

Aspectos estructurales y funcionales de la asparraginasa en pino

Sonia Van Kerckhoven, Fernando de la Torre, María B. Pascual, Rafael A. Cañas,
Concepción Ávila, Francisco R. Cantón, Francisco M. Cánovas

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Campus univ. de Teatinos, s/n, 29071 Málaga. e-mail: frcanton@uma.es

La asparragina es un metabolito clave en plantas para el transporte y reserva temporal de nitrógeno. La principal vía de movilización del nitrógeno contenido en el grupo amido de este aminoácido implica a la enzima asparraginasa (ASPG, EC 3.5.1.1), que cataliza la hidrólisis de asparragina a aspartato y amonio. Las asparraginasas de plantas, al igual que todas las enzimas de la familia Ntn-hidrolasas, son sintetizadas como precursores inactivos. La enzima activa es un heterotetrámero con dos tipos distintos de subunidades (α y β) producidas por el procesamiento autocatalítico del precursor. En angiospermas se han identificado genes que codifican dos subtipos de asparraginasas (Bruneau et al. 2006), las K^+ -independientes y las K^+ -dependientes, con al menos un gen codificante para cada tipo en los genomas que han sido secuenciados. La caracterización de ambos subtipos indica que la forma K^+ -dependiente sería más eficiente en la movilización del nitrógeno amido de la asparragina bajo condiciones de alta demanda metabólica de nitrógeno (Bruneau et al. 2006), mientras que el papel de las K^+ -independientes estaría relacionado con su actividad isoaspartil dipeptidasa. Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado una caracterización de las distintas formas presentes y sus funciones en gimnospermas. Una búsqueda en el transcriptoma disponible de *Pinus pinaster* (Canales et al. 2014) nos permitió identificar un total de tres genes con similitud a asparraginasa. Sólo uno (*PpASPG1*), identificado previamente por nuestro grupo de investigación (Cañas et al. 2006), presenta mayor similitud con las asparraginasas K^+ -dependientes. El principal inconveniente para la caracterización de estas proteínas es su baja abundancia. Para soslayar este impedimento se expresaron transitoriamente los tres genes de pino en un sistema heterólogo, se purificaron las proteínas recombinantes y se compararon sus características. Por otro lado, esta aproximación nos ha permitido también estudiar cómo afecta al procesamiento del precursor y a la actividad de la enzima la presencia de una extensión de 70 aminoácidos en el extremo carboxilo de la subunidad α de *PpASPG1*, que no está conservada en las proteínas ortólogas de especies angiospermas. Finalmente, con el objetivo de dilucidar posibles funciones, hemos realizado un análisis de expresión de los tres genes identificados, así como el aislamiento y análisis del promotor del gen *PpASPG1*.

Referencias

- Bruneau L. et al (2006) Co-occurrence of both L-asparaginase subtypes in Arabidopsis: At3g16150 encodes a K^+ -dependent L-asparaginase. *Planta*, 224:668–679, doi: 10.1007/s00425-006-0245-9.
- Canales J. et al. (2014) De novo assembly of maritime pine transcriptome: implications for forest breeding and biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, 12:286–299. doi: 10.1111/pbi.12136.
- Cañas RA et al. (2006) Coordination of *PsASI* and *PsASPG* expression controls timing of re-allocated N utilization in hypocotyls of pine seedlings. *Planta*, 225:1205–1219. doi: 10.1007/s00425-006-0431-9.