

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
VICKY HOULE

DÉTERMINATION DE L'IMPACT DE LA GLYCOSYLATION SUR L'ACTIVITÉ
ET LA STABILITÉ DE L'ENDOPOLYGALACTURONASE DE *S. CEREVISIAE* PAR
MUTAGENÈSE DIRIGÉE

Avril 2007

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

J'aimerais, tout d'abord, remercier mon directeur de maîtrise Monsieur Marc Beauregard, Ph.D. pour m'avoir acceptée dans son équipe de recherche durant mes études. Ainsi que pour son soutien et ses bons conseils qui m'ont permis de me rendre jusqu'au bout de ma maîtrise et de passer au travers des moments parfois plus difficiles présents dans le domaine de la recherche. Je désire aussi remercier mes coéquipiers de travail : Cindy Lavallée, Étienne Dubé, Fatma Meddeb et Mylène Gagnon qui m'ont aidé de plusieurs façons au cours de ma maîtrise que ce soit au niveau professionnel ou au niveau personnel. Je leur suis reconnaissante de m'avoir donné de leur temps et de leur support moral lorsque le découragement se montrait le bout du nez. J'ai eu bien du plaisir avec eux que ce soit sur les heures de travail ou en dehors lors de souper ou d'activités diverses. Finalement, je remercie tous mes amis et ma famille qui m'ont encouragé durant mes études.

RÉSUMÉ

Les endopolygalacturonases de levures ont une valeur commerciale importante pour certaines industries. Étant donné la variation des conditions pour chacun des procédés industriels, il est impératif de trouver des enzymes fonctionnant dans les conditions données. La glycosylation peut avoir un impact sur l'activité et la stabilité des enzymes dans différentes conditions, ainsi l'étude de celle-ci est importante pour la détermination des propriétés des enzymes. Dans le cas des endopolygalacturonases de levures, le nombre et la position des sites de glycosylation sont très variables, ainsi il est nécessaire d'étudier l'impact des chaînes d'oligosaccharides. De plus, l'endopolygalacturonase étudiée provient de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et dans la littérature, aucune étude n'a permis de déterminer si les asparagines des deux sites de glycosylation putatifs aux positions 318 et 330 sont glycosylées. La glycosylation joue un rôle dans le contexte présent puisque deux buts sont visés, l'un étant de trouver une enzyme fonctionnant dans les conditions d'un procédé choisi, l'autre, de produire cette enzyme à un prix compétitif. Pour ce faire, des mutagenèses dirigées individuelles ou combinées ont été effectuées sur les sites de glycosylation putatifs de l'endopolygalacturonase recombinante de *S. cerevisiae*. En effet, les asparagines 318 et 330 ont été remplacées soit par un acide aspartique soit par une glutamine. L'analyse sur gel de polyacrylamide du patron de bandes obtenu pour chacune des enzymes étudiées (native recombinante et les huit mutants) démontre que les sites putatifs 318 et 330 sont glycosylés dans l'endopolygalacturonase de *S. cerevisiae*. De plus, cette analyse a permis d'estimer que chacune des chaînes de sucres est composée de deux N-acétylglucosamines et de 22 mannoses. Tous les mutants ne possédant pas la mutation N330Q ont une activité supérieure à la protéine native, avec un maximum d'activité à pH 4.5. La mutation simple N330Q n'a pas d'impact sur l'activité toutefois, il y a une diminution de l'activité pour les doubles mutants possédant la mutation N330Q peu importe l'acide aminé présent en position 318. Cette mutation entraîne aussi une diminution importante de la stabilité aux pH 4.5 et 5.0. Un fait intéressant, la stabilité à pH 6.0 n'est nullement affectée par les mutations. Ainsi, cette étude a aussi permis de

déterminer que la glycosylation n'est pas nécessaire pour que l'endopolygalacturonase de *S. cerevisiae* ait un maximum d'activité à pH 4.5. Tous ces résultats sont significatifs puisqu'ils permettront de produire l'enzyme à grande échelle pour les applications industrielles à moindres coûts.

