



FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS ADICIONALES DE LA LEVANSACARASA LevS DE *Leuconostoc mesenteroides*

Flor de María García Paz, Sandra Morales Arrieta, Agustín López Munguía Canales, Clarita Olvera Carranza. Instituto de Biotecnología, UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología. Cuernavaca, Mor. C.P. 62210. florgpaz@ibt.unam.mx

Palabras clave: Fructosiltransferasas, relación estructura/función, fructanas.

Introducción. Las levansacarosas (LS) son fructosiltransferasas (FTF) pertenecientes a la familia 68 de las glucosilhidrolasas (GH68). Las LS utilizan sacarosa como sustrato donador para sintetizar levana, un polímero de fructosa con enlaces $\beta(2-6)$ en su cadena principal (1). En 2006, se reportó el aislamiento y caracterización molecular del gen LevS, que codifica para una levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F, así como la producción y caracterización funcional de la enzima. LevS pertenece a una subfamilia de FTF que se caracteriza por la presencia de dominios adicionales en las regiones N- y C-terminal con identidad de glucosiltransferasas (GTF), por lo que se les considera como quimeras naturales (2).

Objetivo. Investigar los efectos de los dominios adicionales (N- y C-terminal) de la levansacarasa LevS en función de su actividad y estabilidad.

Metodología.



Fig. 1. Diseño experimental.

Las construcciones de las versiones truncadas de la levansacarasa LevS fueron clonadas en el plásmido pBad/D y expresadas en *E. coli* (Figura 2). La purificación se realizó a través de la etiqueta de histidinas (His) en el extremo C-terminal. El polímero producido fue analizado por resonancia magnética nuclear (RMN).

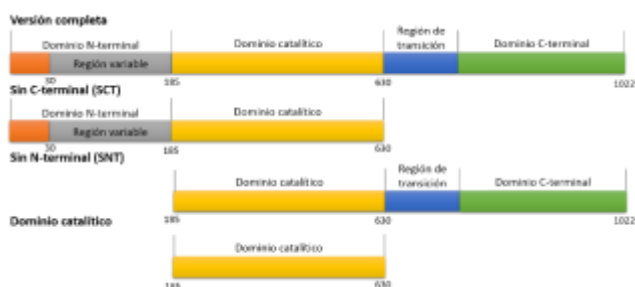


Fig. 2. Esquema de versiones truncadas de LevS.

Resultados.

Se generaron versiones truncadas de la levansacarasa LevS (Figura 2), eliminando la región N y/o C-terminal. Estas versiones no mostraron cambios en el tipo de polímero sintetizado. Sin embargo, la eliminación de la región N-terminal afectó fuertemente la actividad de LevS probablemente debido a un efecto en la estabilidad,

mientras que la eliminación de la región C-terminal modifica la relación hidrólisis/transferencia de la enzima, disminuyendo de forma importante la transfructosilación (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros bioquímicos, cinéticos y producto de reacción de las versiones truncadas de LevS

VERSIÓN DE LevS	ACT. ESP.	POLIMERO PRODUCIDO	RELACIÓN H/T
LevS (WT)	5 U/mg	Levana Alto PM	39/61
LevS SCT	0.28 U/mg	Levana Alto PM	72/28
LevS SNT	N/D	Levana Alto PM	N/D
LevS Cat	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad

El análisis de la secuencia de LevS mostró que la región de transición presente en el dominio C-terminal contiene una secuencia con identidad a un dominio de unión glucano presente en glucansacarasas, que podría estar involucrado en la unión al polímero sintetizado. Un modelamiento de esta región de transición mostró un plegamiento tipo solenoide con presencia de residuos aromáticos, características típicas de un módulo de unión a carbohidratos (CBM), (Figura 3) (3).

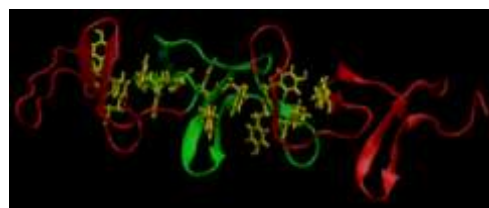


Fig. 3. Modelamiento de la región de transición de LevS.

Conclusiones. Los dominios adicionales de LevS no son esenciales para la catálisis. Sin embargo, la región N-terminal parece estar relacionada con la estabilidad de la enzima, mientras que la región C-terminal afecta la capacidad de la enzima para transfructosilar eficientemente, probablemente debido a la interacción de esta región con el polímero sintetizado, funcionando como un CBM.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado a través del proyecto CONACyT CB-SEP No 219728

Bibliografía.

1. Chambert R, Treboul G, Dedonder R. 1974. *Eur J Biochem.* 41(2):285-300.
2. Morales-Arrieta S, Rodríguez ME, Segovia L, López-Munguía A, Olvera-Carranza C. 2006. *Gene.* 376(1):59-67.
3. Notenboom V, Boraston AB, Chiu P, Freelove AC, Kilburn DG, Rose DR. 2001. *J Mol Biol.* 314(4):797-806.