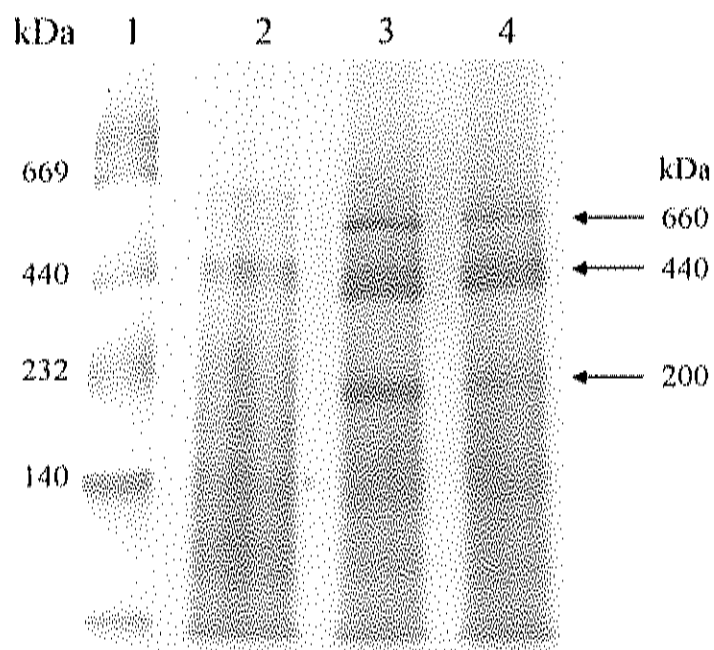


Figura 13. Electroforesis nativa de la TPS obtenida por cromatografía de intercambio iónico (Q-Sefarosa de flujo rápido), PhastGel en gradiente de 4-15% de poliacrilamida teñido con plata; línea 1) marcadores de masa molecular; línea 2) TPS eluida a 0.35 M de KCl; línea 3) TPS eluida a 0.7 M de KCl; línea 4) TPS eluida a 1 M de KCl.

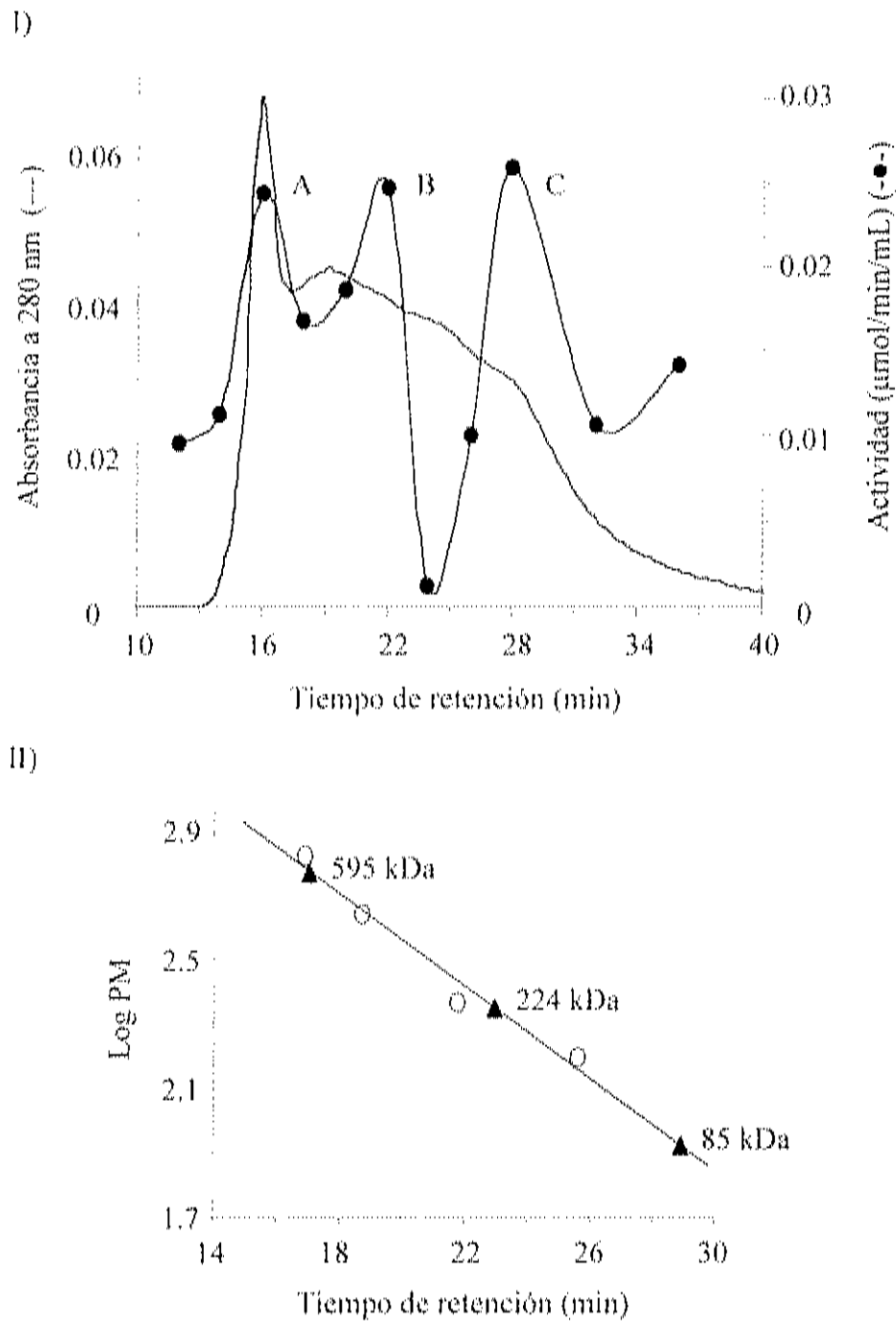


Figura 14. Filtración en gel del extracto crudo de *S. lepidophylla*. I) Cromatograma: absorbancia a 280 nm (---); actividad de TPS (-●-). II) Re gráfico: marcadores de masa molecular (o); TPS (▲).

Cada una de las fracciones con actividad de TPS se agruparon y se denominaron A, B y C de acuerdo al tiempo de retención del pico de actividad. La fracción A coincidió con el máximo de absorbancia a 280 nm, lo cual nos indica que ahí está la máxima concentración de proteína. Esta fracción A correspondió a una masa molecular de 595 kDa, la fracción B a 224 kDa y la fracción C a 85 kDa (Fig. 14II).

Dado que se inyectó a la columna un extracto crudo, se repitió la cromatografía para obtener mejor resolución en cada una de las fracciones mencionados anteriormente. Las tres fracciones A, B y C se concentraron y colocaron cada una por separado en la columna de exclusión molecular. La fracción A se recromatografió y se eluyó una fracción con actividad de TPS, el pico correspondió a una masa molecular de 595 kDa (Fig. 15B). Al realizar la electroforesis nativa se observó una banda de 441 kDa (Fig. 16) seguido de un barrido de proteína por debajo de los 232 kDa.

Esta banda de 441 kDa es la misma banda obtenida en la electroforesis nativa de la proteína que eluye de la cromatografía de afinidad (DPA-Ni). Además, una cromatografía de exclusión molecular de la enzima eluida a 1 M de KCl mostró un pico de actividad que correspondió a un peso molecular de 410 kDa (Fig. 17).

Por su parte, al repetir la cromatografía de exclusión molecular de la fracción B se encontraron tres picos de actividad enzimática (Fig. 18A). Considerando el tiempo de retención de los marcadores de masa molecular se calculó que en el pico 1 se encuentra una proteína de 595 kDa, en el pico 2 una proteína de 224 kDa y en el pico 3 una de 98 kDa (Fig. 18B). Se seleccionó la fracción del pico 2 para electroforesis nativa ya que fue la que coincidió con el pico de proteína. Se obtuvo una banda de 288 kDa (Fig. 19) que coincidió con la banda obtenida en la cromatografía del extracto crudo.



