



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

**Función de las regiones adicionales de la
inulosacarasa (IsIA) de *Leuconostoc citreum* CW28.**

TESIS

que para obtener el grado académico de:
Doctora en Ciencias

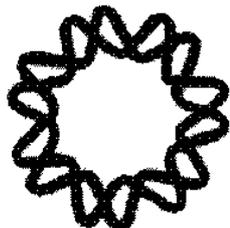
Presenta:

M. en C. Sandra Trinidad del Moral Ventura

Tutor:

Dra. Agustín López-Munguía Canales.

Cuernavaca, Mor., Septiembre de 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el **Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis** del **Instituto de Biotecnología-UNAM** bajo la dirección del **Dr. Agustín López-Munguía Canales** y colaboración de la Dra. Clarita Olvera Carranza.

A **Dios**

A mis **padres**, Efrén y Olivia por la paciencia, el amor, el apoyo
y simplemente por dejarme ser libre.

A **Paolo**, mi rey de chocolate....por ser la maquinita
que impulsa y le da vida a mis días.

A **César**.....por ser mi compañero durante todos estos años y
por darme lo más valioso que tenemos, a Paolo. TQM.

A mi **hermano** Ernesto por compartir el idealismo, el mismo
entusiasmo de nunca dejar de aprender y por esas pláticas
tontas en las que solemos reír mucho.

A mis **abues**, principalmente a mi Abuelita Trini por los
muchos gratos momentos que compartimos, por hacer de mi
niñez una etapa inolvidable y por el amor que me dieron.
Donde quieran que estén....gracias.

A la **familia García Reyes**, por compartir a Betito.

A mis **suegros**, Don Beto y Doña Carmen.

Agradecimientos

Al Dr. Agustín López por su paciencia, por sus enseñanzas y por brindarme la oportunidad de colaborar en su grupo de trabajo.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza por su amistad, por su paciencia y por enseñarme que la tenacidad es la mejor manera de obtener las cosas.

Al comité tutorial por su entusiasta participación en el desarrollo de este proyecto:

Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

Dr. Enrique Rudiño Piñeira.

Al jurado revisor de tesis por sus muy acertados comentarios, críticas y sugerencias:

Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Dra. Amelia Farres González Saravia.

Dra. Brenda M. Valderrama Blanco.

Dr. Jesus Caballero Mellado.

Dr. Lorenzo P. Segovia Forcella.

Al T.L. Fernando González por el extraordinario apoyo técnico y a la T.L. Aurelia Ocampo por toda la ayuda brindada.

A Verónica Aldama por la ayuda administrativa que siempre me brindó.

A las (os) López: Arlette (Werita), María, Chelo, Fer, Alex (..inche pato), Angela, Edmundo, Male, Sara, Poncho, Anabel, Edith, Clarita, Andrés, Gabriel y a los que ya no están Ericka, Sandra y Rubén; gracias por su amistad y por la ayuda con Paolo.

A las arpiás por el aquelarre!

A mis amigos Melchy y JC por compartir todos estos años... desde el examen de admisión, los exámenes de candidatura, los tutorales, etc....

A Lolita, por no solo ser mi cuñada, sino mi amiga.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (169929) por los apoyos económicos otorgados.

2.1. Hipótesis.....	36
2.2. Objetivos.....	36
2.2.1. Objetivo general.....	36
2.2.2. Objetivos específicos.....	36
CAPITULO 3	37
3. Materiales y métodos.....	37
3.1. Material biológico	37
3.1.1. Cepas utilizadas	37
3.2. Medios y condiciones de cultivo.....	37
3.3. Técnicas de biología molecular.....	39
3.3.1. Purificación de ADN plasmídico.....	39
3.3.2. Amplificación de fragmentos de ADN (PCR).....	39
3.3.2.1. Clonación de las versiones truncadas	40
3.3.3. Transformación en <i>E. coli</i>	41
3.3.4. Secuenciación.....	42
3.3.5. Análisis de las secuencias.....	42
3.3.6. Sobreexpresión y obtención de las versiones truncadas de la IsIA de <i>L. citreum</i> CW28 en <i>E. coli</i>	42
3.4. Técnicas enzimáticas y bioquímicas.	43
3.4.1. Producción de glicosiltransferasas de <i>Leuconostoc</i>	43
3.4.1.1. Eliminación de ADN del extracto enzimático de la IsIA.....	43
3.4.2. Producción de células de <i>Leuconostoc</i> sin actividad glicosiltransferasas. ..	44
3.4.2.1. Pegado de las glicosiltransferasas a las células de <i>L. citreum</i> CW28 y <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-1355	44
3.4.3. Determinación de la actividad enzimática fructosiltransferasa.....	44
3.4.4. Purificación de proteínas recombinantes.....	45
3.4.5. Cuantificación de proteína.....	45

3.4.6. Electroforesis de proteínas.....	45
3.4.7. Determinación de propiedades cinéticas de las versiones truncadas	46
3.4.8. Determinación del efecto del pH, temperatura y estabilidad de las versiones truncadas con actividad FTF.....	47
3.4.9. Determinación de la relación hidrólisis/transferencia de las versiones truncadas con actividad FTF.....	48
3.4.10. Producción y análisis del polímero.....	49
3.4.11. Fluorescencia.....	50
3.4.12. Dicroísmo Circular.....	50
3.4.13. Absorción ATComica.....	50
CAPITULO 4.	
4. Resultados y discusión.....	52
4.1. Subclonación de las versiones truncadas de la inulosacarasa de <i>L. citreum</i> CW 28.....	52
4.2. Caracterización bioquímica de las versiones truncadas.....	54
4.2.1. Determinación de termoestabilidad y efecto de la temperatura en la actividad.....	54
4.2.2. Efecto del pH en la actividad.....	57
4.2.3. Caracterización del polímero.....	58
4.3. Determinación de las constantes cinéticas de las versiones truncadas.....	62
4.4. Determinación de la relación hidrólisis/transferencia de las versiones truncadas.....	65
4.5. Efecto de las regiones adicionales en la difusión del calcio.....	68
4.6. Cambios estructurales influenciados por la ausencia y presencia de calcio en la IslA y las versiones truncadas.....	71
4.7. Anclaje de la IslA a las células de <i>L. citreum</i> CW28.....	76
Conclusiones.....	80
Perspectivas.....	81
Bibliografía.....	82
Anexo 1.....	83

Índice de tablas

Tabla 1.1. Características importantes de algunas FTFs bacterianas.....	9
Tabla 1.2. Secuencias repetidas en el dominio C-terminal de las glucosiltransferasas....	25
Tabla 1.3. Mecanismo de unión propuesto para las GTFs asociadas a células.....	28
Tabla 2.1. Composición del medio de cultivo para la producción de glucosiltransferasas de especies de <i>Leuconostoc</i>	38
Tabla 2.2. Medio Luria Bertani	38
Tabla 2.3. Medio SOC.....	39
Tabla 2.4. Condiciones de amplificación de los fragmentos de ADN.....	40
Tabla 2.5. Oligonucleótidos utilizados.	40
Tabla 2.6. Vectores empleados y generados en este trabajo.....	41
Tabla 4.1. Estabilidad térmica de las versiones truncadas de la IsIA.	55
Tabla 4.2. Desplazamientos químicos de los carbonos del polímero producido por las versiones truncadas de la IsIA.....	60
Tabla 4.3. Propiedades cinéticas de la IsIA y las versiones truncadas.....	62
Tabla 4.4. Relación hidrólisis/transferencia de las versiones truncadas de la IsIA.....	66
Tabla 4.5. Motivos de unión a la pared celular propuestos de las glucosiltransferasas...	79

Índice de figuras

Fig. 1.1. Reacciones que son catalizadas por las FTFs bacterianas.....	7
Fig. 1.2. Esquema de la estructura general de las fructosiltransferasas bacterianas.	11
Fig. 1.3. Vistas ortogonales de la β -propela.....	13
Fig. 1.4. Pocket catalítico de SacB	14
Fig. 1.5. A. Comparación estructural de la rafinosa con la estructura de SacB E322A.....	15
Fig. 1.6. Densidad electrónica del sitio probable de unión a Ca^{2+} de SacB	16
Fig. 1.7. Esquema del mecanismo Ping-Pong Bi-Bi propuesto para SacB.....	18
Fig. 1.8. Mecanismo de formación del complejo fructosil-enzima.....	19
Fig. 1.9. Representación esquemática de la secuencia de reacciones que ocurren en el sitio activo de las FTFs.	21
Fig. 1.10. Esquema de la estructura general de las glucosiltransferasas.....	24
Fig. 1.11. Secuencia del GBD de DsrP, las repetidas A se marcan en rectángulos y los motivos ChBr o CW en negritas. (Olvera y col., 2007).....	27
Fig. 1.12. Comparación de las secuencias repetidas del C-terminal de la DsrP y de las ChBr de LytA, la secuencia consenso se muestra en negritas (Olvera y col., 2007).....	27
Fig. 1.13. Esquema de las FTFs de <i>Leuconostoc</i> spp.....	30
Fig. 1.14. Análisis filogenético del dominio catalítico(A) y del C-terminal (B) de 20 diferentes FTFs	32
Fig. 1.15. Glicosil Hidrolasas. A. β -glucoronidasa B. β -galactosidasa. El domino de color rojo es el catalítico (Bashton y Cothia, 2007).....	34
Fig. 4.1. Esquema de la IsIA y de las versiones truncadas	52
Fig. 4.2. Purificación de las versiones truncadas de la IsIA.....	53
Fig. 4.3. Efecto de la temperatura en la actividad de las versiones truncadas.	56
Fig. 4.4. Distribución del PM de los polímeros producidos por la IsIA y algunas de sus versiones truncadas.....	59
Fig. 4.5. Espectro de ^{13}C -RMN del polímero producido por las versiones truncadas de IsIA	61

Fig. 4.6. Efecto de la concentración del sustrato en la velocidad de reacción de las versiones truncadas.....	63
Fig. 4.7. Especificidad de las versiones truncadas a diferentes concentraciones de sacarosa	66
Fig. 4.8. Efecto de diversos iones monovalentes y divalentes sobre la actividad de la Isla4	68
Fig. 4.9. Efecto de la incubación del EDTA en la actividad de la Isla y las formas truncadas	70
Fig.4.10. Cinética de desplegamiento de la Isla4 por fluorescencia	74
Fig. 4.11. Modificaciones estructurales de la Isla y las formas truncadas provocadas por EDTA y Ca^{2+} medida a través de fluorescencia intrínseca.....	75
Fig. 4.12. Espectros de DC de las modificaciones estructurales de la Isla4, Isla3 e Isla mediada por EDTA y Ca^{2+}	75
Fig. 4.13. Ensayos de unión de la Isla (a) e Isla3 (b) las células de <i>L. citreum</i> CW28 sin inducir	76
Fig. 4.14. Western de la unión del GBDIsla a las células de <i>L. citreum</i> CW28.....	77
Fig. 4.15. Anclaje de la Isla a células de <i>L. citreum</i> CW28 sin actividad FTF.	77

Índice de abreviaciones

Asr	Alternansacarasa
CW	Repetidas CW
FOS	Fructooligosacáridos
FTF	Fructosiltransferasas
GBD	Región de unión a glucano (Glucan binding domain, por sus siglas en inglés)
GH	Glicosil hidrolasas
GP	Grado de polimerización
GTF	Glucosiltransferasas
GW	Repetidas GW

Resumen

Las fructosiltransferasas sintetizan polímeros de fructosa: inulina o levana, producidos por inulosacarasas y levansacarasas, respectivamente. La inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 es una enzima multi-dominio de 165 kDa, que pertenece a una nueva subfamilia de fructosiltransferasas (FTFs), que contienen dominios adicionales en los extremos N y C terminal con alta identidad a las glucosiltransferasas (GTFs). La función de tales dominios es desconocida en esta nueva subfamilia de FTFs. En este trabajo se estudió la función de estos dominios a través de la construcción de versiones truncadas a las que se les eliminó el extremo N y/o C-terminal y de la construcción del dominio C-terminal. Se demostró que el extremo C-terminal está relacionado con el anclaje de la enzima a la pared celular. La eliminación de las regiones adicionales, principalmente la región de transición, afecta la estabilidad, la tasa de transferencia y las propiedades cinéticas y bioquímicas. La accesibilidad de moléculas tales como el EDTA hacia el sitio catalítico (donde se localiza un sitio de unión a Ca^{2+}) también se afectó, principalmente con la eliminación de la región de transición, ya que se requirió concentraciones 100 veces más altas de EDTA para inactivar a la IsIA con respecto a la requerida para inactivar la forma de menor peso molecular (IsIA4). Es probable que los dominios adquiridos interactúen con el dominio catalítico dando lugar a una nueva conformación más estable y más específica hacia la reacción de transferencia. A partir de estos resultados, es posible no solo tener una explicación de la función de los dominios adicionales en FTFs, sino incluso, emplear la misma estrategia para la construcción de FTFs quiméricas con el fin de modular su catálisis y proporcionar estabilidad.

Summary

Inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28 belongs to a new subfamily of multi-domain fructosyltransferases (FTFs), that containing additional domains from glucosyltransferases. It is not known what the function of the additional domains in this subfamily is. Through construction of truncated versions we demonstrate that the acquired regions are involved in anchoring IsIA to the cell wall (C-terminal domain); they also confer stability to the enzyme, mostly the transition region, generating a larger structure that affects its kinetic properties and reaction specificity, particularly the hydrolysis and transglycosylase ratio. The accessibility of large molecules such as EDTA to the catalytic domain (where a Ca^{2+} binding site is located) is also affected, mostly by the transition region, demonstrated by the requirement of 100 times higher EDTA concentrations to inactivate IsIA with respect to the smallest truncated form (IsIA4). The C-terminal domain may have been acquired to anchor inulosucrase to the cell surface. Furthermore, the acquired domains in IsIA interact with the catalytic core resulting in a new conformation that renders the enzyme more stable and switch the specificity from a hydrolytic to a transglycosylase mechanism. Based on these results, chimeric constructions may become a strategy to stabilize and modulate biocatalysts based on FTF activity.

Introducción

Las fructosiltransferasas a partir de la sacarosa sintetizan polímeros de fructosa (fructana) con enlace β (2-1): inulina o β (2-6): levana (actividad transferasa), pueden hidrolizar la sacarosa (actividad hidrolítica) o en presencia de otra molécula aceptora diferente al agua y al sustrato, como azúcares o alcoholes, pueden formar fructósidos.

Tanto las fructanas como los FOS tienen características prebióticas por lo que son utilizados a nivel industrial en diversos alimentos. Las fructanas son sintetizadas por plantas, hongos y bacterias, en las primeras se requiere de la acción concertada de diversas FTFs, en cambio en hongos y bacterias solo se requiere de una enzima.

Existen diversas FTFs bacterianas, principalmente levansacarasas, cuya producción se da tanto en bacterias Gram positivas como negativas, mientras que las inulosacarasas solo son producidas por bacterias Gram positivas: *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Estructuralmente, las FTFs de bacterias Gram negativas están constituidas por un dominio catalítico con pesos moleculares de 45-60 kDa; en contraste, las FTFs de bacterias Gram positivas presentan dominios adicionales lo que hace que alcancen pesos moleculares de hasta 170 kDa.

Hace algunos años, en el laboratorio de Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM, se aisló de *L. citreum* CW28 una inulosacarasa (IsIA) de 165 kDa con actividad asociada a células. El análisis de su estructura primaria indicó que es una FTF con regiones adicionales con alta similitud a Asr una glicosiltransferasa (GTF) de *L. mesenteroides* NRRL B-1355. Las GTFs y las FTFs son transferasas que emplean el mismo sustrato: sacarosa, solo que las GTFs transfieren el residuo glicosilo de la sacarosa y por lo tanto forman un polímero de glucosa (glucano), mientras que las FTF transfieren el residuo de fructosa y por lo tanto forman un polímero de fructosa.

Más recientemente, se aislaron en el mismo laboratorio otras FTFs de *Leuconostoc* spp., esta vez levansacarosas, con la misma organización molecular que Isla; es decir, que el dominio catalítico de estas FTFs está rodeado por regiones/dominios con similitud a las mismas regiones de las GTFs de *Leuconostoc* spp. Esto dio como resultado la integración de una nueva subfamilia de FTFs mosaico (Olvera y col., 2007).

Con la finalidad de obtener información sobre el posible papel de estas regiones adicionales en la función de la Isla, en este trabajo se llevó a cabo el análisis del comportamiento cinético y bioquímico de versiones truncadas en los dominios adicionales. Se analizó también el efecto de la eliminación de las regiones adicionales en la estructura terciaria y secundaria, cuando se sustrae el Ca^{2+} (cerca al sitio activo). Además, se analizó el papel del dominio C-terminal en la unión de la enzima a la pared celular.

En el primer capítulo se describe la importancia de las fructanas a nivel industrial, la organización molecular, así como el mecanismo de acción de las FTFs. Se hace una breve reseña de las principales características de las GTFs y la importancia del dominio C-terminal en el anclaje a la pared celular. Se describen ejemplos de cómo se generan nuevas funciones con la incorporación de dominios a enzimas unidominio. En la segunda sección de la tesis se describen los materiales y métodos empleados y finalmente en el cuarto capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en este trabajo.

1. Generalidades

1.1. Las fructanas y sus aplicaciones.

Las fructanas o polifruetosilsacarosas son polímeros de fructosa sintetizados principalmente de sacarosa, cuya estructura consiste de una glucosa inicial unida a múltiples unidades de fructosa. Existen dos tipos principales de fructanas: inulina y levana. La inulina es un polímero lineal con enlaces $\beta(2-1)$ en la cadena principal y $\beta(2-6)$ en la ramificada mientras que la levana presenta enlaces $\beta(2-6)$ en la cadena principal y $\beta(2-1)$ en la cadena secundaria. El porcentaje de ramificación de la fructana dependerá de la enzima productora.

Las fructanas y principalmente los fructooligosacáridos (FOS, cadenas de fructosa con grado de polimerización (GP) menor a 10), son considerados como nutraceuticos. Los nutraceuticos son alimentos o componentes de alimentos que además de nutrir al cuerpo, contienen ingredientes que desempeñan una actividad específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, favoreciendo la salud. En ese sentido, las fructanas se han caracterizado por su función prebiótica (alimentos que promueven el crecimiento de bacterias bifidogénicas en el intestino), siendo actualmente el componente mas importante de los alimentos funcionales. Las fructanas son parte de la dieta normal humana, ya que se encuentran en muchas plantas como: cereales (trigo, cebada, avena) y vegetales (chicoria, cebolla, puerros o poros, ejotes, alcachofa) entre otras.

Se han realizado múltiples estudios acerca de los efectos de la inulina y de los FOS en la salud humana y en la animal. Los reportes indican que al reemplazar la grasa por inulina en una dieta occidental típica se incrementa la población de bifidobacterias (Kaur y Gupta, 2002). Así mismo, se ha encontrado que un suplemento de oligosacáridos en la dieta, disminuye la po-

blación de bacterias patógenas (bacteroides, clostridia y fusobacteria) (Gibson y col., 1995). Aunado a su efecto bifidogénico, se ha demostrado una influencia directa positiva en la absorción de minerales (particularmente Ca^{2+} y Mg^{2+}), además, se ha encontrado que decrece los niveles de triglicéridos, fosfolípidos y lipoproteínas de baja densidad debido a que disminuye la lipogénesis de novo en hígado.

Por todas estas razones, la inulina es utilizada como sustituto de grasas en yogurts, quesos, helados (Vijn y Smeekens, 1999). Los FOS de GP 3-6 tienen ligero sabor dulce, por lo que se usan como edulcorantes naturales en postres, gelatinas, pasteles y fórmulas para bebés (Roberfroid, 2000). Por otra parte la levana se usa en cosméticos, como goma industrial, sustituto de plasma sanguíneo y edulcorante. También se ha propuesto que puede actuar como emulsificante, estabilizante, espesante y acarreador de fragancias y sabores (Han, 1990).

1.2. Las fructosiltransferasas

Las fructosiltransferasas (FTFs) (E.C. 2.4.1.) o fructansacarasas, transfieren el residuo fructosilo de la sacarosa, a una molécula aceptora, que puede ser a una cadena de alto peso molecular, sintetizando fructana (actividad transferasa); una molécula de agua, provocando la hidrólisis de la sacarosa (actividad hidrolasa) o hacia carbohidratos de bajo peso molecular sintetizando fructooligosacáridos como se muestra en la fig. 1.1.

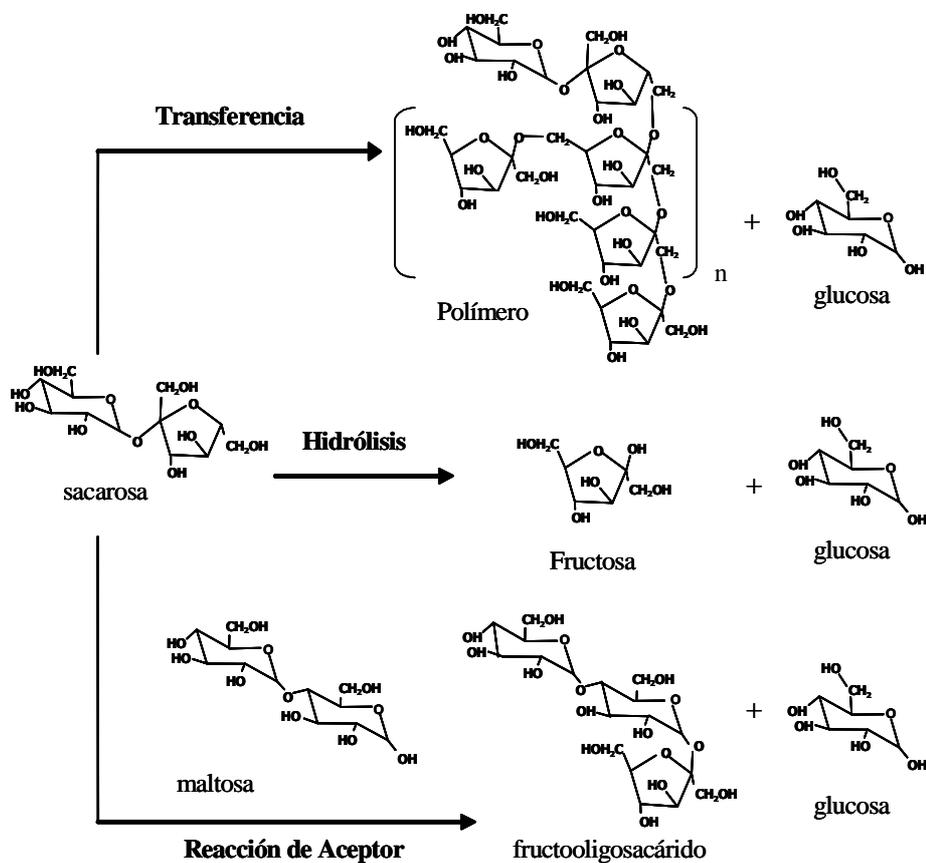


Fig. 1.1. Reacciones catalizadas por las FTFs bacterianas.

En la naturaleza, las FTFs son producidas por alrededor del 15% de las plantas superiores, por algunos hongos y numerosas especies bacterianas. Las fructanas en plantas tienen acción crioprotectora además de prevenir la desecación, mediante la acción concertada de diversas FTFs para la síntesis de fructanas; la primera enzima de la vía es la 1-SST (sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa), la cual transfiere un residuo fructosilo a la sacarosa sintetizando el trisacárido 1-kestosa. La segunda enzima, 1-FFT, transfiere residuos fructosilo de una molécula de fructana con $GP \geq 3$ a otra molécula de fructana. Así, entre la 1-FFT y 1-SST se sintetizan fructanas de diversos GP, obteniendo series de hasta 20 unidades. En general, el GP de las fructanas de plantas es alrededor de 200.

Se han identificado diversas cepas de hongos que producen fructanas tanto de bajo como de alto peso molecular: *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* (Rehm y col., 1998). Los genes de esas FTFs se han expresado en *E. coli* y *S. cerevisiae*, en general la expresión heteróloga de las FTFs de hongos solo ha producido FOS. También se han expresado en plantas, como es el caso de la papa, aunque se observó un fuerte fenotipo de retardamiento del crecimiento y necrosis de las hojas hasta la muerte en pocas semanas (Heyer y Wendenburg, 2001)

Las FTFs bacterianas son sintetizadas por numerosas especies, la mayoría pertenecientes a los géneros de *Bacillus*, *Zymomonas*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. En las bacterias, solo se requiere de una FTF (inulosacarasa o levansacarasa) para la síntesis del polímero. El papel fisiológico que juegan las fructanas en algunos de estos microorganismos está bien establecido, como en el caso de *Streptococcus* y *Actinomyces*, las cuales están implicadas en la formación de la placa dentobacteriana, donde participan en la adhesión de la bacteria a la superficie del diente y a la mucosa intestinal (Heyer y col., 1998, Rozen y col., 2001).

La inulina bacteriana solo es producida por bacterias ácido lácticas y son pocas las secuencias aminoacídicas conocidas (tabla 1.1), en cambio la levana bacteriana es producida tanto por

bacterias Gram positivas como Gram negativas y el conocimiento en general es mayor que el de las inulosacararas. En la literatura hay mas de 40 secuencias aminoacídicas de levansacararas reportadas (<http://www.brenda-enzymes.info/>), donde tan solo el genero *Burkholderia* reporta 12 genes en diversas especies y *Bacillus* 9 secuencias proteínicas, donde recientemente la levansacrasa (SacB) de *Bacillus subtilis* fue cristalizada (Meng y Futterer, 2004). Cabe señalar que debido a la versatilidad, y promiscuidad catalítica que presenta SacB es la FTF mas estudiada. En la tabla 1.1 se agrupan todas las inulosacararas hasta hoy conocidas y dada la variedad de levansacararas solo se enlistan algunas de ellas.

Tabla 1.1. Clasificación de FTFs bacterianas.

Fructana y cepa	Locus	Tinción de Gram	Peso molecular (kDa)	Referencia
Inulina				
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	<i>inuJ</i>	Positiva	87	Anwar y col., 2008
<i>Lactobacillus reuteri</i> 121	<i>inu</i>	Positiva	87	van Hijum y col., 2002
<i>Streptococcus criceti</i> AHT	Nd	Positiva	nd	Ebisu y col., 1975
<i>Streptococcus ratti</i> BHT	Nd	Positiva	Nd	Ebisu y col., 1975
<i>Streptococcus mutans</i> GS5	<i>Ftf</i>	Positiva	86	Heyer y col., 1998
<i>Streptococcus mutans</i> Ingbritt	Nd	Positiva	Nd	Aduse-Opoku y col., 1989
<i>Streptococcus mutans</i> JC1	Nd	Positiva	Nd	Ebisu y col., 1975
<i>Streptococcus mutans</i> JC2	Nd	Positiva	Nd	Rosell y Birkhed, 1974
<i>Bacillus sp.</i> 217C-11	Nd	Positiva	45	Wada y col. 2003
<i>Leuconostoc citreum</i> CW	<i>islA</i>	Positiva	165	Olivares-Illana y col., 2003

28				
Levana				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F	<i>levS</i>	Positiva	111	Morales-Arrieta y col., 2007
<i>Leuonostoc mesenteroides</i> NRRL B-512FMC	<i>mltf</i>	Positiva	53	Kang y col., 2005
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293	<i>levC</i>	Positiva	112	Olvera y col., 2007
	<i>levL</i>	Positiva	112	Olvera y col., 2007
<i>Lactobacillus reuteri</i> 121	<i>lev</i>	Positiva	88	Van Hijum, y col., 2001
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>ftfA</i>	Positiva	98	Korakli y col., 2001
<i>Streptococcus sobrinus</i> OMZ176	<i>Nd</i>	Positiva	Nd	Corrigan y Robyt, 1979
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 13419	<i>Nd</i>	Positiva	Nd	Newbrun y Baker, 1968
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 25795	<i>ftf</i>	Positiva	107	Song y Jacques, 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>sacB</i>	Positiva	50	Chambert y col., 1992
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Nd</i>	Positiva	52	Pérez y col., 1996
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> STR4 (antes <i>Acetobacter diazotrophicus</i> STR4)	<i>isdA</i>	Negativa	65	Arrieta y col., 1996
	<i>lsdA</i>	Negativa	58	Hernandez y col., 1995
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>lsc</i>	Negativa	45	Hettwer y col., 1995
<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>sucZE2</i>	Negativa	47	Kyono y col., 1995
<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>lsrA</i>	Negativa	64	Seo y col., 2000

1.2.1. Organización molecular de las fructosiltransferasas bacterianas.

Las FTFs bacterianas se encuentran clasificadas en la familia 68 de las glicosilhidrolasas (GH68) de acuerdo a la clasificación CAZY (Carbohydrate Active enzymes). Aunque existe gran diversidad en el plegamiento de las enzimas que conforman esta familia, los aminoácidos involucrados en la catálisis se encuentran altamente conservados.

Como se mencionó anteriormente, las FTFs son producidas tanto por bacterias Gram positivas y negativas, el peso molecular de las FTFs de bacterias Gram negativas oscila entre 45-64 kDa y solo presentan un dominio, mientras que, la mayoría de las FTFs de bacterias Gram positivas son enzimas multidominio, lo que las hace alcanzar pesos moleculares de hasta 170 kDa. Una excepción es la levansacarasa (SacB) de *Bacillus subtilis*, la cual tiene la misma estructura que las FTFs bacterianas Gram negativas.

Las FTFs de bacterias Gram positivas se conforman de cuatro regiones: péptido señal, región variable, dominio catalítico y C-terminal (fig. 1.2) (van Hijum y col, 2006). A continuación se mencionan algunas de sus características más importantes.