Mots-clés : activité; endopolygalacturonase; glycosylation; mutagenèse dirigée; *Saccharomyces cerevisiae*; stabilité

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	.iii
TABLE DES MATIÈRESv
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x

CHAPITRE I	INTRODUCTION	1
------------	--------------------	---

1.1	Les polygalacturonases	1
1.1.1.	Les polygalacturonases en général	1
1.1.2	Le substrat des polygalacturonases.....	.4
1.1.3	La fonction des polygalacturonases.....	.4
1.1.4	Les facteurs affectant l'activité enzymatique	6
1.2	La glycosylation.....	7
1.2.1	La N-glycosylation	7
1.2.2	La glycosylation de type mannose.....	10
1.3	Le choix de l'enzyme.....	11
1.4	Les objectifs	15

CHAPITRE II	ARTICLE SCIENTIFIQUE	17
-------------	----------------------------	----

2.1	Résumé.....	17
2.2	Contribution des auteurs	19
2.3	Présentation de l'article.....	20
2.4	Abstract	21
2.5	Introduction.....	22
2.6	Materials and methods	25
2.6.1	Strains and plasmids	25
2.6.2	Media composition and growth conditions.....	25

2.6.3	Purification and quantification.....	26
2.6.4	DNA manipulation, cloning and mutagenesis	26
2.6.5	Electrophoresis and protein detection.....	26
2.6.6	Detection of endoPG activity.....	27
2.6.7	Enzymatic and stability assay	27
2.6.8	Modelling of the 3D structure.....	28
2.7	Results.....	29
2.8	Discussion	31
2.9	Figures.....	36
2.10	References.....	40
2.11	Figures legends	44
2.12	Tables.....	45
CHAPITRE III	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	47
3.1	Hypothèse et comparaison des séquences d'endoPG	47
3.2	Expression des isoformes d'endoPGs.....	49
3.3	Activité et stabilité	50
3.4	Mutations d'intérêt.....	51
3.5	Comparaisons avec des données de la littérature.....	52
BIBLIOGRAPHIE.....		57

LISTE DES TABLEAUX

2.1	Effect of pH and temperature on the activity of Sc HN, and on all the mutants at different temperatures	45
2.2	Time during which Sc HN and all the mutants are active after different incubation time in various pH at 50 °C.	46
3.1	Résumé des comparaisons entre les méthodes de mesure de l'activité enzymatique utilisées pour trois études sur l'endoPG de <i>S.cerevisiae</i>	54

LISTE DES FIGURES

1.1	Alignement de séquence des acides aminés pour huit endoPGs à partir de la première méthionine.....	3
1.2	Modèle de la structure des endoPGs.....	3
1.3	Structure de la paroi cellulaire des plantes.....	5
1.4	Structures de trois types de pectines composant la paroi cellulaire des plantes et des fruits	5
1.5	Réaction d'hydrolyse du lien glucosidique α 1-4 du PGA par une endoPG	6
1.6	Structure d'un site de glycosylation NXS/T montrant le lien entre l'asparagine et le N-acétylglucosamine	9
1.7	Types de glycosylation, exemple de chaînes	10
1.8	Types de glycosylation pouvant être produite par différents organismes suite aux changements post-traductionnels.....	10
1.9	Exemple d'une chromatographie des ions totaux. TIC de l'endoPG II d' <i>Aspergillus niger</i>	12
1.10	Exemple d'une spectroscopie de masse d'un fragment d'une protéine.....	12
1.11	Graphiques des résultats obtenus par l'équipe de Miraiyi et al. (1985) pour l'endoPG de <i>S. purpureum</i>	14
1.12	Graphiques des résultats obtenus par l'équipe de Sieiro et al. (2003) pour l'endoPG de <i>S. cerevisiae</i>	14
1.13	Graphiques des résultats obtenus par l'équipe de Schwan et al. (1997) pour l'endoPG de <i>K. marxianus</i>	14
1.14	Alignement de séquence des acides aminés pour les endoPGs de <i>S. purpureum</i> , <i>S. cerevisiae</i> et <i>K. marxianus</i>	15
2.1	SDS-PAGE analysis of endoPG Sc HN and its mutants	36
2.2	Relative activity of Sc HN and all the simple mutants measured at various pH...	37
2.3	Relative activity of Sc HN and all the double mutants measured at various pH...	38

2.4	Model of the 3D structure of endoPG I from <i>S. cerevisiae</i>	39
3.1	Structure 3D de l'endoPG de <i>S. cerevisiae</i>	48
3.2	Alignement de séquence des endoPGs de <i>S. cerevisiae</i> (Sc), <i>A. niger</i> (An), <i>P. parasitica</i> (Pp) et <i>S. purpureum</i> (Sp)	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-hydroxybenzoyl hydrazine	PABAH
Acide aspartique	Asp, D
Acide bicinehoninique	BCA
Acide galacturonique	GA
Acide polygalacturonique	PGA
Albumine de sérum bovin	BSA
Asparagine	Asn, N
Endopolygalacturonase	endoPG
Exopolygalacturonase	exoPG
Generally recognized as safe	GRAS
Glutamine	Gln, Q
Glycine	Gly
Hydroxide de sodium	NaOH
Leucine	Leu
Root Mean Square	RMS
Polygalacturonases	PGs
Polymerase chain reaction	PCR
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-PAGE
Valine	Val