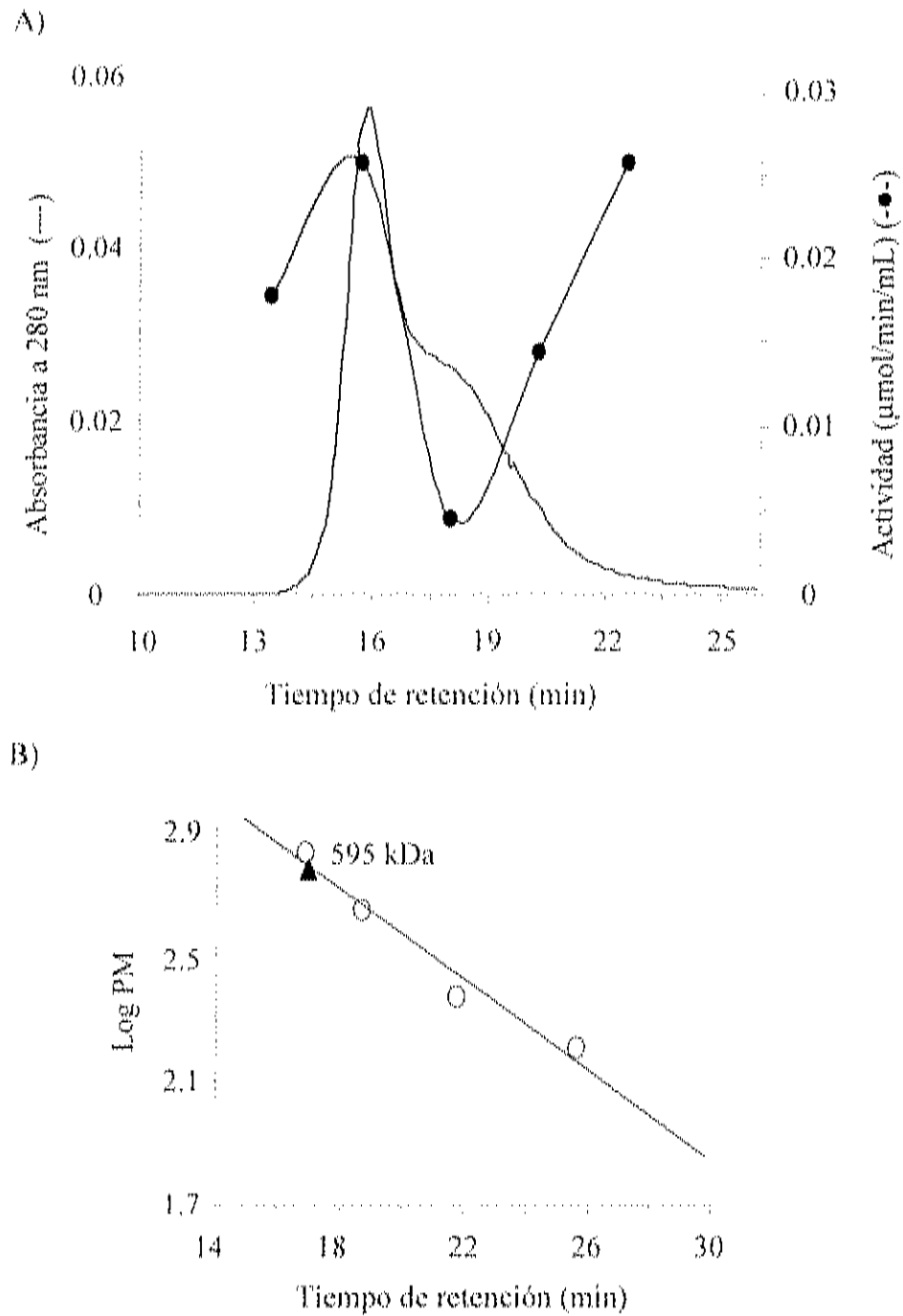


Figura 15. Filtración en gel de la fracción A del extracto crudo. A) Recromatograma: absorbancia a 280 nm (—); actividad de TPS (-●-). B) Regráfico: marcadores de masa molecular (○); TPS (▲).

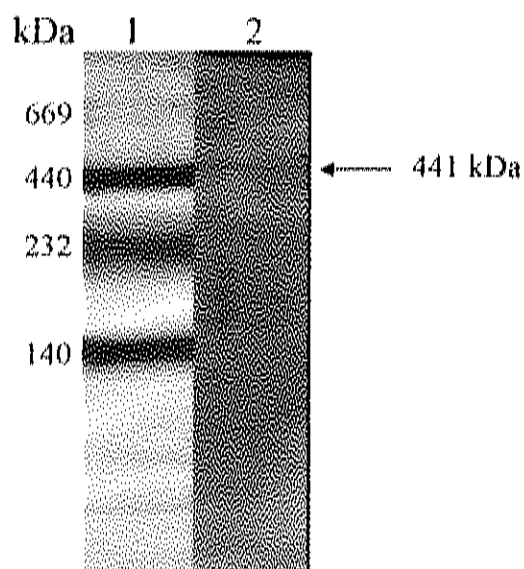


Figura 16. Electroforesis nativa de la fracción A. Gel al 6% de poliacrilamida teñido con plata; línea 1) marcadores de masa molecular; línea 2) TPS.