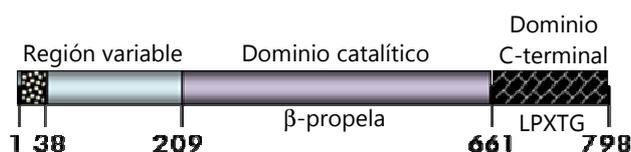


Fig. 1.2. Esquema de la estructura general de las fructosiltransferasas bacterianas.

Péptido señal y región variable: Todas las FTFs bacterianas son extracelulares y contienen un **péptido señal** de aproximadamente de 38 aa, el cual sirve para exportar la enzima que se procesa después de su translocación. En cuanto a la **región variable**, su longitud oscila entre 100-200 aa y su función aun no ha sido establecida, aunque se han encontrado elementos de repetición en LevC e IsIA.

Dominio catalítico: Es el responsable de la actividad FTF, en promedio, está formado por 500 residuos de aa. En 2003 se elucidó la primera estructura tridimensional de una FTF: SacB (Meng y Futterer, 2003). Se identificó el tipo de plegamiento de dicha proteína así como los residuos involucrados en la catálisis. Las características de la estructura se describen mas adelante.

Dominio C-terminal: El tamaño de este dominio es variable (100-500aa). La función de este dominio en algunas enzimas es el anclaje de la enzima a la pared celular del microorganismo productor, a través de la unión covalente del motivo LPXTG tal como se ha observado en las FTFs de *L. reuteri* y en la levansacarasa de *S. salivarius* ATCC 25975 (van Hijum y col., 2006).

1.2.1.1. Estructura cristalográfica de la levansacarasa (SacB) de *Bacillus subtilis*

Hace algunos años se resolvió la estructura cristalográfica de la levansacarasa (SacB) de *B. subtilis* a 1.5 Å [PDB: 1OYG], lo que permitió observar que la enzima está constituida por un solo dominio y presenta un plegamiento tipo β -propela con 5 hojas β , las cuales están arregladas alrededor de un túnel central(fig. 1.3) (Meng y Futterer, 2003).

Las hojas I-V adoptan una topología clásica "W" de cuatro hojas β -antiparalelas (Meng y Futterer, 2003). La secuencia de motivos conservados encontrados en la familia GH68 (VWD-86, EWSG-165, RDP-248, DEIER-343 y TYS-412) forman parte de la cavidad central de la propela (fig. 1.3 A). Dentro de estos motivos se localizan los 3 residuos ácidos involucrados en la catálisis: el Asp86 y el Glu342 son los residuos catalíticos, por lo que respecta al Asp247, existe evidencia de que se requiere para la catálisis, sin embargo queda muy distante del carbono anomérico del fructosilo de la sacarosa por lo que se sugiere que su función sea estabilizar al sustrato. En el bolsillo catalítico además de los aminoácidos involucrados directamente en la catálisis, se han

identificado una serie de aminoácidos que dirigen el posicionamiento correcto del sustrato: Arg343, Arg360, Glu340, Trp85, Arg346 (fig. 1.4) (Meng y Futterer, 2003).

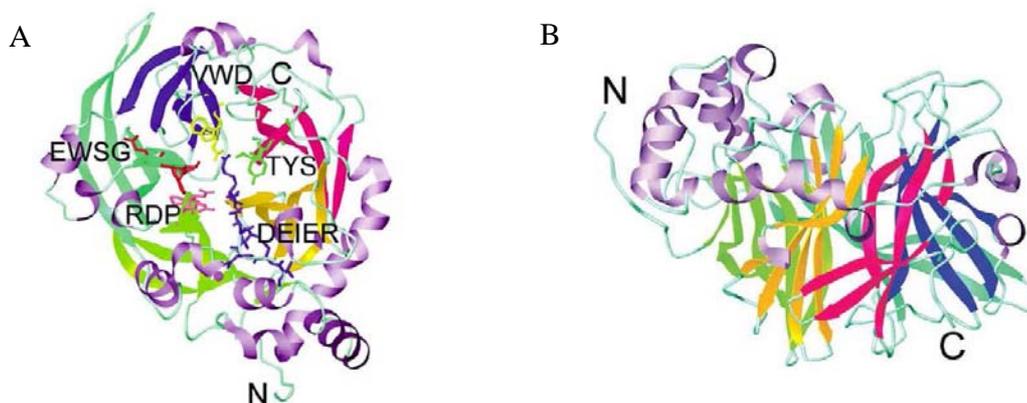


Fig. 1.3. Vistas ortogonales de la β-propela. Las hojas β están coloreadas de acuerdo a la secuencia, con el N-terminal en azul y el C-terminal en rojo. (A) Aminoácidos conservados en la familia GH68. (B). Rotación a 90° donde se aprecian los extremos N- y C-terminal de la proteína.

En estudios de relación estructura-función realizado con levansacarosas como la de *Z. mobilis* se encontró que los aminoácidos catalíticos están involucrados únicamente en la hidrólisis de la sacarosa ya que su modificación disminuyó la k_{cat} hidrolítica cerca de 200 veces sin afectar la k_{cat} de de transfructosilación. En contraste, se encontró que la His296, que corresponde a la Arg360 de la SacB, es crucial para la reacción de transfructosilación ya que su alteración modificó la reacción de polimerización pero no la reacción de hidrólisis (Yanase y col., 2002). Se piensa, a raíz de la estructura cristalográfica de la SacB y del estudio realizado por Yanase y col. en 2002, que la carga positiva de la Arg360 (o His296 en la levansacarasa de *Z. mobilis*) y de los aminoácidos que la rodean funcionan como "ancla" de la molécula aceptora, posicionándola hacia los aminoácidos catalíticos y originando así la transfructosilación. La mutación de la Arg360/His296 evita que el FOS recién formado pueda actuar como molécula aceptora, dando lugar únicamente a oligosacáridos de DP 3 (1-kestosa, Glc α 1-2 β Fru1-2 β Fru). Estos resultados permiten concluir que coexisten dos subsitios en la

enzima, uno donde se realiza la hidrólisis del sustrato y otro donde se realiza la reacción de transfructosilación (Yanase y col., 2002).

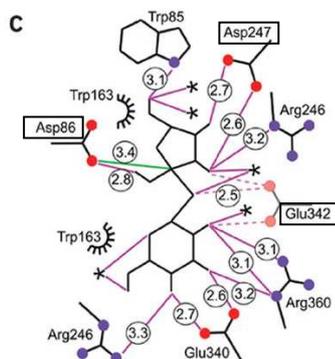


Fig. 1.4. Bolsillo catalítico de SacB. Los aminoácidos localizados en recuadros son los catalíticos. Las líneas de color magenta continuas y punteadas indican puentes de hidrógeno y las distancias de dichos puentes se observan en círculos (Meng y Futterer, 2003).

Más recientemente, se cristalizaron y resolvieron las estructuras tridimensionales de las mutantes Glu342Ala, Asp86Ala y Asp247Ala de SacB de *B. subtilis*, en las que se observó que la cadena lateral del Glu342 participa en la red de interacciones con los aminoácidos que conforman el sitio catalítico, principalmente con Arg246 y Arg360 (Meng y Futterer, 2008).

En particular, el análisis de la estructura de la mutante nula Glu342Ala de SacB con rafinosa (α -Gal (1-6) α Glu(1-2) β Fru) en el sitio activo indicó que el residuo fructosilo interactúa con el sitio -1 y los residuos glucosilo y galactosilo con los subsitios +1 y +2, respectivamente (fig. 1.5). Aparentemente, a excepción de la Arg360 y Glu342, todas las cadenas laterales de los aa que conforman el bolsillo catalítico interactúan solo con uno de los tres subsitios: el subsitio -1 ocupado por el residuo fructosilo. En contraste, el residuo galactosilo solo forma puentes de hidrógeno con el solvente y

algunos aminoácidos alejados (Asp242 y Tyr237) de los residuos catalíticos (Meng y Futterer, 2008).

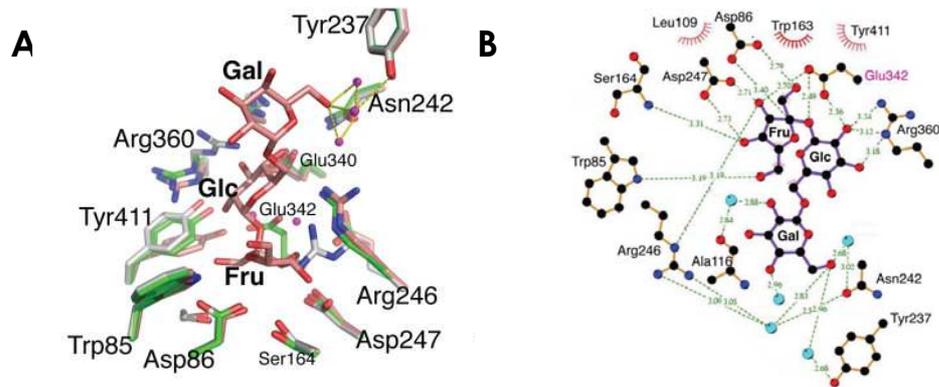


Fig. 1.5. Estructura cristalográfica del sitio activo de la mutante E342A *SacB* de *B. Subtilis* con rafinosa como sustrato. A. Comparación estructural la estructura nativa (verde) de *SacB*, la mutante E342A (gris) y la mutante E342A con rafinosa (roja). B. Diagrama esquemático de interacciones entre la rafinosa y *SacB* E322A, los puentes de H están indicados por líneas verdes punteadas, los residuos que interactúan por medio de fuerzas de van der Waals o hidrofóbicas se muestran con el símbolo de peines rojos doblados. Las moléculas de agua se dibujan con esferas azules.

Los datos anteriores indican que la interacción del sustrato con el subsitio -1 determina su orientación en el sitio catalítico, posicionando correctamente el carbono anomérico a 3.2 Å del Asp86 y el enlace glicosídico de la sacarosa cercano al Glu342 (~2.5 Å). La estructura también muestra que la Arg360, cuya función esta relacionada con el proceso de transfructosilación (Yanase y col., 2002), alterna entre dos tipos de rotámeros, los cuales contribuyen con el sitio de unión de la molécula donadora y aceptora. Es decir, la flexibilidad de la Arg360 le permite actuar como "ancla" y acomodar a los aceptores en diversas orientaciones (Meng y Futterer, 2008).

Otro de los aspectos también analizados en la estructura de *SacB* es el sitio de unión a metales. *SacB* no requiere de cofactores metálicos y solo la Thr265 ha mostrado una

baja afinidad por el Ca^{2+} ($K_d=1.25 \text{ mM}$, $\text{pH}7$). El análisis de la estructura indicó que los residuos Leu308, Asp339, Asn310, Asp241, y Gln272 están pentacoordinados por un agua y el Asp339, del motivo **DEIER**, hace una interacción bidentada con el solvente, resultando una zona con densidad positiva muy fuerte. Así mismo, la geometría de la pentacoordinación y las distancias metal-proteína coinciden con los datos que se han reportado para la coordinación del Ca^{2+} (Meng y Futterer, 2003), por lo que se propuso como probable sitio de unión a calcio (fig. 1.6).

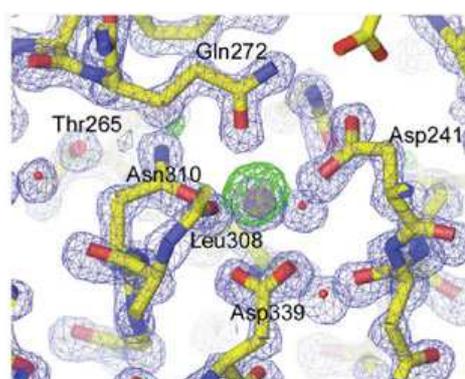


Fig. 1.6. Densidad electrónica del sitio probable de unión a Ca^{2+} de SacB.

1.2.1.2. Estructura cristalográfica de la levansacarasa (LsdA) de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Casi de manera paralela a la publicación de la estructura cristalográfica de SacB se resolvió la estructura cristalográfica de la levansacarasa (LsdA) de la bacteria Gram-negativa *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Martinez-Fleites y col., 2005). Esta enzima presenta un plegamiento β -propela con 5 hojas β , al igual que SacB. De la misma manera que en SacB, la LsdA presenta los aa catalíticos dentro de propela, sin embargo contiene un puente disulfuro entre las Cys339-Cys395. Aunque se han encontrado residuos de Cys en levansacarasas de especies de bacterias Gram positivas como: *Arthrobacter* sp. K-1 (GenBank® no. de acceso BAB72022) y *Actinomyces naeslundii* (GenBank® no. de acceso AAG09737) y bacterias Gram positivas como: *Burkholderia cepa-*

cia R1808 (GenBank® accession number ZP 00218900) y *Burkholderia pseudomallei* K96243 (GenBank® accession number YP 110564), no se conserva el puente disulfuro entre los miembros de la familia GH68. Es más, el par de residuos de cisteína no está en la mayoría de las FTFs de bacterias Gram positivas, incluyendo a SacB. Sin embargo, las levansacarinas de bacterias Gram negativas como: *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas aurantica* presentan dos residuos de Cys conservados, que aunque no corresponden a los encontrados en la LsdA de *G. diazotrophicus*, podrían estar implicados en la formación de un puente disulfuro, ya que la actividad de la levansacarasa de *P. syringae* se afecta cuando se incuba en dithiothreitol o 2-mercaptoetanol (Martinez-Fleites y col., 2005).

En contraste, los residuos involucrados en la unión a Ca^{2+} en FTFs de bacterias Gram positivas están sumamente conservados (Martinez-Fleites y col., 2005; Ozimek y col., 2005). Además la actividad en algunas de estas FTFs (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus reuteri*) muestran su máxima actividad en presencia de tan solo 1 mM de Ca^{2+} . Así mismo, cuando en las FTFs de *Lactobacillus reuteri* se mutó uno de los aminoácidos conservados en la unión a Ca^{2+} (el Asp del motivo DEIER por Asn) las enzimas disminuyeron considerablemente la actividad y la afinidad por el Ca^{2+} (Ozimek y col., 2005).

Cuando se comparan las estructuras de SacB y LsdA se observa que la posición del sitio de unión a Ca^{2+} en SacB y el puente disulfuro en LsdA corresponden estructuralmente, es por ello que se sugiere que los iones de Ca^{2+} en las FTFs de bacterias Gram-positivas podrían tener un papel estabilizante muy importante, semejante al del puente disulfuro de la LsdA de *G. diazotrophicus*.

1.2.2. Mecanismo de reacción de las fructosiltransferasas.

Como se ha mencionado, las FTFs son enzimas capaces de realizar diversas reacciones en presencia de sacarosa, por lo que ha sido complicado elucidar el mecanismo mediante el

cual se efectúa la síntesis del polímero. También en este aspecto la enzima más estudiada es SacB. Chambert y col. (1974) reportaron que la enzima realiza principalmente la reacción:



Entre las moléculas aceptoras podemos encontrar a aquellas que tienen un grupo hidroxilo como: alcoholes, monosacáridos, sacarosa, levana y agua, entre otras. Se sabe que la reacción se puede modular en función de las condiciones y composición del medio de reacción. La temperatura es un factor importante, ya que al aumentar se favorece la reacción de hidrólisis. La presencia de solventes orgánicos logra que la tasa de transferencia aumente de un 40 a un 85% (Castillo y López-Munguía, 2004). En nuestro laboratorio se ha demostrado que cuando la enzima agota la sacarosa puede empezar a hidrolizar el polímero formado. Finalmente, la adición de levana de diferentes pesos moleculares aumenta el porcentaje de transferencia (Ortiz Soto y col., 2008).

Una propuesta sobre el mecanismo de estas enzimas fue planteada por Chambert y col., en 1974. En este trabajo, los autores adicionaron al medio de reacción levana para eliminar la reacción de hidrólisis y simplificar el modelo; con los datos obtenidos concluyeron que el comportamiento cinético se ajusta al modelo básico de tipo Ping-Pong Bi-Bi (fig. 1.7).

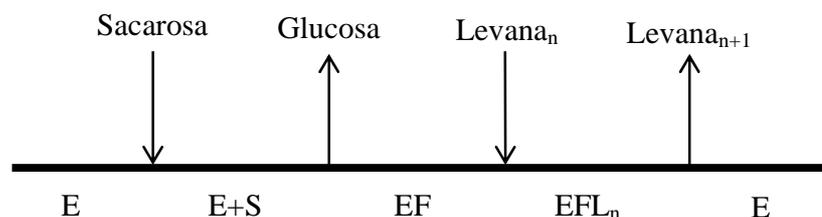


Fig. 1.7. Esquema del mecanismo Ping-Pong Bi-Bi propuesto para SacB. E: Enzima, S: sacarosa, F: fructosa, n: no. de residuos de fructosa.

En el mecanismo se plantea la unión de la enzima con la sacarosa formando un intermediario enzima-sacarosa que, después de liberar la glucosa da origen al intermediario enzima-fructosilo. A partir de éste, la fructosa es transferida a la cadena de levana aumentando así el tamaño de la cadena, en este esquema el producto es prácticamente el mismo compuesto que el aceptor, solo que una unidad fructosilo mas grande.

Chambert y Gonzy-Treboul aislaron y caracterizaron en 1976 el complejo enzima-fructosilo, proponiendo así un mecanismo para la transfructosilación. Donde el residuo de fructosa se encuentra unido covalentemente a la enzima a través de un enlace glicosil-éster, en el que estaría implicado el C-2 de la fructosa y el grupo β -carboxilo de un residuo aspártico. Tomando en cuenta que las levansacarosas catalizan la reacción de transfructosilación con retención de la configuración, se propuso un mecanismo de doble desplazamiento, con una inversión transitoria de la configuración de la fructosa en el complejo enzima-fructosilo. Una vez liberada la glucosa y formado el complejo enzima-fructosilo, el grupo ácido de la enzima, ya desprotonado por la glucosa, actúa sobre la molécula aceptor desprotonándola y convirtiéndola en una molécula nucleófila altamente reactiva que realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace éster del complejo enzima-fructosilo (fig.1.8).

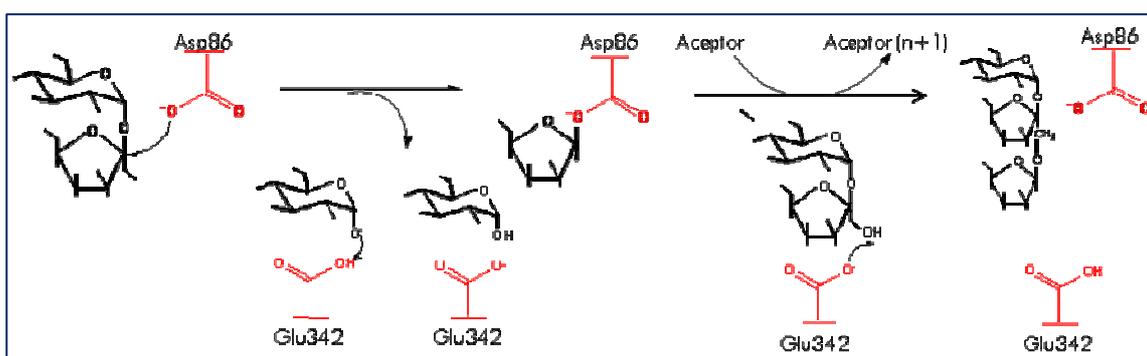


Fig. 1.8. Mecanismo de formación del complejo fructosilo-enzima.

Para que se efectúe la catálisis se requiere de ciertas características estructurales que aseguren los diferentes estados de protonación de los aminoácidos catalíticos: Asp86 (nucleófilo) y Glu342 (ácido general). El pKa del aminoácido libre es de 4.07, y generalmente el pH óptimo de reacción de las FTFs varía entre 6-6.5; por lo que el pKa de Glu342 debería de estar cercano a ese pH para que el residuo pueda actuar como ácido, es posible que eso ocurra a través de la yuxtaposición de cadenas hidrofóbicas o ácidas. En ese sentido, la estructura cristalográfica de SacB indica que el Glu342 interacciona con la Tyr411 (puente de H, 2.6 Å) y Arg246 (2.9 Å). Además, basados en el cálculo de pKa del Glu342, el grupo Wade (<http://projects.embl.org/mcm/software/pka>) sugiere que el pKa está 2 unidades arriba que del pKa del aminoácido libre (4.07), argumentando que se debe a las interacciones y contactos que hace el Glu342 con los aminoácidos que lo rodean: Glu340, Glu362, Asp 243 (Meng y Futterer, 2008). Por lo tanto, los cambios del estado de protonación de los aminoácidos catalíticos son dependientes de los aminoácidos vecinos.

Hasta ahora existen varias hipótesis para explicar el mecanismo de iniciación y crecimiento de las cadenas de levana. El aceptor inicial de la síntesis es una molécula de sacarosa ya que se han encontrado trazas de glucosa en las cadenas de polímero. Desde entonces se postuló que la misma enzima es la responsable de la síntesis tanto de la cadena principal como de las ramificaciones.

Se han propuesto tres mecanismos de elongación de la cadena:

- a. **Crecimiento de una cadena (procesivo):** los residuos de la fructosa se agregan sucesivamente a la misma cadena de polímero, hasta que concluye su síntesis.
- b. **Crecimiento múltiple (no procesivo):** los residuos de fructosa se unen al azar a todas las moléculas de polímero aceptoras, liberándolas al medio después de cada adición.
- c. **Crecimiento multirepetitivo:** varios residuos fructosilo se unen a más de una molécula de molécula aceptora.

Chambert y col., (1974) concluyen que el mecanismo que sigue la enzima es de crecimiento múltiple. Esto lo logran mediante la determinación del peso molecular de los polímeros antes y después de la reacción. Los resultados experimentales muestran que el aceptor y el producto prácticamente son del mismo tamaño, lo que los llevo a descartar el primer mecanismo procesivo y aunque el mecanismo no-procesivo y multirepetitivo no se pueden descartar completamente, deducen que el que mas se ajusta a sus datos es el de crecimiento múltiple.

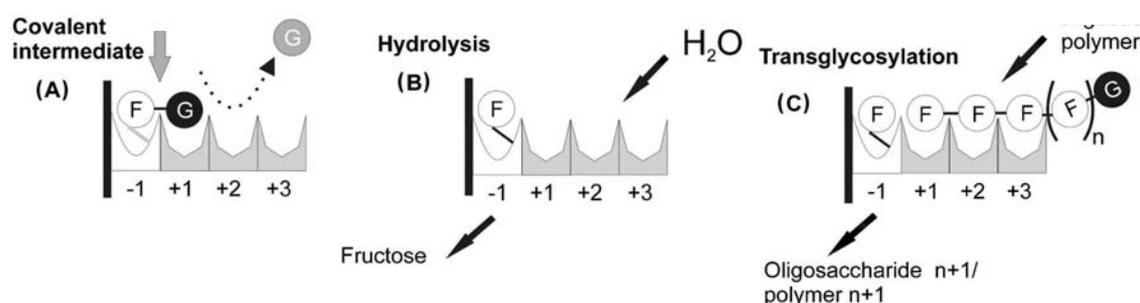


Fig. 1.9. Representación esquemática de la secuencia de reacciones que ocurren en el sitio activo de las FTFs. A. Unión de la sacarosa a los subsitios -1 y +1, resultando en un rompimiento del enlace glicosídico y la formación del enlace covalente, B. Reacción de hidrólisis y C. Reacción de transglucosilación. F: fructosa, G: glucosa.

Lactobacillus reuteri produce dos FTFs, una levansacarasa capaz de producir polímero de alto peso molecular y una inulosacarasa que produce principalmente oligosacáridos. Ozimek y col. (2006) proponen que la levansacarasa utiliza un mecanismo de transglucosilación procesivo, debido a esto la enzima produce principalmente polímero, en contraste la inulosacarasa que produce principalmente oligosacáridos lleva a cabo su reacción mediante un mecanismo no procesivo, donde la cadena después de la transfructosilación es liberada. Los autores sugieren que la diferencia en el mecanismo de elongación de estas FTFs se puede deber a la afinidad de los subsitios por la molécula aceptora (fig. 1.9), donde los subsitios de la inulosacarasa tienen menos afinidad por la molécula aceptora (Ozi-

mek y col. 2006). De alguna manera esto se ha corroborado con la reciente estructura cristalográfica de SacB con rafinosa, donde destacan que los subsitios +1 y +2 forman interacciones débiles con el aceptor (Meng y Futterer, 2008).

La mayoría de las FTFs se ajustan al modelo cinético de Michaelis-Menten para las reacciones de hidrólisis-transferencia. La excepción a esta regla son las FTFs de *L. reuteri* 121, la InuJ de *L. johnsonii* y la levansacarasa de *L. sanfranciscensis*, las cuales no se saturan con sacarosa; se asume que se debe a que estas FTFs producen FOS de manera paralela a la producción de polímero (Tieking y col., 2005, Anwar y col., 2008 y van Hijum y col., 2004), fenómeno que también se ha observado en algunas FTFs de plantas y hongos.

1.3. Las glucosiltransferasas

Las glucosiltransferasas (GTFs) (E.C. 2.4.1.) o glucansacarasas catalizan diversas reacciones a partir de la sacarosa, de manera concertada: síntesis de polímero de glucosa (actividad transferasa) liberando fructosa al medio de reacción, hidrólisis de sacarosa (actividad hidrolítica) y en presencia de moléculas aceptoras como la maltosa o lactosa desvían la síntesis de polímero hacia la formación de glucooligosacáridos, tal como las FTFs, solo que las GTFs transfieren glucosa.

La GTF más importante a nivel industrial es la dextrantransferasa sintetizada por *L. mesenteroides* NRRL B-512F, ya que su polímero, la dextrana, se utiliza desde la segunda guerra mundial como sustituto de plasma sanguíneo (Groenwall e Ingelman, 1948). También se utiliza como anticoagulante y soporte cromatográfico (gel Sephadex®) y la elaboración del complejo Fe-dextrana (Soetaert y col., 1995).

Las GTFs se encuentran clasificadas en la familia 70 de las glicosilhidrolasas (GH70), en este grupo se encuentran todas GTFs hasta hoy conocidas, las cuales solo son producidas por bacterias acidolácticas de los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Todas presentan el mismo plegamiento con un mecanismo de retención de configuración del carbono anomérico. Las características del polímero sintetizado dependen de la enzima productora, clasificándose así en **dextrantransferasas** que sintetizan polímero con enlaces α -(1,6) en la cadena principal; **mutantransferasas** que producen polímero con enlaces α -(1,3) consecutivos (Mooser, 1992); **alternantransferasas** cuyo polímero presenta enlaces α -(1,6) y α -(1,3) de manera alternada (Jeanes y col, 1954) y **reuterantransferasas**, que sintetizan polímero denominado reuterana cuyo enlace es α -(1,4) en la cadena principal (Kralj y col., 2004).

1.3.1. Organización molecular de las glucosiltransferasas

Las GTFs, tienen en promedio 1500 aminoácidos y presentan pesos moleculares entre 150 y 200 kDa. A partir del análisis de su estructura primaria se observó que las GTFs están organizadas en dominios (fig. 1.1). Se han identificado dos dominios funcionales: el dominio N-terminal, en el se encuentra el péptido señal seguido de una región variable y del dominio catalítico; terminando con el dominio de unión al glucano (GBD, por sus siglas en inglés) en el C-terminal (Vickerman y col., 1997).



Fig. 1.10. Esquema de la estructura general de las glucosiltransferasas.

Péptido señal y region variable: Todas las GTFs extracelulares contienen un péptido señal (35 y 40 aminoácidos), el cual está muy conservado entre las GTFs de *L. mesenteroides* y *Streptococcus*, presentando alrededor del 50% de identidad entre ellas. Hasta el momento solo se ha encontrado una GTF que no presenta péptido señal y es activa: la DsrA de *L. mesenteroides* NRRL B1299 (Monchois y col., 1996). La longitud de aa en la región variable de las GTFs es poco constante (200-700 aa) aunque se han identificado algunos elementos de repetición en esta región de algunas GTFs. La función de esta región en la catálisis aún no está clara, ya que su eliminación en la GTF-I de *S. downei* no implicó la pérdida de la actividad ni modificaciones en la estructura del glucano (Monchois y col., 1999), en cambio en la Asr de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 sí afectó su actividad (Joucla y col., 2006).

Dominio catalítico. Este dominio está altamente conservado entre las GTFs y comprende alrededor de 900 aa. Recientemente, mediante la cristalización de GTF-A de *L. reuteri* (Meeting 7th Braunschweig, 2007) se comprobó que tiene un plegamiento tipo barril (α/β)₈

similar al de las glicosidasas, solo que la GTF-A presentó una permutación circular con respecto a las glicosidasas.

