

FUNCION Y CONSECUENCIAS DEL C-TERMINAL DE LA INULOSACARASA (IslA) DE *Leuconostoc citreum*

Sandra T. del Moral Ventura, Clarita Olvera Carranza y Agustín López-Munguía Canales. Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca.Mor., C.P. 62210. Tel (777) 329 1609, Fax (777) 311 4903, sandit@ibt.unam.mx

Palabras clave: C-terminal, inulosacarasa, *Leuconostoc*

Introducción: La inulosacarasa y levansacarasa son fructosiltransferasas (FTF) que sintetizan polímeros de inulina y levana, respectivamente. El peso molecular (PM) de la mayor parte de estas enzimas oscila entre 45-90 kDa y están constituidas únicamente por un dominio catalítico con un plegamiento tipo β -propela. En 2002 se aisló del pozol una inulosacarasa (IslA) con actividad asociada a células de *Leuconostoc citreum* con un PM de 165 kDa. La IslA es una enzima quimérica ya que presenta dos dominios con alta identidad a la alternansacarasa (ASR, una glucosiltransferasa) de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 ubicados en el C y N-terminal de la enzima ⁽¹⁾. Este mismo fenómeno lo encontramos en otras 4 FTF, las cuales forman una nueva subfamilia de FTF ⁽²⁾. Con el fin de determinar la función de los dominios adicionales en la actividad enzimática de la IslA se construyeron tres versiones truncadas (Fig 1).

Metodología: Se clonaron y expresaron los genes que codifican para las versiones truncadas de la IslA en el vector pBAD/TOPO inducible por L-arabinosa. Las formas truncadas fueron purificadas por cromatografía de afinidad por Ni⁺². La determinación de actividad se realizó con 100 g/L sacarosa en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 y CaCl₂ 1 mM por medio de DNS. Los ensayos de estructura secundaria y terciaria se realizaron por medio de fluorescencia y dicroísmo circular (DC).

Resultados y discusión: La comparación de diversos parámetros bioquímicos de las formas truncadas tales como: pH óptimo, estructura y tamaño del polímero producido, no mostró diferencias, indicando que el N- y C-terminal no intervienen ni en tipo de enlace ni en la elongación del polímero. Sin embargo, la temperatura óptima y la estabilidad disminuyeron como consecuencia de las eliminaciones del N y C-terminal, por lo que se sugiere que las regiones adquiridas confieren estabilidad a la enzima. Otro parámetro evaluado fue la relación transferencia/hidrólisis en el mecanismo de reacción, la cual también disminuyó como consecuencia de las supresiones. El aumento de la capacidad hidrolítica de la enzima podría deberse a la modificación del

microambiente, donde la supresión del C- y N- terminal aumentan la accesibilidad e hidrofiliidad del bolsillo catalítico y por ende su capacidad hidrolítica. Esto sugiere que las regiones adquiridas no sólo están relacionadas con la estabilidad sino que también podrían funcionar como barreras difusionales hacia el sitio activo modificando la tasa de hidrólisis. Una manera de comprobar esta hipótesis fue a través del análisis de los parámetros cinéticos de las versiones truncadas, los cuales indican que a pesar de que se pierde afinidad por el sustrato hay un aumento de la kcat, probablemente por la facilidad con la que los sustratos accedan al sitio activo. La IslA así como sus versiones truncadas son dependientes del ión calcio y otra evidencia a favor de esta hipótesis se observa en el comportamiento de la sustracción del ión calcio. Efectivamente, la dificultad para sustraer al ión Ca⁺² con EDTA aumentó con el tamaño de la enzima. Estudios de fluorescencia y DC indicaron que en ausencia de calcio, la EIS4 pierde parte de su estructura terciaria generando una estructura mas laxa que dificulta la catálisis, aunque el plegamiento original se recupera cuando se reincorpora calcio. Además los análisis de estructura secundaria y terciaria de las enzimas de mayor PM (ESI2 y ESI3) en ausencia de calcio, indicaron que las regiones adicionales evitan el desplegamiento, proporcionando una mayor rigidez y estabilidad a la estructura: de esta manera también se demuestra que el C-terminal proporciona estabilidad. Con el fin de determinar si los dominios adquiridos de la IslA participan en el anclaje de la enzima a la pared celular, se puso en contacto la IslA y la EIS3 con células de *L. citreum* sin actividad FTF. Se observó que la IslA se “ancla” a las células a través del C-terminal, ya que la ESI3 no se unió a las células. Con estos resultados se puede suponer que el C-terminal además de estabilizar a la enzima y funcionar como barrera difusional, actúa como medio de anclaje.

Conclusiones: A través de los resultados obtenidos se concluye que las regiones adquiridas funcionan como dominios estabilizadores y actúan como barrera difusional hacia el sitio activo, afectando al mecanismo de reacción. Además los resultados de “anclaje” demuestran que la enzima se asocia a las células a través del C-terminal, por lo que funciona como dominio de unión a células.

Bibliografía:

- Olivares-Illana V, Olvera C and López-Munguía A. (2004). Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *J Bacteriol.* 2003 Jun;185(12):3606-12.
- Olvera C, Centeno-Lejía S, López-Munguía A. (2006). Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie Van Leeuwenhoek.* [Epub ahead of print]

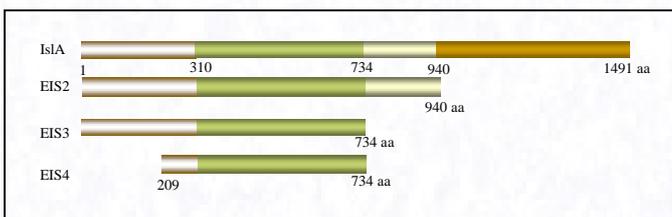


Fig. 1. Esquema de las tres versiones truncadas de la IslA. GBD: Región de Unión a Glucano