

Póster P23

En la búsqueda de α -manosidasas como herramientas en glicobiología

Lorena Herrera¹, María Eugenia Cedrés¹, Paula Rodríguez Bonnacarrere², Cecilia Giacomi^{1*}

¹ Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

² Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, Departamento de Biociencias-Departamento Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República

*Autor correspondiente: cgiacomi@fq.edu.uy

Resumen

Numerosos procesos biológicos se encuentran mediados por interacciones proteína-glicanos. Por ello, alteraciones en los patrones de glicosilación celular se traducen en diversas patologías entre las que se encuentran enfermedades infecciosas o inflamatorias crónicas y el cáncer. Las exoglicosidasas son herramientas útiles para la elucidación tanto de la estructura como del rol de los glicanos biológicos. Las α -manosidasas en particular adquieren relevancia en función del rol que cumplen los glicanos manosilados en procesos tumorales y de infección parasitaria o viral.

En un screening de actividad α -manosidasa realizado en nuestro laboratorio en 19 cepas bacterianas se identificó dicha actividad extracelular en el *Bacillus* sp 12.22.

En este trabajo nos enfocamos en el diseño de una estrategia de purificación de la α -manosidasa de este microorganismo. Se realizaron cultivos en un medio líquido utilizando extracto de levadura 2% como inductor y se crecieron durante 24 horas a 30°C. Dado que está descrito en bibliografía que la actividad de las α -manosidasas es dependiente de la presencia de iones metálicos, se realizó un estudio de la actividad enzimática en presencia de distintos iones (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , K^{1+} y Na^{1+}) en concentraciones 1-10 mM, determinándose una mayor actividad en presencia de $MgCl_2$ 10 mM. A los efectos de concentrar la α -manosidasas presente en el sobrenadante del cultivo se estudiaron dos estrategias diferentes: i) precipitación fraccionada con sulfato de amonio y ii) precipitación con solventes orgánicos. Si bien la primera estrategia fue efectiva para realizar una purificación parcial, se observó pérdida de la actividad enzimática. La precipitación con solventes orgánicos fue efectiva utilizando tanto acetona como etanol o isopropanol al 65%, pero siendo mayor la actividad recuperada en el caso de isopropanol. Se optimizó la concentración de isopropanol a utilizar obteniéndose los mejores resultados con una concentración de 35%. Se continuó el proceso de purificación mediante intercambio aniónico utilizando columnas High trap Q HP a PH 6.5 y eluyendo con una concentración de NaCl 0.8 M. El análisis electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones eluidas permitió identificar una banda relativamente pura con un PM de 66 kDa. Sin embargo, la enzima purificada demostró una baja estabilidad perdiendo rápidamente su actividad por lo cual no fue posible escalar su producción. Por tal motivo se procedió a la realización de un nuevo screening de actividad α -manosidasa en 9 cepas de hongos, obteniéndose actividad extracelular en cuatro cepas de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* y *Penicillium*. Actualmente se está trabajando en la optimización de las condiciones de cultivo para proceder a la purificación de las mismas.

Agradecimientos:

Universidad de la República, PEDECIBA, ANII