Dominio de unión a glucano. Este dominio tiene en promedio 500 aminoácidos, varios estudios han mostrado que esta region está involucrado en la unión al glucano (Abo y col., 1991, Kato y Kuramitsu, 1990, Kingston y col., 2002), Está compuesto por una serie de unidades repetidas que han sido designadas como A, B, C, D y N (tabla 1.2)(Ferretti y col., 1987, Giffard y col. 1991). Por otro lado, estos motivos son comparables con los encontrados en el C-terminal de toxinas A y B de *Clostridium difficile*, cuyo papel es el de interactuar con oligosacáridos de receptores en células blanco (von Eichel-Streiber y col., 1992). Finalmente, a partir del análisis de secuencia de estas unidades de repetición, Giffard y Jaques (1994) propusieron que las unidades A, B, C y D presentan el motivo estructural **YG** (tabla 1.2)

Tabla 1.2. Secuencias repetidas en el dominio C-terminal de las glucosiltransferasas

Motivo	Tamaño (aa)	Secuencia consenso
A	32-37	WYYFNxDGQAATGLQTVFDNGxQVKG
B	45	VNGKTYFYGSDGTAQTQANPKGQTFKDGSGVLRFYNL EGQYVSGSGWY
C	20	DGKIYFFDSGEVVKNRV
D	15	GGVKNADGTYSKY
N	12	YFxAxQGxxxL
YG	18	NDGYFxxxGxxH°x(G/N)H°H°

X:aa ácido no conservado

H°: aa hidrofóbico

Rusell (1990), Ferretti y col. (1987), Giffard y col. (1991) y Monchois (1997)

Por otro lado, se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de identificar si el C-terminal de la GTFs interviene en la catálisis. En algunas GTFs se ha demostrado que el GBD afecta considerablemente la actividad, como en el caso DsrS de *L. mesenteroides* NRRL B512F (Monchois y col., 1998); mientras que en otras como en la GTF-I de *S. downei* la eliminación del C-terminal solamente afectó la actividad parcialmente (Monchois y col., 1999). Sin embargo, la eliminación del C-terminal en la GTFA de *L. reuteri* 121 afectó la Km, disminuyendo la afinidad por el sustrato (Kralj y col., 2004). Estudios con la alternanasacarasa (Asr) de *L. mesenteroides* NRRL B1355 (Joucla y col., 2006) indicaron que la eliminación del GBD disminuyó drásticamente la actividad, aunque no su especificidad de reacción ni de producto. De estos estudios es posible concluir que en la mayoría de las enzimas analizadas hasta la fecha, la eliminación total o parcial del C-terminal no afecta la actividad enzimática, existiendo controversia en cuanto a la unión de este dominio a dextrana, ya que algunos autores reportan que se une fuertemente al glucano (Miller y col., 1986, Funane y col., 2001), mientras que otros autores no observan esta interacción (Shah y col., 2004).

1.3.1.1. Intervención del C-terminal en la asociación a las células.

Otra función del dominio C-terminal en las GTF es el de unir las proteínas a la pared celular. Entre las GTFs con actividad asociada a células encontramos a la DsrP, DsrE, Asr de *Leuconostoc* spp. (Tabla 1.3) y GTF-I y GTF-B de *Streptococcus* spp.

El GBD de la DsrP presenta 5 repeticiones del tipo A (fig. 1.11), clasificadas también como repeticiones YG (Shah y col., 2004). Recientemente, se demostró que la secuencia tiene identidad con el motivo de unión a colina (ChBD o CW, por sus siglas en inglés) presente en la autolisina (Lyt A) de *S. pneumoniae* y ToxA de *Clostridium difficile*. Estos módulos se unen a la colina de los ácidos lipoteicoicos los cuales sirven para unir proteínas a la pared celular.

```

1124KDTFIQDDKSNWYYFDKNGYMTYG---FQTVNDNN--YYFLPNGIELQDAILEDKSGDVVYFN-QYGKQT1187
1188IDGYMLANKTWRYYFDKNGVMANAGLTTVTVDGQKHIOYFDKNGIQVKGTSVKDADGKLRVFDTS GEMV1257
1258TNRFGKTDGTSWYFGADGIAVTG---AQTISGQK--LFFDADGQQIKGKEATDKKGMHYYDADSGEMT1322
1323TNRFEKLSDGSWMYFNKKNVVTG---AQVINGQH--LFFESNGNQVKGREYATDGKMRYYDADSGDMV1387
1388TNRFERISDGSWAYFGANGVAVTG---AQNINGQQ--LYFDTRKGHQVKGAAVAQADGSGQKYYDANSGELIKS145
    
```

Fig 1.11. Secuencia del GBD de DsrP, las repetidas A se marcan en rectángulos y los motivos ChBr o CW en negritas. (Olvera y col., 2007)

La estructura cristalográfica de LytA revela que los módulos ChBD presentan un plegamiento tipo solenoide constituido únicamente por giros β formando una pila de superhélices (Fernández-Tornero y col., 2001). Las repetidas del GBD de la DsrP y los módulos ChWR de LytA muestran una identidad importante entre los aminoácidos hidrofóbicos (marcados en negrita, fig. 1.12); estas repetidas también se han encontrado en la DsrE (Bozzonet y col., 2002) otra GTF asociada a células, y en la DsrB de *mesenteroides* NRRL B-1299 que presenta los motivos ChBR o CW tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal.

LytA		DsrP	
198	KFEK .ING. TWYYFD .SSG	1126	TFIQDDKS . NWYYFD .KNG
219	RWRKHTDG . NWYWFD .NSG	1190	GYMLANK . TWRYFD .KNG
240	GWKKIAD .. KWYYFN .EEG	1260	RFGEKTDG . TWSYFG .ADG
260	GWVKYKD .. TWYYLDAKEG	1325	RFEKLSDG . SWMYFN .KKG
282	AFIQSADGTGWYYLK .PDG	1390	RFERISDG . SWAYFG .ANG

Fig. 1.12. Comparación de las secuencias repetidas del C-terminal de la DsrP y de las ChBr de LytA, la secuencia consenso se muestra en negritas (Olvera y col., 2007)

Con estos antecedentes Olvera y col. (2007) proponen que aquellas enzimas que presenten esas repetidas deberán ser capaces de unirse a la pared celular, por lo que para comprobar su hipótesis realizaron ensayos de unión de la DsrP y DsrE con las células de *Leuconostoc* spp. libres de actividad GTF. Los autores observaron que dichas enzimas se unen fuertemente a la pared celular y para verificar la funcionalidad del GBD expresaron el fragmento de gen que codifica para el GBD de la DsrP (GBDDsrP). Los autores realizaron ensayos de unión entre las células de *L. mesenteroides* IBT-PQ

sin actividad GTF y GBDDsrP y después de lavar las células intensamente, observaron que la proteína se une a las células, comprobando así la funcionalidad del C-terminal en la DsrP. Otras GTF que presentan los motivos CW en el C-terminal son la GTF-I y GTF-B de *S. downei* y *S. mutans*, respectivamente (tabla 1.3).

Tabla 1.3. Mecanismo de unión propuesto para las GTFs asociadas a células.

Enzima	Microorganismo	Motivo	No. de acceso	Referencia
GTF-I	<i>S. downei</i>	Repetidas CW	P11001	Fernandez-Tornero y col., 2001
GTF-B	<i>S. mutans</i>	Repetidas CW	AAA88588	Rathsam y col., 1993
Dsr-E	<i>L. mesenteroides</i> NRRL 1299	Repetidas CW	CAD22883	Olvera-Carranza y col., 2007
Dsr-P	<i>L. mesenteroides</i> IBT-PQ	Repetidas CW	AAS79426	Olvera-Carranza y col., 2007

Es probable que la función del dominio C-terminal en otras GTFs asociadas a células, tal como la Asr, DsrE, GTF-B y GTF-I sea la de anclarse a las células.

1.4. Fructosiltransferasas de *Leuconostoc* spp.

Hace algunos años en el laboratorio de Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM se aisló del pozol, bebida maya fermentada, una inulosacarasa asociada a células de *L. citreum* CW28, la FTF de mayor tamaño hasta el momento reportada (Olivares-Illana, 2003) (fig. 1.13). De acuerdo al análisis de la estructura primaria se encontró que esta FTF es el resultado de su inclusión dentro de la alternansacarasa (Asr), una GTF de *L. mesenteroides* NRRL B-1355, ya que los dominios N y C-terminal que rodean a la FTF tienen alta identidad con los mismos dominios de la Asr. La región variable presenta 36% de identidad con la misma región que la Asr, además se encontraron 10 repetidas consecutivas de 12 residuos (KDSKVATSDELA) (Olivera y col., 2007). Por otro lado, el dominio C-terminal tiene una longitud de ~700 aa, presenta 80% de identidad con el C-terminal con la Asr y tres unidades A de repetición (tabla 1.2). Como se ha mencionado, la función del dominio C-terminal en las GTFs es dependiente de la enzima y en las FTFs así como en algunas GTFs se ha encontrado que puede estar relacionado con la unión de la enzima a la pared celular. Olivares-Illana y col., (2003) realizaron estudios preliminares acerca de la función del C-terminal, eliminando la región con alta identidad a la Asr (IsIA2) y el dominio C-terminal (IsIA3, fig. 4.1), indicando que este dominio podría estar relacionado en la especificidad de reacción y en la estabilidad.

Como resultado de una búsqueda de FTFs en cepas de *Leuconostoc*, en el laboratorio de Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM se aisló, clonó y expresó el gen que codifica para la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F (LevS), la cual presenta un peso molecular de 113 kDa. El análisis de secuencia de LevS indicó que al igual que la IsIA, es una proteína mosaico, es decir, su extremo N y C-terminal presenta identidad con GTFs de *L. mesenteroides* y su dominio catalítico es el de una FTF. A la par del desarrollo de este proyecto se secuenció el genoma de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293, donde se reportó la existencia de potenciales GTFs y FTFs, estas últimas identificadas como Lmes 02002054, Lmes 02002055 y Lmes 02002058. Se aisló, clonó y expresó el gen que codifica cada una de las

tres FTFs potenciales, sin embargo sólo, Lmes 02002054 (LevC) y Lmes 02002058 (LevL), mostraron actividad FTF (Olvera y col., 2007). El análisis de la secuencia indicó que LevC y LevL mostraban la misma arquitectura que IslA y LevS: es decir presentan dominios adicionales en las regiones N y C-terminal con identidad a las GTFs (fig. 1.13).

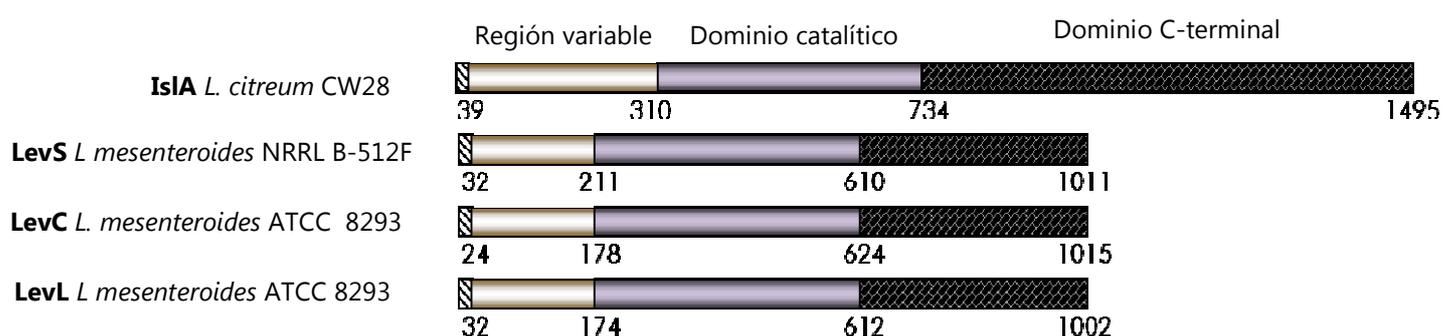


Fig. 1.13. Esquema de la estructura primaria de las FTFs de *Leuconostoc* spp.

Recapitulando, las FTFs de *Leuconostoc* spp. son quimeras naturales que presentan en la región N-terminal: **un péptido señal** y **región variable** los cuales tienen identidad con GTFs y una longitud de 200 aa aproximadamente. Dada la baja identidad de la región variable entre las FTF multidominio aún no ha sido posible determinar su función, sin embargo, se han encontrado unidades de repetición en tandem en la IslA y LevC, las cuales podrían estar implicadas en la catálisis, aunque no se han realizado estudios al respecto. El **dominio catalítico** presenta identidad con las FTFs, y finalmente en la región C-terminal, se localiza un **dominio de unión a glucano** (GBD, por sus siglas en inglés). El GBD de las FTFs de *Leuconostoc* spp. tiene alrededor de 400 aa, encontrándose que en la IslA este dominio es de 700 aa, lo que corresponde a un poco más de la mitad de la proteína. En LevC y LevS el C-terminal presenta tres repetidas de 90 aa en tandem a las que aun no se les ha determinado la función. Dado que en las GTFs la función de este dominio depende de la naturaleza de la enzima resulta atractivo estudiar la función y las consecuencias de estos dominios en las FTFs de *Leuconostoc* spp.

Dadas las características de la estructura primaria de estas FTFs se realizaron relaciones filogenéticas de la región catalítica y del C-terminal por separado (Morales Arrieta, 2007). El análisis filogenético del dominio catalítico mostró cuatro grupos de FTFs bacterianas: 1) Bacterias Gram negativas, 2) *Bacillus* y *Clostridium*, 3) *Lactobacilli* y *Streptococci* y 4) *Leuconostoc* (fig. 1.14). Esta distribución sugiere que el dominio catalítico de la Isla divergió antes que las FTFs de *L. mesenteroides* pero no antes que las enzimas de *Streptococcus* y *Bacillus*. En lo que respecta al análisis del C-terminal de las FTFs y GTFs se observan tres grupos: 1) GTFs de *Leuconostoc* spp., 2) GTFs de *Streptococcus* spp., y 3) FTFs de *Leuconostoc* spp. Dicha distribución sugiere que aunque todas ellas comparten un ancestro común, el GBD de las FTFs de *Leuconostoc* spp. divergió hace mucho tiempo del C-terminal de las GTFs (fig. 1.14).

Con todos los antecedentes de estructura primaria así como el análisis filogenético se planteó una nueva familia de FTFs multi-dominio las cuales combinan características estructurales de FTFs y GTFs (Olvera y col., 2007).

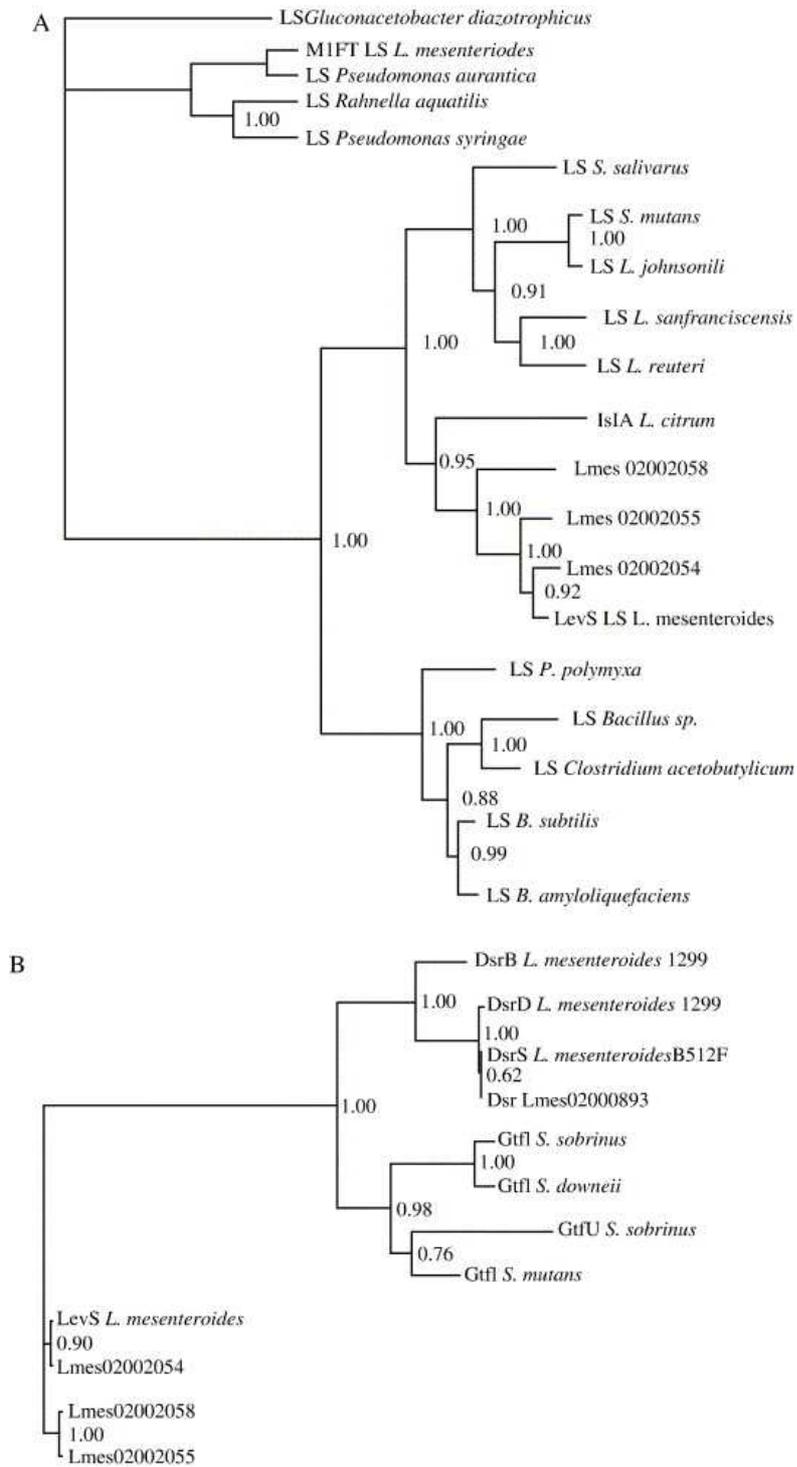


Fig. 1.14. Análisis filogenético del (A) dominio catalítico y del (B) C-terminal de 20 diferentes FTFs (Morales-Arrieta y col. 2007).

1.5. Funcionalidad de las proteínas multi-dominio.

Los dominios son unidades funcionales y estructurales considerados como módulos de evolución: se les puede encontrar en forma simple constituyendo proteínas de bajo peso molecular o en combinación, dando origen a proteínas multi-dominio (dos o más dominios) (Janin y Chothia, 1990). Las proteínas multi-dominio se han generado durante el proceso de evolución por la inserción/eliminación (indel), intercambio y/o repetición de genes, dando lugar a proteínas que pueden contener funciones nuevas o modificadas. En ese sentido, Bashton y Chothia (2007) analizaron un conjunto de 45 proteínas homólogas uni y multi-dominio donde observan cómo la combinación de dominios provoca cambios funcionales: incremento en la especificidad, modificación en la unión del sustrato al sitio activo, como "linker" entre dominios con papel funcional, reconocimiento hacia DNA, modificación en el reconocimiento del sustrato por la formación de oligómeros, etc. A continuación describo algunos casos particulares donde la inserción de dominios provoca cambios funcionales

Dominios que actúan como "linker" entre dominios funcionales

En proteínas que contienen solo dos dominios, generalmente ambos tienen un papel directo con la función enzimática. En cambio, proteínas con más de dos dominios, no todos los dominios están involucrados en la función, sino que pueden unir u orientar a otros dominios para que lleven a cabo otras funciones, un caso particular es el de las glicosilhidrolasas (GH).

Las GH hidrolizan tanto polisacáridos como disacáridos, generalmente los miembros de la familia que hidrolizan polisacáridos solo tienen un dominio, en cambio las GH que hidrolizan disacáridos tienen tres o más dominios, que en conjunto restringen el tamaño del sitio de unión del sustrato, por lo que solo reconoce disacáridos. Una de ellas es la β -glucuronidasa la cual tiene 3 dominios y otra la β -galactosidasa que está compuesta por cinco dominios (fig. 1.15).

En la β -glucuronidasa, el dominio 3 que es el catalítico pertenece a la familia de las transglicosidasas, el dominio 1 pertenece a la familia "galactose binding", este presenta un "loop" que

interfiere con el sitio activo restringiendo de esta manera su tamaño y por lo tanto provoca que solo hidrolice disacáridos. En lo que respecta al dominio 2, éste presenta un plegamiento tipo inmunoglobulina y se sabe que no interacciona con ninguno de los otros dominios. Sin embargo, diversos estudios señalan que además de servir como "linker" entre el dominio 1 y 3, determina la geometría de esos dos dominios.

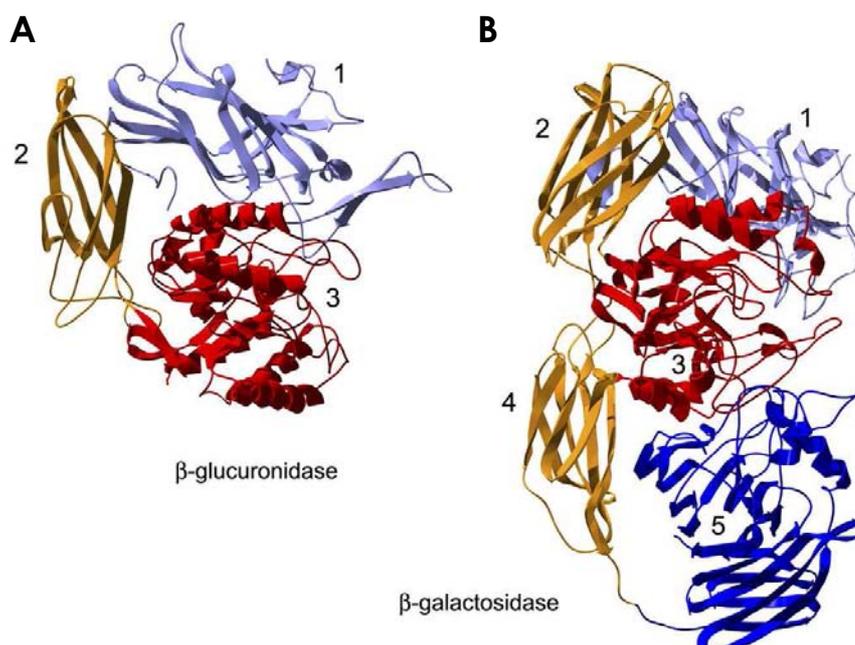


Fig. 1.15. Glicosil Hidrolasas. A. β -glucuronidasa B. β -galactosidasa. El dominio de color rojo es el catalítico (Bashton y Chothia, 2007).

Por otro lado, la β -galactosidasa ha evolucionado hacia una proteína más compleja en términos de su estructura y función. La subsecuente incorporación de dominos podría haber reducido el sitio activo de ranura (cleft) a un bolsillo (pocket) para hidrolizar mejor la lactosa y al mismo tiempo, facilitar la producción del inductor alolactosa (Juers y col., 1999) que es un análogo de la lactosa. Aparentemente el dominio 5 junto con el dominio 1 compactan desde dos frentes al dominio catalítico (Bashton y Chothia, 2007).

Dominios que intervienen en la estabilidad de la enzima la trealosa sintasa (TS) es una enzima termoestable que cataliza la conversión de maltosa en trealosa. Posee un dominio extra

en su extremo C-terminal que en la mayoría de las trealosas sintasas no se encuentra. Se encontró en *Deinococcus* una trehalosa sintasa (DS) unidomino que cataliza la misma reacción. Para determinar la función del dominio adicional del extremo C-terminal de TS se eliminó y se fusionó con DS, observando que la TS-"deletada" perdió estabilidad, en cambio la DS-fusionada aumentó su termoestabilidad y mejoró su especificidad de reacción (Wang 2007).

Aparentemente, la naturaleza ha utilizado la estrategia de integración de dominios para modular la actividad, especificidad, etc. de una enzima, generando en muchos casos nuevas funciones. Además, estudios recientes han indicado que las proteínas multidominio han evolucionado para minimizar los problemas de plegamiento en falso entre dominios (misfolding). Es decir, las interacciones estabilizantes entre dominios podrían proteger a la proteína por disminuir la velocidad de desplegamiento y por aumentar la velocidad de replegamiento. Ambos eventos disminuyen el porcentaje de enzima desplegada que podrían ser propensos a un plegamiento anómalo (Han y col., 2007).

En resumen: la inulosacarasa de *L. citreum* CW28 es una proteína multi-domino, conforma una nueva familia de FTFs multidominio las cuales no se han estudiado a profundidad, posee características estructurales tanto de FTFs y GTFs y su dominio C-terminal está involucrado en la especificidad de reacción. En consecuencia surgen una serie de interrogantes: ¿afectan los dominios adicionales la actividad enzimática?, ¿el dominio C-terminal interviene en la asociación de la enzima a la pared celular?, ¿de que manera pueden influir los dominios adicionales en la estabilidad enzimática?, ¿los dominios tienen influencia en la especificidad hacia el producto? ¿cuál es el efecto de los dominios adicionales en el comportamiento cinético?. Por ello resulta interesante realizar un estudio de la inulosacarasa de *L. citreum* CW28 en el que se aborden aspectos de la relación estructura-función de la enzima y se aporte al conocimiento de la función de los dominios adicionales de las FTFs.

CAPITULO 2

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis.

La fructosiltransferasa de *L. citreum* CW 28 (IsIA) es una enzima que puede funcionar como tal con un solo dominio, pero que ha adquirido regiones adicionales para mejorar su estabilidad, mejorar sus propiedades y bioquímicas y ubicarse en la pared celular de la enzima.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general.

Contribuir al conocimiento de la relación estructura-función en la IsIA de *L. citreum* CW28; específicamente determinar la función de las regiones adquiridas en su comportamiento bioquímico.

2.2.2. Objetivos específicos

- Construir y purificar versiones truncadas de la IsIA, eliminando las regiones N y C-terminal.
- Determinar si el dominio C-terminal de la IsIA contribuye a la unión de la enzima a la pared celular de *L. citreum* CW28.
- Caracterizar cinética y bioquímicamente las versiones truncadas obtenidas.
- Determinar el efecto de la eliminación de las regiones adquiridas en la interacción con el medio de reacción.
- Analizar los cambios estructurales de la IsIA y sus formas truncadas inducidos por la ausencia y presencia de Ca^{2+} .

CAPITULO 3

3. Materiales y Métodos

3.1. Material biológico

3.1.1. Cepas utilizadas.

La cepa *Leuconostoc citreum* CW28 se obtuvo de la colección de cepas aisladas del pozol por la Dra. Carmen Wachter Rodarte de la Facultad de Química, UNAM. La cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 se obtuvo de la colección del Northern Regional Research Laboratory (NRRL) Peoria, Illinois. Las células se conservaron a -20°C en una solución de glicerol al 30% (v/v) y se utilizaron como inóculos para las fermentaciones.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizados en este estudio se enlistan a continuación indicando sus principales características:

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	$\Delta(\text{mcr A})183$, $\Delta(\text{mcr CB-hsdSMR-mrr})$, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, [F' pro AB, lacIq Z Δ M15, Tn10(tetr)]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$ Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 $\Delta(\text{ara-leu})7697$ galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen

3.2. Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas de *Leuconostoc* se reactivaron a partir de células liofilizadas en el medio descrito en la tabla 2.1 y cultivadas a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar 5 unidades de DO600 nm. El pH del medio se ajustó antes de esterilizar a 6.9 con ácido fosfórico.

Tabla 2.1. Composición del medio de cultivo para la producción de glicosiltransferasas de especies de *Leuconostoc*

Reactivo	Concentración (g/L)
Sacarosa o glucosa	20
Extracto de levadura	20
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.02
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0.01
MnSO ₄ .7 H ₂ O	0.01
NaCl	0.01

Las células de *E. coli* se crecieron a diversas temperaturas y 250 rpm en medio Luria-Bertani (LB, tabla 2.2) pH fisiológico. El medio fue adicionado con 100 µg/ml de ampicilina ó 50 µg/ml de kanamicina de acuerdo al gen de resistencia del plásmido estudiado. En el caso de la expresión de proteínas heterólogas en *E.coli*, las condiciones del cultivo se variaron buscando la máxima producción de proteína, como se mencionará más adelante.

Tabla 2.2. Medio Luria Bertani

Reactivo	Concentración (g/L)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

El medio para la recuperación de células *E. coli* después de la electroporación, se describe en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Medio SOC

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración</i>
Triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM

3.3. Técnicas de biología molecular.

3.3.2. Purificación de ADN plasmídico.

El ADN plasmídico se extrajo con el Kit CONCERT de Roche siguiendo las indicaciones del proveedor a partir de 5 ml de cultivo crecidos O/N en medio LB adicionado con el antibiótico requerido.

3.3.3. Amplificación de fragmentos de ADN (PCR).

Los fragmentos de ADN se amplificaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones del gen *isla* de *L. citreum* CW28 se realizaron con la polimerasa Taq DNA Polimerase (Invitrogen) ya que en ambos extremos deja 4 terminaciones en A, necesarias para la clonación en los sistemas de expresión pBAD/TOPO, además de ser una polimerasa de alta fidelidad. En general el volumen final de reacción fue de 50 μ L colocando los siguientes volúmenes de cada reactivo:

High Expand Fidelity (Roche)	1 μ L
dNTP's (10 mM)	1 μ L
Oligonucleótidos (50 pM)	0.5 μ L
DNA	100 ng
Buffer 10x con Mg ⁺²	5 μ L

Las reacciones se realizaron en el termociclador RoboCycler Gradient 96 Stratagene. El tiempo de elongación varió de acuerdo a la longitud del fragmento amplificado de ADN, tomando en cuenta que para cada 1000 pb se requiere de un tiempo de extensión de 1 minuto. Las condiciones de reacción generales se mencionan en la tabla 2.4; la temperatura de alineamiento dependió de la T_m de los oligonucleótidos (tabla 2.5). Para analizar los productos de PCR obtenidos se utilizaron 5 μ L de reacción y se corrieron en geles de agarosa 0.8% a voltaje constante (100 V).

Tabla 2.4. Condiciones de amplificación de los fragmentos de ADN.

No. de ciclos	Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	Desnaturalización	5	94
	Desnaturalización	1	94
30	Alineamiento	1	58
	Extensión	Variable ^b	68
1	Extensión final	10	68

^bTiempo de extensión de acuerdo al tamaño del fragmento a amplificar

3.3.2.1. Clonación de las versiones truncadas

El gen que codifica para la IsIA2 se generó usando los oligonucleótidos: SPdirevecto y IS2reverso.; para la IsIA3 con SPdirevecto y ISE3rvEco y para la IsIA4 con β ProNaeI e ISE3rvEco. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se enlistan en la tabla 2.5.

Tabla 2.5. Oligonucleótidos utilizados en la construcción de IsIA y sus versiones truncadas.