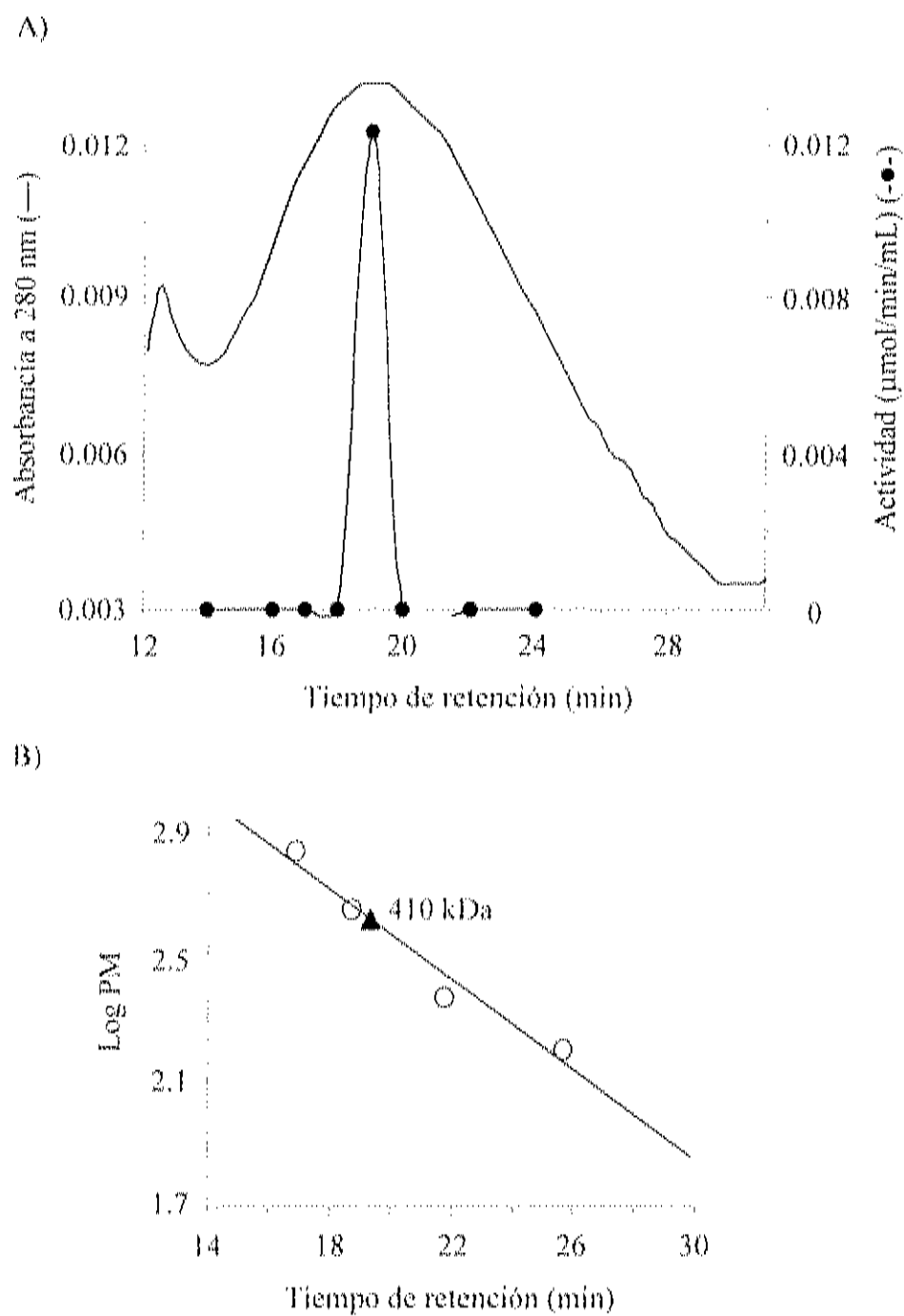


Figura 17. Filtración en gel de la TPS obtenida por intercambio iónico (1 M de KCl).  
 A) Recromatograma: absorbancia a 280 nm (—); actividad de TPS (-●-).  
 B) Re gráfico: marcadores de masa molecular (o); TPS (▲).

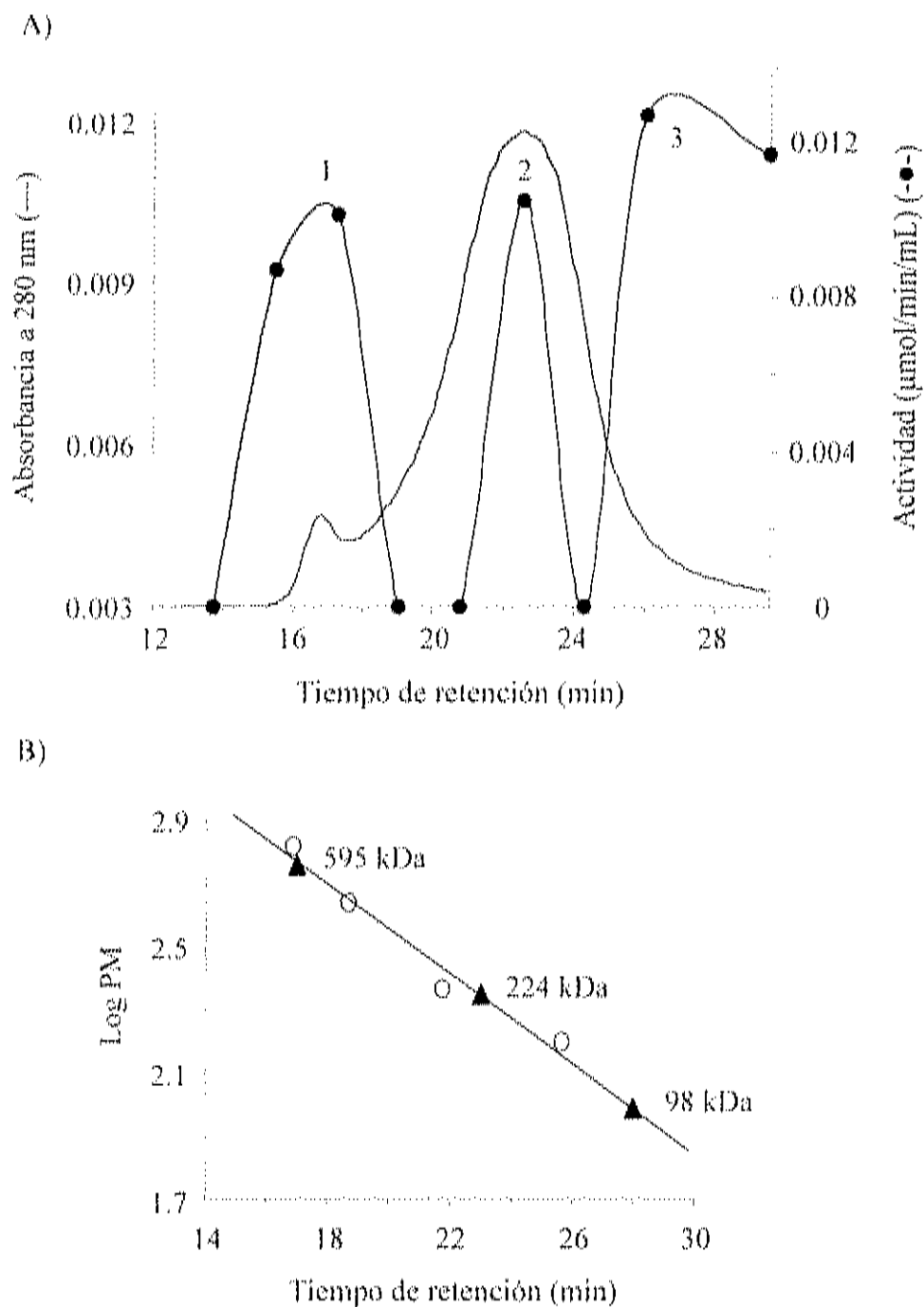


Figura 18. Filtración en gel de la fracción B del extracto crudo. A) Recromatograma: absorbancia a 280 nm (—); actividad de TPS (-●-). B) Regráfico: marcadores de masa molecular (o); TPS (▲).

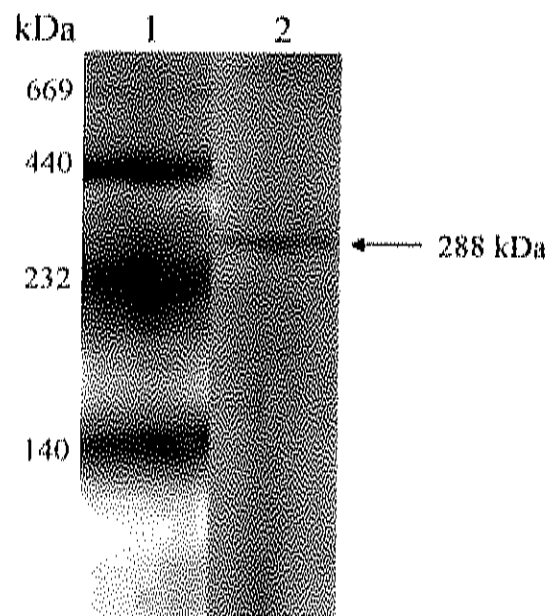


Figura 19. Electroforesis nativa de la fracción B. Gel al 6% de poliacrilamida teñido con plata; línea 1) marcadores de peso molecular; línea 2) TPS.

Con respecto a la fracción C, se encontraron dos picos de actividad. El pico 1 correspondió a una proteína de 595 kDa, y el pico 2 a una proteína de 115 kDa (Fig. 20B). Se selecciono la fracción del pico 2 y se llevó a cabo una electroforesis nativa en la cual se obtuvo una banda de 160 kDa (Fig. 21). Resumiendo estos resultados, podemos afirmar que la TPS de *S. lepidophylla* forma complejos de diferente masa molecular.