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les polygalacturonases

1.1.1 Les polygalacturonases en général

Les polygalacturonases, aussi appelées pectinases, sont des hydrolases se divisant en deux sous-groupes, les endopolygalacturonases (E.C.3.2.1.15) (endoPG) et les exopolygalacturonases (E.C. 3.2.1.67) (exoPG). Ces deux sous-groupes sont divisés selon leur mode d'action sur le substrat, soit une hydrolyse interne ou externe (Blanco et al. 1998; Gainvors et al. 2000; Serrat et al. 2002). Ces enzymes sont produites et sécrétées par divers microorganismes tels que certaines bactéries, levures et champignons. Elles sont aussi produites par les plantes au niveau intracellulaire. Les souches de bactéries *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*, produisent une PG qui, lorsque sécrétée, entraîne la maladie de la pourriture molle pour de nombreux fruits et légumes comme la maladie appelée "jambe noire" chez la patate (Basset *et al.* 2000). Quelques levures produisent aussi des PGs comme certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* (Gainvors et al. 2000; Blanco et al. 2002; Sieiro et al. 2003; Radoi et al. 2005) et d'autres levures comme *Kluyveromyces marxianus* (Siekstele et al. 1999; Jia et Wheals 2000) et *Kluyveromyces fragilis* (Sakai *et al.* 1984). Leur fonction dans la nature n'est pas très bien connue (Blanco *et al.* 1998; Blanco *et al.* 1999) mais ces PGs sont utilisées dans certains procédés industriels. Ces enzymes peuvent être utilisées en agro-alimentaire pour la clarification du jus, dans l'industrie du textile pour l'assouplissement des fibres et dans l'industrie des pâtes et papiers. Les champignons comme *Aspergillus flavus* (Yan et Liou 2005), *Botrytis cinerea* (Kars *et al.* 2005) et

Stereum purpureum, sont des champignons pathogènes pour les plantes, car ils produisent et sécrètent diverses PGs. *Stereum purpureum* produit quatre endoPGs lui permettant d'infecter plusieurs arbres tels les pommiers causant la maladie des feuilles argentées (Miyairi *et al.* 1997; Shimizu *et al.* 2000; Williams *et al.* 2002). Les polygalacturonases produites par les plantes au niveau intracellulaire fragilisent les membranes cellulaires, ce processus est nécessaire à la croissance de la plante ainsi qu'à la chute des feuilles et des fruits (Hadfield et Bennett 1998). Le fruit produit aussi des polygalacturonases nécessaires à la maturation (changement de couleur et de goût) et au ramollissement du fruit (Hadfield *et al.* 1998; Morgutti *et al.* 2006). De plus, les polygalacturonases sont aussi nécessaires pour la germination et la croissance du tube pollinique dans le pistil et pour le développement et la maturation du pollen jusqu'à sa sortie pour la pollinisation (Hadfield et Bennett 1998).

Pickersgill *et al.* (1998) ont aligné 36 PGs et ils ont déterminé qu'il y avait quatre régions conservées soient : Asn²⁰¹-Thr²⁰²-Asp²⁰³, Gly²²²-Asp²²³-Asp²²⁴, Gly²⁵⁰-His²⁵¹-Gly²⁵² et Arg²⁸⁰-Ile²⁸¹-Lys²⁸² (figure 1.1). Ces séquences sont retrouvées dans le même ordre dans les différentes PGs, seule la position des acides aminés change. Le site actif est constitué de trois acides aspartiques (D) et d'une histidine (H) (Blanco *et al.* 1998; Shimizu *et al.* 2002), il est donc conservé au sein des divers organismes qui produisent des PGs puisque ces quatre acides aminés se retrouvent dans les régions conservées.

La structure 3D est aussi très conservée, même si le pourcentage d'identité de la séquence varie beaucoup. La structure est majoritairement composée de feuilletts bêta formant un baril entrecoupé de boucles, le site actif est entouré de deux boucles formant un tunnel dans lequel le substrat va s'insérer (figure 1.2) (Pickersgill *et al.* 1998; van Santen *et al.* 1999; Shimizu *et al.* 2002).