Nombre	Secuencia (5' \rightarrow 3')	Longitud (b)
Para clonación las versiones truncadas en pBAD/TOPO		
SPdirevecto	ACC ATG GAC GTG AAT CAA CCA CTT TTA GCG	30
IS2reverso	CTA ATT TAA ATC GCG TGA AAA GCT AAT GGC	30
ISE3rvEco	ATC CTC AGA ATT CAA TGC TAA TAA CTC AAC	30
β ProNaeI	ACC GAA ATG ACT AGT GTG CCG GCG CTT ATA	30
GBDIslAF	TGG GGA GAT GAT GAT CAC TCT ATA	24
C-IsIAXhoI	GG ATT GAT AAG CGT GCT TTG CAA GCT CTC GAG CGG	35

Las ligaciones de los productos de PCR se realizaron con el Kit pBAD/TOPO® Thio Fusion de Invitrogen siguiendo las especificaciones del proveedor. En la tabla 2.6 se describen las características de los plásmidos utilizados y generados en este trabajo.

Tabla 2.6. Vectores empleados y generados en este trabajo.

<i>Plásmido</i>	<i>Tamaño (kpb)</i>	<i>Características</i>	<i>Referencia</i>
pBAD/TOPO	4.5	Vector de expresión cuyo promotor ara es inducible por L-arabinosa, con resistencia a ampicilina.	Invitrogen
pEIS1	9.5	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la IslA, clonado en los sitios	Pérez Morales, 2004
pESI2	7.3	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la IslA2, clonado en los sitios	Olivares Illana, 2003
pΔNEIS2	6.6	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para el dominio catalítico y la región de transición (ΔIslA2)	Este trabajo
pEIS3	6.8	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la IslA3.	Este trabajo
pGBDIslA	6.8	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para el C-terminal de la IslA.	Este trabajo
pEIS4	6.1	pBAD/TOPO con el fragmento que codifica para la IslA4	Este trabajo

3.3.3. Transformación de *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* fueron transformadas por electroporación con un aparato Micropulser Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en las condiciones: 2.5kV, 25 μ F y 200 Ω . Se colocaron de 2-5 μ L de plásmido purificado o de ligación con 60 μ L de células electrocompetentes en una cubeta de 0.2 mm; después de la electroporación se agregó 1 ml de medio SOC y las células se transfirieron a un tubo eppendorf, manteniéndose incubadas durante 1 h a 37°C y 250 rpm. Posteriormente, las células se plaquearon en cajas LB con el antibiótico adecuado.

3.3.4. Secuenciación.

Las secuencias obtenidas en este trabajo se realizaron en el secuenciador automático Applied Biosystem 3100 en la Unidad de Secuenciación Automática de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Mor.).

3.3.5. Análisis de las secuencias de ADN.

Los alineamientos entre secuencias de aminoácidos se realizaron con el programa Clustal W. Las comparaciones de las secuencias tanto nucleotídicas como de aminoácidos con las bases de datos se realizaron utilizando distintas versiones Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3.3.6. Sobreexpresión y obtención de las versiones truncadas de la IsIA de *L. citreum* CW28 en *E. coli*.

Diversas cepas de *E. coli* fueron utilizadas para la expresión de las versiones truncadas con el fin de encontrar las mejores condiciones de expresión: con el plásmido pESI1 y pESI2 transformaron células de *E. coli* DH5 α ; con pESI3 se transformaron células de *E. coli* TOP10 y con pESI4 se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3). Los cultivos se realizaron a 37°C a 250 rpm hasta alcanzar 0.6 unidades de DO600 nm; en este punto los cultivos fueron inducidos con diferentes concentraciones de arabinosa: 0.02 % (v/v) para la IsIA2 y Δ NIIsIA2, 0.2 % (v/v) para la IsIA3 y IsIA4 y 0.002% para la GBDIsIA. Posteriormente se modificó la temperatura a 22°C para evitar la formación de cuerpos de inclusión y disminuir la proteólisis. Las células permanecieron creciendo hasta alcanzar 1.8 U de DO600 nm (aprox. 4 h) y fueron colectadas por centrifugación a 7 000 rpm durante 10 min a 4°C; posteriormente fueron lavadas 2 veces con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5; a continuación la pastilla fue resuspendida en 5 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5. Las células

se lisaron por medio de la prensa de French, sometiéndolas 2 veces a 9000 psi de presión. El sobrenadante se recuperó por centrifugación a 10 000 rpm durante 30 min, y se determinó la actividad FTF.

3.4. Técnicas enzimáticas y bioquímicas.

3.4.1. Producción de glicosiltransferasas de *Leuconostoc*.

El inóculo de las fermentaciones se preparó a partir de células almacenadas en glicerol 30% (v/v) a -20°C en 100 ml de medio de cultivo LM con sacarosa, éste sirvió para inocular 900 ml del mismo medio y se mantuvo creciendo a 23°C y 200 rpm hasta alcanzar 5 U de DO600 nm. El crecimiento celular fue monitoreado midiendo la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU® 650. Las células se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min a 4°C y se lavaron 2 veces con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 (si las células provenían de *L. citreum* CW28) o de acetatos 50 mM pH 5.2 (si las células eran de *L. mesenteroides* NRRL B-1355). El paquete celular se solubilizó con 25 ml de 8 M urea, agitándose lentamente por 1 h. El sobrenadante se recuperó por centrifugación a 10000 rpm por 10 min y se dializó por 24 h con el amortiguador indicado y 1 mM de CaCl_2 con cambios del amortiguador cada 8 h.

3.4.1.1. Eliminación de ADN del extracto enzimático de la ISLA

La ISLA obtenida de la extracción con urea contiene ADN, por lo que el material genético se precipitó con sulfato de estreptomicina. La muestra se incubó durante 1 h con sulfato de estreptomicina 1% (P/V) y posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante nuevamente se dializó contra amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 conteniendo 1 mM de CaCl_2 para eliminar los restos del sulfato de estreptomicina.

3.4.2. Producción de células de *Leuconostoc* sin actividad glicosiltransferasas.

Con el fin de producir células de *L. citreum* CW28 carente de la Isla en la pared se utilizó glucosa al 2% (V/V) como fuente de carbono y se las células se resembraron tres veces en medio líquido antes de inocular. El resto de la producción se realizó como se describe en el apartado anterior.

3.4.2.1. Pegado de las glicosiltransferasas a las células de *L. citreum* CW28 y *L. mesenteroides* NRRL B-1355 .

Se pusieron en contacto la enzima purificada 0.3 mg/mL y 2.25 mg/mL de células en el amortiguador indicado para la enzima con agitación suave 12 h a 4°C. Posteriormente el medio se centrifugó a 7000 rpm, 4°C y 10 min, colectándose ambas fracciones. Las células fueron lavadas intensamente 3 veces, colectándose todas las fracciones para su posterior análisis por medio de geles de SDS-PAGE, western blot y/o determinación de actividad por DNS cuando la proteína contenía el dominio catalítico. Para eliminar las uniones inespecíficas, además de los lavados ya descritos, las células que contenían la proteína anclada se lavaron con NaCl 1 M.

3.4.3. Determinación de la actividad enzimática fructosiltransferasa.

La actividad fructosiltransferasa total es determinada por la cuantificación de azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática en presencia de 100 g/L de sacarosa en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 a 30°C. Los azúcares reductores se determinaron mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sumer y Howell, 1935). Una unidad se define como la cantidad de enzima que libera de una μmol de fructosa por minuto en las condiciones mencionadas.

3.4.4. Purificación de proteínas recombinantes

Las formas truncadas se purificaron por medio de cromatografía de afinidad con la resina Ni-NTA de Qiagen, siguiendo las siguientes condiciones. La columna se equilibró con el amortiguador de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM) y se ajustó el pH a 7.5 para IsIA2 y $\Delta\text{NIIsIA2}$ a pH 7 para IsIA3 e IsIA4 y a pH 8 para GBDIsIA. Se lavó con 8 volúmenes de amortiguador de lavado A (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM) al pH correspondiente y la proteína se eluyó con 2 volúmenes del amortiguador de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM). Para eliminar el imidazol la enzima se diafiltró con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 y CaCl_2 1 mM. Para retardar el procesamiento proteolítico de las enzimas se adicionó Pepstatina 0.7 $\mu\text{g/ml}$ y cocktail Complete EDTA Free.

3.4.5. Cuantificación de proteína.

La determinación de la concentración de proteína se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando el kit Bio-Rad (Hercules, CA) y la de proteína celular por medio del método de Lowry. Como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (fracción V, SIGMA). La concentración del estándar osciló entre 0- 20 mg/L de proteína.

3.4.6. Electroforesis de proteínas.

Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) siguiendo la metodología de Laemmli (1970). Se utilizó una cámara Mighty small I, con geles de 1 mm de espesor. El gel concentrador se realizó al 4% y el de separación al 8%, los pesos moleculares que se pueden separar en geles con esta concentración van de 50 a 200 kDa. Las muestras a analizar fueron incubadas a 95°C durante 5 min con una solución de carga desnaturizante que contiene: tris-HCl 0.12M pH 6.8, SDS 4% (w/v), glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.05% (w/v).

La migración se efectuó a corriente constante de 20 mA por gel. La solución amortiguadora empleada para esta migración contiene Tris-base 15.1 g/L, glicina 72 g/L, SDS 5 g/L. Posterior a la migración, el gel podía seguir uno de los siguientes tratamientos:

- a. *Coloración de proteínas con azul de coomassie*: el gel es incubado durante 10 min., en una solución de ácido acético 10% (v/v), metanol 30% (v/v) y azul de coomassie 0.2% (v/v). Posteriormente se efectúan lavados del gel para eliminar los excesos del colorante con una solución de ácido acético 10% (v/v) y metanol 30% (v/v).
- b. *Coloración con reactivo de Schiff*: el gel es lavado a temperatura ambiente 3 veces durante 20 min con una solución renaturalizante que contiene: amortiguador de acetatos 20-50 mM y Tritón X-100 o Tween 80 1% (v/v). Posteriormente durante toda la noche a temperatura ambiente el gel es incubado con esa misma solución adicionada con sacarosa 100 g/L. La aparición de bandas blancas corresponden a la síntesis de polímero producido por la enzima. Las bandas de polímero son fijadas con una solución de etanol al 75% (v/v) durante 30 min. Posteriormente el gel permaneció 1 h en una solución de ácido peryódico 0.7% (p/v) y ácido acético 5% (v/v). En seguida, se efectuaron 3 lavados sucesivos de 20 min con metabisulfito de sodio 0.2% (p/v) y ácido acético 5% (v/v). Finalmente el gel se puso en contacto con el reactivo de Schiff (Sigma) hasta alcanzar la coloración deseada.
- c. *Western Blot*. Se siguió la técnica descrita por el proveedor (Invitrogen)

3.4.7. Determinación de propiedades cinéticas de las versiones truncadas.

La determinación de la velocidad inicial se realizó a pH 6.5 y 30°C, 1 mM de CaCl₂ en un intervalo de 0 a 584 mM de sacarosa. Se usó la técnica del DNS para la cuantificación del poder reductor. Para determinar V_{max} y K_m se utilizó la forma linealizada de la ecuación de Hill o Michaelis-Menten, según el caso.

Ec. de Hill

$$\frac{V}{V_{\max} - V} = \frac{S^n}{Km^n}$$

V= Velocidad inicial ($\mu\text{mol fru min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)

Vmax= Velocidad máxima($\mu\text{mol fru min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)

S= Sustrato (mM)

Km= Constante de afinidad por el sustrato (mM)

n= coeficiente de Hill

ó bien:

$$\log \frac{V}{V_{\max} - V} = n \log S - n \log Km$$

Ecuación de Michaelis-Menten

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{Km + S}$$

Linearizando

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Ecuación de Lineweaver-Burk

3.4.8. Determinación del efecto del pH, temperatura y estabilidad de las versiones truncadas con actividad FTF.

Para definir el pH óptimo de actividad de la formas truncadas, se preparó amortiguador de fosfatos 50 mM a diferentes pHs (5-8) y se determinó la actividad de la enzima a 30°C con 100 g/L de sacarosa, 1 mM de CaCl₂ usando 1 U/ml de enzima. En la determinación de temperatura óptima, el rango analizado fue de 20-45°C en presencia de 100 g/L de sacarosa, 1 mM de CaCl₂ y usando 1 U/ml de enzima. En todos los casos la mezcla de reacción se preincubó durante 5 min., iniciando el ensayo de actividad al colocar la enzima. La

duración del ensayo fue de 15 min; tomando alícuotas cada 3 min. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

Se determinó la estabilidad a 35°C de las formas: Δ NIslA2, IsIA2, IsIA3 y IsIA4, para lo cual se incubaron las enzimas a 35°C. Se tomaron alícuotas a diversos tiempos y se determinó la actividad residual a 30°C mediante la técnica del DNS. Con estos datos se determinó la vida media de las enzimas ($t_{1/2}$) y la constante de desactivación de primer orden (k), a partir del cálculo de k se estima la vida media.

$$\ln Act = -kt$$

de donde se puede demostrar que:

$$\ln \frac{A}{A_0} = -kt$$

donde A_0 es la actividad inicial y A al tiempo "t", por lo tanto la vida media ($t_{1/2}$) se calcula:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

3.4.9. Determinación de la relación hidrólisis/transferencia de las versiones truncadas con actividad FTF

La especificidad enzimática hacia hidrólisis y transferencia se analizó a diferentes concentraciones de sacarosa (0-873 mM), usando 1 U/ml de extracto enzimático. Las muestras se analizaron en un equipo de cromatografía de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés) de Waters, equipado con un detector de índice de refracción, una columna para determi-

nación de carbohidratos (4.6x250 mm) a 35°C. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/agua en relación 75:25 a un flujo de 1.4 mL/min.

La tasa de hidrólisis y transferencia fueron calculadas con las siguientes formulas:

Actividad transferasa:

$$\frac{\text{Glu (mM)} - \text{Fru (mM)}}{\text{Glu (mM)}} \times 100, [=] \%$$

Actividad hidrolasa:

$$\frac{\text{Fru (mM)}}{\text{Glu (mM)}} \times 100, [=] \%$$

100 - % Actividad transferasa, [=] %

3.4.10. Producción y análisis del polímero

La síntesis de polímero se realizó en las siguientes condiciones:

Sacarosa	100 g/L
Amortiguador fosfatos 50 mM pH 6.5	20 mM
CaCl ₂	1 mM
Enzima	1 U/ml

Las reacciones se realizaron a 30°C y se detuvieron hasta alcanzar el 70% de conversión de sustrato, en todos los casos. El polímero no soluble fue separado por centrifugación a 10000 rpm durante 10 min. El polímero soluble fue precipitado con dos volúmenes de etanol, dializado contra agua y liofilizado para su posterior análisis.

El polímero producido por las formas truncadas fue analizado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del C₁₃. El peso molecular del polímero fue analizado por cromatografía de permeación en gel en una columna para HPLC Waters 600E HPLC (Waters Corp. Milford, MA) equipada con detector de índice de refracción (Waters 410), usando un set de co-

lumnas Ultrahydrogel (UG 500) con agua como fase móvil a 0.9 mL/min. Las muestras se inyectaron a una concentración de 2 mg/mL.

3.4.11. Fluorescencia.

Los ensayos de fluorescencia se realizaron en el fluorímetro Perkin Elmer LS-55. Excitando a 280 nm y colectando los datos en el rango de 300-500 nm a 30°C, observándose la máxima fluorescencia a 348 nm (típica del triptofano oculto). La concentración de proteína utilizada fue de 0.018 mg/mL para la IslA4, 0.020 mg/mL para la ΔN IslA2, IslA2, IslA3 e IslA. La fluorescencia se reporta en Unidades relativas de Fluorescencia (URF).

Para la curva de desnaturalización por urea, se usó 0-8 M de urea con 0.018 U/mg IslA4, dejándola incubar por 1 h, se cuantificando su actividad al término de la incubación y se observó el espectro de emisión en el rango de 300-500 nm.

3.4.12. Dicroísmo circular (DC)

Los ensayos de dicroísmo circular (DC) se realizaron en un espectrofotómetro Jason J-715 en el UV-lejano (190-250nm), promediando 3 lecturas de una misma muestra. Para calcular la elipticidad molar (Θ_{mrw}) de las muestras se utilizó la siguiente fórmula:

$$\Theta_{mrw} = \frac{\Theta \times M_{mrw}}{10 \times c \times l}$$

Θ_{mrw} = Elipticidad molar (grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$)
 Θ = Elipticidad (mgrados)
 M_{mrw} = Peso molecular promedio de residuo (peso de la proteína/no. de residuos)
 c = concentración proteína (mg mL^{-1})
 l = longitud de la celda (cm)

3.4.13. Absorción atómica.

Se produjeron 2 L de fermentación de *L. citreum* CW28 para purificar la IslA como se menciona en la sección 3.4.1. Posteriormente, se cuantificó la actividad específica y se incubó con EDTA 5 mM por 12h, para eliminar el Ca^{2+} quelado se dializó contra agua MQ por 12

h haciéndole cambios cada 6h. A continuación las muestras se liofilizaron y se hidrolizaron con HClO_4 70% (V/V) al mechero hasta ebulir y obtener una coloración negruzca en aquellas donde había mucha materia orgánica. Finalmente las muestras se aforaron a 20 mL con agua MQ y se enviaron al lab. de la Dra. Liliana Saldívar en la Fac. de Química, UNAM para su análisis.

Todo el material previo a su utilización se lavó con HNO_3 10% (V/V). Bajo las mismas condiciones experimentales se trató la muestra blanco y el control positivo, solo que no se les agregó EDTA. La concentración obtenida del blanco se le restó a la muestra control positivo y la que contenía EDTA.

4. Resultados y discusión.

4.1. Subclonación y clonación de las versiones truncadas de la inulosacarasa de *L. citreum* CW 28.

Debido a las características estructurales que presenta IsIA de *L. citreum* CW 28, se planteó estudiar la relación estructura-función de la enzima a través de la eliminación total o parcial de dominios y/o regiones adquiridas, dando lugar al diseño de nuevas versiones truncadas. Para lograr esto se utilizaron las construcciones IsIA e IsIA2 (Olivares-Illana, 2003, Pérez Morales, 2004) (fig. 4.1), además se construyeron otras versiones truncadas: IsIA3 a la cual se le eliminó todo el dominio C-terminal, IsIA4 a la que se le eliminó de manera parcial el N-terminal (209 aa) y todo el dominio C-terminal, Δ NIsIA2 a la cual se le eliminó parcialmente el N-terminal y la región de alta identidad con la Asr dejándole la región de transición y el GBDIsIA que consiste del dominio C-terminal (fig.4.1). Todas las construcciones se clonaron en el sistema pBAD/TOPO con un promotor inducible por arabinosa.

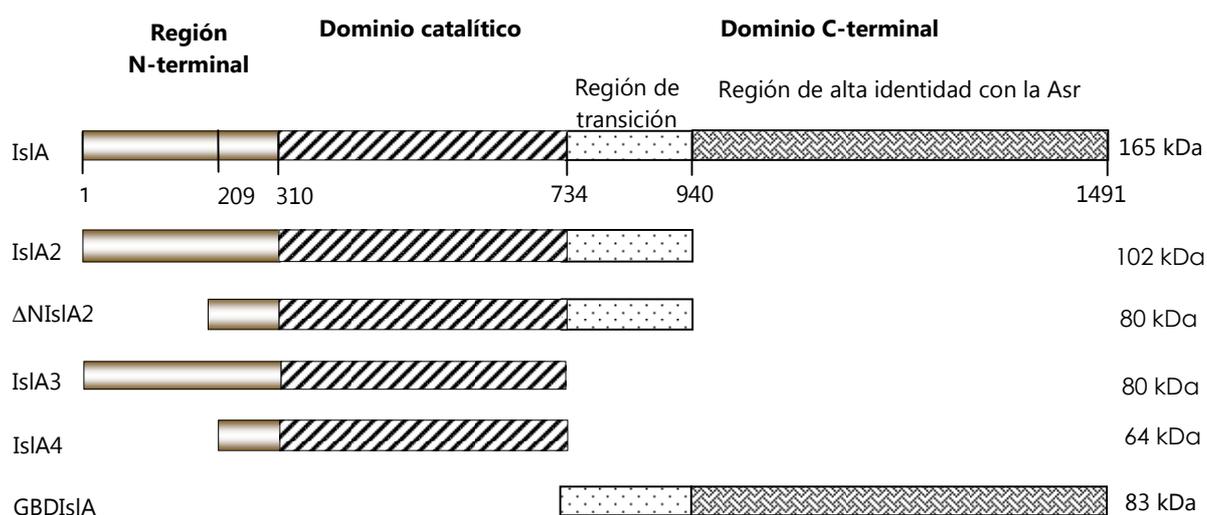


Fig.4.1. Esquema de IsIA y de las versiones truncadas

La expresión de las versiones truncadas se realizó en *E. coli* induciendo con arabinosa. Después de crecer las células se cosecharon y lisaron. La actividad FTF fue detectada en la fracción soluble después de la ruptura celular. Esta fracción se utilizó posteriormente para purificar las proteínas recombinantes a través de cromatografía de afinidad en una resina de Ni-NTA de Qiagen, por medio del parche de His presentes en el extremo C-terminal de las proteínas recombinantes. En la fig. 4.2 se observa que además de una principal de mayor concentración se aprecian otras bandas de menor peso molecular; dichas bandas son producto de la proteólisis de la proteína de mayor peso molecular. Aun no se ha determinado si el procesamiento es autoproteolítico o por proteasas endógenas, por lo que las fracciones purificadas se caracterizaron de inmediato.

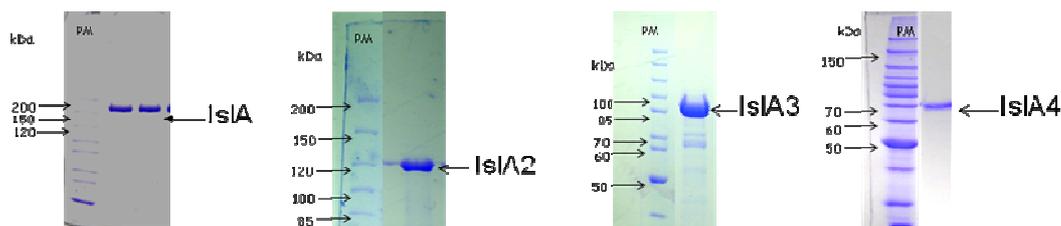


Fig. 4.2. Purificación de las versiones truncadas de IsIA.

El estudio de la relación estructura-función de IsIA se realizó a través de analizar diversos parámetros bioquímicos de las versiones truncadas: efecto del pH y de la temperatura en la actividad, estabilidad, tamaño y estructura del polímero y especificidad de reacción (hidrólisis/transferencia). También se analizaron sus parámetros cinéticos y la influencia de los dominios adicionales en la sustracción del ión Ca^{2+} por EDTA.

4.2. Caracterización bioquímica de las versiones truncadas con actividad FTF.

4.2.1. Determinación de termoestabilidad y efecto la temperatura en la actividad.

En experimentos preliminares se había propuesto que el extremo C-terminal influye en la estabilidad de la enzima, por lo que se realizó un análisis acerca de la termoestabilidad de IsIA y las enzimas truncadas a 35°C.

En la tabla 4.1 se observa que IsIA2, que carece del C-terminal, es casi tan estable como IsIA, en cambio cuando se elimina parte de la región N-terminal (Δ NIsIA2), la estabilidad disminuye drásticamente, reduciéndose a 60 min. el tiempo de vida media. Por otro lado, IsIA3 que carece de la región de transición, muestra una vida media mayor que Δ NIsIA2 y menor que IsIA. Finalmente IsIA4, que carece tanto de la región N-terminal como del dominio C-terminal presenta una vida media menor que IsIA3, como consecuencia de la eliminación del N-terminal, aunque mayor que la Δ NIsIA2. Por lo tanto, los resultados indican que la eliminación de la región C-terminal de alta identidad con la Asr no tiene un efecto importante en la estabilidad, contrario a lo que se había propuesto inicialmente (Olivares-Illana y col., 2003). Así, mientras que la eliminación en conjunto de las regiones N-terminal y de transición tuvo una repercusión negativa en la estabilidad de la enzima, la eliminación de las regiones N-terminal y de transición permiten concluir que la región de transición provoca la desestabilización de la proteína a 35°C, mientras que la región N-terminal la estabiliza.

Tabla 4.1. Estabilidad térmica de las versiones truncadas de IsIA.

<i>Versión truncada</i>	<i>Vida media a 35°C (min)</i>
IsIA	420±10
IsIA2	407±22
ΔNIsIA2	60±15
IsIA3	346±16
IsIA4	128±18

De lo anterior podría inferirse que la estabilidad de IsIA se ve beneficiada por interacciones entre las regiones N-terminal y de transición quizá por una cooperatividad conformacional entre ambas regiones y el dominio catalítico. Algunos autores sugieren que si la interfaz entre los dominios es grande éstos se estabilizan entre sí, en cambio si presentan uniones flexibles y pequeñas interfaces es poco probable que tal fenómeno ocurra (Han y col., 2007). Recientemente en el 7th Carbohydrate Bioengineering Meeting Braunschweig 2007, se presentó la estructura cristalográfica de GTF-A, una GTF de *L. reuteri* 121, reportando una estructura poco usual. Se propone que la cadena proteica se dobla en forma de "U", de tal forma que interaccionan los extremos N y C-terminal para conformar entre ellos un dominio (Pijning y col., 2008). El parecido estructural entre las FTFs y GTFs hace suponer que también en IsIA la región N-terminal interacciona con la región variable, conformando una estructura mas estable, por lo que cuando se elimina una o ambas regiones la termoestabilidad disminuye. ΔNIsIA2 presenta la vida media más corta de todas las versiones truncadas, se sugiere que la falta de una región con la cual estabilizarse origina un aumento en la entropía y entalpía de la enzima que favorece el desplegamiento y la inactivación de la enzima. Para una demostración fehaciente de este fenómeno sería necesario hacer estudios acerca de la cinética y termodinámica del desplegamiento de las versiones truncadas.

En algunas enzimas se ha reportado que la presencia de dominios adicionales incrementa la estabilidad de las proteínas. Se ha demostrado que versiones truncadas de DsrS son más susceptibles a la desnaturalización térmica (Monchois y col., 1998). En contraste, la estabilidad térmica de Asr de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 (el N y C-terminal de IsIA presenta alta identidad con las mismas regiones de Asr) no disminuye con las supresiones del N y C-terminal (Joucla y col., 2006), indicando que estas regiones en la Asr no tienen la misma función que en IsIA, y que la adquisición de estos dominios en IsIA tiene consecuencias importantes en la estabilidad.

Otro aspecto analizado fue la influencia de la temperatura en la actividad de las formas truncadas. Como se puede ver en la fig. 4.3, se presentan dos tipos de perfiles: IsIA2, Δ NIsIA2 y IsIA muestran la misma temperatura óptima, 35 - 40°C, mientras que, las otras dos versiones truncadas (IsIA3 e IsIA4) disminuyeron su temperatura óptima a 25-30°C. Asimismo, se observan dos tipos de comportamientos originados por las supresiones, uno donde se agrupan las enzimas con región de transición (IsIA, IsIA2 y Δ NIsIA2) y otro donde se congregan las que no la tienen (IsIA3 e IsIA4).

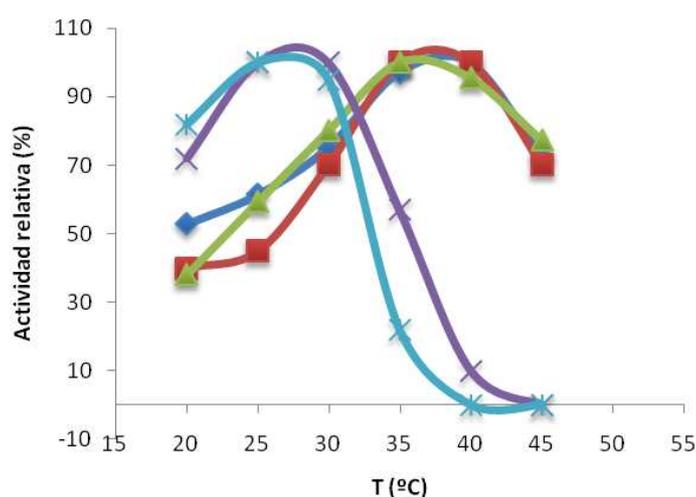


Fig. 4.3. Efecto de la temperatura en la actividad de las versiones truncadas. IsIA (—), IsIA2 (—), Δ NIsIA2 (—), IsIA3 (—) e IsIA4 (—).

Bajo estas condiciones de reacción (30°C, pH 6.5 y sacarosa 100 g/L), las enzimas que poseen la región de transición son más tolerantes a la temperatura que aquellas enzimas que no la tienen. De acuerdo con el análisis del efecto de la temperatura en la actividad, se sugiere que la región de transición (200 aa) contribuye de manera importante a que la enzima soporte temperaturas más altas, aunque en el ensayo de termostabilidad a 35°C, la región de transición requiere de la región N-terminal para su mostrar su efecto.

4.2.2. Efecto del pH en la actividad.

Así mismo se analizó la influencia del pH en la actividad de las formas truncadas. En la figura 4.4 se observa que todas las versiones truncadas mantienen el pH óptimo a 6.5, tal como la nativa, sin embargo la "campana" del perfil de pH se modificó, haciéndose mucho más estrecha como consecuencia de la eliminación de la región de transición.

