

**Título:** Estudio de la regulación de la asparraginasa de pino.

**Autores:** Sonia Van Kerckhoven, Fernando de la Torre, María B. Pascual, Concepción Avila, Francisco Cantón, Francisco M. Cánovas.

**Abstract :**

La asparraginasa (ASPG, EC 3.5.1.1) de plantas pertenece a la familia de Ntn-hidrolasas, enzimas que se sintetizan como un precursor inactivo, el cual es activado mediante un procesamiento autocatalítico que genera dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Estas subunidades forman un tetrámero  $(\alpha\beta)_2$ , que constituye la forma madura de la enzima, en la cual cada subunidad  $\beta$  presenta un residuo nucleófilo (Thr) en su extremo amino como resultado del procesamiento. La asparraginasa está implicada en la movilización del nitrógeno contenido en el grupo amido de la asparragina, el metabolito principal para la reserva y el transporte de nitrógeno en plantas. Nuestro objetivo es determinar cómo se regula esta enzima en pino, tanto a nivel transcripcional como postraducciona. A nivel transcripcional estamos realizando una caracterización estructural y funcional de la región promotora del gen, así como el análisis del patrón de expresión del gen en diferentes tejidos y condiciones. A nivel postraducciona nos hemos centrado en determinar las características del procesado y activación de la ASPG en pino. Debido a los bajos niveles de la proteína en pino, este estudio se abordó con proteína recombinante purificada desde sistemas heterólogos. La expresión de la proteína recombinante de *Pinus pinaster* en células de *E. coli* resulta en una proteína inmadura sin capacidad de autocatálisis *in vitro*, a diferencia de lo que se ha descrito para ASPG de otras especies angiospermas. Por el contrario, la expresión heteróloga en plantas de tabaco genera una proteína madura. En comparación con la estructura primaria de las ASPG de especies cuyo genoma ha sido secuenciado, las ASPG de coníferas presentan una extensión de unos 70 aminoácidos en la posición que precede al residuo nucleófilo, sitio donde ocurre el procesamiento que activa a la enzima. Un análisis mediante espectrometría de masas ha demostrado que esta extensión forma parte de la proteína de *Pinus pinaster* en su forma madura. En la actualidad estamos analizando el efecto de esta extensión sobre el autoprosesamiento del precursor.

Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2012-33797, AGL9-12139C0202) y una ayuda de la

Universidad de Málaga (Programa de Fortalecimiento, PP03) y una ayuda F.P.U. del Ministerio de Educación a SVK (AP2010-5434).