



EL DOMINIO C-TERMINAL DE LA DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* ESTA INVOLUCRADO EN LA ASOCIACION DE LA ENZIMA A LA PARED CELULAR.

, Jose Luis Fernández, Luis Ledezma, Fernando González, Agustín López Munguía. Instituto de Biotecnología, UNAM, Departamento de Ingeniería celular y biocatálisis. Ave Universidad 2001. Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. e-mail: clarita@ibt.unam.mx

Palabras clave: Glucosiltransferasas, Dextranacarasas, Leuconostoc, asociación celular.

Introducción. Las dextranacarasas son enzimas que catalizan la transferencia de un residuo de glucosilo de una molécula de sacarosa a una molécula aceptora que pueden ser: otra molécula de sacarosa, un alcohol primario o un polímero en crecimiento, denominado glucano. Estas enzimas son producidas por microorganismos ácido lácticos, principalmente por bacterias del género *Leuconostoc*. Las dextranacarasas tienen un peso molecular promedio 160 kDa y están constituidas de una región variable N-terminal, un dominio catalítico y una región C-terminal. En la región C-terminal se encuentran secuencias repetidas, las cuales se propone, están involucradas en el pegado a polímero. Sin embargo, estas repetidas tienen similitud con secuencias repetidas de diversas proteínas de unión a pared celular como LytA de *Streptococcus pneumoniae* y ToxA de *Clostridium difficile*. Nuestro trabajo se enfoca en determinar si la región C-terminal de las dextranacarasas típicamente asociada a células es la responsable del anclaje a la pared celular y si esta propiedad nos ayudaría a desarrollar un nuevo sistema de inmovilización de proteínas a la pared celular.

Metodología. El gen (*dsrP*) que codifica para la dextranacarasas de *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ fue aislado, clonado y secuenciado mediante técnicas de biología molecular. La expresión heteróloga de esta enzima se llevó a cabo en *E. coli* con el sistema de expresión pBAD/TOPO Thiofusion (invitrogen). La actividad DsrP fue determinada por el poder reductor liberado de la sacarosa utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Los ensayos de pegado a pared se llevaron a cabo utilizando células de *Leuconostoc* no inducidas (crecidas en xilosa) y DsrP y DsrE nativas purificadas con urea 6M y DsrS se obtiene de sobrenadante de cultivo. Las condiciones de contacto fueron: 1 U/ml enzima contra 2.5 mg de proteína celular durante 12hrs a 4°C. Después del contacto las células fueron lavadas y se determinó la actividad DsrP.

Resultados y discusión. El gen que codifica para dextranacarasas DsrP fue aislado, clonado y secuenciado. La expresión heteróloga y la caracterización de la enzima recombinante nos confirmó que el gen aislado codifica para una dextranacarasas. El análisis de la secuencia aminoacídica nos reveló que esta enzima tiene un 94% de identidad con la DsrT una dextranacarasas inactiva debido a una delección de la región C-terminal, presente en el genoma de *L. mesenteroides* B512F. Comparando la región C-terminal de la DsrP encontramos que existen 5 secuencias repetidas con homología a las presentes en la

región de unión a pared de LytA, de forma interesante estas secuencias también se encuentran conservadas en la DsrE, otra enzima reportada como asociada a la pared, y no están presentes en las dextranacarasas típicamente extracelulares como la DsrS de *L. mesenteroides* B 512F. Con base en estos descubrimientos sugiere la hipótesis de que la región C-terminal está implicada en la asociación a la pared celular de estas enzimas. Basados en esta hipótesis realizamos ensayos de pegado a pared celular de las enzimas DsrP, DsrE y DsrS, utilizando enzima purificada y poniéndolas en contacto con células de *L. mesenteroides* no inducidas (carentes de actividad dextranacarasas), para determinar si las enzimas eran capaces de unirse a la pared celular. En la fracción celular encontramos a las enzimas DsrP y DsrE, mientras la enzima DsrS se mantuvo siempre en la fracción soluble. Estos resultados muestran que las enzimas DsrP y DsrE fueron capaces de unirse de nuevo a la pared celular de *L. mesenteroides*, sin embargo la enzima DsrS no fue capaz de unirse a las células. Con el objetivo de demostrar si la región C-terminal es la responsable de la unión a la pared celular de la DsrP, se construyó una enzima mutante carente de esta región fusionada a un tag de histidinas. Se llevó a cabo el ensayo de contacto utilizando la mutante DsrP- sin C-terminal con células de *L. mesenteroides* no inducidas, identificando a la enzima mutante mediante Western Blot utilizando anticuerpos anti-His. La enzima mutante carente del C-terminal fue incapaz de unirse a la pared celular sugiriendo que esta región es necesaria para la asociación de la enzima a las células. Con el fin de conocer la capacidad que tiene DsrP para unirse a la pared celular realizamos ensayos de rendimiento de unión a la pared celular donde observamos que alrededor de 50% de las enzimas es capaz de unirse a la pared celular. Actualmente se llevan a cabo análisis de fusión de la región C-terminal de la DsrP con genes reporteros para determinar si esta región pudiera ser utilizada como un nuevo tag para inmovilizar células en superficie.

Conclusiones. La dextranacarasas DsrP es capaz de unirse a la pared celular y este anclaje pudiera estar llevándose a cabo mediante la región C-terminal de la enzima. Este sistema de anclaje es utilizado por otras enzimas asociadas a células (DsrE). La región C-terminal de estas enzimas podría ser usada para desarrollar métodos de inmovilización de enzimas a la pared celular.

Agradecimientos. A Ma Elena Rodríguez por su apoyo técnico y al proyecto PAPIIT No IN228006.