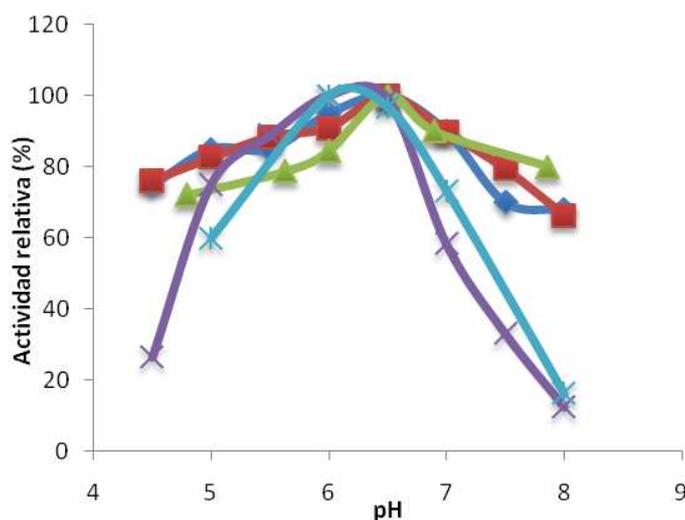


Fig. 4.4. Efecto del pH en la actividad de las versiones truncadas. IsIA (—), IsIA2 (—), Δ NIsIA2 (—), IsIA3 (—) e IsIA4(—).

En lo que actividad se refiere, mientras que las versiones que contienen la región de transición a pH 8 muestran alrededor del 80% de su actividad, IsIA3 e IsIA4 solo presentan el 10%. Además, se observan claramente dos tipos de comportamiento: el de las enzimas que contienen la región de transición y el de las que carecen de ella, probablemente por la disminución de la estabilidad al pH de las versiones truncadas que no cuentan ya con la región de transición (fig. 4.4).

En conclusión, de acuerdo con el análisis del efecto del pH se sugiere que la región de transición (200 aa) contribuye de manera importante a que la enzima tolere un rango de pH mayor.

De manera general, concluimos que en IsIA las regiones N-terminal y de transición son relevantes en la termoestabilidad, aunque cuando se evaluó el efecto de la temperatura y del pH en la actividad en las versiones truncadas, se observó una clara aportación de la región de transición en la tolerancia a la temperatura y el pH, probablemente debido a la mayor estabilidad estructural de la enzima.

4.2.3. Caracterización del polímero.

Debido a que el dominio C-terminal de IsIA tiene identidad con el GBD de Asr (una GTF), y en algunas GTFs la eliminación del GBD modifica el tamaño o estructura del polímero, se decidió investigar si las supresiones del N y C-terminal podrían tener algún efecto en la especificidad hacia el producto de la reacción. Para esto se determinó el peso molecular y la estructura por RMN del ^{13}C de los polímeros producidos por IsIA y las enzimas truncadas IsIA2, IsIA3 e IsIA4.

En la fig. 4.4 se puede apreciar que el tamaño del polímero no se modificó ni con la eliminación del N-terminal ni del C-terminal, mostrando el mismo peso molecular que el polímero producido por la enzima nativa (en promedio 3 000 000 Da). Por otro lado,

comparando la inulina comercial de origen vegetal (Raftiline*), se determinó que las diferencias en PM fueron de hasta 3 ordenes de magnitud, ya que Raftiline* consiste en inulina con un promedio de 8300 Da (fig. 4.5). Se sabe que las cadenas de inulina de GP bajo son biofuncionales, aunque no se sabe si las de alto GP también tienen efecto bifidogénico. Sin embargo, su efecto en la viscosidad de la solución podría dar lugar a nuevos desarrollos en alimentos funcionales.

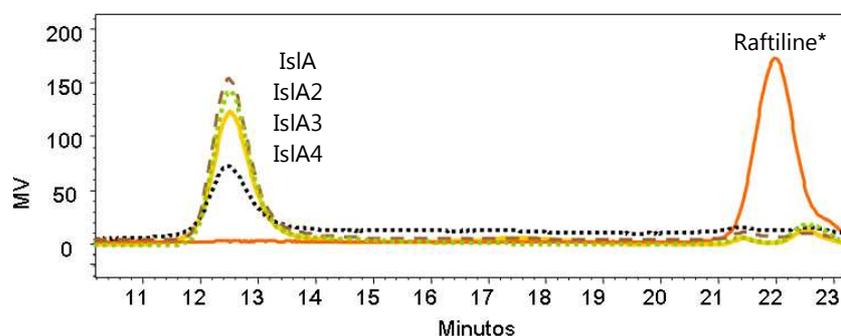


Fig. 4.5. Distribución del PM de los polímeros producidos por la IsIA y algunas de sus versiones truncadas. IsIA — — — — — , IsIA2 — — — — — , IsIA3 — — — — — , IsIA4 — — — — — .

Los espectros obtenidos de la RMN del ^{13}C de los polímeros producidos por las versiones truncadas de IsIA corresponden a un polímero de fructosa con enlaces $\beta(2-1)$, que es la estructura usualmente encontrada para inulina (Shimamura y col., 1987) además de corresponder con los desplazamientos químicos del polímero producido por IsIA (tabla 4.2).

Es evidente, que la eliminación de la región y el dominio que flanquean al dominio catalítico de IsIA no afecta ni el proceso de elongación del polímero ni la especificidad del producto de reacción, ya que no se observan diferencias entre el polímero de las FTFs mosaico y el producido por las formas truncadas. Este fenómeno también ha sido observado en Asr, en la que la eliminación del C-terminal no afectó las propiedades del producto (Joucla y col., 2006). Un comportamiento similar se observó en las ver-

siones truncadas de la inulosacarasa de *L. reuteri* y en las de GTF-I de *Streptococcus downei* (van Hijum y col., 2004 y Monchois y col., 1999).

Tabla 4.2. Desplazamientos químicos de los carbonos del polímero producido por las versiones truncadas de la IsIA.

Desplazamiento químico (ppm)					
	Átomo de carbono	Inulina <i>L. citreum</i> CW28	Polímero IsIA2	Polímero IsIA3	Polímero IsIA4
E s e v i d	C1	61.4	61.140	60.90	61.72
	C2	103.6	103.81	103.6	104.04
	C3	77.5	77.2	77.5	77.8
	C4	74.9	74.5	74.6	75.12
	C5	81.8	81.00	81.17	81.8
	C6	62.7	62.39	62.4	62.93

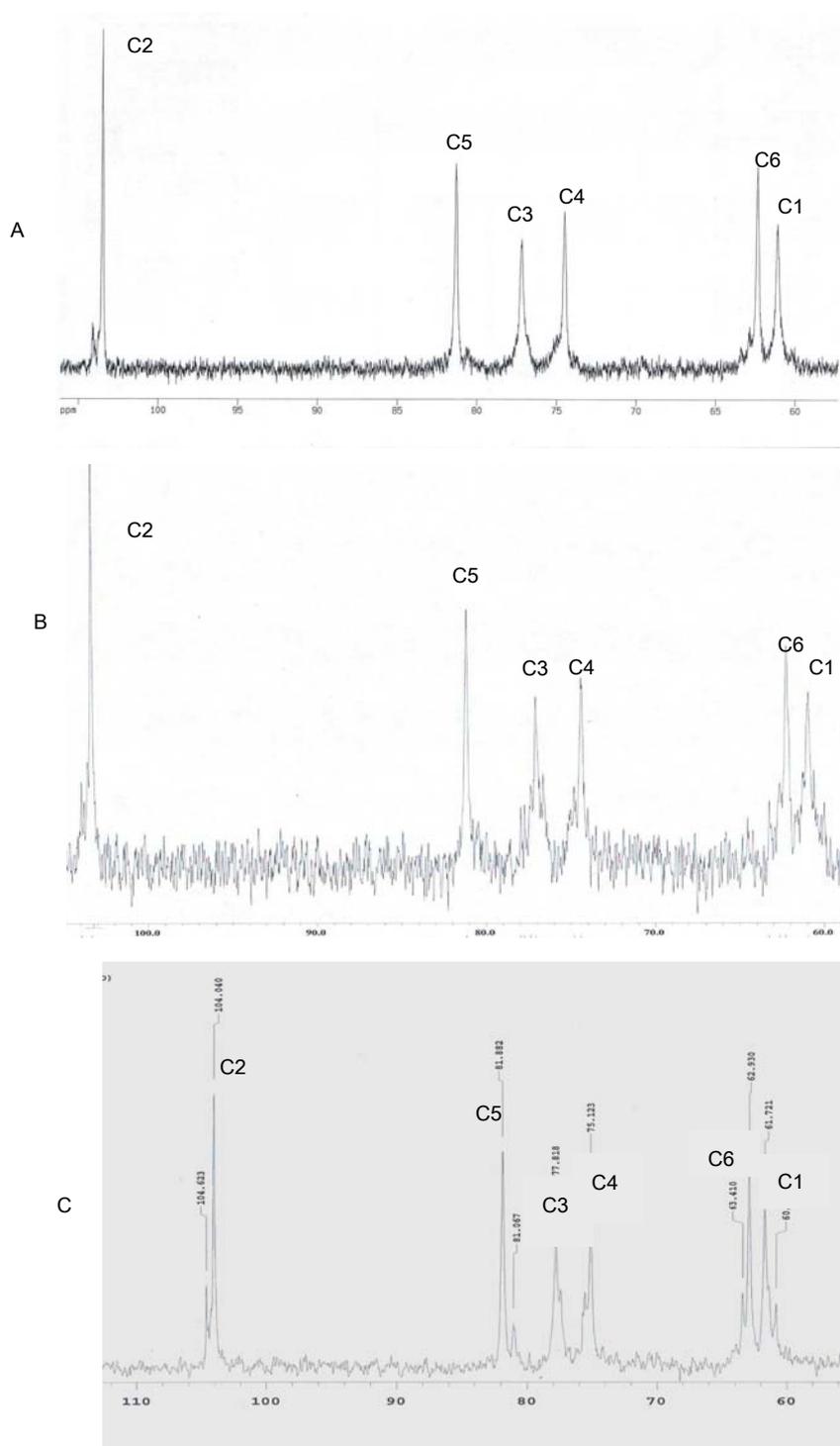


Fig. 4.5. Espectro de ^{13}C -RMN del polímero producido por las versiones truncadas de IsIA. A. IsIA2, B. IsIA3, C. IsIA4

4.3. Determinación de las constantes cinéticas de las versiones truncadas.

Con la finalidad de identificar si la región N-terminal y el dominio C-terminal afectan la catálisis se caracterizó el comportamiento cinético de las versiones truncadas purificadas. Dentro de la caracterización enzimática se determinaron los parámetros de K_m^G y k_{cat}^G para cada una de ellas (tabla 4.3). Las cinéticas de IsIA, IsIA2, Δ NIIsIA2 e IsIA4 se ajustaron al modelo cinético de Michaelis-Menten y los parámetros se calcularon mediante la regresión lineal empleando la representación de Lineweaver-Burk. IsIA2 y Δ NIIsIA2 mostraron los mismos parámetros cinéticos (k_{cat}^G y K_m^G) (tabla 4.3 y fig. 4.6), es decir la eliminación de la región N-terminal no alteró sus propiedades cinéticas.

Tabla 4.3. Propiedades cinéticas de IsIA y las versiones truncadas.

Versión truncada	K_m^G (mM)	k_{cat}^G (s⁻¹)	k_{cat}^G/K_m^G (mM⁻¹ s⁻¹)
IsIA	38	25	0.65
IsIA2	24	28.19	1.17
Δ NIIsIA2	18	29.6	1.64
IsIA3	nd ^a	nd	nd
IsIA4	142	105	0.73

K_m^G : K_m global, S=sustrato (sacarosa)

nd: no determinado

^aLos parámetros cinéticos fueron calculados con EZ-fit software debido a que los datos cinéticos no se ajustan al modelo de Michaelis-Menten.

La cinética de IsIA3 se ajustó al modelo de Hill, con un coeficiente de $n=1.2$ (Enzyme-Fit Software), además, perdió significativamente la afinidad por el sustrato reportando una $K_{S_{0.5}}=1017$ mM y una $k_{cat}=600$ s⁻¹. Cuando un comportamiento cinético se ajusta al modelo de Hill se asume que hay más de un sitio de unión presente en la enzima y/o formas multiméricas de la enzima que se regulan alostéricamente. Con $n>1$ se dice que el proceso es cooperativo e indica una interacción positiva de los sitios de unión presentes en la

enzima y/o en los multímeros con el sustrato, incrementándose la actividad enzimática. Alternativamente, cuando $n < 1$ la cooperatividad es negativa y se dice que hay una interacción negativa de los sitios de unión de la enzima y/o en los multímeros con el sustrato, disminuyendo la actividad. En este caso se sugiere que el proceso es cooperativo.

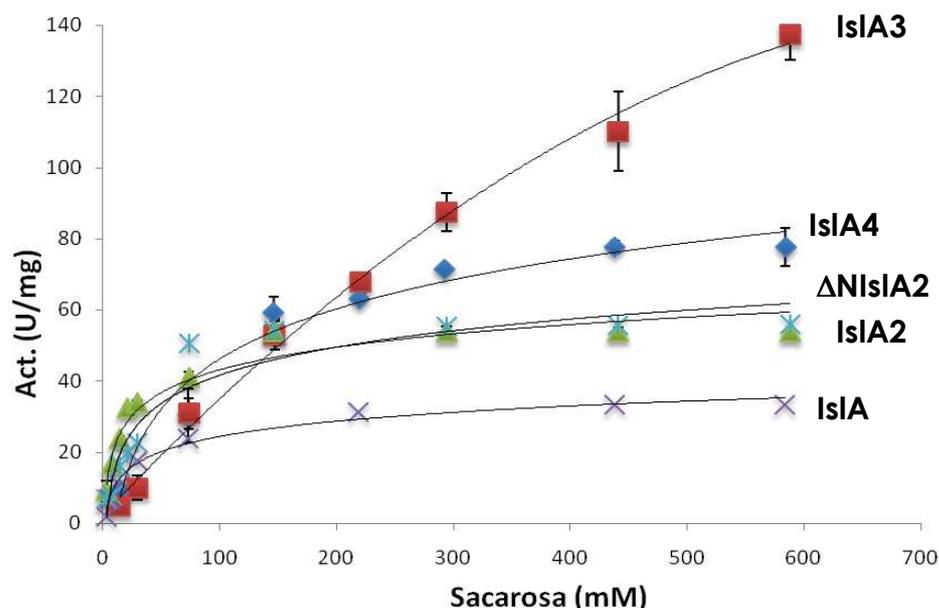


Fig. 4.7. Efecto de la concentración del sustrato en la velocidad de reacción de IsIA y las versiones truncadas.

Sorprendentemente es en la variante en la que se mantiene la región variable y se elimina la de transición, IsIA3, donde se genera un cambio importante en la cinética (fig. 4.7). Es difícil dar una razón por la cual el comportamiento cinético cambió, pues para ello se requerirían estudios más extensos ligados a datos cristalográficos, que nos permitan analizar los cambios estructurales sufridos con la eliminación de la región de transición. Es posible que la región de transición interactúe con el dominio catalítico, provocando que la enzima modifique la afinidad por el sustrato, por lo que en ausencia de esta región el sitio catalítico podría cambiar su conformación alterando su interacción con las moléculas de sustrato y aceptor vía la modificación de subsitios, en este tipo de mecanismo se invo-

lucra más la cooperatividad que la regulación alostérica (Frieden y col., 1984). Es importante señalar que el modelo de Michaelis-Menten solo es una descripción matemática de un fenómeno cinético que puede darse mediante muy diversos mecanismos, por lo que intentar describir diferencias a partir de datos cinéticos puntuales es muy aventurado.

En otras FTFs, la ecuación de Hill también ha servido para describir el comportamiento cinético; tal es el caso de la inulosacarasa y levansacarasa de *L. reuteri* a 50°C (van Hijum, 2003 y van Hijum, 2004), las cuales alcanzan la saturación a concentraciones altas de sustrato. La reuteransacarasa (GTFA) de *L. reuteri* 121, de la cual se construyeron también versiones truncadas del N y C-terminal, presenta un comportamiento similar al de IsIA: el comportamiento cinético de la enzima completa se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, mientras la versión que carece del N-terminal y parte del C-terminal se ajusta al modelo de Hill (Kralj y col., 2004). La inulosacarasa (InuJ) de *L. johnsonii* NCC 833 presenta el mismo comportamiento, cuando se elimina el N y C-terminal deja de obedecer un modelo michaeliano (Anwar y col., 2008).

De cualquier manera, al realizar el análisis de los parámetros cinéticos se observa que no hay una modificación importante entre las eficiencias catalíticas (k_{cat}^G/K_m^G) de IsIA y las formas truncadas, pero se obtienen algunas observaciones interesantes al analizar los parámetros individuales. Se puede observar que para IsIA4, la afinidad por el sustrato se pierde, incrementándose en un orden de magnitud su K_m . Además, la k_{cat} aumenta de 2-4 veces, como si la eliminación parcial de la estructura facilitara el acceso al sitio activo. De la misma manera, las versiones truncadas del N-terminal de GTFA de *L. reuteri* 121 mostraron una pérdida de la afinidad por el sustrato, incrementándose su K_m (Kralj y col., 2004).

Es interesante puntualizar que, la K_m^G de IsIA, IsIA2 y ΔN IsIA2 es similar a los valores reportados para la mayoría de las FTFs, incluyendo también a las que sólo presentan el dominio catalítico: la levansacarasa de *L. reuteri* (21 ± 4 mM) (van Hijum y col., 2003), *A. diazo-*

trophicus (11.8 mM) (Hernández y col., 1995), *L. sanfranciscensis* (13.1 mM) (Tieking y col., 2005), *L. mesenteroides* NRRL B-512F (LevS) (36.7 ± 5.4 mM) (Morales-Arrieta y col., 2006) y *L. mesenteroides* ATCC 1359 (27.3 mM) (Olvera y col., 2007), donde las últimas dos FTFs también presentan dominios adquiridos. Para las otras formas más pequeñas (IslA3 y IslA4) esta afinidad se ve afectada, siendo mas parecida a los valores reportados para las levansacarasas de bacterias Gram negativas que solo presentan el dominio catalítico: *Z. mobilis* y *P. syringae* (160 y 122 mM respectivamente) (Yanase y col., 1992, Hettwer y col., 1995).

4.4. Determinación de la relación hidrólisis / transferencia de las versiones truncadas.

Teniendo el precedente de que de la k_{cat}^G aumenta como consecuencia de la eliminación de las regiones adicionales, estudiamos la relación hidrólisis/transferencia al equilibrio a diferentes concentraciones de sustrato. Se ha demostrado que la actividad transglicosilasa depende de diversos factores, entre ellos, de la concentración de sustrato. Cuando esta propiedad fue estudiada al equilibrio en las versiones truncadas con diversas concentraciones de sacarosa (hasta 870 mM) se encontró, como se esperaba, que a bajas concentraciones de sustrato la actividad es preferentemente hidrolasa y transglicosilasa cuando se aumenta la concentración del sustrato (fig. 4.8). Así mismo, se observó que las supresiones de la región N-terminal y el dominio C-terminal disminuyeron la tasa de transferencia, modificando la especificidad de reacción hacia la hidrólisis del sustrato (tabla 4.4). Es importante señalar que la diferencia mas importante en la tasa de transferencia se registra entre Δ NIslA2 e IslA3, así mismo se observan dos comportamientos: el de aquellas enzimas que contienen la región de transición y las que carecen de tal región.

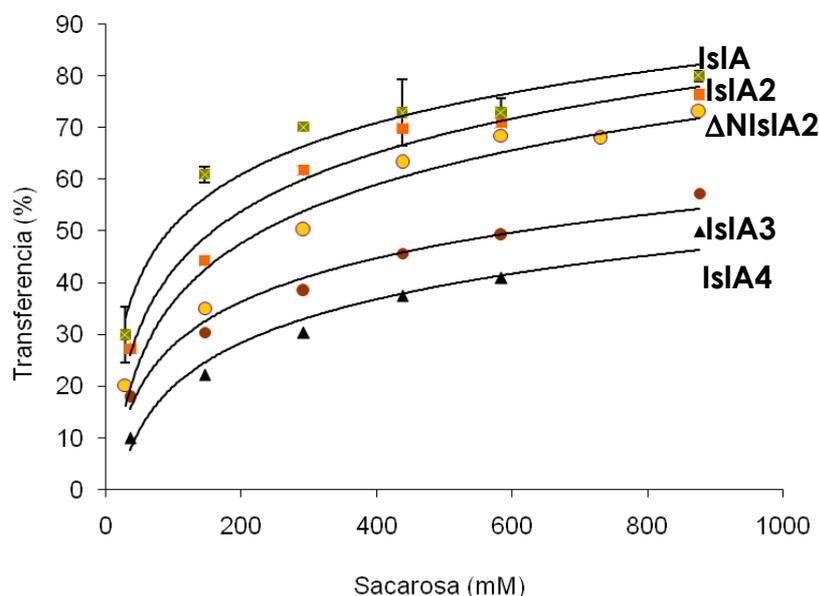


Fig. 4.8. Especificidad de las versiones truncadas a diferentes concentraciones de sacarosa.

El cambio de especificidad en las versiones truncadas se podría explicar mediante dos teorías: en una construcción quimérica la región N-terminal y el dominio C-terminal podrían producir una enzima menos hidrolítica, por la generación de un acceso complejo y largo para el ingreso de las moléculas de agua hacia el sitio activo; o bien, que los dominios adicionales modifiquen la conformación del dominio catalítico y con ello la afinidad del bolsillo catalítico por la molécula aceptora, reteniéndola por más tiempo y con ello favorecer la reacción de transferencia.

Existen otros factores que favorecen la actividad transferasa como son la utilización de solventes orgánicos o la inmovilización de la enzima. Como ejemplo de ello es el comportamiento de SacB en solventes orgánicos, cuando el agua del medio de reacción se sustituye por 2-metil, 2-propanol (2M2P), de esta manera se incrementó significativamente su capacidad transferasa de 45% a 85% (Castillo y Lopez-Munguía, 2004), en acetonitrilo (ACN) 50% (v/v) la enzima solo despliega actividad transferasa (Chambert y Petit-

Glatron, 1989). Es claro que la disminución de la a_w originada por el uso de solventes orgánicos genera una disminución en la relación hidrólisis/transferencia.

Tabla 4.4. Relación hidrólisis/transferencia de las versiones truncadas de IsIA

Versión truncada	Hidrólisis / transferencia (%)^a
IsIA	40/60
IsIA2	38/62
Δ NIsIA2	45/55
IsIA3	61/39
IsIA4	70/30

^a Medida después de consumir 293 mM de sacarosa (16 h de reacción)

Por otro lado, algunos estudios realizados en SacB inmovilizada en hidroxiapatita (HA), sugieren que la síntesis de levana se incrementa por la restricción de agua en el microambiente (Chambert y Petit-Glatron, 1993). Estudios recientes en torno a la estructura cristalográfica de SacB en presencia de rafinosa, sugieren que su alta capacidad hidrolítica podría deberse a la poca interacción entre los subsitios +1 y +2 y la rafinosa, por lo que el aumento en la síntesis de levana en SacB inmovilizada en HA podría deberse a una interacción del soporte con el dominio catalítico que incrementa la afinidad por el aceptor y con ello la transglicosilación. Por lo anterior, se propone que el cambio de especificidad se debe a que los dominios adquiridos generan una vía de acceso lento que dificulta el acceso de sustratos hacia el sitio activo y que las regiones adquiridas principalmente la región de transición junto con el N-terminal generan una interacción que modifica la conformación del sitio activo, modificando tal vez la afinidad por la molécula aceptora y por lo tanto un aumento en la tasa de transferencia.

4.5. Efecto de las regiones adicionales en la difusión del calcio.

Como se describió anteriormente, las FTFs de bacterias Gram positivas presentan un sitio potencial de unión a calcio, cuya función podría ser estabilizadora (Meng y Futterer, 2003 y Ozimek y col., 2004), por lo que nos dimos a la tarea de investigar si IslA tiene dependencia hacia el uso algún catión y que función podría tener.

En principio se evaluó si la actividad de IslA4 se afecta por el uso de EDTA, para lo que fue necesario sustraer el Ca^{2+} con EDTA (50 μM). Posteriormente se determinó que tipo de iones reestablecen la actividad, para lo que se usaron iones divalentes y monovalentes (MgCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , BaCl_2 , ZnCl_2 , NaCl , KCl , LiCl 1 mM) (fig. 4.9).

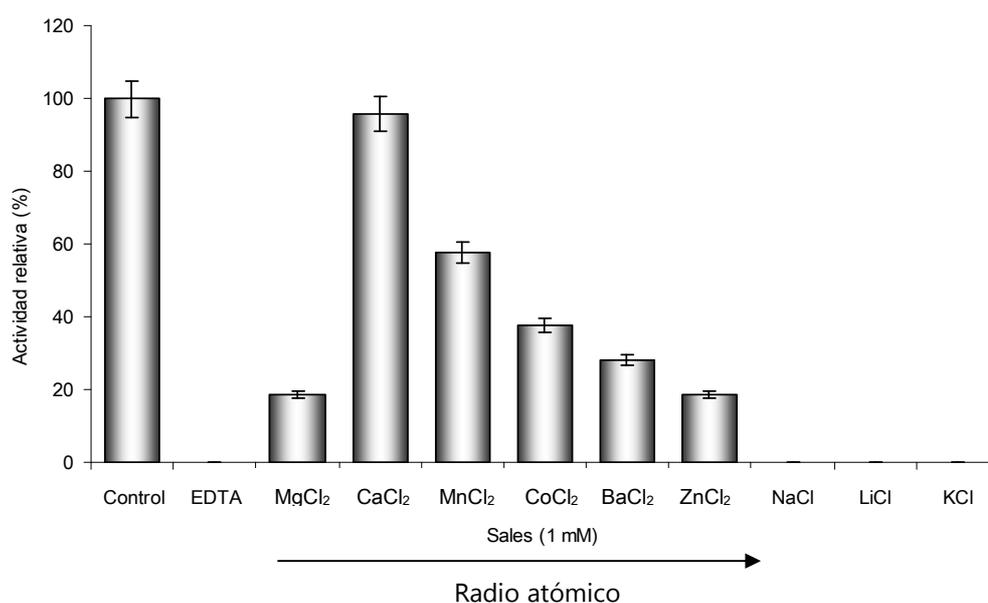


Fig. 4.9. Efecto de diversos iones monovalentes y divalentes sobre la actividad de IslA4

En la figura 4.9 se puede apreciar que solo los iones divalentes son capaces de reestablecer la actividad FTF, aunque no todos con el mismo porcentaje, siendo el Ca^{2+} el único de reestablecer la actividad totalmente. El radio atómico del Ca^{2+} es clave, ya que, conforme aumenta el radio atómico la capacidad para reestablecer la actividad disminuye (fig. 4.9).

A través del hilvanamiento del dominio catalítico de IslA con SacB, se localizaron los residuos que podrían estar conformado el sitio de unión a calcio: Asp495, Thr564, Asn566 y Asp597 (Asp339/SacB).

Una vez que se determinó la susceptibilidad de IslA4 por el Ca^{2+} y considerando su cercanía al sitio catalítico, se evaluó su efecto en la actividad de las versiones truncadas a través de la utilización de EDTA como agente quelante.

Se encontró que la velocidad de sustracción de Ca^{2+} es dependiente de la estructura de la enzima, ya que para removerlo, las formas de menor peso molecular requirieron de tiempos cortos de incubación y concentraciones bajas de EDTA (fig. 4.10), contrario a lo requerido por $\Delta\text{N}IslA2$, IslA2 e IslA. Estos resultados se muestran en la figura 4.10, donde se observa que solo 50 μM de EDTA y 5 min. de incubación a 30°C son suficientes para sustraer el Ca^{2+} y abatir la actividad de IslA4 e IslA3; sin embargo para observar el mismo efecto en $\Delta\text{N}IslA2$, IslA2 e IslA se requirió de utilizar 1000 μM durante 180 min a 20°C. Es decir, la región de transición provoca un cambio importante en términos de la sustracción de Ca^{2+} , ya que para $\Delta\text{N}IslA2$, cuyo peso molecular es el mismo que IslA3, se requiere usar 20 veces más de EDTA, para lograr un efecto similar al de IslA3.

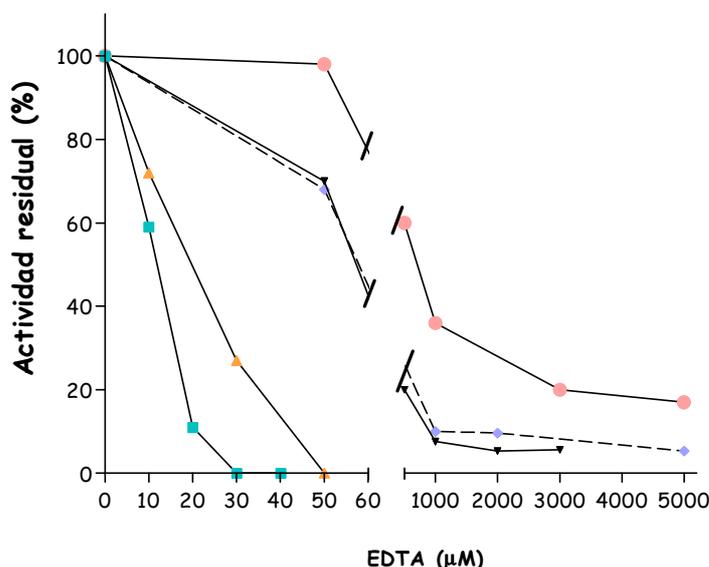


Fig. 4.10. Efecto de la incubación del EDTA en la actividad de la IsIA y las formas truncadas.

IsIA4(■), IsIA3(▲), IsIA2 (▼), ΔNIsIA2 (◇), IsIA (●). La actividad se cuantificó después de 5 min de incubación con EDTA para IsIA4 e IsIA3, y después de 180 min para IsIA2, ΔNIsIA2 e IsIA, la temperatura de incubación fue de 20°C.