Los resultados de las cromatografías: exclusión molecular e intercambio iónico, así como la electroforesis nativa y punto isoeléctrico nos permiten decir que hay tres isoenzimas de TPS presentes en los extractos de plantas completamente hidratadas de *S. lepidophylla*. Estas formas de la enzima tienen diferente carga y peso molecular, por lo que es posible esperar que muestren distintas características bioquímicas. Por lo tanto, una vez que las aislamos por carga (cromatografía de intercambio iónico) se procedió a su caracterización, para lo cual se determinó la estabilidad al pH, pH óptimo, la estabilidad a la temperatura y temperatura óptima.

### Caracterización de las isoenzimas

#### **pH Óptimo**

Para estudiar el efecto del pH sobre la actividad de la enzima, se trabajó con cada una de las isoenzimas separadas a través de la cromatografía de intercambio iónico (Fig. 12). La isoenzima de TPS que eluye a baja fuerza iónica (0.35 mM de KCl) tiene valores de máxima actividad a pHs de 5, 7, y 9, mientras que la isoenzima que eluye a 0.7 M de KCl posee pHs óptimos de 5.5, 7 y 9. Finalmente la isoenzima que eluye a 1 M de KCl presenta nuevamente tres valores de máxima actividad a pH de 5, 6.5 y 9 (Fig. 22).

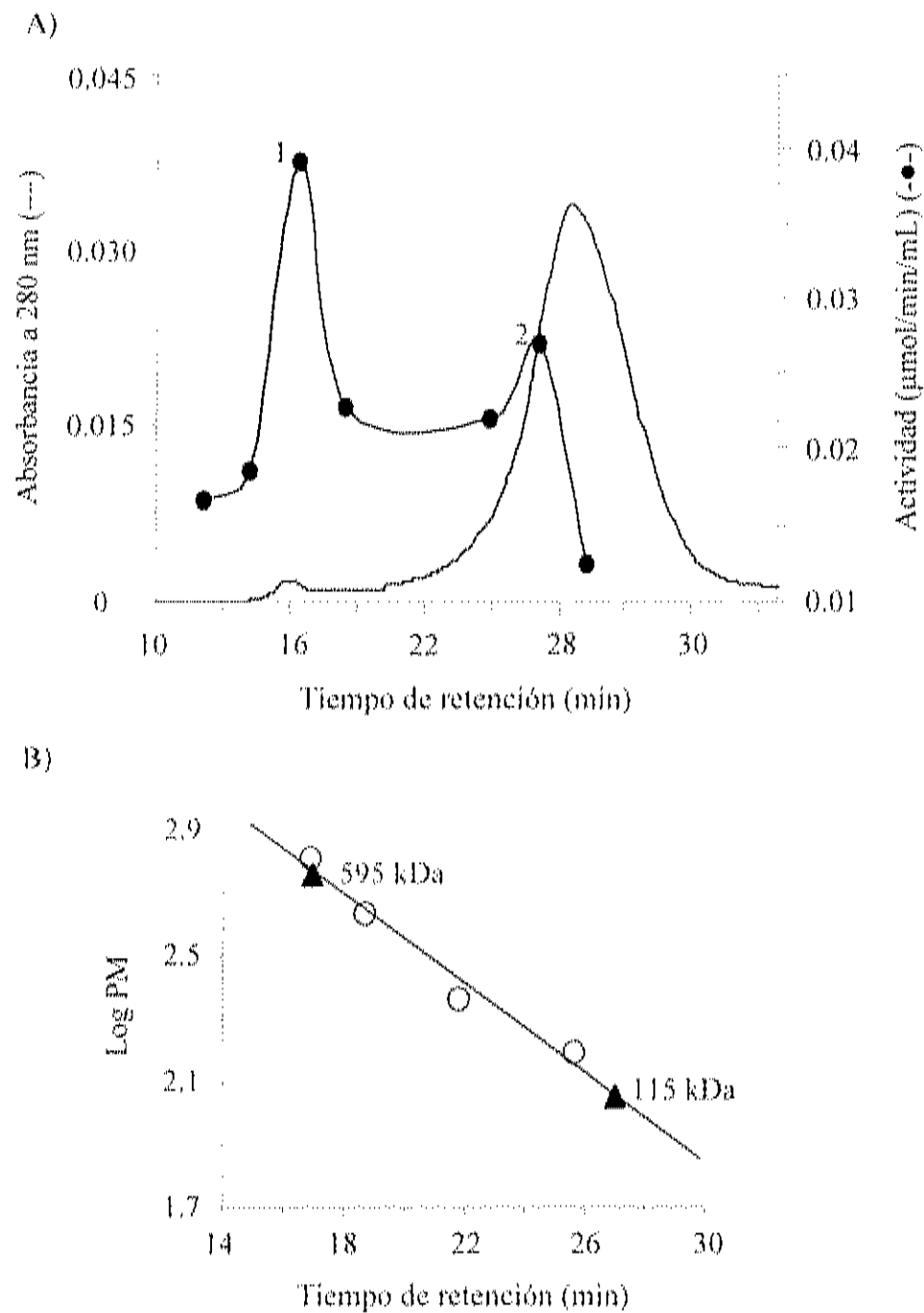


Figura 20. Filtración en gel de la fracción C del extracto crudo. A) Cromatograma: absorbancia a 280 nm (---); actividad de TPS (-●-). B) Re gráfico: marcadores de masa molecular (o); TPS (▲).

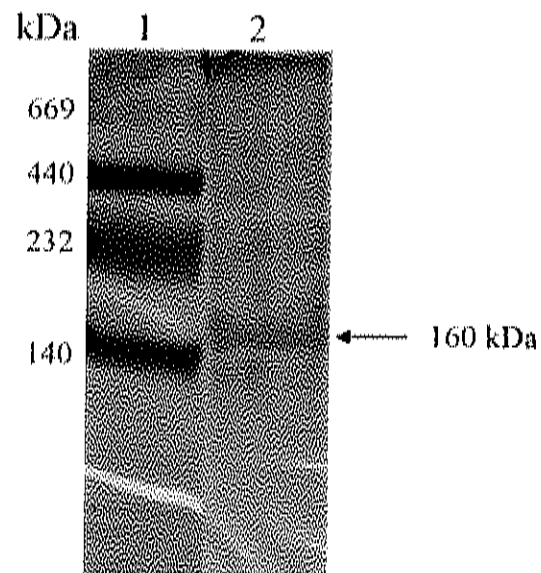


Figura 21. Electroforesis nativa de la fracción C. Gel al 6% de poliacrilamida teñido con plata; línea 1) marcadores de masa molecular; línea 2) TPS.