E. carotovora	225	-rnt	gidpmssknitiaysniatg	nvaika----	y-kgraetrnisilhndfg
X. axonopodis	240	spnt	gldldsvvnatihdsdvmgg	cvaiktiasrs-a-----	nitvrnsr
S. cerevisiae	175	ghnt	gfdvgsssnvliqgctvynq	ciavns----g-s-----	tikfmnny
K. marxianus	175	ghnt	gfdvgvnnvtienschvynq	ciavns----g-t-----	gvyfknnycs
S. purpureum	175	--nt	gfdv-sannvtiqncivknq	ciaind----g-n-----	nirfennqcs
A. niger	195	-ant	gfdigdstyititganvynq	cvavns----g-e-----	niyfsggvcs
Zea maize	210	--nt	gihmgdssgititntvigvg	disigp----gts-----	kvnitgvtcg
A. thaliana	185	spnt	gihlgrsdgikilnsfistg	cisvgd----gmk-----	nlhvekvtecg
E. carotovora	275	tg	gmsigs----	e-tmg-vynvtvddlkmgtn-----	griksd--
X. axonopodis	289	gt	gisigs---	ev-msg-vsnvlvdnnalvstdlgnrstdns	griktsl-
S. cerevisiae	221	ng	gisvgs	vggrs-dnt-vngfwaennhvinsdn-----	grikteve-
K. marxianus	221	gg	gasigs	vgllrs-nnv-vdtvyfennqivnsdn-----	grikitiq-
S. purpureum	218	gg	gisigsia--	t-gkh-vsnvikgntvtrsm-----	gvrikaqr-
A. niger	239	gg	gisigs	vggrs-dnt-vknvtfydsdikssqn-----	gvriktiyg
Zea maize	254	pg	gisigs	lgryk-dekdvtadinvkdtlkkmtf-----	gvrikaye-
A. thaliana	231	pg	gisvgs	lgrygheqd-vsgikvinctlqetdn-----	grik---

FIGURE 1.1 : Alignement de séquence des acides aminés pour huit endoPGs à partir de la première méthionine. Les endoPGs proviennent des bactéries *Erwinia carotovora* et *Xanthomonas axonopodis*, des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyces marxianus*, des champignons *Stereum purpureum* et *Aspergillus niger* et des plantes *Zea maize* et *Arabidopsis thaliana*. En vert : séquence avec 80 % d'homologie, en magenta : acides aminés du site actif.



FIGURE 1.2 : Modèle de la structure des endoPGs. En rose : acides aminés du site actif, en orange : N-terminal et en bleu : C-terminal.

1.1.2 Le substrat des polygalacturonases

Les substrats de la pectinase sont de longs polymères appelés pectines. La pectine est le principal constituant de la paroi cellulaire primaire des plantes (fruits, feuilles, racines) et aussi de la lamelle moyenne (Gognies et al. 1999) (figure 1.3). La fonction de la pectine dans la lamelle moyenne est de réguler l'adhésion des cellules végétales entre elles. Dans le cas des pectines présentes dans la paroi cellulaire primaire, elles sont nécessaires pour la structure de la plante (Willats et al. 2001). Les pectines se divisent en trois types, les rhamnogalacturonans de type I et II (RG-I et RG-II) et l'homogalacturonan. La chaîne de polymères est composée d'acide galacturonique (GA) lié par une liaison α 1-4 dans le cas du RG-II et de l'homogalacturonan. Dans le cas du RG-I, la chaîne de polymères est composée de GA et de rhamnoses distribués de façon à ce qu'un GA soit suivi d'un rhamnose, ces deux composés sont liés par une liaison α 1-2 (Willats *et al.* 2001) (figure 1.4). Les pectines peuvent être méthylées sur le carbone 1 des GA et le degré de méthylation (DM) peut différer d'une plante à une autre. Selon l'article de Serrat et al. (2004) dans lequel différents homogalacturonans ont été étudiés, le DM de l'acide polygalacturonique (PGA) est de 6 %, celui de la pectine low-methoxyl (LM) de la pomme est de 28,9 %, 63,4 % dans le cas de la pectine du citron et 74,8 % pour la pectine high-methoxyl (HM) de la pomme. De plus, sur les chaînes des rhamnogalacturonans I et II il peut y avoir des ramifications de longueurs différentes composées de divers sucres tels le galactose et l'arabinose. Dans le cas de RG-II, les ramifications se font sur les GA, toutefois, pour RG-I, les ramifications se font seulement sur les rhamnoses composant la chaîne principale (figure 1.4).