Sorprendentemente, aunque IsIA se incubó hasta por 40 h con 5000 µM de EDTA, esto es, 100 veces más de EDTA que la utilizada para IsIA4, esta retuvo el 20% de la actividad original y con varias horas de incubación no se eliminó completamente la actividad enzimática.

La actividad residual observada en ΔNIsIA2, IsIA2 e IsIA podría deberse a que el Ca^{2+} estructural no fue sustraído totalmente o a que la enzima presenta cierta actividad basal en ausencia de Ca^{2+} . Una manera de corroborar si aun hay Ca^{2+} estructural es mediante la cuantificación del metal por medio de absorción atómica. Para ello se analizó el Ca^{2+} residual en IsIA después de la incubación por 12 h con EDTA 5000 µM determinando en forma paralela al experimento la actividad FTF. Los resultados mostraron que después de la incubación con EDTA, IsIA aun contiene el 30% del Ca^{2+} original, así como un 30% de actividad residual, lo que permite inferir una relación estequiométrica entre el sitio de

Ca^{2+} y la actividad catalítica. IslA retiene parte del Ca^{2+} original probablemente debido a una mayor afinidad por el ión que el resto de las versiones truncadas, derivado de un cambio conformacional en el sitio de unión a Ca^{2+} al eliminar las regiones N-terminal y de transición. Específicamente podría suceder que el motivo ³³⁹DEIER (motivo conservado en la familia GH68, que coordina al Ca^{2+} y tienen al aa catalítico Glu342/SacB) se encuentre menos expuesto y comprometido en una interacción de la región de transición con el dominio catalítico.

4.6. Cambios estructurales influenciados por la sustracción de calcio en IslA y sus versiones truncadas.

Con el fin de realizar un análisis más detallado del papel de los dominios adicionales en la estabilidad de la inulosacarasa, se analizó la influencia del Ca^{2+} en la estructura de la enzima nativa y las versiones truncadas a través de la medición de la fluorescencia intrínseca en presencia de EDTA y Ca^{2+} . La IslA4 posee 8 Trp, de los cuales, a través del hilvanamiento de IslA4 con SacB se localizaron 4 Trp en de la cavidad de la propela y dos Trp expuestos al solvente. Para tener una referencia de cómo es el proceso de desplegamiento de IslA4 por fluorescencia, se evaluó su comportamiento estructural en presencia de diferentes concentraciones de urea (datos no mostrados) observándose que hay un apagamiento de la fluorescencia como consecuencia de la desnaturalización por urea. Tal comportamiento indica que los residuos del Trp están siendo expuestos al solvente (Eftink, 2000) y por lo tanto la enzima está desplegada. Conociendo el comportamiento de desplegamiento de IslA4 se analizó el efecto del EDTA y el Ca^{2+} .

Con la adición de 50 μM EDTA a IslA4 y/o IslA3, se observó un apagamiento parcial de la fluorescencia, lo que nos indica que ocurre un ligero cambio conformacional provocado por la ausencia de Ca^{2+} , como se observa en la fig. 4.11. Este cambio conformacional se da con una pérdida total de actividad. Así mismo, este ligero cambio en la fluorescencia de la enzima, provocado por el EDTA se restituyó cuando se adicionó 500 μM de

CaCl₂, indicándonos que la enzima retornó a su estado conformacional original, recuperando también el 100% de la actividad.

De forma complementaria, los espectros de elipticidad obtenidos a través de Dicroísmo Circular (DC), confirmaron que los cambios observados en la estructura terciaria durante la sustracción de Ca²⁺ no modificaron la estructura secundaria ni de Isla3 ni de Isla4 (fig. 4.12 A y B).

En SacB el Ca²⁺ está coordinado por el Asp339 del motivo ³³⁹DEIER, se sugiere que cuando Isla4 e Isla3 pierden el Ca²⁺ el asa del ³³⁹DEIER asume una conformación menos favorable para la catálisis, en la que probablemente la distancia que hay entre el carboxilato del Asp339 y el O del enlace glicosídico de la sacarosa es mayor por lo que se dificulta la transferencia del protón a la glucosa y como consecuencia no se puede realizar el siguiente paso, produciendo así una enzima inactiva. De tal modo que es posible concluir que la pérdida de actividad provocada por la ausencia de Ca²⁺ se debe a que el motivo DEIER adquiere una conformación menos favorable para realizar la catálisis y no se debe al desplegamiento total de la enzima.

Sorprendentemente, en el caso de Isla2, no se observaron cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia en ausencia de Ca²⁺, aun cuando en presencia de 1000 μM de EDTA la enzima es inactiva. De manera semejante, la medición de la fluorescencia de Isla en presencia de 5000 μM de EDTA durante 180 min. no sufrió ningún cambio, a pesar de que la enzima solo presenta el 20% de la actividad original (fig. 4.9). Experimentos adicionales de DC en Isla en ausencia de calcio, no mostraron cambios en su estructura secundaria (fig. 4.11 C). En conclusión, el análisis de la estructura secundaria y terciaria de Isla y sus versiones truncadas, indica que la región N-terminal y de transición probablemente interaccionan entre ellas en conjunto con el dominio catalítico, confiriéndole rigidez a la estructura y dando lugar a una enzima más estable en ausencia de Ca²⁺.

Asimismo, comparando los resultados de estabilidad de las versiones truncadas a la temperatura (35°C) (tabla 4.1) con los datos de sensibilidad al EDTA (fig. 4.9), a pesar de tratarse de dos mecanismos diferentes podemos concluir que la enzima más estable, IsIA, lo es porque contiene la mayor afinidad al Ca^{2+} , mientras que la menos estable, ΔNIsIA2 , lo es porque se le eliminó la región N-terminal. Sin embargo no hay en este caso un efecto importante en la susceptibilidad al EDTA, es decir, al quitar únicamente el C-terminal no se afecta sustancialmente ni la susceptibilidad al EDTA ni la estabilidad (IsIA2). Estos resultados de falta de correlación entre estabilidad y susceptibilidad al EDTA se complementan con la medición de fluorescencia, donde solo se observan cambios conformacionales locales en los casos en que hay pérdida tanto de estabilidad como de actividad (IsIA3 e IsIA4). Por otro lado, en términos de pérdida de actividad, en el caso de la estabilidad, las enzimas sufren posiblemente un desplegamiento parcial y como consecuencia de ello pérdida de la actividad, donde ΔNIsIA2 , que no contiene el N-terminal es la enzima más susceptible. Sin embargo, cuando se les sustrae el Ca^{2+} , las enzimas pierden la actividad como consecuencia del ligero cambio conformacional cercano al sitio activo, proceso que se ve limitado cuando se mantiene la región de transición.

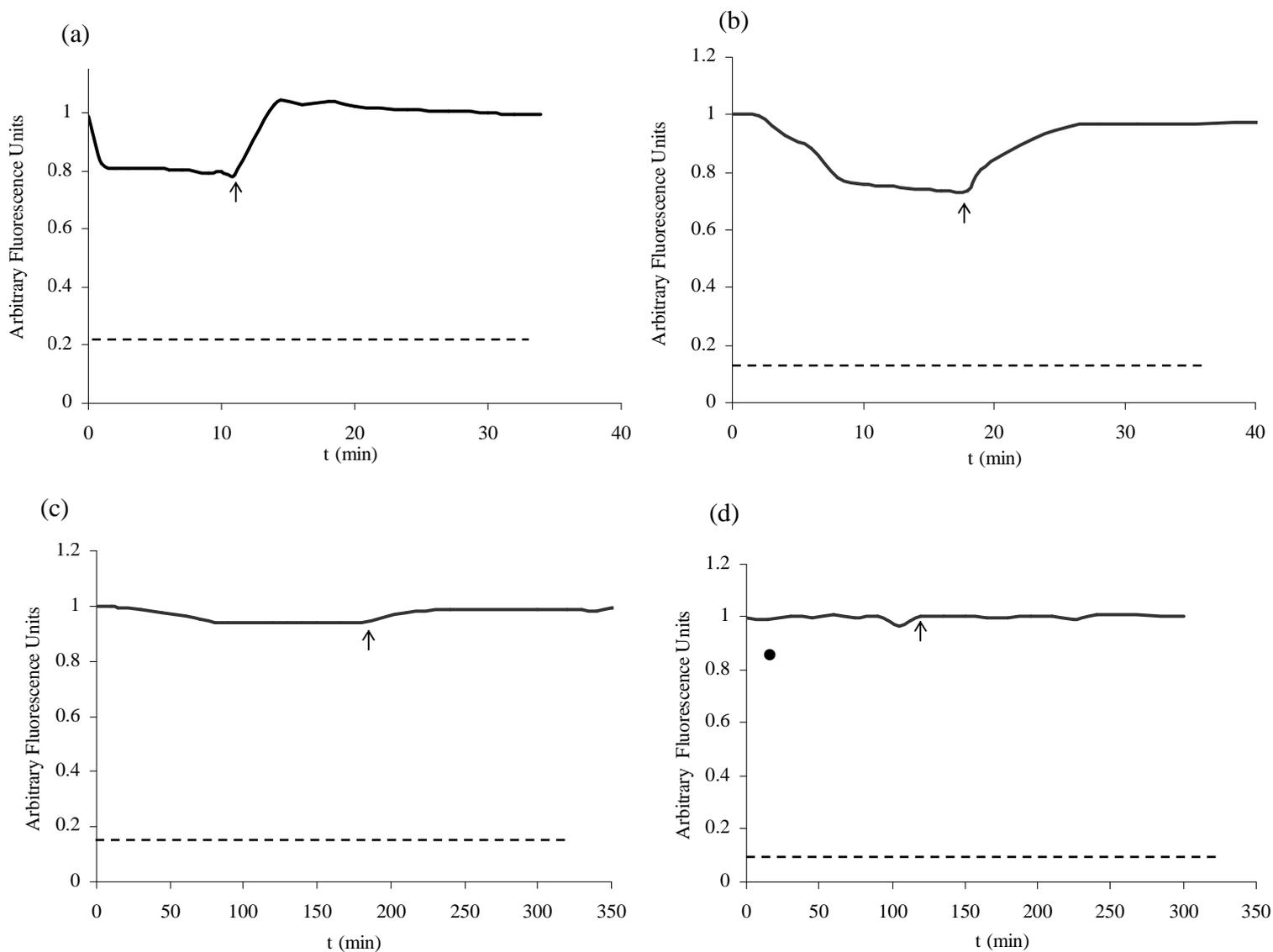


Fig. 4.11. Modificaciones estructurales de IsIA y sus formas truncadas provocadas por EDTA y Ca^{2+} medida a través de fluorescencia intrínseca (λ excitación=280 nm, λ emisión=348 nm). a. IsIA4, 50 μM EDTA y 500 μM Ca^{2+} ; b. IsIA3, 50 μM EDTA y 500 μM Ca^{2+} , c. IsIA2 1000 μM EDTA y 2000 μM Ca^{2+} , d. IsIA 5000 μM EDTA y 7000 μM Ca^{2+} . La adición de EDTA se indica con un punto y la de Ca^{2+} con una flecha. En cada caso, la fluorescencia de las enzimas desnaturalizadas por calor se indica con una línea punteada.

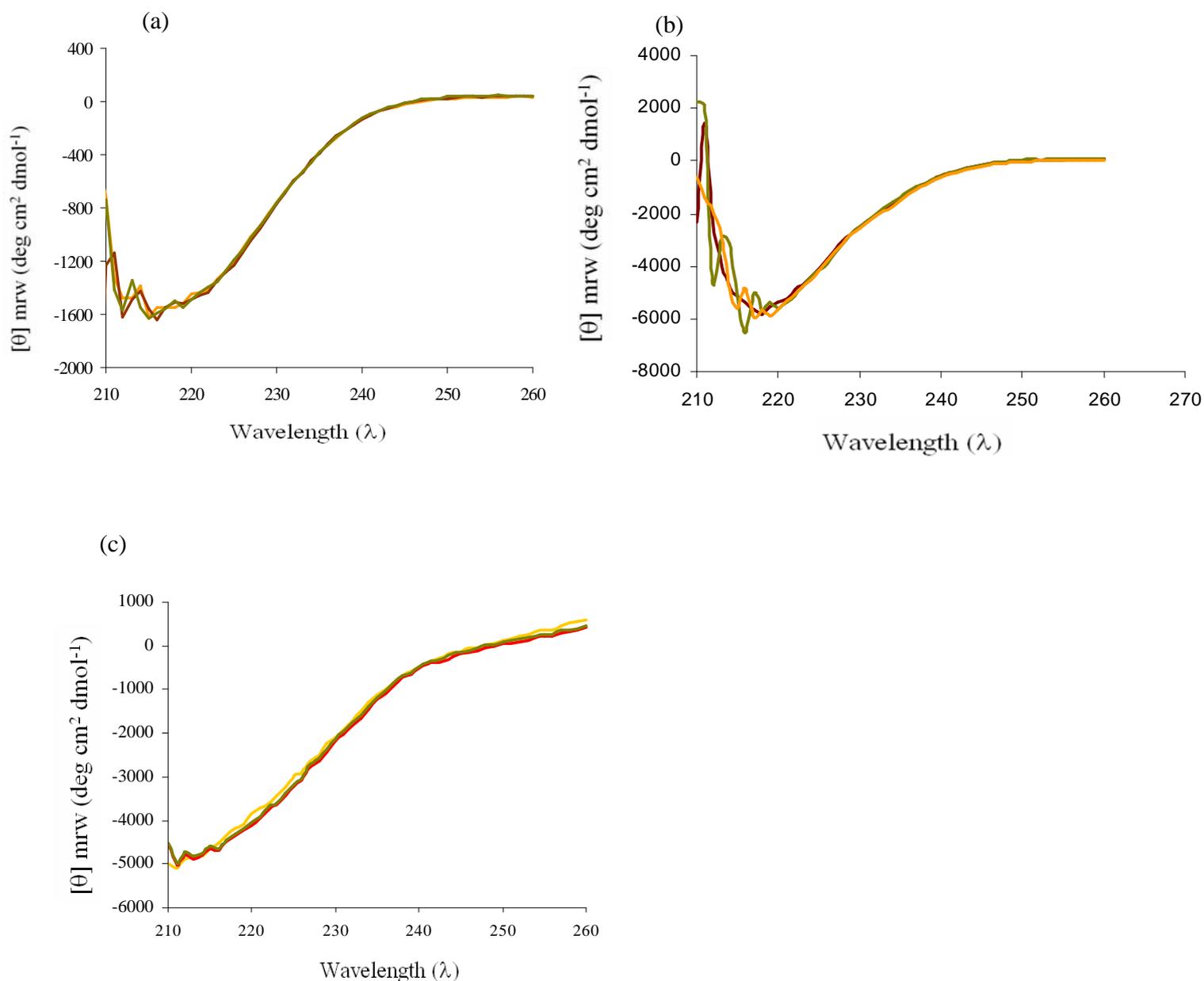


Fig. 4.12. Espectros de DC de las modificaciones estructurales de IsIA4, IsIA3 e IsIA mediada por EDTA y Ca^{2+} . a. IsIA4 y b. IsIA3. La línea amarilla es el control, la línea café es la proteína con 0.5 mM de EDTA y la línea verde indica la proteína incubada con 0.5 mM de EDTA por 15 min y posteriormente con 1 mM de CaCl_2 por 15 min. más. c. IsIA La línea amarilla es el control, la línea café es la proteína con 5 mM de EDTA y la línea verde indica la proteína incubada con 5 mM de EDTA por 180 min. y posteriormente con 1 mM de CaCl_2 por 180 min. más. .

4.7. Anclaje de IsIA a las células de *Leuconostoc citreum* CW28.

Con la finalidad de determinar si el dominio C-terminal está involucrado con la unión de IsIA a la pared celular de *L. citreum* CW28, se realizaron ensayos de unión entre células de *L. citreum* CW28 sin actividad FTF (crecidas en glucosa 2% como fuente de carbono) y la enzima completa (IsIA) e IsIA3, que es la forma enzimática sin C-terminal.

El contacto entre las células y las enzimas se realizó por 12 h; después de lavarlos intensamente, por medio de geles SDS-PAGE 8% y de ensayos de actividad, IsIA fue localizada en la superficie de las células. Por otro lado, IsIA3 que carece del C-terminal, no puede ubicarse en la pared (fig. 4.13). Con estos resultados es posible sugerir que el C-terminal de IsIA está involucrado en el anclaje a la pared celular.

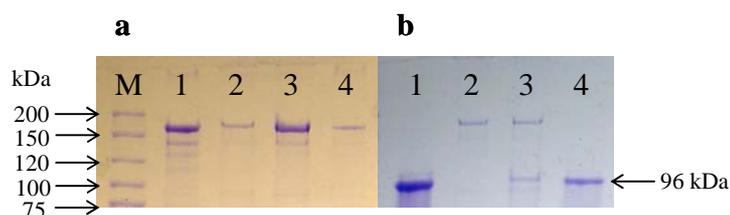


Fig. 4.13. Ensayos de unión de IsIA (a) e IsIA3 (b) las células de *L. citreum* sin inducir. (M) Marcador de peso molecular, (1) enzima parcialmente purificada, (2) células de *L. citreum* CW28 sin inducir, (3) células lavadas después del contacto con la proteína (4) solución de proteínas después del contacto con células sin inducir.

Para demostrar que el GBD de IsIA es el responsable del su anclaje se expresó el dominio C-terminal de la inulosacarasa (GBDisIA), el cual contiene la región de transición y la de alta identidad con Asr (fig. 4.1). Debido al alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos la solubilidad fue muy baja, por lo que la detección se realizó por medio de western blot. De igual manera, se realizaron ensayos de unión entre el GBDisIA y células de *L. citreum* CW28

sin actividad FTF. Observamos que del GBDIsIA se retuvo en las células comprobando de esta manera, que a través de este dominio IsIA se ancla a las células (fig. 4.14).

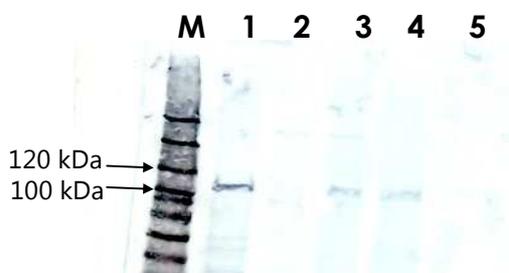


Fig. 4.14. Western de la unión del GBDIsIA a las células de *L. citreum* CW28. 1. GBDIsIA, 2. Células de *L. citreum* CW28, 3. Células lavadas después del contacto con la proteína, 4. sobrenadante, 5. Lavado 1.

Para descartar que al anclaje a la pared celular de este dominio pudiera darse por interacción iónica, una vez unida IsIA a las células intentamos despegarlos mediante la incubación con NaCl 1 M. Después de 3 lavados intensos analizamos las fracciones, observando que IsIA no se despegó y se mantuvo unida a la superficie celular (fig. 4.15). En ensayos de unión realizados en el laboratorio con el GBDDsrP y células de *L. mesenteroides* IBT-PQ se observó que la única manera de desorberlo de la pared celular es mediante la incubación con urea.

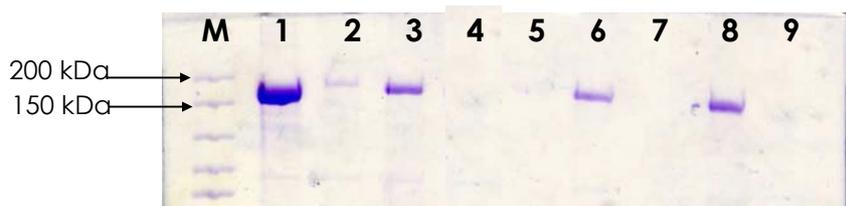


Fig. 4.15. Anclaje de IsIA a células de *L. citreum* CW28 sin actividad FTF. 1. IsIA, 2. Células de *L. citreum* CW28, 3. Células lavadas después del contacto con la proteína, 4. sobrenadante, 5. Lavado, 6. Células lavadas con NaCl 0.5 M, 7. Sobrenadante del lavado de células con NaCl 0.5 M, 8. Células lavadas con NaCl 1 M, 9. Sobrenadante del lavado de células con NaCl 1 M

Se sugiere que la unión entre el dominio GBD de IsIA y la célula no es por intercambio iónico; sino que más bien dada su naturaleza hidrofóbica, el anclaje podría realizarse por

interacción hidrofóbica, aunque faltarían estudios más profundos para demostrar el mecanismo de unión. Sin embargo este dominio podría ser utilizado como dominio de inmovilización de enzimas.

IsIA no contiene ni el motivo LPXTG ni el PGST presentes en otras FTFs, y no obstante que presenta solo una repetida A en el C-terminal (tabla 1.5) no presentó identidad con las repetidas CW, encontradas en LytA, ToxA, DsrP y DsrE. Sin embargo un análisis de secuencia (Blast) realizado con el C-terminal de IsIA reveló identidad con la región de unión a pared de la amidasa (Ami) de *Lysteria monocytogenes*. Ami contiene 8 módulos de secuencias repetidas denominadas GW que sirven para anclar a la proteína a los ácidos lipoteicoicos de la pared celular mediante un mecanismo no covalente (Braun y col., 1997). Los módulos GW también se han encontrado en la internalina B (InIB) de *L. monocytogenes* y en algunas proteínas de superficie de los géneros *Lysteria* y *Streptococcus* (Cabanés y col., 2002), por lo que IsIA podría unirse a las células mediante este tipo de secuencia. Es probable que la adquisición del C-terminal en las FTFs sea un mecanismo para anclar a la enzima a la superficie celular con el fin de producir un biofilm.

A través de diversos mecanismos, las bacterias acidolácticas localizan FTFs y GTFs en la superficie de la célula, los cuales se resumen en la tabla 4.1. Sin embargo, el mecanismo de interacción entre proteína y células es aún desconocido, por lo que requiere la realización de experimentos detallados.

Tabla 4.5. Motivos de unión a la pared celular propuestos de las glicosiltransferasas.

<i>Enzima</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>Motivo propuesto</i>	<i>No. de acceso</i>	<i>Referencia</i>
GTF-I	<i>S. downei</i>	Repetidas CW	P11001	Fernandez-Tornero y col., 2001
GTF-B	<i>S. mutans</i>		AAA88588	Vacca-Smith y Bowen, 1998
Dsr-E	<i>L. mesenteroides</i>		CAD22883	Olvera y col., 2007
Dsr-P	<i>L. mesenteroides</i> IBT-PQ		AAS79426	Olvera y col., 2007
Asr	<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-1355	Repetidas GW	CAB65910	Este trabajo
IslA	<i>L. citreum</i> CW 28		AAO25086	Este trabajo
Inu	<i>L. reuteri</i> 121	Motivo LPXTG	AAN05575	van Hijum y col., 2002
Lev	<i>L. reuteri</i> 121		AAO14618	van Hijum y col., 2002
Ftf	<i>S. salivarius</i>	Motivo PGST	AAN87104	Rathsam y col., 1993

Conclusiones

La inulosacarasa de *L. citreum* CW28 es una FTF multi-dominio con regiones en el extremo N/C-terminal con alta identidad a Asr. En estudios preliminares se propuso que el dominio C-terminal podría estar relacionado con la estabilidad y la especificidad, por lo que la finalidad de este trabajo fue determinar la función de los dominios adicionales y como estos afectan la catálisis de la enzima. Esto se realizó a través del estudio bioquímico y cinético de diversas versiones truncadas, a las cuales se les eliminó la región N y/o C-terminal. Estas versiones fueron producidas y purificadas con éxito en la primera parte de este trabajo.

A través del análisis del efecto del pH y temperatura en la actividad de las versiones truncadas observamos que aquellas versiones que poseen la región de transición son mucho más tolerantes al pH y temperatura, teniendo rangos más amplios.

Los experimentos de termoestabilidad indicaron que, contrario a lo que se había sugerido con anterioridad (Olivares-Illana y col., 2003), la región C-terminal con alta identidad con Asr no está involucrada con la estabilidad. No obstante la región N-terminal en conjunto con la de transición es necesaria para estabilizar a la enzima, ya que cuando el dominio catalítico mantiene la región de transición la estabilidad de la enzima disminuye drásticamente.

La eliminación del dominio C-terminal y la permanencia de la región N-terminal provoca que la cinética enzimática se ajuste al modelo de Hill, con un proceso cooperativo. Además, con la interpretación de los datos cinéticos en conjunto con los datos de especificidad hacia las reacciones de hidrólisis y transferencia se demostró que ambas regiones están relacionadas con el cambio de especificidad, principalmente la región de transición y no solo el C-terminal como se había propuesto. Cuando la región de transición se elimina, ocurre un cambio importante de afinidad por el sustrato y de velocidad de reacción, obteniéndose una enzima más hidrolítica. Es posible que la región de transición establezca una interacción con el dominio catalítico, lo que explicaría el cambio en la afinidad por la molécula aceptora.

A través del análisis estructural del sitio probable de unión a Ca^{2+} deducido a partir de la estructura cristalográfica de SacB, se puede sugerir que la pérdida de actividad en IsIA y sus versiones truncadas en presencia de EDTA se debe probablemente al desacomodo del Glu342 (en SacB), el cual actúa como ácido/base en la catálisis y se encuentra en el motivo conservado DEIER. Además, en ausencia de Ca^{2+} , se observó que las regiones/dominios adicionales intervienen en la conformación de la enzima ya que previenen el desplegamiento en ausencia del ion. Es posible que la rigidez que proporcionan la región variable y de transición se deba a que los dominios forman una interfaz de gran interacción, lo que queda demostrado por la dificultad para eliminar el Ca^{2+} del sitio activo conforme se integra la región de transición al dominio catalítico.

Se realizaron experimentos en los que se demostró que el dominio C-terminal permite a IsIA anclarse a las células de *L. citreum* CW28, aunque aun no se sabe de manera precisa cual es mecanismo de unión.

Perspectivas

- Investigar el mecanismo de pegado entre el C-terminal y la pared celular, así como buscar cual es el fragmento mínimo para realizar esta unión.
- Estudiar a profundidad el motivo de cambio del comportamiento cinético de IsIA3.
- Promover el uso del dominio C-terminal como dominio de inmovilización de enzimas.
- Dado que las regiones adicionales confieren estabilidad a la enzima y generan un cambio en la especificidad de reacción, se podrían construir quimeras de FTFs unidominio y análogas a IsIA con las regiones adicionales con el fin de modificar su especificidad y aumentar su estabilidad.
-

Bibliografía

1. **Abo H**, Matsumura T, Kodama T, Ohta H, Fukui K, Kato K and Kagawa H. **1991**. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase). *J. Bacteriol.* **173**:989–996
2. **Aduse-Opoku J**, Gilpin ML and Russell RR. **1989**. Genetic and antigenic comparison of *Streptococcus mutans* fructosyltransferase and glucan-binding protein. *FEMS Microbiol Lett.* Jun;50(3):279-82.
3. **Anwar MA**, Kralj S, van der Maarel MJ and Dijkhuizen L. **2008**. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Appl Environ Microbiol.* Jun;74(11):3426-33.
4. **Arrieta JG**, Hernandez L, Coego A, Suarez V, Bamori E, Menendez C, Petit-Glatron MF, Chambert R and Selman-Housein G. **1996**. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* 142:1077–1085.
5. **Bashton M** and Chothia C. **2007**. The generation of new protein functions by the combination of domains. *Structure.* 15, 85-99.
6. **Bozonnet S**, Dols-Laffargue M, Fabre E, Pizzut S, Remaud-Simeon M, Monsan P and Willemot R. **2002**. Molecular characterization of DSR-E an α -1,2 linkage-synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. *J. Bacteriol.* 184:5753-5761.
7. **Bradford MM**. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-54.
8. **Braun L**, Dramsi S, Dehoux P, Bierne H, Lindahl G and Cossart P. **1997**. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol.* 25, 285–294
9. **Cabanes D**, Dehoux P, Dussurget O, Frangeul L, Cossart P. **2002**. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 10:238-245.
10. **Castillo E** and Lopez-Munguia A. **2004**. Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *J Biotechnol.* 114, 209-217
11. **Chambert R** and Petit-Glatron MF. **1989**. Study of effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Carbohydr Res* 191, 117-123
12. **Chambert R** and Gonzy-Treboul G. **1976**. Levansucrase of *Bacillus subtilis*. Characterization of a stabilized fructosyl-enzyme complex and identification of an aspartyl residue as the binding site of the fructosyl group. *Eur. J. Biochem.* **71**:493–508.
13. **Chambert R** and Petit-Glatron MF. **1993**. Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. *Carbohydr Res* 244, 129-36.
14. **Chambert R**, Rain-Guion MC and Petit-Glatron MF. **1992**. Readthrough of the *Bacillus subtilis* stop codon produces an extended enzyme displaying a higher polymerase activity. *Biochim Biophys Acta.* 1132:145-53.
15. **Chambert R**, Treboul G and Dedonder R. **1974**. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **41**:285–300.

