



OBTENCIÓN DE LA TREHALOSA-6-FOSFATO SINTASA 1 DE *Setaria viridis*

Zlauvinen, Camila

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, UNL-CONICET
Laboratorio de Enzimología Molecular

Director: Figueroa, Carlos María

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: fotosíntesis C₄, sacarosa, trehalosa 6-fosfato

INTRODUCCIÓN

La trehalosa 6-fosfato (Tre6P) es un metabolito señal que regula el metabolismo del carbono en plantas. En los últimos años, la Tre6P ha cobrado relevancia ya que se ha demostrado que participa en una diversa cantidad de procesos, desde el desarrollo del embrión hasta la floración (Figueroa y Lunn, 2016). Los niveles de Tre6P se encuentran estrictamente regulados y guardan correlación con los niveles de sacarosa (Yadav et al., 2014). Mediante el estudio de la Tre6P sintasa 1 (TPS1) pretendemos dilucidar los mecanismos moleculares que regulan la síntesis de Tre6P en plantas, un paso fundamental para comprender de qué manera se regula el metabolismo del carbono en dichas especies. Hasta el momento, la mayor parte de nuestros conocimientos sobre la regulación del metabolismo del carbono por Tre6P provienen de experimentos realizados con *Arabidopsis thaliana*, una planta dicotiledónea que realiza fotosíntesis del tipo C₃. Por lo tanto, trasladar estos conceptos a plantas monocotiledóneas que realizan fotosíntesis C₄ resulta de gran utilidad para el mejoramiento de cultivos de interés agronómico. Por lo expuesto, nuestro grupo de trabajo se propuso obtener de forma recombinante y caracterizar la trehalosa-6-fosfato sintasa 1 de *Setaria viridis*, una planta que ha sido ampliamente adoptada como un modelo de estudio para las especies C₄ monocotiledóneas más importantes (tales como maíz, sorgo y caña de azúcar).

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la producción y caracterización bioquímica de la TPS1 de *Setaria viridis* obtenida a partir de células de *Escherichia coli*.

Objetivos específicos:

- Producir de forma recombinante y purificar la TPS1 de *Setaria viridis* (SvTPS1) a partir de células de *Escherichia coli*. La enzima pura se utilizará para estudiar sus propiedades cinéticas, estructurales y regulatorias.

Título del Proyecto: Estudio de la partición intercelular del metabolismo de la trehalosa 6-fosfato en plantas C₄.

Instrumento: PICT

Año de la convocatoria: 2018

Organismo financiador: Agencia I+D+i

Director: Figueroa, Carlos María



- Obtener y caracterizar una mutante trunca en el extremo N-terminal de la SvTPS1, para evaluar si dicho dominio tiene algún efecto sobre la actividad de la enzima.
- Obtener y caracterizar una mutante trunca en un dominio intrínsecamente desordenado ubicado en el extremo C-terminal de la SvTPS1, para evaluar si dicho dominio tiene algún efecto sobre la actividad de la enzima.

METODOLOGÍA

La secuencia de ADN que codifica para la SvTPS1 fue sintetizada *de novo* por la compañía Bio Basic (Canadá), teniendo en cuenta la secuencia proteica deducida a partir del genoma de *Setaria viridis*, disponible en el servidor Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). La proteína recombinante fue expresada en células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET28b conteniendo la secuencia codificante entre los sitios de restricción *NdeI* y *SacI*. De esta forma, se le adiciona una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal, lo que permite la posterior purificación mediante cromatografía de pseudo-afinidad por metal inmovilizado (IMAC). Alternativamente, la secuencia codificante de la SvTPS1 se clonó en el vector pET24b entre los sitios *NdeI* y *XhoI*, lo cual permite obtener la enzima de interés con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal. Se realizaron ensayos de expresión de las diferentes formas de la SvTPS1 utilizando los vectores anteriormente nombrados y las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las medidas de actividad enzimática se llevaron a cabo utilizando un método espectrofotométrico (Figuroa et al., 2013).

Para obtener la proteína trunca en el extremo N-terminal, se diseñaron oligonucleótidos que permitieron amplificar por PCR el dominio catalítico de la SvTPS1 (Δ Nterm). Para obtener la proteína trunca en el dominio intrínsecamente desordenado de la SvTPS1, se amplificaron dos fragmentos de ADN utilizando oligonucleótidos diseñados de forma tal que los productos amplificados contuvieran extremos superponibles. Los productos obtenidos se utilizaron como molde para amplificar la secuencia completa, que carecía del dominio intrínsecamente desordenado (Δ Cterm). En ambos casos, los productos de PCR fueron clonados en el vector comercial pEASY-Blunt3 (TransGen Biotech) y las secuencias fueron verificadas mediante secuenciación automática (Macrogen). Luego, las secuencias de interés fueron subclonadas en los vectores de expresión pET28b y pET24b. Se realizaron ensayos de expresión y se analizaron las fracciones obtenidas mediante SDS-PAGE.