1.1.3 La fonction des polygalacturonases

La fonction des pectinases est d'hydrolyser les liens glucosidiques α 1-4 liant deux GA non méthylés. Étant donné que la chaîne de RG-I est composée d'un GA suivi d'un

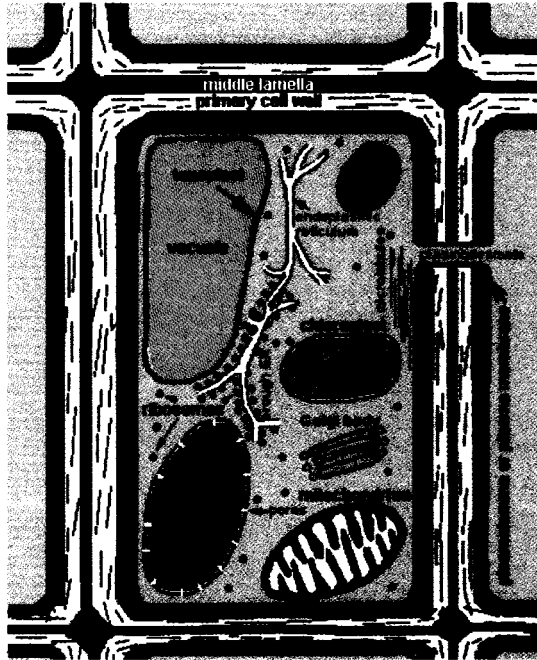


FIGURE 1.3 : Structure de la paroi cellulaire des plantes. Les pectines sont présentes dans la lamelle moyenne (bleu) et dans la paroi cellulaire primaire (jaune). Elles sont peu ou pas présentes dans la paroi cellulaire secondaire (vert).

Source : <http://www.ualr.edu/botany/plantcell2.gif>

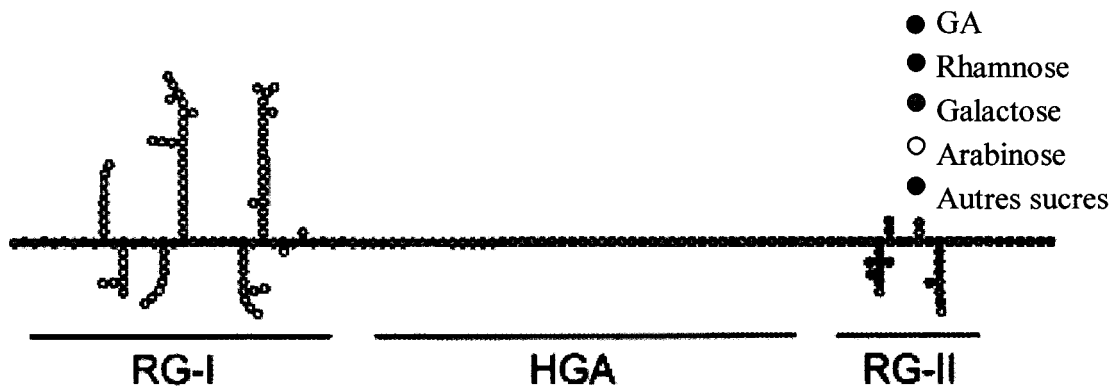


FIGURE 1.4 : Structure des trois types de pectines composant la paroi cellulaire des plantes et des fruits. HGA: homogalacturonan, RG-I: rhamnogalacturonan-I, RG-II: rhamnogalacturonan-II.

Source: <http://www.springerlink.com/content/t7651p1k44410504/fulltext.pdf>

rhamnose, il n'y a pas deux GA liés par un lien α 1-4, ainsi, les pectinases ne peuvent pas dégrader ce type de pectine. Ainsi, seuls les homogalacturonans et le RG-II sont hydrolysés par les PGs. Les endoPGs hydrolysent le substrat de façon aléatoire à l'intérieur du polymère, tandis que les exoPGs font l'hydrolyse à partir des extrémités du polymère (Gainvors et al. 2000). La figure 1.5 montre l'hydrolyse de l'acide polygalacturonique (PGA, substrat qui sera utilisé pour les expérimentations) par une endoPG, et pour chacune des hydrolyses, la longueur du polymère diminue et il y a formation d'un groupe réducteur à une des extrémités.

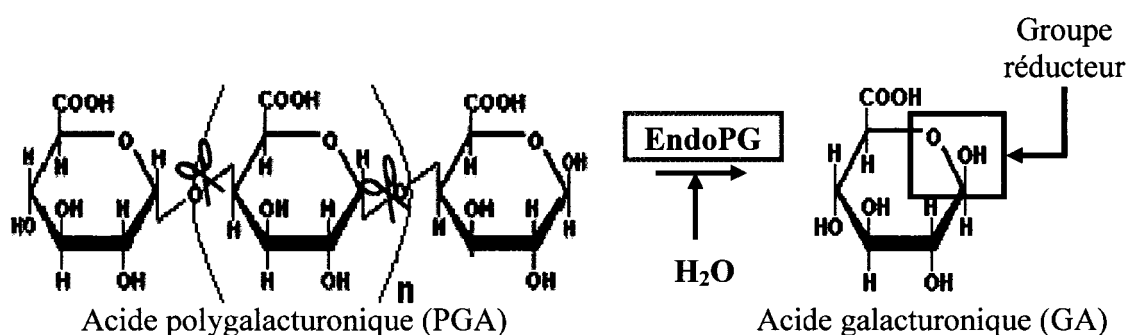


FIGURE 1.5 : Réaction d'hydrolyse du lien glucosidique α 1-4 du PGA par une endoPG. Source : <http://www.public.iastate.edu/~cfford/101pectin.gif>