16. **Corrigan AJ** and Robyt JF. **1979**. Nature of the fructan of *Streptococcus mutans* OMZ 176. Infect. Immun. **26**:387–389.
17. **Ebisu S**, Kato K, Kotani S and Misaki A. **1975**. Structural differences in fructans elaborated by streptococcus mutans and Strep. salivarius. J Biochem. Nov; 78(5):879-87.
18. **Eftink MR**. **2000**. Use of fluorescence spectroscopy as thermodynamics tool. Methods Enzymol. 323:459-473.
19. **Fernandez-Tornero C**, Lopez R, Garcia E, Gimenez-Gallego G and Romero A. **2001**. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. Nat. Struct. Biol. 8, 1020-1024
20. **Ferretti J**, Gilpin M and Rusell R. **1987**. Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* Mfe28. J. Bacteriol. 169:4271-4278.
21. **Funane K**, Ishii T, Matsushita M, Hori K, Mizuno K, Takahara H, Kitamura Y and Kobayashi M. **2001**. Water soluble and water-insoluble glucans produced by *Escherichia coli* recombinant dextranases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. Carbohydr. Res. 334: 19-25.
22. **Gibson GR**, Beatty ER, Wang X and Cummings JH. **1995**. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Gastroenterology. Apr;108(4):975-82.
23. **Giffard P**, Milward C, Simpson C and Jacques N. **1991**. Molecular characterization of a cluster of at least two glucosyltransferase genes in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. J. Gen. Microbiol., 137:2577-2593.
24. **Giffard PM** and Jacques **NA**. **1994**. Definition of a fundamental repeating unit in streptococcal glucosyltransferase glucan-binding regions and related sequences. J Dent Res. Jun;73(6):1133-41.
25. **Groenwall A** and Ingelman B. **1948**. Manufacture of infusion and injection fluids. US Patent 2437518.
26. **Han JH**, Batey S, Nickson AA, Teichmann SA, Clarke J. **2007**. The folding and evolution of multidomain proteins. Nat Rev Mol Cell Biol. 8:319-30.
27. **Han YW**. **1990**. Microbial levan. Adv Appl Microbiol.;35:171-94.
28. **Hernandez L**, Arrieta J, Menendez C, Vazquez R, Coego A, Suarez V, Selman G, Petit-Glatron MF and Chambert R. **1995** Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. Biochem. J. 309, 113–118.
29. **Hettwer U**, Gross M and Rudolph K. **1995**. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. J Bacteriol. 177, 2834-2839
30. **Heyer AG** and Wendenburg R. **2001**. Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. Appl Environ Microbiol. Jan;67(1):363-70.
31. **Heyer AG**, Schroerer B, Radosta S, Wolff D, Czaplá S, Springer J. **1998**. Structure of the enzymatically synthesized fructan inulin. Carbohydr Res. 15;313(3-4):165-74.
32. **Janin J** and Chothia C. **1990**. The structure of protein-protein recognition sites. J Biol Chem. 25;265(27):16027-30. Review
33. **Joucla G**, Pizzut S, Monsan P and Remaud-Simeon M. **2006**. Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its carboxy-terminal domain. FEBS Lett. 580, 763-768.

34. **Juers DH**, Huber RE, and Matthews BW. **1999**. Structural comparisons of TIM barrel proteins suggest functional and evolutionary relationships between beta-galactosidase and other glycohydrolases. *Protein Sci.* 8:122-36.
35. **Kang HK**, Seo MY, Seo ES, Kim D, Chung SY, Kimura A, Day DF and Robyt JF. **2005**. Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.*;1727:5-15.
36. **Kato C** and Kuramitsu HK. **1990**. Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 299-302.
37. **Kaur N** and Gupta AK. **2002**. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci.* 27:703-14.
38. **Kingston KB**, Allen DM and Jacques NA. **2002**. Role of the C-terminal YG repeats of the primer-dependent streptococcal glucosyltransferase, GtfJ, in binding to dextran and mutan. *Microbiology* 148:549-558.
39. **Korakli M**, Rossmann A, Ganzle MG and Vogel RF. **2001**. Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J. Agric. Food Chem.* **49**:5194-5200
40. **Kralj S**, Van Geel-Schutten GH, Van Der Maarel MJEC and Dijkhuizen L. **2004**. Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase. *Microbiology* **150**:2099-2112
41. **Kyono K**, Yanase H, Tonomura K, Kawasaki H and Sakai T. **1995** Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertase. *Biosci Biotechnol Biochem.* Feb;59(2):289-93
42. **Laemmli UK**. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227. 680-685.
43. **Lowry OH**, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. **1951**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275.
44. **Martinez-Fleites C**, Ortiz-Lombardia M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta JG, Hernandez L and Davies GJ. **2005**. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J.* 390, 19-27.
45. **Meng G** and Fütterer K. **2003**. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol.* 11, 935-941
46. **Meng G** and Fütterer K. **2008**. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct Biol.* 17;8:16.
47. **Miller A W** and Robyt JF. **1986**. Activation and inhibition of dextransucrase by calcium. *Biochim. Biophys. Acta* 880:32-39.
48. **Monchois V**, Argüello-Morales M, Russell R. **1999^a**. Isolation of an active catalytic core of *Streptococcus downei* Mfe28 GTF-I glucosyltransferase. *J. Bacteriol.*, 181:2290-2292.
49. **Monchois V**, Reverte A, Remaud-Simeon M, Monsan P y Willemot R. **1998**. Effect of cloning *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F dextransucrase carboxyl terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:1644-1649
50. **Monchois V**, Vignon M y Russell RR. **1999^b**. Isolation of key amino acid residues at the N-terminal end of the core region *Streptococcus downei* glucansucrase, GTF-I. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 52, 660-665

51. **Monchois V**, Willemot R, Remaud-Simeon M, Croux C y Monsan P. **1996**. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-1299 synthesizing only $\alpha(1,6)$ and $\alpha(1,3)$ linkages. *Gene*, 182: 23-32.
52. **Monchois V**, Remaud-Simeon M, Russell RR, Monsan P and Willemot RM. **1997**. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 48:465-72.
53. **Mooser G**. **1992**. *Glycosidases and glycosyltransferases, in The Enzymes*. Academic. Press Inc.
54. **Morales-Arrieta S**, Rodriguez ME, Segovia L, Lopez-Munguia A and Olvera-Carranza C. **2006**. Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene* 376, 59-67.
55. **Newbrun E** and Baker S. **1968**. Physico-chemical characteristics of the levan produced by *Streptococcus salivarius*. *Carbohydr. Res.* **6**:165-170.
56. **Olivares-Illana V**, Lopez-Munguia A and Olvera C. **2003**. Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *J Bacteriol*. 185, 3606-3612.
57. **Olvera C**, Centeno-Leija S and Lopez-Munguia A. **2007^a**. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 *Int. J. Gen. Mol. Microbiol. Antonie van Leeuwenhoek*. 92:11-20
58. **Olvera C**, Fernandez-Vazquez JL, Ledesma-Candanoza L and Lopez-Munguia A. **2007^b**. Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. *Microbiol*. 153:3994-4002
59. **Ortiz-Soto ME**, Rivera M, Rudiño-Piñera E, Olvera C and López-Munguía A. **2008**. Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng Des Sel*. In press.
60. **Ozimek LK**, Euverink GJ, van der Maarel MJ and Dijkhuizen L. **2005**. Mutational analysis of the role of Ca^{2+} ions in the *Lactobacillus reuteri* strains 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Lett*. 579, 1124-1128.
61. **Ozimek LK**, Kralj S, van der Maarel MJ and Dijkhuizen L. **2006**. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology*. 2006 Apr;152(Pt 4):1187-96
62. **Perez Morales R**. **2004**. Expresión heteróloga de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* y dos versiones truncadas. Instituto de Biotecnología, UNAM. Tesis de licenciatura.
63. **Perez-Oseguera MA**, Guereca L and Lopez-Munguia A. **1996**. Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **4** 5:465-471
64. **Pijning T**, Vujii-agar A, Kralj S, Eeuwema W, Dijkhuizen L and Dijkstra BW. **2008** Biochemical and crystallographic characterization of a glucansucrase from *Lactobacillus reuteri* 180. *Biocatal. Biotrans*, 26:1:12 – 17 .Proceedings of CBM7.
65. **Rathsam C**, Giffard PM and Jacques NA. **1993**. The cell-bound fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*: the carboxyl terminus specifies attachment in a *Streptococcus gordonii* model system. *J Bacteriol*. 175, 4520-4527.
66. **Rehm J**, Willmitzer L and Heyer AG. **1998**. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol*. 180(5):1305-10

67. **Roberfroid MB. 2000.** Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Jour. Clin. Nutr.*71:1682S-1687S.
68. **Rosell KG** and Birkhed D. **1974.** An inulin-like fructan produced by *Streptococcus mutans*, strain JC2. *Acta Chem Scand B*.;28(5):589.
69. **Rozen R**, Bachrach G, Bronshteyn M, Gedalia I and Steinberg D. **2001.** The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett.*;195(2):205-10.
70. **Seo JW**, Song KB, Jang KH, Kim CH, Jung BH and Rhee SK. **2002.** Molecular cloning of a gene encoding the thermoactive levansucrase from *Rahnella aquatilis* and its growth phase-dependent expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.*;81(1):63-72
71. **Shah DS**, Joucla G, Remaud-Simeon M and Russell RR. **2004.** Conserved repeat motifs and glucan binding by glucansucrases of oral *streptococci* and *Leuconostoc mesenteroides*. *J Bacteriol.* 186(24):8301-8.
72. **Shimamura A**, Tsuboi K, Nagase T, Ito M, Tsumori H and Mukasa H. **1987.** Structural determination of D-fructans from *Streptococcus mutans*, serotype b, c, e, and f strains, by ¹³C-NMR spectroscopy. *Carbohydr Res.* 165: 150-4.
73. **Soetaert D**, Schwengers W, Bucholz K and Vandamme E. **1995.** A wide range of carbohydrate modifications by simple micro-organism: *Leuconostoc mesenteroides*, in *Carbohydrate Engineering*. Elsevier Science, B.V.
74. **Song DD** and Jacques NA. **1999.** Mutation of aspartic acid residues in the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem.J.* **344**:259–264
75. **Sumner JB** and Howel S. **1935.** A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* 108:51-54
76. **Tiekink M**, Ehrmann MA, Vogel RF and Ganzle MG. **2005.** Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66, 655-663.
77. **Vacca-Smith AM** and Bowen WH. **1998.** Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Arch Oral Biol.* 43, 103-110.
78. **van Hijum SA**, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L and van Geel-Schutten IG. **2006.** Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70, 157-176.
79. **van Hijum SA**, Szalowska E, van der Maarel MJ and Dijkhuizen L. **2004.** Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* 150, 621-630
80. **van Hijum SA**, van der Maarel MJ and Dijkhuizen L. **2003.** Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS Lett.* 534, 207-210.
81. **van Hijum SA**, van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, van der Maarel MJ and Dijkhuizen LK. **2002.** Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl. Environ Microbiol.* 68, 4390-4398
82. **van Hijum SAFT**, Bonting K, Van Der Maarel MJEC and Dijkhuizen L. **2001.** Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:323–328.

83. **Vickerman M**, Sulavik M, Nowak J, Gardber N, Jones C and Clewell D. **1997**. Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase gene *gtfG*. DNA Seq. 7:83-95
84. **Vijn I** y Smeekens S. **1999**. Fructan: more than a reserve carbohydrate? Plant Physiol. 120(2):351-60.
85. **von Eichel-Streiber C.**, Saueborn M. y Kuramitsu H. **1992**. Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding site of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. J. Bacteriol., 174:6707-6710.
86. **Wada T**, Ohguchi M and Iwai Y. **2003**. A novel enzyme of *Bacillus* sp. 217C-11 that produces inulin from sucrose. Biosci Biotechnol Biochem. 67(6):1327-34
87. **Wang JH**, Tsai MY, Chen JJ, Lee GC and Shaw JF. **2007**. Role of the C-Terminal Domain of *Thermus thermophilus* trehalose synthase in the thermophilicity, thermostability, and efficient production of trehalose. J. Agric. Food Chem. 55:3435-3443
88. **Yanase H**, Iwata M, Nakahigashi R, Kita K and Tonomura K. **1992**. Purification, crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56, 1335-1336.
89. **Yanase H**, Maeda M, Hagiwara E, Yagi H, Taniguchi K and Okamoto K. **2002**. Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. J Biochem. 132(4):565-72.

Research article

Open Access

Functional role of the additional domains in inulosucrase (IslA) from *Leuconostoc citreum* CW28

Sandra del Moral, Clarita Olvera, Maria Elena Rodriguez and Agustin Lopez Munguia*

Address: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 510-3. C. P. 62250, Cuernavaca, Morelos, México

Email: Sandra del Moral - sandit@ibt.unam.mx; Clarita Olvera - clarita@ibt.unam.mx; Maria Elena Rodriguez - maelena@ibt.unam.mx; Agustin Lopez Munguia* - agustin@ibt.unam.mx

* Corresponding author

Published: 31 January 2008

Received: 23 August 2007

BMC Biochemistry 2008, 9:6 doi:10.1186/1471-2091-9-6

Accepted: 31 January 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/9/6>

© 2008 del Moral et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Inulosucrase (IslA) from *Leuconostoc citreum* CW28 belongs to a new subfamily of multidomain fructosyltransferases (FTFs), containing additional domains from glucosyltransferases. It is not known what the function of the additional domains in this subfamily is.

Results: Through construction of truncated versions we demonstrate that the acquired regions are involved in anchoring IslA to the cell wall; they also confer stability to the enzyme, generating a larger structure that affects its kinetic properties and reaction specificity, particularly the hydrolysis and transglycosylase ratio. The accessibility of larger molecules such as EDTA to the catalytic domain (where a Ca²⁺ binding site is located) is also affected as demonstrated by the requirement of 100 times higher EDTA concentrations to inactivate IslA with respect to the smallest truncated form.

Conclusion: The C-terminal domain may have been acquired to anchor inulosucrase to the cell surface. Furthermore, the acquired domains in IslA interact with the catalytic core resulting in a new conformation that renders the enzyme more stable and switch the specificity from a hydrolytic to a transglycosylase mechanism. Based on these results, chimeric constructions may become a strategy to stabilize and modulate biocatalysts based on FTF activity.

Background

Fructansucrases (E.C. 2.4.1.1) or fructosyltransferases (FTFs) are enzymes that catalyze the transfer of the fructose unit from sucrose to either a growing fructan polymer chain (transglycosylase activity) or to water (hydrolytic activity). Among FTFs, levansucrases (E.C. 2.4.1.10) and inulosucrases (E.C. 2.4.1.9) are the most studied due to the physiological and industrial implications of levan and inulin, the product of their transglycosylase activity; while

in levan fructose molecules are linked through $\beta(2-6)$ bonds, in inulin the linkages are $\beta(2-1)$, in both cases with a relative amount of branching which is dependent on the source of the enzyme.

FTFs have been reported in both Gram positive and Gram negative bacteria, but while FTFs from Gram negative bacteria have molecular weights ranging from 45 to 64 kDa [1,2] most FTFs from Gram positive bacteria present addi-

tional domains and therefore reach molecular weights as large as 170 kDa [3]. An exception is levansucrase (SacB) from *Bacillus subtilis* which has the same architecture as FTFs from Gram negative bacteria. Its structure consists of a five-bladed β -propeller single-domain fold enclosing a funnel-like central cavity, where most of the conserved residues are located including the catalytic residues Asp86 (nucleophile), Asp247 (stabilizer), and Glu342 (general acid) [PDB: 1OYG]. A detailed analysis of the structure has provided evidence of the presence of a bound metal ion, most likely Ca^{2+} , which bounds to amino acids that are conserved in most of Gram-positive bacteria FTFs. In SacB, Asp339 in the sequence known as the 339 DEIER motif makes the major contribution to Ca^{2+} binding [4]. Ozimek et al. [5], have shown that Ca^{2+} ions have an important structural role in levansucrase and inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121, suggesting that the stabilizing function of Ca^{2+} ion is a general feature in FTFs from Gram-positive bacteria. Similarly, in Gram-negative FTFs, the calcium-binding site appears to be substituted by a disulphide bridge providing a similar fold-stabilizing role [6]. In terms of the catalytic domain, FTFs have been classified in Family 68 of Glycoside Hydrolases [7].

A subfamily of mosaic FTFs observed in *Leuconostoc spp.* containing acquired structural domains from the N and C-terminal regions of glucosyltransferases (GTFs) has recently been described [8]. Bashton and Chothia [9] have reviewed the generation of new protein functions by the combination of domains, describing how domain acquisition may confer new properties to the original enzymes such as: an increased specificity; a link between domains that have functional roles; regulate activity; combine within one chain functions that can act either independently, in concert, or in new contexts; and provide the structural framework for the evolution of entirely new functions. The authors found that in all the studied cases (45 sets of proteins), the multidomain protein has a function that is more specific or more complex than that of the one-domain protein. In the case of mosaic FTFs the consequences of this domain acquisition have not been studied. The C-terminal region in GTFs, known as the Glucan Binding Domain (GBD), has been associated in glucan polymerization, in glucan structure, in the transfer of products from the catalytic site, in cell surface localization, as well as in cell wall binding through a LPXTG motif [10-13], however, its precise role remains unknown. No specific function has been associated to the N-terminal domain, known as the variable region [3,14].

Among the mosaic FTFs, we have previously reported the characterization of inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28. IsIA is a cell-associated enzyme with a molecular weight of 165 kDa [15]. As already described, this FTF presents an unusual structure: besides the variable

region in the N-terminus its C-terminal domain presents 80% identity to the GBD of alternansucrase (Asr), a GTF from *L. mesenteroides* NRRL B-1355. As its catalytic domain has 36% identity to the single domain of FTF SacB, it is not probable that these additional domains may be involved in fructan specificity. However, they could be involved in other important properties of the enzyme or the products, such as stability of the enzyme, molecular weight of the polymer, reaction specificity (transglycosylation or hydrolysis), etc.

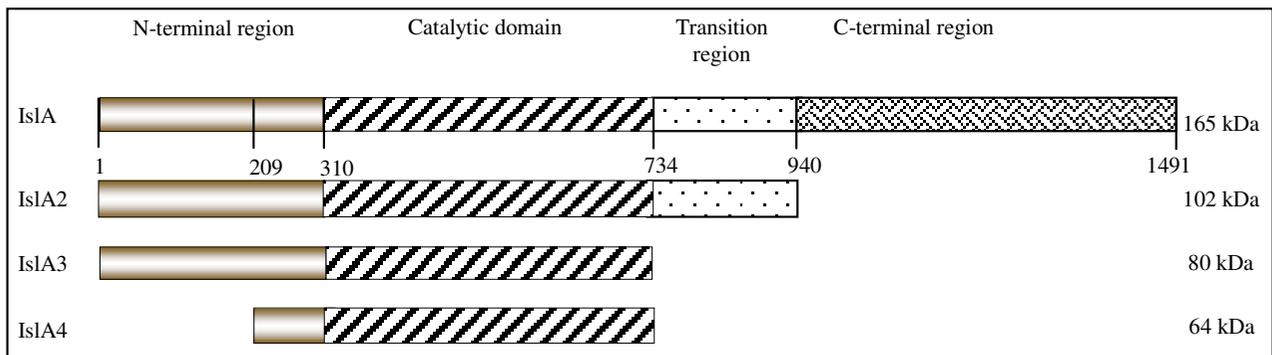
We have already demonstrated that the C-terminal domain is not essential for catalytic activity [15]. However a detailed characterization of truncated versions is required in order to explore other possible functions of these additional domains. In this work we report the biochemical characterization of inulosucrase as compared to three truncated versions: two versions with deletions in the C-terminus glucan binding domain, and one version deleted in both C- and N-terminal regions. We provide evidence demonstrating that the C-terminal region of IsIA is involved in anchoring the enzyme to the cell wall; in addition, besides conferring stability, the C-terminal domain modifies the accessibility to the active site, affecting its catalytic properties. This is also demonstrated by the fact that 100 times lower EDTA concentrations are required to eliminate Ca^{2+} ions from the catalytic domain when the C-terminal domain is removed.

Results and Discussion

Construction and expression of IsIA truncated mutants

The functional role of the C- and N-terminal domains was studied through the analysis of the biochemical properties of three deleted versions of inulosucrase from *L. citreum* (IsIA) described in Figure 1. IsIA2 consists of a 102 kDa fragment obtained after deletion of 551 amino acid from the C-terminus: the deleted region is homologous to the C-terminal region of alternansucrase (Asr) from *L. mesenteroides* NRRL B-1355. The second construct is a 80 kDa variant designated as IsIA3 and obtained from IsIA2 but deleting also the transition region located between the C-terminal region and the catalytic domain. Finally, IsIA4 is a 64 kDa fragment of IsIA constituted only by the catalytic domain, after total elimination of the C-terminal region and an almost total deletion of the variable region in the N-terminus (the first 209 of 309 aa). In all cases 16 kDa corresponding to thioredoxin fused to the N-terminal regions should be included.

All proteins were produced under the control of the induced arabinose promoter in *E. coli*, resulting in active enzymes able to produce polymer. We have already demonstrated that these regions are not essential for the catalytic activity [15], as has also been demonstrated for C-terminus truncated versions of inulosucrase from *L. reuteri*

**Figure 1**

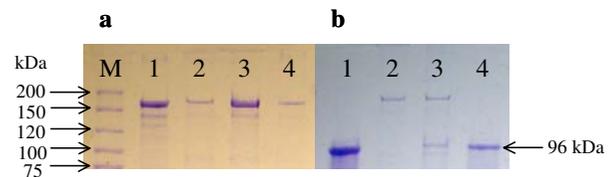
IsIA truncated constructions. IsIA: complete enzyme; IsIA2: deletion of the C-terminal domain; IsIA3: deletion of the transition and the C-terminal regions; IsIA4: deletion of N/C-terminal region.

[16] and for Asr from *L. mesenteroides* NRRL B-1355 [17], which retain their catalytic activity upon modification. The truncated versions are also less stable than the native enzyme. However, other consequences besides the loss of stability may result from domain acquisitions, such as changes in kinetic properties or reaction specificity.

IsIA anchors to *Leuconostoc citreum* cells

IsIA, as well as several other FTFs and GTFs is cell associated. In some FTFs it has been demonstrated the C-terminal region is responsible for anchoring the enzyme to the cell by means of the LPXTG motif [3]. The cell associated FTF from *Streptococcus salivarius* which is devoid of motif LPXTG is released from the cells on exposure to sucrose. Through deletions within the C terminus of this enzyme, Rathsam and Jacques [18], implicated both the hydrophobic and the PGST-rich wall-associated domains in stabilizing the enzyme on the cell surface. In IsIA, neither the LPXTG motif, nor the PGST motif is present. However, a blast analysis revealed a 26% identity of its C-terminal region to the cell wall binding region of amidase (Ami) from *Lysteria monocytogenes*. Ami contains 8 modules of repeat sequences designated as GW that serve to anchor the protein to lipoteichoic acids of the cell wall [19].

In order to determinate if the acquired C-terminal domain of IsIA could be involved in cell wall anchoring, cells of *L. citreum* were produced in the absence of sucrose to avoid IsIA induction. These cells were later contacted with native IsIA and IsIA3 (the last one is an IsIA form deprived of the C-terminal region). After intensive washing, IsIA was strongly retained and active in the cell surface, as demonstrated by successive activity assays and gel electrophoresis (Fig. 2a), while IsIA3 was not retained (Fig. 2b), demonstrating that the C-terminus of IsIA is involved in cell attachment.

**Figure 2**

Binding assays of native IsIA and the truncated form IsIA3 with non induced *L. citreum* CW28 cells. Molecular weight control (M). Gel (a) deals with native IsIA (line 1) while gel (b) with IsIA3 (line 1). In both gels line 2 refers to the non induced *L. citreum* CW28 cells; line 3 refers to the washed non induced cells after contact with the protein; and line 4 refers to the protein solution after contact with non induced cells.

We have already demonstrated the role of the C-terminal domain in DsrP, a GTF from *L. mesenteroides* IBT-PQ. In particular, the homology of DsrP and DsrE (a dextranucrase from *L. mesenteroides* NRRL B-1299) with the binding region (CW repeats) of autolysin (LytA) of *Streptococcus pneumoniae* and ToxA from *Clostridium difficile* lead us to conduct experiments that demonstrated the anchoring role of this domain in DsrP, as well as in DsrE [20]. We also conducted similar experiments with partially purified Asr from *L. mesenteroides* NRRL B-1355, which is able to bind to non induced *L. mesenteroides* NRRL B-1355 (results not shown). Asr is also cell associated and binds to the cells both in the presence or absence of its polymer [21]. Asr C-terminal region contains only a single well defined A repeat: nevertheless, this enzyme has its own seven distinctive repeat elements of nine amino acids in this region [22]. Therefore, the C-terminal region acquisition of FTF may have been a mechanism to display

Table 1: Proposed cell wall association motif in the C-terminal region of several of glycosyltransferases.

Enzyme	Microorganism	motif	Accession number	Reference
GTF-I	<i>S. downei</i>	CW repeats	P11001	[41]
GTF-B	<i>S. mutans</i>	CW repeats	AAA88588	[42]
Dsr-E	<i>L. mesenteroides</i>	CW repeats	CAD22883	[20]
Dsr-P	<i>Lmesenteroides</i> IBT-PQ	CW repeats	AAS79426	[20]
Asr	<i>Lmesenteroides</i> NRRL B-1355	GW repeats	CAB65910	This work
IslA	<i>L. citreum</i> CW 28	GW repeats	AAO25086	This work
Inu	<i>L. reuteri</i> 121	LPXTG motif	AAN05575	[13]
Lev	<i>L. reuteri</i> 121	LPXTG motif	AAO14618	[13]
FTF	<i>S. salivarius</i>	PGST motif	AAN87104	[43]

and anchor the enzyme in the cell surface in order to produce a biofilm a common property of these microorganisms. Several structures are displayed in *Leuconostoc spp.* FTFs and GTFs to locate them in the cell surface as can be summarized in Table 1. However the actual mechanism of protein-cell interaction is still unknown. Further experiments are required to clarify this mechanism.

Characterization of IslA and its truncated versions

Biochemical characterization

In order to determinate the effect of the N/C-terminal region deletion on the biochemical properties of inulosucrase, the influence of pH and temperature on the activity of the three truncated versions was studied. Although no changes were observed in the optimal pH for activity in the complete and truncated versions (pH 6.5), the pH-activity profile became sharper in the deleted forms (results not shown), most probably due to the lower stability of the truncated versions. As far as temperature is concerned, no major modifications were observed for IslA2 which retained the optimum temperature of 35°C of IslA activity; however the optimum temperature for activity decreased to 30°C when the transition region was eliminated. A deeper analysis of the truncated IslA forms stability was carried out at 35°C where it was found that the half-life of the truncated versions decrease when the acquired domains are removed (Table 2). These results, together with those reported by Olivares-Illana et al. [15], corroborate that the N/C-terminus contribute to stabilize the catalytic domain. This is also the case of DsrS, where

the truncated version is more susceptible to thermal denaturation [23]. However, the deletion of the C-terminal region does not always result in a lost of stability, as in the case of Asr from *L. mesenteroides* B-1355 where deletions of the N/C-terminus (with high identity to the C-terminal domain of IslA) do not affect the thermal stability of the truncated forms [17].

The polymer structure and the molecular weight of the polysaccharides produced by the truncated versions were analyzed by means of ¹³C NMR: the spectra of the polymer synthesized by the IslA mutants was identical to the one obtained from the complete IslA protein, equivalent to a fructose polymer linked through β(2-1) bonds and identified as inulin (data not shown). The protein deletions have also no influence in the polymer molecular weight distribution as observed by gel permeation HPLC: all polymers have a molecular weight distribution in the range of 90 000 to 4 400 000 Da, similar to the polymer produced by IslA. It is therefore possible to conclude that, although a detailed analysis of the polymer size is difficult to perform, there are no major differences in product specificity of the mosaic FTFs and the deleted forms including, IslA4 which could be considered equivalent to single domain FTFs. This phenomenon has also been observed in Asr, where the deletion of the C-terminal region did not affect the properties of the product [17]. Similar consequences were observed with C-terminus truncated versions of inulosucrase from *L. reuteri* [24] and GTF-I from *Streptococcus downei* [25]. Nevertheless it is not possible to

Table 2: Biochemical and kinetic properties of inulosucrase (IslA) from *L. citreum* CW28 and truncated versions.

Truncated version	Optimum T (°C)	Half life @ 35°C (min)	Hydrolysis/transglycosylase ratio (%) ^a	K _m ^T (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
IslA	35	420	40/60	38	25	0.65
IslA2	35	407	38/62	24	28.19	1.17
IslA3	30	346	61/39	nd	nd	nd
IslA4	30	128	70/30	142	105	0.73

^a Measured after depletion of 293 mM sucrose. K_m^T (total K_m) was determined from sucrose consumption rate. IslA3 did not follow a Michaelis Menten kinetic behavior

generalize this behaviour as when the C-terminal region was deleted from GTF-I from *S. mutans*, the resulting enzyme lost completely its capacity to synthesize the polymer, retaining only sucrase activity [26].

Kinetic properties

Total Km and kcat values were determined for IslA as well as for the truncated versions from initial sucrose consumption rates (Table 2). In this case, all forms exhibit Michaelis-Menten type kinetics, with the exemption of IslA3 which was best described by the Hill equation. The Hill equation has also been applied to describe the kinetic behavior of inulosucrase and levansucrase from *L. reuteri* at 50°C [16] which do not exhibit a saturating behavior. Although there is no net modification in the catalytic efficiency of the IslA forms as measured by the kcat/Km ratio, some interesting observations result from the analysis of the individual parameters. Even when it is difficult to define a trend in terms of the apparent total Km value, it is possible to observe that the smallest IslA versions, lost sucrose affinity as concluded from a one order of magnitude increase in its total Km value. An interesting feature is that there is also a 2–4 fold increase in its total kcat value, as if partial elimination of the structure would result in a facilitated access of the substrates, particularly the catalytic water to the active site. Changes in sucrose affinity have also been reported in the truncated GTF-A from *L. reuteri* [27] which increased its Km with respect to the native enzyme. It is interesting to point out that the total Km value of IslA and IslA2 is similar to the value reported for most FTFs including both single domain enzymes such as levansucrases from *L. reuteri* (21 ± 4 mM) [16], *A. diazotrophicus* (11.8 mM \pm 1.4) [28], *L. sanfranciscensis* (13.1 mM) [11] or multidomain FTFs such as *L. mesenteroides* NRRL B-512F (LevS) (36.7 ± 5.4 mM) [29] and *L. mesenteroides* ATCC 1359 (LevC) (27.3 mM) [8]. Interestingly, the loss of affinity, makes it equivalent, in terms of the total Km value, to single domain levansucrases from Gram negative bacteria, such as *Z. mobilis* [30] and *P. syringae* [1] (160 and 122 mM respectively).