RESULTADOS

Al expresar la SvTPS1 de forma recombinante en células de *E. coli* BL21 (DE3) utilizando el vector pET28b encontramos que la enzima de interés se obtenía sólo como cuerpos de inclusión. Esto nos llevó a pensar que la posición de la etiqueta de histidinas (en este caso, ubicada en el extremo N-terminal) podría tener un efecto negativo sobre el plegamiento y/o la conformación de la estructura cuaternaria de la enzima. Por esta razón, la SvTPS1 fue expresada en células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector pET24b, adicionando en este caso una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal. De esta forma, logramos obtener la enzima de interés de forma soluble; sin embargo, la misma no presentó actividad enzimática. En base a estos resultados, y teniendo en cuenta reportes previos, procedimos a la búsqueda de dominios que podrían dificultar la obtención de la proteína recombinante de forma soluble y activa en el sistema de expresión heteróloga utilizado en este trabajo. Se ha descrito que el dominio N-terminal de las TPS1 de *Selaginella lepidophylla* y *A. thaliana* presenta un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima (Van Dijk et al., 2002). Por esta razón, se diseñaron oligonucleótidos específicos para remover la secuencia que codifica para el extremo N-terminal de la SvTPS1 (125 aminoácidos) mediante PCR. De esta forma, logramos obtener la secuencia que codifica para la enzima trunca en el extremo N-terminal (Δ Nterm). Los ensayos preliminares mostraron que es posible recuperar dicha proteína a partir de la fracción soluble de células de *E. coli* BL21 (DE3) utilizando el vector pET28b, lo cual representa una diferencia importante respecto de los resultados obtenidos con la secuencia completa de la proteína (donde la misma se obtenía sólo como cuerpos de inclusión); sin embargo, la proteína soluble no mostró actividad enzimática. Por ello, se realizó un subclonado de la secuencia codificante al vector pET24b y la SvTPS1- Δ Nterm fue expresada en células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con este plásmido. De la misma manera, fue posible recuperar la proteína a partir de la fracción soluble, pero esta estrategia tampoco permitió obtener la proteína en su forma activa.

Continuando con la tarea de obtener la proteína de interés de forma soluble y activa, procedimos a la obtención de una mutante trunca en el dominio intrínsecamente desordenado presente en el extremo C-terminal de la proteína (Δ Cterm). Al realizar ensayos de expresión con la secuencia obtenida, se encontró que no es posible recuperar la proteína SvTPS1- Δ Cterm de la fracción soluble de células de *E. coli* BL21 (DE3) utilizando el vector pET28b. Actualmente nos encontramos trabajando en la obtención de la misma con el vector pET24b y en la producción de una doble mutante (SvTPS1- Δ Nterm- Δ Cterm).

CONCLUSIONES

Se logró la expresión recombinante de la SvTPS1 en su forma salvaje y de dos versiones mutantes, SvTPS1- Δ Nterm y SvTPS1- Δ Cterm. Las proteínas obtenidas no mostraron actividad enzimática. En un futuro cercano se pretende continuar con el trabajo de investigación realizando ensayos de expresión de la mutante SvTPS1- Δ Cterm utilizando el vector pET24b, como así también de la doble mutante SvTPS1- Δ Nterm- Δ Cterm. De no lograr el objetivo principal de este trabajo, es decir, la obtención de las enzimas en forma soluble y activa, procederemos a la utilización de otros sistemas de expresión heteróloga, tales como levaduras y/o plantas. Por otra parte, las secuencias codificantes obtenidas en este trabajo serán utilizadas para transformar protoplastos de *S. viridis*, para evaluar la importancia de las regiones eliminadas para la localización subcelular de la proteína de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Brutnell TP, Bennetzen JL, Vogel JP.** 2015. *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis*: Model Genetic Systems for the Grasses. *Annu Rev Plant Biol* 66, 465–485.
- Van Dijck P, Mascorro-Gallardo JO, De Bus M, Royackers K, Iturriaga G, Thevelein JM.** 2002. Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochem J* 366, 63–71.
- Figueroa CM, Lunn JE.** 2016. A tale of two sugars: Trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiology* 172.
- Yadav UP, Ivakov A, Feil R, et al.** 2014. The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *J. Exp. Bot.* 65, 1051–1068.