



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



LA DIGESTION ÁCIDA DE LAS LANGOSTAS

Liliana Rojo, Reinhard Saborowski, Adriana Muhlia-Almazán y Fernando García-Carreño. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Laboratorio de Bioquímica, La Paz 23090. lilirojo@gmail.com.

Palabras clave: Aspártico proteasas, Digestión, Langostas.

Introducción. De manera general se acepta que las serino proteinasas son las principales participantes en la digestión del alimento en los crustáceos (1), sin embargo en las langostas queladas americana (*Homarus americanus*) y europea (*Homarus gammarus*) los componentes proteolíticos del jugo gástrico son cisteíno y aspártico proteinasas exclusivamente (2). El presente trabajo es pionero en la descripción de las características bioquímicas y moleculares de una aspártico proteasa participante en la digestión extracelular de crustáceos.

Metodología. Se aisló a la proteinasa aspártica que contribuye sustancialmente a la actividad proteolítica del jugo gástrico de las langostas queladas, se le analizó por espectrofotometría de masas y se obtuvo la secuencia N-términal y deducida de aminoácidos, también se inquirió en la presencia del transcrito en diferentes tejidos por RT-PCR así como en las variaciones en la concentración del mRNA ocasionadas por el ayuno usando qRT-PCR. Con la finalidad de abundar en la función adaptativa de dichas enzimas se evaluaron las propiedades catalíticas y los parámetros cinéticos a 4, 10 y 25 °C comparándolos con los de la catepsina D bovina. Se indagó en las características estructurales y se comparó por cladograma con otras proteasas aspárticas digestivas y no digestivas de invertebrados.

Resultados. Se comprobó la función digestiva de la aspártico proteasa presente en el jugo gástrico de las langostas queladas y se confirmó la identidad de ésta enzima como catepsina D, que fue designada aquí como catepsina D1. El mRNA de dicha enzima se expresa exclusivamente en el tejido de la glándula digestiva y la forma activa se encuentra en el jugo gástrico. Se encontró que la concentración del mRNA de ésta enzima varía a lo largo de un periodo de ayuno y realimentación. En cuanto a las propiedades catalíticas, se encontró que las catepsinas D1 de las langostas tienen actividad proteolítica a un rango de pH más amplio y una menor estabilidad a temperaturas altas y moderadas comparada con su homólogo bovino. Respecto a la dependencia a la temperatura de los parámetros cinéticos, las catepsinas D1 de las langostas no mostraron una diferencia significativa en los valores de K_M a las tres temperaturas evaluadas (4, 10 y 25 °C), mientras que la enzima bovina tiene valores de K_M dependientes de la temperatura. El valor del k_{cat}/K_M de la enzima de las langostas resultó ser cerca de 20 veces mayor respecto a la enzima bovina. En una modelación por comparación, se encontró que la

diferencia más conspicua entre las catepsinas D1 de las langostas y la catepsina D bovina es la sustitución de residuos de prolina en un sitio putativo de unión al sustrato conocido como "polyproline loop" (Fig. 1).

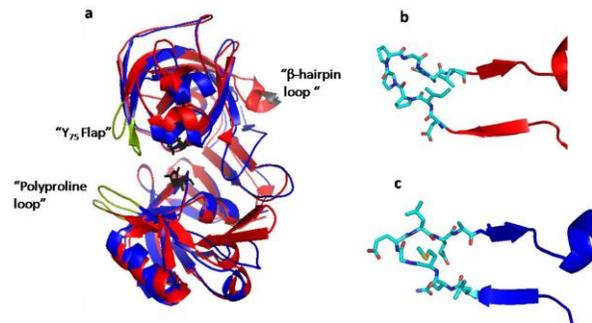


Fig. 1 (a) Predicción del modelo molecular que representa la superficie de la catepsina D1 (azul) y la comparación por superposición con la catepsina D bovina (rojo). Comparación estructural del "polyproline loop" de la catepsina D bovina (b) con el lazo homólogo de la catepsina D1 (c).

Conclusiones. Se propone que la baja temperatura ambiental en la que habitan las langostas queladas es una de las fuerzas evolutivas que han conllevado a la participación de cisteíno y aspártico proteasas, ya que dichas enzimas, incluyendo a la catepsina D1 aquí caracterizada, muestran propiedades bioquímicas y estructurales de las enzimas adaptadas para catalizar a bajas temperaturas. Las propiedades catalíticas de la catepsina D1 de las langostas queladas pueden ser el resultado de un aumento en la flexibilidad de su conformación estructural debido a una disminución de residuos de prolina en sitios de unión al sustrato como el "polyproline loop", lo que hipotéticamente podría permitir un centro catalítico más flexible que deriva en una mayor eficiencia catalítica a temperaturas bajas y moderadas (3), la cual es intercambiada por una baja estabilidad a altas temperaturas. De acuerdo al análisis por cladograma, la ausencia de residuos de prolina en el "polyproline loop" está también asociada a enzimas aspárticas con función digestiva.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el proyecto CONACYT: 80935. LR recibió apoyo del CONACYT a través de la beca doctoral 220577.

Bibliografía.

1. Glass HJ y Stark JR (1994). *Comp Biochem Physiol.* 108B (2): 225–235.
2. Navarrete del Toro MA, García-Carreño FL, Díaz LM, Celis-Guerrero L, y Saborowski R (2006). *J Exp Zool.* 305A: 645–654.
3. Feller G y Gerday C (2003). *Nat Rev Microbiol.* 1 (3): 200–208.