1.1.4 Les facteurs affectant l'activité enzymatique

L'activité enzymatique et la stabilité de l'enzyme peuvent être affectées positivement ou négativement par différents facteurs externes présents dans l'environnement de l'enzyme. Comme il a été dit dans la section 1.1.2 (le substrat des polygalacturonases), le degré de méthylation a un effet négatif sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat ce qui diminue l'activité enzymatique. Toutefois, dans les procédés industriels, les enzymes sont soumises à des conditions autres que celles présentes dans la nature et tout changement peut affecter l'enzyme. Selon le procédé industriel dans lequel la pectinase peut être utilisée, l'environnement auquel l'enzyme sera soumise est spécifique. Le pH, la température et la présence de substances (ex. produits chimiques) pouvant inhiber l'enzyme vont affecter l'activité et la stabilité de la pectinase. Il faut

trouver des enzymes fonctionnant dans les conditions industrielles. Si dans la nature, aucun organisme ne produit de pectinase pouvant fonctionner dans les conditions industrielles, des changements au niveau d'une protéine naturelle peuvent être fait pour améliorer son activité enzymatique et /ou sa stabilité dans les conditions choisies.

En plus des facteurs externes, il y a aussi les facteurs internes qui peuvent affecter les propriétés de l'enzyme, comme le repliement de la protéine, la présence de ponts disulfures et la glycosylation. Le repliement de la protéine est très important, car si la structure n'est pas maintenue correctement, l'enzyme ne sera plus active ou elle sera plus sensible aux protéases. Les ponts disulfures permettent de stabiliser l'enzyme en formant des liens covalents qui sont plus solides que les liaisons de Van der Waals. Ces ponts disulfures sont formés entre les soufres des résidus de deux cystéines (Shimizu et al. 2000). La glycosylation est aussi un autre moyen utilisé par les organismes pour stabiliser les enzymes. En plus de l'effet stabilisant, la glycosylation peut aussi avoir un effet sur l'activité enzymatique, la sécrétion et la protection contre les protéases (van Berkel et al. 1995; Yanez et al. 1998).

1.2 La glycosylation

La glycosylation, c'est l'ajout d'une chaîne de sucres sur un ou des sites particuliers d'une protéine. Les sucres peuvent se lier de deux façons différentes sur la protéine : une liaison sur une asparagine (soit une N-glycosylation) ou une liaison sur une sérine ou une thréonine (soit une O-glycosylation) (Yanez et al. 1998).

1.2.1 La N-glycosylation

La N-glycosylation est une modification post-traductionnelle ayant lieu à la surface de la membrane du réticulum endoplasmique des cellules. Cette modification peut se faire sur des protéines membranaires et sur toutes autres protéines sécrétées, qu'elles soient sécrétées dans le périplasme ou à l'extérieure de la cellule (Weerapana et Imperiali 2006). Les protéines possédant des sites de glycosylation glycosylés se nomment glycoprotéines. Selon la protéine, la glycosylation peut avoir un effet positif ou négatif sur la stabilité conformationnelle (repliement de la protéine) (Kim et al. 2004), l'activité enzymatique, la stabilité, la sécrétion (Aikawa et al. 1990; Yanez et al. 1998) ainsi que sur la susceptibilité aux protéases (van Berkel et al. 1995). La chaîne de sucres s'ajoute sur des sites particuliers des protéines, pour la N-glycosylation, la séquence consensus de ces sites est Asn-Xaa-Ser/Thr où Xaa est n'importe quel acide aminé sauf une proline (Yanez et al. 1998). La chaîne de sucres se lie à la fonction amide de la chaîne latérale de l'asparagine via un atome d'azote (figure 1.6) d'où l'expression N-glycosylation. La présence de ces séquences consensus n'indique pas nécessairement qu'il va y avoir glycosylation, puisque la glycosylation dépend aussi de la position de l'asparagine dans la structure 3D qui doit être accessible à la surface de la protéine. Une même protéine peut être glycosylée de plusieurs façons selon que les sites soient glycosylés ou non, dans différentes combinaisons, donnant lieu à des isoformes. Dans le cas de l'endoPG de *Stereum purpureum*, la protéine possède cinq sites de glycosylation, mais seulement quatre peuvent être glycosylés. Cette protéine possède trois isoformes soit endoPG Ia, Ib et Ic, et ces isoformes sont glycosylés sur 2, 3 et 4 sites respectivement (Shimizu et al. 2000).