We have already demonstrated that IslA, as most FTFs and GTFs, have a transglycosylase activity which is a function, among others parameters, of sucrose concentration [31]. When this property was studied for the truncated versions in a wide substrate concentration range (up to 0.87 M sucrose) it was found that, as expected, the higher the sucrose concentration, the higher the transglycosylase activity. In spite of this result, observed for all IslA forms, a higher hydrolytic activity was found when the transition region was eliminated, as shown in Table 2. These results suggest that in the chimeric construction, the acquired domains, in particular the transition region, may interact with the catalytic core, turning the enzyme less hydrolytic, probably due to the conformation of a larger path for the

accessibility of the catalytic water molecules to the active site. In any case, the higher the hydrolytic activity of the IslA form, the higher its kcat value (Table 2), as a consequence of a preferential transfer of the fructosyl residue to water than to the polymer acceptor. In the same context, other factors reducing the hydrolysis in favor of the transglycosylase activity in FTFs include the use of organic solvents [32,33] or the immobilization of the enzyme [34]. It is interesting to observe that in these last cases (high substrate concentration, use organic of solvents or enzyme immobilization) the common feature is the reduction of water activity (a_w) in the vicinity of the active site.

Effect of the additional regions on calcium diffusion

A putative calcium binding site coordinated by Asp339 of the ³³⁹DEIER motif, where the Glu342 catalytic residue is also found, has been determined in SacB crystallographic structure [4]. The authors speculate that in the absence of Ca²⁺ ions the ³⁴⁹DEIER loop acquire a conformation less favorable for catalysis.

Considering this structural feature, the Ca²⁺ ion effect on IslA4 activity was evaluated. It was found that the activity is lost when Ca²⁺ ions are depleted using EDTA. However, when this effect was analyzed in detail, the rate of Ca²⁺ ions depletion was found to be structure-dependent, as measured by the rate of activity loss and the higher EDTA concentrations required to remove Ca²⁺ ions in short times. These results are summarized in Figure 3, where it may be observed that while 50 μ M of EDTA and 5 minutes of incubation are enough to deplete IslA4 and IslA3 of Ca²⁺ ions and activity, 1000 μ M and 180 min are required to achieve the same effect with IslA2. Interestingly, after 40 h incubation of IslA with 5000 μ M EDTA, that is 100 fold more EDTA that the concentration used with IslA4 and IslA3, the enzyme still retains 20% of the original activity. This is probably due to the fact that the three domain IslA require Ca²⁺ ions to optimize the activity, but is not essential, a property that would be inherent to the mosaic structure. In any case, the interaction of the additional domains, particularly the transition region, with the catalytic core put forward to describe the hydrolysis/transglycosylase reaction ratio variations, could also explain the difficulties to remove Ca²⁺ ions (Fig. 3) a consequence of a less exposed DEIER motif.

Structural changes influenced by Ca²⁺ ions on the truncated forms

In order to perform a detailed analysis of the role of the additional domains in inulosucrase stability, the influence of Ca²⁺ ions in the conformational structure of the native and truncated versions was studied through the measurement of intrinsic fluorescence in presence of EDTA and Ca²⁺ ions. For this purpose the fluorescence intensity was followed after EDTA addition; when a con-

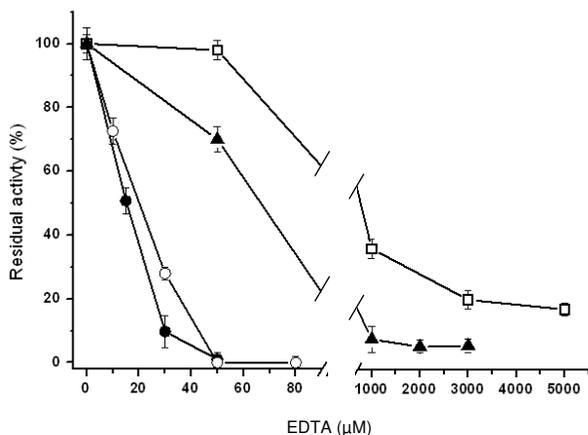


Figure 3
Effect of EDTA on native IsIA and truncated forms activity. IsIA4 (black circles), IsIA3 (open circles), IsIA2 (black triangles), IsIA (open squares). Activity measurements are made after 5 min of incubation with EDTA for the IsIA4 and IsIA3 forms, and after 180 min for native IsIA and IsIA2.

stant intensity was reached, Ca^{2+} ions were restored. The time scale as well as EDTA and Ca^{2+} ions concentration was dependent on the IsIA form studied. It may be observed that IsIA4 (Fig. 4a) and IsIA3 (Fig. 4b) undergo slight local structural modifications when Ca^{2+} ions are depleted by addition of 50 μM EDTA, as deduced from the fluorescence intensity change. However, a rapid recover occurs when 500 μM CaCl_2 are restored. In the case of IsIA4 and IsIA3 a complete unfolding is not reached, contrary to the observations made in SacB [35] by Petit-Glatron *et al.*, who found that SacB suffers a complete unfolding which is reverted when Ca^{2+} ions are restored. On the other hand, Circular Dichroism (CD) experiments confirmed that the changes observed in fluorescence during Ca^{2+} depletion did not result in any modification of the IsIA4 secondary structure, as concluded from the CD spectrum shown in Figure 5a.

Surprisingly, no significant changes in fluorescence intensity in the absence of Ca^{2+} ions were observed for IsIA2, even in the presence of 1000 μM EDTA that inactivates the enzyme (Fig. 4c). Similarly, the fluorescence intensity measurements of IsIA in the presence of 5000 μM EDTA during 180 min, imply that no modifications take place, even when the enzyme retains only 20% of original activity. The CD experiments performed on IsIA in the absence of Ca^{2+} ions demonstrated no changes in secondary structure strengthening the hypothesis that the additional domains confer rigidity to the enzyme, generating a more stable form even in the absence of Ca^{2+} ions. In summary, the smallest versions of IsIA: IsIA3 and IsIA4,

lose activity in the absence of Ca^{2+} ions (Fig. 3) with slight modifications in their tertiary structure (Fig 4); these changes are reverted when Ca^{2+} ions are restored. Throughout this process, the secondary structure of IsIA4 is conserved. In contrast, IsIA and IsIA2 retain around 20% and 10% of the original activity respectively, even in presence of high EDTA concentrations without alterations in its tertiary structure, indicating that the transition and the C-terminal regions confer stability to the protein.

Conclusion

Through binding assays, we demonstrated that the C-terminal domain in inulosucrase IsIA serves to anchor the enzyme to the cell surface. The difficulties found to remove Ca^{2+} ions as the structure becomes more complex, from IsIA4 to IsIA, together with the greater sucrose affinity (smaller K_m) and the higher thermostability, allow also us to conclude that the acquired domains in IsIA interact with the catalytic core resulting in a new conformation that renders the enzyme more stable and generates a switch in specificity from an hydrolytic to a transglycosylase mechanism. Actually, this strategy in nature has been recently observed elsewhere in a completely different enzyme structure and activity. Trehalose synthase has been reported both as a single domain enzyme in *Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas sp.*, *Pimelobacter sp.* [36,37], and as mosaic proteins with α -amylase regions acquired in the C-terminal domain in *Thermus thermophilus* [38]. Wang *et al.* [38] through deletion of the acquired regions demonstrated also that the single domain enzyme is not only less stable but hydrolyzes more trehalose.

Methods

Cloning and expression of truncated versions

In a previous work, truncated versions were constructed in order to explore if the C-terminal domain was essential for activity [15]. In this work, the same truncated versions were fused to a His tag and expressed under the *ara* promoter in order to produce and purify enough protein for characterization. Each gene fragment was amplified from *islA* cloned in plasmid pCR-TOPO [15] using the corresponding primers: IsIA2 *IS2reverse* (CTAATTAAATCGCGTGAAAAGCTAATGGC) and *SPdirecto* (ACCATGGACG TGAATCAACCACTTTTAGCG); IsIA3 *ISE3rvEco* (ATC CTC AGA ATT CAA TGC TAA TAA CTC AAC) and *SP directo*; IsIA4 *BproNae* (GAA ATG ACT AGT GTG CCG GCG CTT ATA TC) and *ISE3rvEco*. The amplification products were cloned into the pBAD/Thio TOPO expression vector (Invitrogen, Calsbad, CA). *E. coli* strain TOP10 was used to transform the constructed plasmids and to express the truncated IsIA truncated versions. Overnight cultures of the transformed strains, carried out at 37°C in 50 ml Luria-Bertani medium supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin, were used as inoculum of 950 ml of

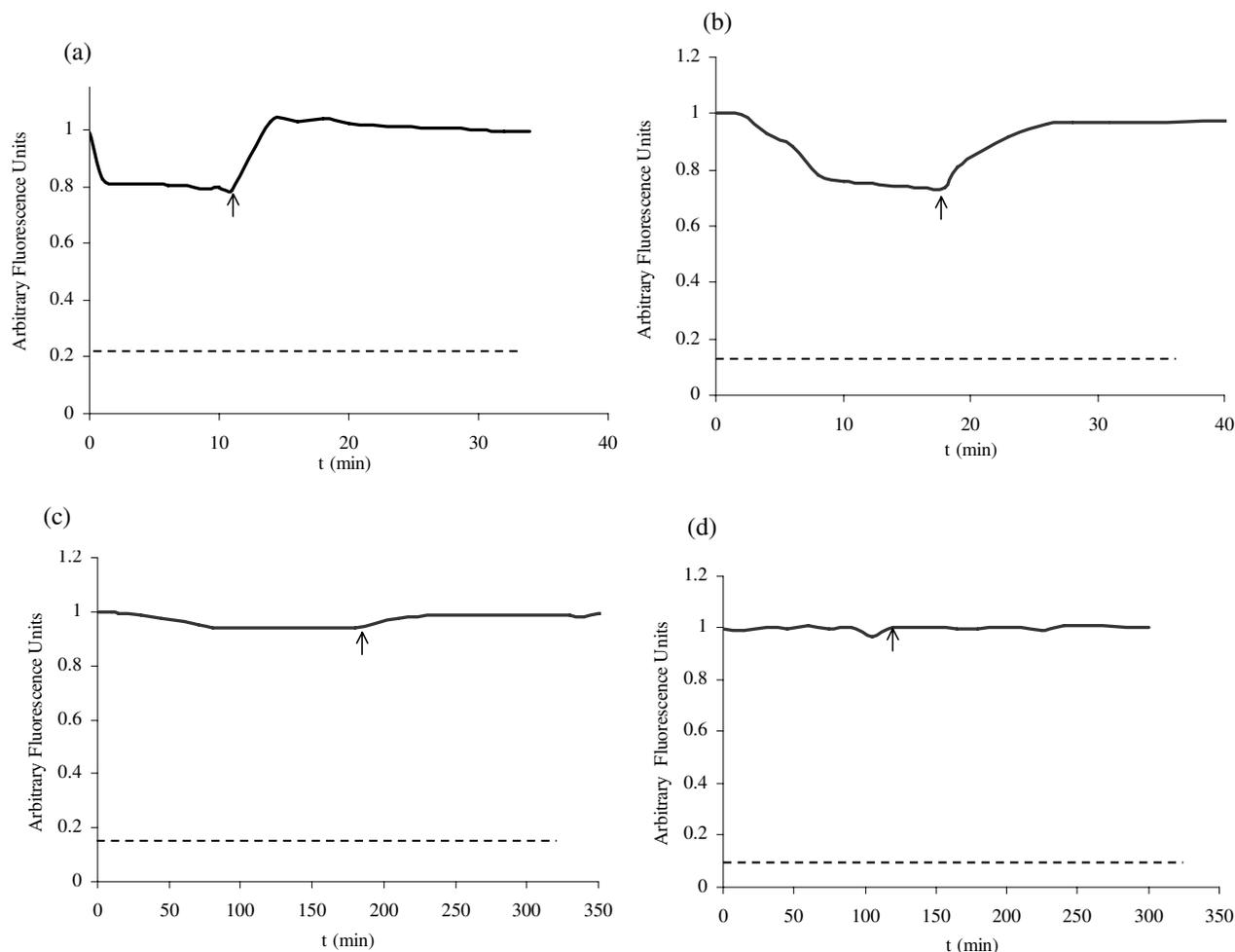


Figure 4

Structure modifications of IslA and truncated forms mediated by EDTA and Ca^{2+} ions measured by intrinsic fluorescence (excitation wavelength = 280 nm, emission wavelength = 348 nm) (a) IslA4, 50 μM EDTA and 500 μM Ca^{2+} ions; (b) IslA3, 50 μM EDTA and 500 μM Ca^{2+} ions; (c) IslA2 1000 μM EDTA and 2000 μM Ca^{2+} ions and (d) IslA 5000 μM EDTA and 7000 μM Ca^{2+} ions. EDTA is added after the first fluorescence measurement; time of Ca^{2+} ions addition is indicated by an arrow. For each case, the fluorescence of the heat denaturated protein is shown as a broken line.

the same medium and grown until an 0.6 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ was reached. At this time, expression of the recombinant proteins was induced by addition of 0.02% (w/v) L-arabinose for IslA2 and 0.2% (w/v) for IslA3 and IslA4 and the temperature reduced to 23°C. Cells were harvested at 1.8 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$.

Preparation of *E. coli* cell extracts and purification of IslA and truncated versions

E. coli cells were harvested by centrifugation (10 min, 4°C, 4600 g). The resulting pellet was washed twice with 50 mM pH 6.5 phosphate buffer. Afterwards, cells were suspended in 5 ml of the same buffer and broken at 900 psi in a French press. Cell debris was removed by centrifuga-

tion for 30 min at 4°C at 10000 g and the supernatant assayed for activity.

The enzymatic forms were purified by affinity chromatography through their His tags. A bed volume of 600 μl of Ni-nitroacetic acid (Ni-NTA) resin (Qiagen) was used to bind protein from 5 ml of cell extract. The resin was equilibrated with 3 ml of binding buffer (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM) pH 7.5 for IslA2 and pH 7 for IslA3 and IslA4. The cell extract was diluted 1:1 with buffer binding and incubated for 1 h at 4°C with the equilibrated resin, followed by washing with 7 ml of the same buffer containing 30 mM imidazole. Finally the recombinant protein(s) were eluted with 2 ml of elution

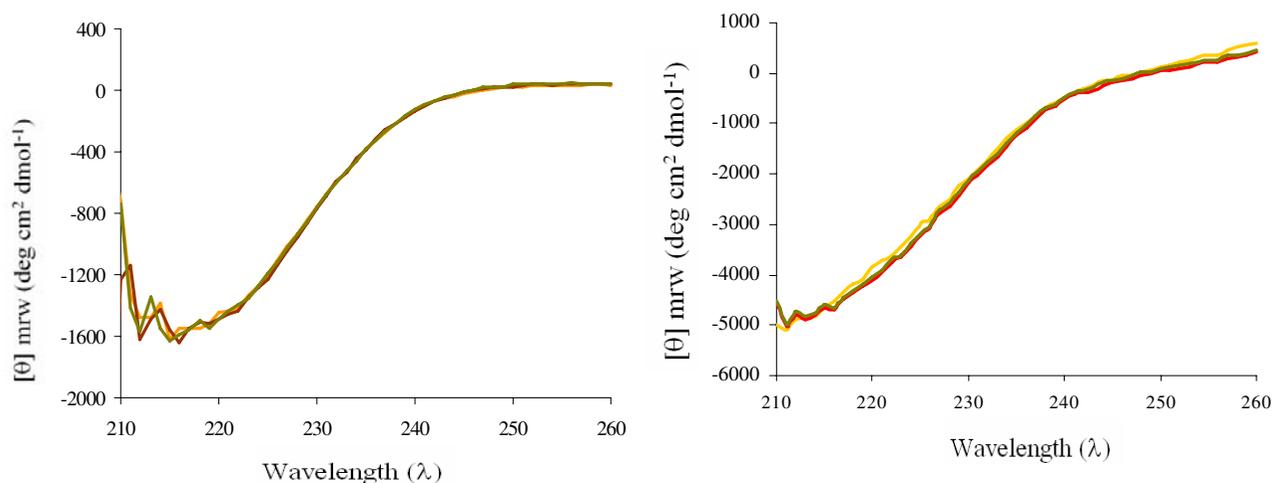


Figure 5

Circular Dichroism spectra of native IsIA and IsIA4 mediated by EDTA and Ca^{2+} ions. (a) IsIA4: control (yellow line), IsIA4 after incubation for 15 min with 0.5 mM EDTA (brown line); IsIA4 after incubation for 15 min of the previous sample after restoring Ca^{2+} ions (1 mM) (green line). (b) IsIA: control (yellow line), IsIA after incubation for 180 min with 0.5 mM EDTA (brown line); IsIA after incubation for 180 min of the previous sample after restoring Ca^{2+} ions (8 mM) (green line).

buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole). The proteins were dialyzed against 50 mM pH 6.5 phosphate buffer and 1 mM CaCl_2 . The cell-associated IsIA was extracted from *L. citreum* CW28 cells with 8 M urea at 25°C for 1 h with occasional gentle shaking as already described [31]. The extract was then dialyzed against 50 mM pH 6.5 phosphate buffer, after centrifugation. With this procedure, IsIA was obtained in a highly purified form. The purity of the enzyme and truncated forms was verified by SDS-PAGE 8%.

FTF activity assay

Initial reaction rates of IsIA and truncated versions were measured at 30°C in 50 mM pH 6.5 phosphate buffer in the presence of 293 mM sucrose and 1 mM CaCl_2 . The activity was measured by following of the reducing power released from sucrose by the 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS). One activity unit (U) is defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of glucose per minute. Specific activity is reported as U/mg of protein. The protein concentration was determined by the Bradford method [39], using the Bio-Rad reagent and BSA as standard. In a more specific assay, glucose and fructose were analyzed by HPLC in a Waters instrument equipped with a refraction index detector (Waters 410) and using a high performance carbohydrate cartridge (Waters) at 35°C and acetonitrile:water 75:25 as eluent at a flow rate of 1.4 mL/min.

Biochemical and enzymatic characterization of IsIA and truncated versions

IsIA and truncated versions activity was assayed in the 20 to 40°C temperature range in 50 mM pH 6.5 phosphate buffer and 1 mM CaCl_2 , while the effect of pH was determined in the 5.0 to 8.0 range in the same buffer. All the experiments were performed in triplicates.

Kinetics properties were studied through initial rate of reaction measurements carried out at pH 6.5 and 30°C in sucrose solutions ranging from 14.6 to 584.8 mM and containing 1 mM of CaCl_2 . Samples of 50 μl were withdrawn after addition of the enzyme at 3 min time intervals and poured into 50 μl of DNS solution to stop the reaction and perform the reducing power assay. The data was processed using the Hills or the Michaelis-Menten equations. The transglycosylase and hydrolase activities of IsIA and truncated versions were determined from the glucose and fructose concentrations measured by HPLC.

Ca^{2+} ions binding

Ca^{2+} ions were depleted by addition of EDTA in amounts that were found dependent on the protein structure, as described in the results section. Accordingly, different concentrations of Ca^{2+} ions were used to restore the activity.

Fructan characterization

Fructan was produced with all the enzymes forms at 30°C in 50 mM pH 6.5 phosphate buffer containing 100 g/L

sucrose and 1 mM CaCl₂. The polymer was precipitated with two volumes of ethanol, dialyzed against water, lyophilized and analyzed by ¹³C NMR. Inulin MW was analyzed by gel permeation chromatography in a Waters 600E HPLC system controller (Waters Corp. Milford, MA) equipped with a refractive index detector (Waters 410), using a serial set of Ultrahydrogel columns (UG 500 and linear) at 35 °C with water as mobile phase at 0.9 mL/min.

Secondary and tertiary structure determination

Tertiary structure of the truncated forms was examined by Trp fluorescence assays on a Perkin Elmer LS-55 spectrofluorimeter. The proteins were purified and filtered and solutions prepared containing 0.018 mg/mL of IslA4; 0.02 mg/mL of IslA3 and IslA2; and 0.01 mg/mL of IslA. The proteins were excited at 280 nm and the fluorescence emission measured at 348 nm at 30 °C. The secondary structure of the truncated versions was determined by Circular Dichroism (CD) from solutions containing 5.04 μM of IslA4 and IslA3 and 1.7 μM of IslA in 50 mM pH 6.5 phosphate buffer (CaCl₂ and/or EDTA were added according to the case). The solutions were placed in quartz cuvettes of 2 mm path length and CD spectra in the far UV region (190–250 nm) recorded on a Jasco J-715 spectropolarimeter at 25 °C. All the spectra shown is the average of 3 scans recorded at a scanning rate of 20 nm/min. Spectra were corrected by subtracting appropriate buffer blanks and smoothed by noise reduction.

Cell wall anchoring assay

In order to demonstrate the role of the C-terminal domain in binding to *L. citreum* CW28 cells, we first produced non induced *L. citreum* CW28 cells in LM culture supplemented with glucose 2% (w/v) instead of sucrose, harvested at 5 OD_{600 nm} by centrifugation and washed twice with 50 mM pH 6.5 phosphate buffer. Cell protein was measured by the Lowry method [40]. In a second step, 0.5 mg/ml of the purified proteins IslA and IslA3 (with and without the C-terminal domain respectively but retaining enzymatic activity) were incubated with 2.5 mg/ml final concentration of non induced *L. citreum* CW28 cells for 12 h at 4 °C with gentle shaking. Afterwards, cells were separated by centrifugation at 4 °C, 12000 g. The pellet was washed three times with 50 mM pH 6.5 phosphate buffer, and for both, supernatant and the pellet, the FTF activity was determined and SDS-PAGE 8% gels were performed.

Authors' contributions

SMV generated, expressed and purified the truncated versions and carried out the structural characterization, the binding assays, and drafted the manuscript; MERA realized the biochemical characterization of truncated versions; COC participated in experimental design and coordination. ALM conceived and supervised the project

and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This project was supported by PAPIIT-UNAM No. IN228006-3 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 40609-Z. We thank Rebeca Pérez-Morales for preliminary kinetic experiments and Fernando Gonzalez, Alma Martinez, Juan Manuel Hurtado, Arturo Ocadiz and Abel Blancas for technical assistance.

References

- Hettwer U, Gross M, Rudolph K: **Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.** *J Bacteriol* 1995, **177**:2834-2839.
- Senthilkumar V, Busby SJ, Gunasekaran P: **Serine substitution for cysteine residues in levansucrase selectively abolishes levan forming activity.** *Biotechnol Lett* 2003, **25**:1653-1656.
- van Hijum SA, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, van Geel-Schutten IG: **Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**:157-176.
- Meng G, Futterer K: **Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase.** *Nat Struct Biol* 2003, **11**:935-941.
- Ozimek LK, Euerink GJ, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L: **Mutational analysis of the role of Ca²⁺ ions in the *Lactobacillus reuteri* strains 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes.** *FEBS Lett* 2005, **579**:1124-1128.
- Martinez-Fleites C, Ortiz-Lombardia M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta JG, Hernandez L, Davies GJ: **Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*.** *Biochem J* 2005, **390**:19-27.
- Devulapalle K, Goodman S, Gao Q, Hemsley A, Mooser G: **Knowledge-based model of a glucosyltransferase from oral bacterial group of mutant *Streptococci*.** *Pro Sci* 1997, **12**:2489-2493.
- Olvera C, Centeno-Leija S, Lopez-Munguia A: **Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293.** *Int J Gen Mol Microbiol Antonie van Leeuwenhoek* 2007, **92**:11-22.
- Bashton M, Chothia C: **The generation of new protein functions by the combination of domains.** *Structure* 2007, **15**:85-99.
- Pabst MJ, Cisar JO, Trummel CL: **The cell wall-associated levansucrase of *Actinomyces viscosus*.** *Biochim Biophys Acta* 1979, **566**:274-82.
- Tiekling M, Ehrmann MA, Vogel RF, Ganzle MG: **Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **66**:655-663.
- van Geel-Schutten GH, Faber EJ, Smit E, Bonting K, Smith MR, Ten Brink B, Kamerling JP, Vliegenthart JF, Dijkhuizen L: **Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**:3008-3014.
- van Hijum SA, van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, van der Maarel MJ, Dijkhuizen LK: **Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:4390-4398.
- Kato C, Kuramitsu HK: **Molecular basis for the association of glucosyltransferases with the cell surface of oral streptococci.** *FEMS Microbiol Lett* 1991, **63**:153-157.
- Olivares-Illana V, Lopez-Munguia A, Olvera C: **Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase.** *J Bacteriol* 2003, **185**:3606-3612.
- van Hijum SA, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L: **Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121.** *FEBS Lett* 2003, **534**:207-210.
- Joucla G, Pizzut S, Monsan P, Remaud-Simeon M: **Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its carboxy-terminal domain.** *FEBS Lett* 2006, **580**:763-768.

18. Rathsam C, Jacques NA: **Role of C-terminal domains in surface attachment of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975.** *J Bacteriol* 1998, **180**:6400-6403.
19. Braun L, Dramsi S, Dehoux P, Bierne H, Lindahl G, Cossart P: **InIB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association.** *Mol Microbiol* 1997, **25**:285-294.
20. Olvera C, Fernandez-Vazquez JL, Ledesma-Candanoza L, Lopez-Munguia A: **Carboxy terminal domain role of dextranucrase cellular association from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ.** *Microbiology* 2007, **153**:3994-4002.
21. Zahnley JC, Smith MR: **Cellular association of glucosyltransferases in *Leuconostoc mesenteroides* and effects of detergent on cell association.** *Appl Biochem Biotechnol* 2000, **87**:57-70.
22. Janecek SS, Svensson B, Russell RR: **Location of repeat elements in glucanucrases of *Leuconostoc* and *Streptococcus* species.** *FEMS Microbiol Lett* 2000, **192**:53-57.
23. Monchois V, Reverte A, Remaud-Simeon M, Monsan P, Willemot RM: **Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase carboxy terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**:1644-1649.
24. van Hijum SA, Szalowska E, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L: **Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*.** *Microbiology* 2004, **150**:621-630.
25. Monchois V, Vignon M, Russell RR: **Isolation of key amino acid residues at the N-terminal end of the core region *Streptococcus downei* glucanucrase, GTF-I.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1999, **52**:660-665.
26. Kato C, Kuramitsu HK: **Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme.** *FEMS Microbiol Lett* 1990, **60**:299-302.
27. Kralj S, van Geel-Schutten GH, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L: **Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* I21 reuteransucrase.** *Microbiology* 2004, **150**:2099-2112.
28. Hernandez L, Arrieta J, Menendez C, Vazquez R, Coego A, Suarez V, Selman G, Petit-Glatron MF, Chambert R: **Isolation and enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane.** *Biochem J* 1995, **309**:113-118.
29. Morales-Arrieta S, Rodriguez ME, Segovia L, Lopez-Munguia A, Olvera-Carranza C: **Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F.** *Gene* 2006, **376**:59-67.
30. Yanase H, Iwata M, Nakahigashi R, Kita K, Tonomura K: **Purification, crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*.** *Biosci Biotechnol Biochem* 1992, **56**:1335-1336.
31. Ortiz-Soto ME, Olivares-Illana V, Lopez-Munguia A: **Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW 28 used for inulin synthesis.** *Biocat Biotrans* 2004, **22**:275-281.
32. Castillo E, Lopez-Munguia A: **Synthesis of levan in water-miscible organic solvents.** *J Biotechnol* 2004, **114**:209-217.
33. Chambert R, Petit-Glatron MF: **Study of effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase.** *Carbohydr Res* 1989, **191**:117-123.
34. Chambert R, Petit-Glatron MF: **Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity.** *Carbohydr Res* 1993, **244**:129-36.
35. Petit-Glatron MF, Monteil I, Benyahia F, Chambert R: ***Bacillus subtilis* levansucrase: amino acid substitutions at one site affect secretion efficiency and refolding kinetics mediated by metals.** *Mol Microbiol* 1990, **12**:2063-2070.
36. Nishimoto T, Nakano M, Nakada T, Chaen H, Fukuda S, Sugimoto T, Kurimoto M, Tsujisaka Y: **Purification and properties of novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48.** *Biosci Biotechnol Biochem* 1996, **60**:640-644.
37. Ohguchi M, Kubota N, Wada T, Yoshinaga K, Uritani M, Yagisawa M, Ohigi K, Yamagishi M, Ohta T, Ishikawa K: **Purification and properties of trehalose-synthesizing enzyme from *Pseudomonas* sp. FI.** *J Ferment Bioeng* 1997, **84**:358-360.
38. Wang JH, Tsai MY, Chen JJ, Lee GC, Shaw JF: **Role of the C-Terminal Domain of *Thermus thermophilus* trehalose synthase in the thermophilicity, thermostability, and efficient production of trehalose.** *J Agric Food Chem* 2007, **55**(9):3435-43.
39. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-54.
40. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**:265-275.
41. Fernandez-Tornero C, Lopez R, Garcia E, Gimenez-Gallego G, Romero A: **A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA.** *Nat Struct Biol* 2001, **8**:1020-1024.
42. Vacca-Smith AM, Bowen WH: **Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces.** *Arch Oral Biol* 1998, **43**:103-110.
43. Rathsam C, Giffard PM, Jacques NA: **The cell-bound fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*: the carboxyl terminus specifies attachment in a *Streptococcus gordonii* model system.** *J Bacteriol* 1993, **175**:4520-4527.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