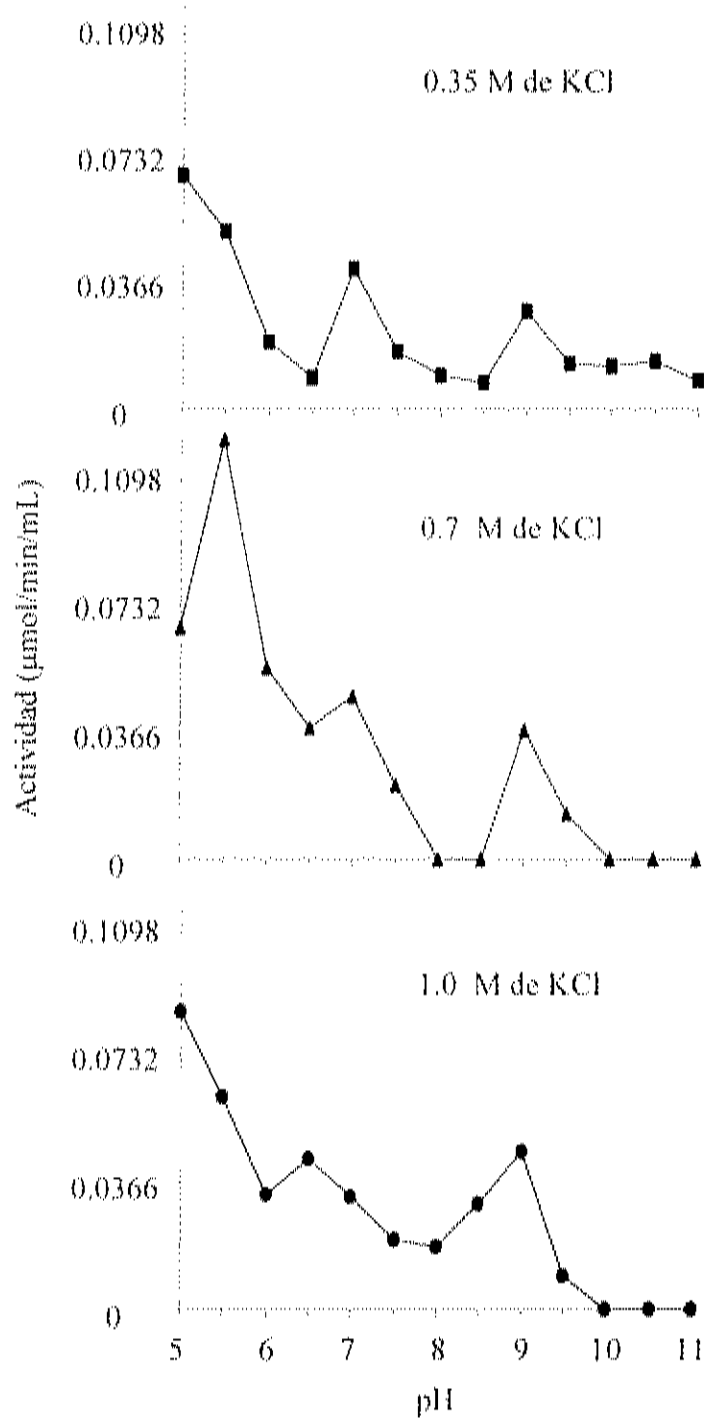


Figura 22. pH óptimo de las isoenzimas de TPS obtenidas por intercambio iónico a las concentraciones de sal indicadas.

Las tres isoenzimas fueron más activas a pH ácido, lo cual también ha sido publicado para la maltooligosil trehalosa sintasa (MTS) de *Sulfolobus acidocaldarius* (Nakada *et al.*, 1996a). También, las isoenzimas de TPS tuvieron un pH óptimo de 7 igual que las TPSs de los hongos *Grifola frondosa* (Saito *et al.*, 1998) y *D. discoideum* (Killick, 1979).

Además, otras enzimas que sintetizan trehalosa como MTS de *Arthrobacter* sp Q36 (Nakada *et al.*, 1995) y trehalosa sintasa (TS) de *Thermus aquaticus* (Nishimoto *et al.*, 1996a) tiene su actividad máxima a este pH. Sin embargo, hasta el momento no se ha publicado que enzimas que sintetizan trehalosa tengan un pH óptimo alcalino (pH de 9) como se encontró en este estudio.

### **Estabilidad al pH**

En cuanto a la estabilidad al pH de las isoenzimas, todas fueron estables en un intervalo de pH entre 5 y 11, a diferencia de la TPS de *D. discoideum* (Killick, 1979) que es estable en un intervalo de pH de 5.5 a 9.5. Además, las isoenzimas de TPS mantienen mayor actividad remanente a pHs medianamente alcalinos en comparación con las enzimas MTS, MTH y TS, ya que a pHs superiores a 9.5 pierden más del 50% de actividad remanente (Nakada *et al.*, 1996a; Nakada *et al.*, 1996b; Nakada *et al.*, 1995; Nishimoto *et al.*, 1996a).

La TPS que eluye a 0.35 M de KCl presenta en general la menor estabilidad frente al pH (entre 5 a 11) en el intervalo de tiempo (60 min) estudiado en este trabajo, ya que esta fracción presentó la menor actividad remanente de las tres isoenzimas. En cambio, la TPS eluida a 1 M de KCl fue más estable a pHs ácidos, mientras que la TPS eluida a 0.7 M de KCl lo fue a pHs alcalinos ya que conservaron mayor actividad remanente.

### **Temperatura Optima**

El efecto de la temperatura sobre la actividad de las isoenzimas de TPS se muestra en la figura 23. Las temperaturas óptimas fueron de 45°, 55° y 25°C para las isoenzimas eluidas a 0.35, 0.7 y 1 M de KCl respectivamente. La temperatura óptima de 45°C de la TPS eluida a 0.35 M de KCl fue similar a la reportada para TPS de *Grifola frondosa* (Saito *et al.*, 1998) y MTS de *Arthrobacter* sp Q36 (Nakada *et al.*, 1995). Por su parte, el dato de la TPS eluida a 0.7 M de KCl es similar a la TS de *Thermus aquaticus* (Nishimoto *et al.*, 1996b) ya que ambas tienen temperaturas óptimas altas de 55 y 65°C repectivamente. Asi mismo, la TPS eluida a 1 M de KCl mostró una temperatura óptima de 25°C que es cercana a la de TS de *Pimelobacter* sp R48 (Nishimoto *et al.*, 1996a) con 20°C.

### **Estabilidad a la Temperatura**

El análisis de la estabilidad de las isoenzimas a la temperatura demostró que la isoenzima eluida a baja fuerza iónica (0.35 M de KCl) no es estable en el intervalo de 25°-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 extremas de 50 a 60°C. Estos resultados coinciden con lo publicado sobre las enzimas MTS y MTH, las cuales son estables a altas tamperaturas (Nakada *et al.*, 1996a; Nakada *et al.*, 1996b; Nakada *et al.*, 1995). Adicionalmente, la TPS de *Grifola frondosa* es estable entre 0 y 37.5°C (Saito *et al.*, 1998).