Il existe deux types de glycosylation : le type élevé en mannose et le type complexe. Dans les deux cas, les chaînes commencent par 2 N-acétylglucosamines suivies de trois mannoses formant deux ramifications en forme de "Y". Pour les chaînes élevées en mannoses, d'autres mannoses seulement sont ajoutés pour allonger la chaîne et quelques nouvelles ramifications peuvent se former. Pour les chaînes de type

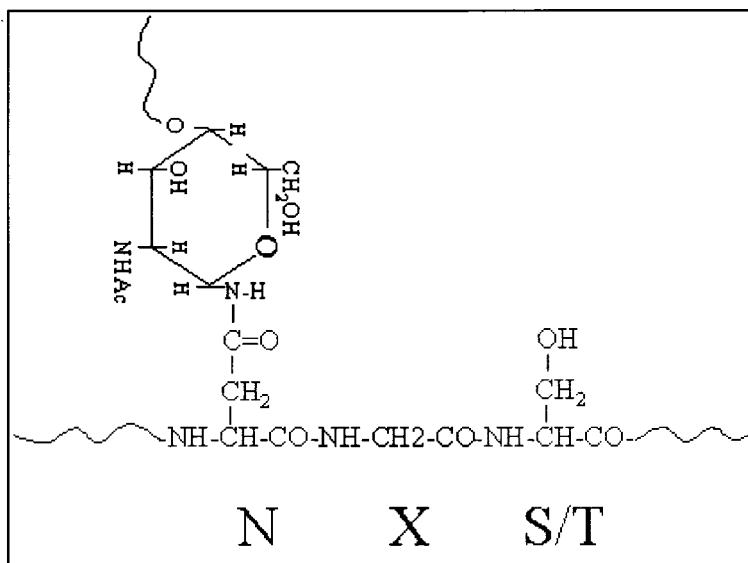


FIGURE 1.6 : Structure d'un site de glycosylation NXS/T montrant le lien entre l'asparagine et le N-acétylglucosamine. Source : <http://www.ionsource.com/Card/carbo/glycon3.gif>

complexe, des sucres autres que le mannose peuvent être ajoutés, tels le galactose et l'acide N-acétylneuraminique (figure 1.7). La figure 1.8 montre le type de glycosylation produit chez différents organismes. La majorité des bactéries ne font pas de glycosylation. Les bactéries gram-négatives font de la O-glycosylation pour obtenir des glycoprotéines à la surface. Seule la bactérie Gram-négative *Campylobacter jejuni* est connue pour faire de la N-glycosylation (Weerapana et Imperiali 2006). Les levures et les cellules des insectes font seulement de la glycosylation de type mannose. On retrouve de la glycosylation de type complexe chez les parasites, les cellules de mammifères et les cellules de plantes.

1.2.2 La glycosylation de type mannose

La masse théorique des chaînes de sucres ajoutées sur un site de N-glycosylation peut être calculée à l'aide de la masse d'un mannose et de la masse d'un N-acétylglucosamine. La masse réelle peut être mesurée par les techniques de chromatographie des ions totaux (TIC) et de la spectroscopie de masse (MS).

