

MODULACION DE LA ESPECIFICIDAD DE ENDOPOLIGALACTURONASA II DE *Aspergillus niger*.

Blanca Trejo-Aguilar, Jacques Benen, Jaap Visser y Guillermo Aguilar., Facultad de Química, Laboratorio 312, Conjunto E, UNAM. 5622-5306, Section of Functional Genomics Wageningen University, The Netherlands. gao@servidor.unam.mx

Palabras clave: *endopoligalacturonasa*, *procesividad*, *Aspergillus*.

Introducción: Las poligalacturonasas (PGs) pertenecen a la familia 28 de la clasificación general de las glicosilhidrolasas⁽¹⁾. Estas enzimas hidrolizan los enlaces ??1,4 de la cadena de ácido galacturónico en la región del homogalacturonano de la pectina. Existen dos tipos de PGs que hidrolizan el homogalacturonano: las enzimas con actividad endo (E.C. 3.2.1.15) y las enzimas con actividad exo (E.C. 3.2.1.67). Las endo enzimas atacan la cadena del polímero al azar, en contraste con las enzimas de tipo exo las cuales atacan el polímero por el extremo no reductor. La caracterización de siete endoPGs secretadas por *A. niger* indican que cada enzima posee funciones enzimáticas y fisiológicas específicas, una de estas características es la *procesividad* observada en endo PGI, A y C.⁽²⁾ La *procesividad* fue descrita por Robyt y French⁽³⁾ y se caracteriza por el ataque múltiple de la enzima a una sola cadena del sustrato, el rompimiento inicial es seguido de la liberación de una parte del sustrato y de la retención de un fragmento de polímero que puede ser re-atacado múltiples veces. Entre los aminoácidos constituyentes del sitio de unión al sustrato, en las enzimas *no procesivas* se observa consistentemente un residuo de Serina mientras que un residuo de Arginina esta presente en la misma posición en las enzimas *procesivas*. Como el ácido poligalacturónico empleado como sustrato esta cargado negativamente, una fuerte interacción con la enzima en este residuo puede ser la causante de la *procesividad*. Para probar esta hipótesis se han preparado diversas enzimas mutantes ,PGII S91D, PGII S91E, PGII S91DN186E y PGII S91EN186E.

Metodología: Las mutaciones fueron realizadas utilizando QuickChangeTM kit para mutagénesis dirigida (Stratagene, La Jolla CA USA) y oligonucleotidos sintéticos (Isogene, Maarsen, The Netherlands) como es descrito en trabajos previos⁽²⁾ *A. Níger* NW188 fue empleada para la transformación, los plasmidos pki-pgaII fueron empleados con las diferentes mutaciones todos fueron secuenciados para checar la introducción de la mutación deseada.

Resultados y discusión: La *procesividad* puede ser determinada a partir de la progresión de productos durante la hidrólisis del polímero. El perfil de productos de la endo PGII silvestre, está caracterizado por una acumulación de oligogalacturonidos con grado de polimerización (DP) <5 seguido por la acumulación de oligogalacturonidos y ácido galacturónico (GalpA). Este perfil es típico de enzimas con acción endo aleatoria, por lo cual la PGII es considerada *no procesiva*. Empleando mutagénesis dirigida se modificaron aminoácidos localizados en la región de reconocimiento al

sustrato de la PGII de *A. niger*, las mutantes generadas son;

| Sustrato | WT | N186E | S91E | S91E N186 | S91D | S91D N186E |
|----------|-----|-------|------|--------------|------|---------------|
| B15 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| B34 | 65 | 117 | 52 | 46 | 58 | 62 |
| F31 | 72 | 105 | 31 | 37 | 60 | 78 |
| B43 | 69 | 118 | 27 | 32 | 63 | 53 |
| F43 | 64 | 135 | 43 | 45 | 56 | 53 |
| P46 | 94 | 157 | 82 | 61 | 78 | 67 |
| F58 | 52 | 83 | 20 | 24 | 43 | 47 |
| P60 | 72 | 115 | 56 | 40 | 74 | 73 |
| F69 | 33 | 69 | 16 | 24 | 30 | 33 |
| P70 | 35 | 47 | 39 | 67 | 32 | 38 |
| E81 | 5 | 27 | 11 | 17 | 12 | 11 |

S91E,S91EN186E,S91D y S91DN186E.

Tabla 1. Efecto del cambio de un aminoácido sobre la actividad de PG II medida con sustratos de diferente grado de esterificación.

Diversos sustratos con diferentes grados de metilesterificación fueron empleados para investigar el efecto de las mutaciones. La distribución de los grupos metilo en las pectinas usadas da como resultado diferentes actividades relativas. Las pectinas P (des-esterificadas en bloque) son preferidas sobre las otras, y en S91E es mas evidente el efecto. Al emplear pectina E81 la enzima silvestre muestra una actividad muy baja, pero en las enzimas mutantes se observa un ligero aumento. Los datos muestran baja tolerancia de las enzimas (PGII WT y mutantes) a sustratos metilesterificados. Esta en proceso la evaluación de las frecuencias de rompimiento para evaluar la influencia de las mutaciones SE y SD.

Conclusiones: Las curvas de progresión muestran que las enzimas mutantes SD y SE se comportan como *procesivas*; sin embargo, las mutantes dobles SDNE y SENE no son *procesivas*, aparentemente el cambio NE es dominante como se observa en la enzima mutante NE.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por la Comunidad Europea, QRLT 1999-00089. y CONACyT

Bibliografía:

- Henrissat,B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280, 309-316.
- Bussink, H.J.D., Kester H.C.M. and Visser J. (1990). Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonase II of *Aspergillus niger*. *FEBS Lett.* 273, 127-130.

3. Robyt, J.F. and French, D. (1970) Multiple attack and polarity of action of porcine pancreatic α -amylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 138,662-670.