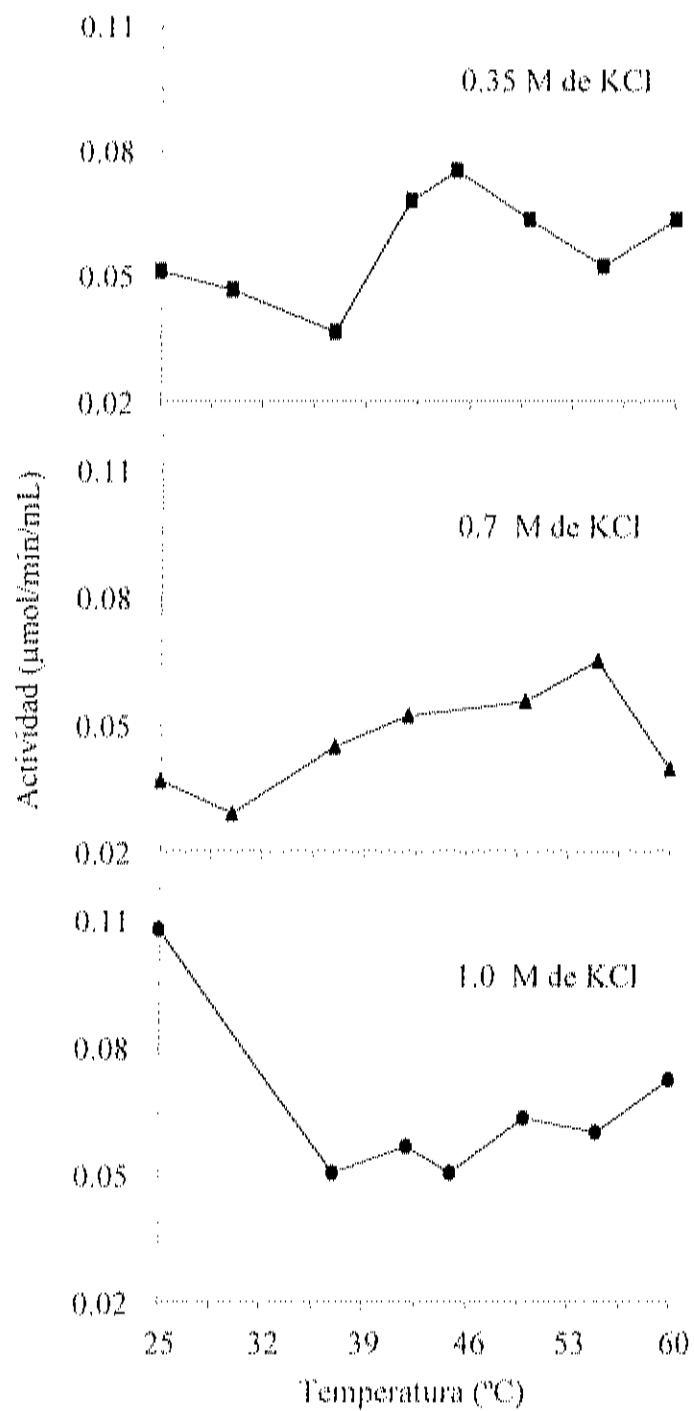


Figura 23. Temperatura óptimo de las isoenzimas de TPS obtenidas por intercambio iónico a las concentraciones de sal indicadas.

## CONCLUSIONES

1. Se logró purificar a la trehalosa 6-fosfato sintasa y separar sus isoenzimas.
2. Las isoenzimas de TPS forman complejos proteicos de distinta masa molecular y punto isoeléctrico.
3. Cada isoenzima esta conformada por subunidades 115 kDa, 67 kDa y 50 kDa en diferente relación estequiometrica.
4. Las isoenzimas de TPS presentan diferencias en:
  - Grado de protonación.
  - Efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática.
  - Estabilidad al pH en el intervalo estudiado.
  - Estabilidad a la temperatura en intervalo analizado.

En conjunto, los datos obtenidos a lo largo de este trabajo demuestran que la enzima trehalosa 6-fosfato sintasa se encuentra en diferentes formas en la planta *S. lepidophylla* totalmente hidratada.

## RECOMENDACIONES

Esta investigación es un precedente para la comprensión y desarrollo de futuros estudios en las enzimas de síntesis de trehalosa en plantas. En consecuencia, es importante definir y ampliar algunos aspectos de este trabajo como lo son:

1. Determinar los parámetros cinéticos de cada una de las isoenzimas de TPS con respecto a sus sustratos.
2. Estudiar el efecto de iones, osmolitos y azúcares sobre la actividad enzimática de cada una de las isoenzimas.
3. Ensayar la actividad enzimática de fosfatasa y así determinar si ambas enzimas se asocian en complejos como sucede en microorganismos.
4. Aislar y secuenciar las subunidades de las isoenzimas de TPS para confirmar si la proteína de 115 kDa tiene la actividad de sintasa y determinar la homología con la proteína predicha por el cDNA de *Selaginella lepidophylla* y de otras especies.
5. Producir anticuerpos para realizar la inmunolocalización de las isoenzimas en los diferentes tejidos y organelos de la planta.

## BIBLIOGRAFIA

- Abundiz-Bonilla L.A. & Tejero-Diez J.D. (1990) El género *Selaginella* pal.-Beauv. (*Selaginellaceae, lycopodiophyts*) en el oeste del Estado de México, México. *Acta Bot Mexicana* **11**:23-47.
- Adams R.P., Kendall E. & Kartha K. (1990) Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochem Syst Ecol* **18**:107-110.
- Albini F., Murelli C., Patrilli G., Rovati M., Zienna P. & Finzi P. (1991) Low molecular-weight substances from the resurrection plant *Sporobolus stapfianus*. *Phytochem* **37**:137-142.
- Aeschbacher R.A., Müller J., Boller T. & Wiemken A. (1999) Purification of trehalase GMTRE1 from soybean nodules and cloning of its cDNA. GMTRE1 is expressed at a low level in multiple tissues. *Plant Physiol* **119**:489-495.
- Argüelles J.C. (1994) Heat-shock response in a yeast *tps1* mutant deficient in trehalosa synthesis. *FEBS Lett* **350**:266-270.
- Asano N., Kato A. & Matsui K. (1996) Two subsites on the active center of pig kidney trehalase. *Eur J Biochem* **240**:692-698.
- Bell W., Sun W., Hohmann S., Wera S., Reinders A., De Virgilio C., Wiemken A. & Thevelin J.M. (1998) Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalosa synthase complex. *J Biol Chem* **273**:33311-33319.
- Bell W., Klaassen P., Ohnacker M., Boller T., Herweijer M., Schoppink P., Zee P.v.d. & Wiemken A. (1992) Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of *C1F1*, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur J Biochem* **209**:951-959.

- Blázquez M., Santos E., Flores C.L., Martínez-Zapater J.M., Salinas J. & Gancedo C. (1998) Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J* **13**:685-689.
- Bonini B.M., Neves M.J. & Terenzi H.F. (1995) Effects of temperature shifts on the metabolism of trehalose in *Neurospora crassa* wild type and a trehalase-deficient (*tre*) mutant. Evidence against the participation of periplasmic trehalase in the catabolism of intracellular trehalose. *Biochim Biophys Acta* **1245**:339-347.
- Boos W., Ehmann U., Forkl H., Klein W., Rümmele M. & Postman P. (1990) Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**:3450-3461.
- Boos W., Ehmann U., Bremer E., Middendorf A. & Postman P. (1987) Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. *J Biol Chem* **262**:13212-13218.
- Botha A.M., Nagel M.A.C., van der Westhuizen A.J. & Botha F.C. (1992) Chitinase isoenzymes in near-isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene, and mechanical wounding. *Bot Bull Acad Sin* **39**:99-106.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Bullifent H.L., Dhaliwal K., Howells A.M., Goan K., Griffin K., Lindsay C.D., Tunnacliffe A. & Titball R.W. (2001) Stabilisation of Salmonella vaccine vectors by induction of trehalose biosynthesis. *Vaccine* **19**:1239-1245.
- Carninci P., Nishitama Y., Westover A., Itoh M., Nagaoka S., Sasaki N., Okazaki Y., Muramatsu M. & Hayashizaki Y. (1998) Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose its application for the synthesis of full length cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:520-524.



- Carpenter J.F. & Crowe J.H. (1989) An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* **28**:3916-3922.
- Chen Q., Ma E., Behar K.L., Xu T. & Haddad G.G. (2002) Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophyla melanogaster*. *J Biol Chem* **277**: 3274-3279.
- Colaço C., Sen S., Thangavelu M., Pinner S. & Roser B. (1992) Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Bio/technology* **10**:1007-1011.
- Crowe J.H., Crowe L.M. & Chapman D. (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalosa. *Science* **223**:701-703.
- Crowe J.H. & Crowe L.M. (2000) Preservation of mammalian cells-learning nature's tricks. *Nature Biotech* **18**:145-146.
- Crowe J.H., Carpenter J.F. & Crowe L.M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* **60**:73-103.
- Crowe L.M., Reid D.S. & Crowe J.H. (1996) Is trehalosa special for preserving dry biomaterials?. *Biophys J* **71**:2087-2093.
- Cushman J.C. & Bohnert H.J. (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* **3**:117-124.
- De Virgilio C., Bärekert N., Bell W., Jenö P., Boller T. & Wiemken A. (1993) Disruption of TPS2, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur J Biochem* **212**:315-323.
- De Virgilio C., Hottiger T., Dominguez J., Boller T. & Wiemken A. (1994) The role of synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast 1. Gene evidence that trehalosa is a thermoprotectant. *Eur J Biochem* **219**:179-186:

- De Virgilio C., Simmen U., Hottiger T., Boller T. & Wiemken A. (1990) Heat shock induces enzymes of trehalose metabolism, trehalose accumulation, and thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*, even in the presence of cyclohexinide. *FEBS Lett* **273**:107-110.
- De Silva-Udawatta M.N. & Cannon J.P. (2001) Roles of trehalose phosphate synthase in yeast glycogen metabolism and sporulation. *Mol Microbiol* **40**:1345-1356.
- Drennan P.M., Smith M.T., Goldsworthy D. & Staden J.v. (1993) The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* welw. *J Plant Physiol* **143**:493-496.
- Eastmond P.J., Dijken A.J.H.v., Spielman M., Kerr A., Tissier A., Dickinson H.G., Jones J.D.G., Smeekens S.C. & Graham I.A. (2002) Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalosa synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J* **29**:225-235.
- Ferreira J.C. & Panek A.D. (1993) Trehalose metabolism during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Molec Biol Int* **31**:1081-1090.
- Gadd G.M., Chalmers K. & Reed R.H. (1987) The role in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **48**:249-254.
- García A.B., Engler J.A., Iyer S., Gerats T., Montagu M.V. & Caplan A.B. (1997) Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol* **115**:159-169.
- García de Castro A., & Tunnacliffe A. (2000) Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells. *FEBS Lett* **487**:199-202.
- Garg A.K., Kim J.K., Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V. & Wu R.J. (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Appl Biol Sci* **99**:15898-15903.

- Gjæver H.M., Styrvold O.B., Kaasen I. & Strom A.R. (1988) Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**:2841-2843.
- Goddijn O.J.M. & Smeekens S. (1998) Sensing trehalosa biosynthesis in plants. *Plant J* **14**:143-146.
- Goddijn O.J.M., Verwoerd T.C., Voogd E., Krutwagen R.H., de Gaaf P.T., Poels J., Dun K.v., Ponstein A.S., Damm B. & Pen J. (1997) Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* **113**:181-190.
- Guo N., Puhlev I., Brown D., Mansbridge J. & Leivine F. (2000) Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotech* **18**:168-171.
- Hazell B.W., Kletsas S., Nevalainen H. & Attfield P.V. (1997) Involvement of *CIF1* (*GGSI/TPSI*) in osmotic stress response in *Saxxharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **414**:353-358.
- Hengge-Aronis R., Klein W., Lange R., Rimmele M. & Boos W. (1991) Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**:7918-7924.
- Hohmann S., Bell W., Neves M.J., Valekx D. & Thevelein J.M. (1996) Evidence for trehalosa-6-phosphate-dependent and -independent mechanisms in the control of sugar influx into yeast glycolysis. *Mol Microbiol* **20**:981-991.
- Hottiger T., De Virgilio C., Hall M., Boller T. & Wiemken A. (1994) The role of trehalose synthesis for acquisition of thermotolerance in yeast II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. *Eur J Biochem* **219**:187-193.
- Hottiger T., Schmutz P. & Wiemken A. (1987) Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalosa in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **169**:5518-5522.

- Kaasen J., McDougal U. & Strom A.R. (1994) Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* **145**:9-15.
- Kandler O. & Senser M. (1965) Vorkommen von trehalose in *Botrychium lunaria*. *Z Pflanzelphysiol* **53**:157-161.
- Kato M., Miura Y., Kettoku M., Shindo K., Iwamatsu A. & Kobayashi K. (1996) Purification and characterization of new trehalose-producing enzymes isolated from the hyperthermophilic archae, *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci Biotech Biochem* **60**:546-550.
- Killick K.A. (1979) Trehalose 6-phosphate synthase from *Dictyostelium discoideum*: partial purification and characterization of the enzyme from young sorocarps. *Arch Biochem Biophys* **196**:121-133.
- Kong X., Liu Y., Gou X., Zhang H., Wang X. & Zhang J. (2001) Directed evolution of operon of trehalosa-6-phosphate synthase/phosphatase from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **280**:396-400.
- Kopp M., Müller H. & Holzer H. (1993) Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**:4766-4774.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lehninger A.L. (1980) Bioquímica. 2<sup>da</sup> edición, Omega S.A., Barcelona España, pp 250-252.
- Lillie S.H. & Pringle J.R. (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol* **143**:1384-1394.
- Lippmann E.v., (1912) Ueber vonkommen von trehalose, vanillin and d-sorbit. *Ber Deut Chem Ges* **45**:3431-3433.

- Londesborough J. & Vuorio O.E. (1993) Purification of trehalose synthase from baker's yeast. It's temperature-dependent activation by fructose-6-phosphate and inhibition by phosphate. *Eur J Biochem* **216**:841-848.
- Londesborough J. & Vuorio O.E. (1991) Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex from baker's yeast: purification of a proteolytically activated form. *J Gen Microbiol* **137**:323-330.
- Londesborough J. & Varimo K. (1984) Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem J* **219**:511-518.
- Löhr E. (1968) Trehalose, respiration and photosynthesis in dem farn *Ophiglossum*. Ein neuer Schattenblatttypus *Physiol Plant* **21**:668-672.
- Márquez-Escalante J.A. (2000) Estudio de las enzimas responsables de la síntesis de trehalosa en la planta *Selaginella lepidophylla*; trehalosa-6-fosfato sintasa (tesis licenciatura). Centro de Investigación en Alimentación en Desarrollo A.C.
- Matsudaira P. (1993) A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing, 5<sup>a</sup>. Edición, Academic Press, New York, USA, pp 100-101.
- McCue K.F. & Hanson A.D. (1990) Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trens Biotechnol* **8**:358-362.
- McDougall J., Kaasen I. & Strom A. (1993) A yeast gene for trehalose-6-phosphate synthase and its complementation of an *Escherichia coli otsA* mutant. *FEMS Microbiol. Lett* **107**:25-30.
- Müller J. (2001) Trehalose in higher plants. *Recent Res Devel Plant Physiol* **2**: 175-186.
- Müller J., Wiemken A. & Aeschbacher R.A. (1999) Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Sci* **147**:37-47.
- Müller J., Boller T. & Wiemken A. (1996) Pool of non-structural carbohydrates in soybean root nodules during water stress. *Physiol Plant* **98**:723-730.

- Müller J., Boller T. & Wiemken A. (1995) Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpea. *Planta* **197**:362-368.
- Nakada T., Ikegami S., Chaen H., Kubota M., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M. & Tsujisaka Y. (1996a) Purification and characterization of thermostable Maltooligosyl Trehalose Synthase from the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci Biotech Biochem* **60**:263-266.
- Nakada T., Ikegami S., Chaen H., Kubota M., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M., Tsujisaka Y. (1996b) Purification and characterization of thermostable Maltooligosyl Trehalose Trehalohydrolase from thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biosci Biotech Biochem* **60**:267-270.
- Nakada T., Maruta K., Tsusaki K., Kubota M., Chaen H., Sugimoto T., Kurimoto M. & Tsujisaka Y. (1995) Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biosci Biotech Biochem* **59**:2210-2214.
- Nelson D.L. & Cox M.M. (2000) *Lehninger principles of biochemistry*, 3<sup>ra</sup> edición, Worth Publishers, New York, USA, glosario pp G-7.
- Nishimoto T., Nakano M., Nakada T., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M. & Tsujisaka Y. (1996a) Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase from *Pimelabacter* sp.R48. *Biosci Biotech Biochem* **60**:640-644.
- Nishimoto T., Nakada T., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M. & Tsujisaka Y. (1996b) Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*. *Biosci Biotech Biochem* **60**:835-839.

- Noubhani A., Bunoust O., Rigoulet M. & Thevelein J.M. (2000) Reconstitution of ethanolic fermentation in permeabilized spheroplasts of wild-type and trehalosa-6-phosphate synthase mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **267**:4566-4576.
- Nuccio M.L., Rhodes D., McNeil S.D. & Hanson A.D. (1999) Metabolic engineering of plant osmotic stress resistance. *Curr Opin plant Biol* **2**:128-134.
- Oda Y., Uno K. & Ohta S. (1986) Selection of yeasts for breadmaking by frozen-dough method. *Appl Environ Microbiol* **52**:941-943.
- Oesch F. & Meier H. (1967) Trehalose in the cambial sap of *Fagus sylvatica*. *Phytochemistry* **6**:1147-1148.
- Pan Y.T. & Elbein A.D. (1996) Inhibition of the Trehalose-P Synthase of mycobacteria by various antibiotics. *Arch Biochem Biophys* **335**:258-266.
- Paiva C.L.A. & Panek A.D. (1996) Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotech Ann Rev* **2**:293-341.
- Panek A.C., Araujo P.S., Neto V.M. & Panek A.D. (1987) Regulation of the trehalosa-6-phosphate synthase complex in *Saccharomyces*, I. Interconversion of forms by phosphorylation. *Curr Genet* **11**:459-465.
- Peixoto D.N. & Panek A.D. (1999) The involvement of hexokinases in trehalosa synthesis. *Biochem Molec Biol Int* **47**:873-880.
- Pereira M.D., Eleutherio E.C.A. & Panek A.D. (2001) Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol* **1**:11
- Pilon-Smits E.A.H., Terry N., Sears T., Kim H., Zayed A., Hwang S., Dun K.v., Voogd E., Verwoerd T.C., Krutwagen R.W.H.H. & Goddijn O.J.M. (1998) Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J Plant Physiol* **152**:525-532.

- Platt K.A., Oliver M.J. & Thomson W.W. (1994) Membranes and organelles of dehydrated *Selaginella* and *Tortula* retain their normal configuration and structural integrity. *Protoplasma* **178**:57-65.
- Porath J. & Olin B. (1983) Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* **4**:263-281.
- Porchia A.C., Fiol D.F. & Salerno G.L. (1999) Differential synthesis of sucrose and trehalose in *Euglena gracilis* cells during growth and salt stress. *Plant Sci* **149**:43-49.
- Reinders A., Romano I., Wiemken A. & De Virgilio C. (1999) The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalosa synthesis for growth at high temperatures but does for normal acquisition of thermotolerance. *J Bacteriol* **181**:4665-4668.
- Reinders A., Bürckert N., Hohmann S., Thevelein J.M., Boller T., Wiemken A. & De Virgilio C. (1997) Structural analysis of the subunits of the trehalosa-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae* and their function during heat shock. *Mol Microbiol* **24**:687-695.
- Ribeiro M.J.S., Reinders A., Boller T., Wiemken A. & De Virgilio C. (1997) Trehalose synthesis is important for the acquisition of thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **25**:571-581.
- Ribeiro M.J.S., Silva J.T. & Panek A.D. (1994) Trehalose metabolism *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Acta* **1200**:139-147.
- Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R. & Willmitzer L. (2000) Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J* **23**:131-142.



- Romero C., Bellés J.M., Vayá J.L., Serrano R. & Culiáñez-Maciá F.A. (1997) Expresión of the *trehalosa-6-phosphate synthase* gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* **201**:293-297.
- Roser B. & Colaço C. (1993) A sweeter way to fresher food: A simple sugar that protects plants and animals from damage during drought could soon be helping us to make food last longer. *New Scient* **138**:25-28.
- Roser B. (1991) Trehalose, a sweeter approach to premium dried foods. *Trends Food, Sci Technol* **2**:166-169.
- Saito K., Kase T., Takahashi E., Takahashi E. & Horinouchi S. (1998) Purification and characterization of a trehalose synthase from the Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Appl Environ Microbiol* **64**:4340-4345.
- Singer M.A. & Linquist S. (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. *Tibtech* **16**:406-468.
- Soto T., Fernández J., Vicente-Solero J., Cansado J. & Gacto M. (1999) Accumulation of trehalose by overexpression of *tps1*, coding for trehalose-6-phosphate synthase, causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Environ Microbiol* **65**:2020-2024.
- Steele N.M. & Fry S.C. (2000) Differences in catalytic properties between native isoenzymes of xyloglucan endotransglycosylase (XET). *Phytochemistry* **54**:667-80.
- Streeter J.G. & Bhagwat A. (1999) Biosynthesis of trehalose from maltooligosaccharides in *Rhizobia*. *Can J Microbiol* **45**:716-721.
- Thevelein J.M. & Hohmann S. (1995) Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast?. *Trends Biochem Sci* **20**:3-10.
- Vandercammen A., François J. & Hers H.G. (1989) Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **182**:613-620.

- Vogel G., Fiehn O., dit-Bressel L.J.R., Boller T., Wiemken A., Aeschbacher R.A. & Wingler A. (2001) Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *J Exp Bot* **52**:1817-1826.
- Vogel G., Aeschbacher R.A., Müller J., Boller T. & Wiemken A. (1998) Trehalose-6-phosphatase phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *Plant J* **13**:673-683.
- Vuorio O., Kalkkinen N. & Londesborough J. (1993) Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **126**:849-861.
- Weisburd S. (1988) Death-defying dehydration: Sugar sweeten survival for died-out animals, membranes and cells. *Sci News* **133**:107-110.
- Wray W., Bouliskas T., Wray V.P. & Hancock R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **118**:197-203.
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D. & Somero G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**:1214-1222.
- Zähringer H., Burgert M., Holzer H. & Nwaka S. (1997) Neutral Trehalase Nthip of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the *NTH1* gene is a multiple stress responsive protein. *FEBS Lett* **412**:615-620.
- Zentella R., Mascorro-Gallardo J.D., dijk P.v., Folch-Mallol J., Bonini B., Vaeck C.v., Gaxiola R., Covarrubias A.A., Nieto-Sotelo J., Thevelein J.M. & Hurriaga G. (1999) A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphatase synthase complements growth and Stress-Tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol* **119**:1-10.

- Vogel G., Fiehn O., di-Bressel L.J.R., Boller T., Wiemken A., Aeschbacher R.A. & Winkler A. (2001) Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *J Exp Bot* **52**:1817-1826.
- Vogel G., Aeschbacher R.A., Müller J., Boller T. & Wiemken A. (1998) Trehalose-6-phosphatase phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *Plant J* **13**:673-683.
- Vuorio O., Kalkkinen N. & Londesborough J. (1993) Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **126**:849-861.
- Weisburd S. (1988) Death-defying dehydration: Sugar sweeten survival for died-out animals, membranes and cells. *Sci News* **133**:107-110.
- Wray W., Boulikas T., Wray V.P. & Hancock R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **118**:197-203.
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D. & Somero G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**:1214-1222.
- Zähringer H., Burgert M., Holzer H. & Nwaka S. (1997) Neutral Trehalase Nthip of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the *NTH1* gene is a multiple stress responsive protein. *FEBS Lett* **412**:615-620.
- Zentella R., Mascorro-Gallardo J.D., dijk P.v., Folch-Mallol J., Bonini B., Vaeck C.v., Gaxiola R., Covarrubias A.A., Nieto-Sotelo J., Thevelein J.M. & Iturriaga G. (1999) A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphatase synthase complements growth and Stress-Tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol* **119**:1-10.