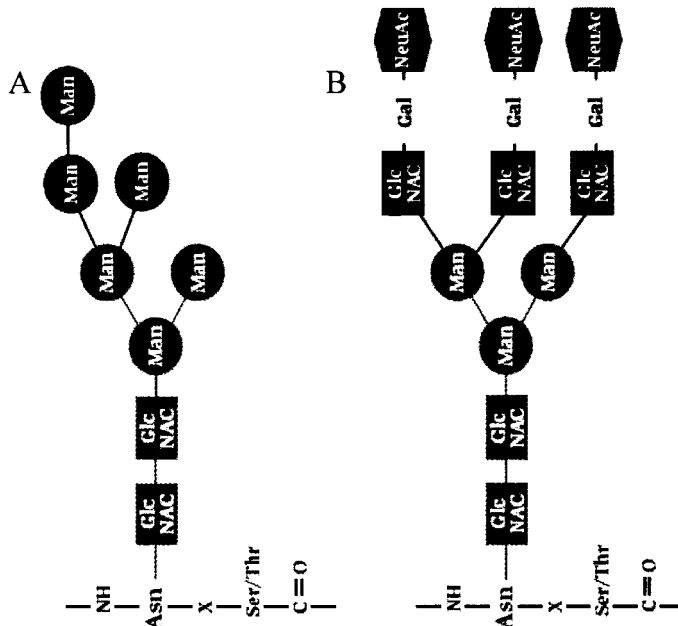


FIGURE 1.7 : Types de glycosylation, exemple de chaînes. A) Chaîne élevée en mannose B) Chaîne complexe. Asn : Asparagine, Ser : Sérine, Thr : Thréonine, Gal : Galactose, Man : Mannose, GlcNAc : N-acétylglucosamine, NeuAc : Acide N-acétylneuraminique. Source : http://www.baculovirus.com/webimages/CH20_shadowed.gif

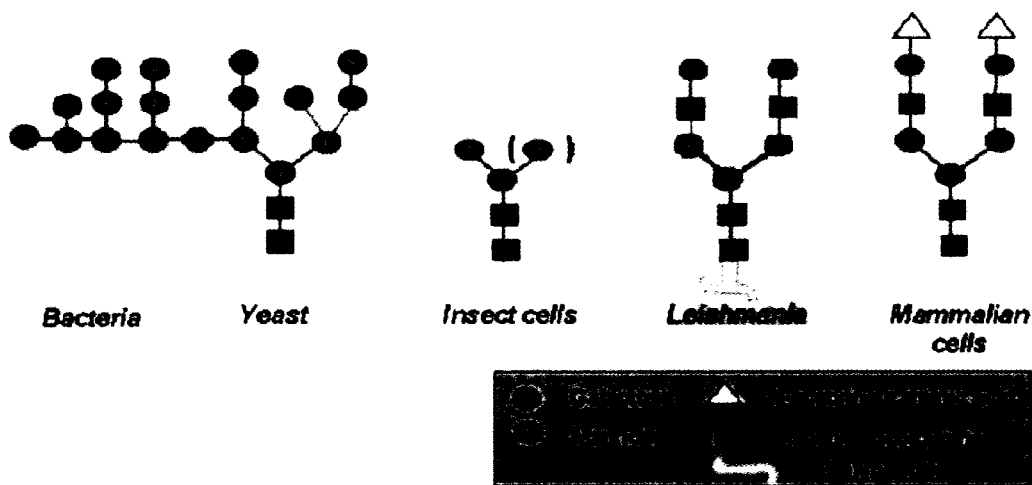


FIGURE 1.8 : Types de glycosylation pouvant être produite par différents organismes suite aux changements post-traductionnels. Source : <http://www.jenabioscience.com/images/d5d8982b86/glycosylation.gif>

Dans le cas du calcul théorique, la masse moléculaire d'un mannose est de 162 Da (Shimizu et al. 2000) et celle d'un N-acétylglucosamine est de 203.1 Da (Xie et al. 2005). Un calcul peut aussi être fait à partir de la différence de masse entre les bandes de deux isoformes sur un gel de polyacrylamide en tenant compte du fait que chacune des chaînes de sucres de type mannose est composée de deux N-acétylglucosamine suivi de mannoses.

Pour mesurer la masse réelle précise, la protéine est préalablement digérée avec de la trypsine, ce qui permet d'obtenir des fragments. Une TIC est ensuite faite pour séparer chacun des fragments. Lorsqu'un pic intense apparaît, cela indique qu'il y a présence d'une chaîne de sucres sur ce fragment. Un exemple de TIC est montré à la figure 1.9 : cette TIC indique qu'il y a seulement un fragment qui possède une chaîne de sucres. Une spectroscopie de masse est ensuite faite sur celui-ci et un ou des pics seront obtenus. La différence de masse/charge de chacun de ces pics par rapport à la masse du fragment non glycosylé, va permettre de calculer précisément le nombre de mannose de la chaîne (Yang et al. 1997; Shimizu et al. 2000; Xie et al. 2005). La figure 1.10 en est un exemple, cette MS indique que sur le site de glycosylation, il peut y avoir ajout d'une chaîne de sucres composée de deux N-acétylglucosamines et de 5 à 11 mannoses.

1.3 Le choix de l'enzyme

Plusieurs enzymes peuvent être utilisées dans les différents procédés industriels et la pectinase a été choisie pour sa polyvalence puisqu'elle peut être utilisée en agro-alimentaire, dans les pâtes et papiers et dans le textile. Dans cette optique, le choix d'une endopolygalacturonase était préférable à une exopolygalacturonase dû à son mode d'action différent sur le substrat. Une endoPG permet de couper le substrat en plus

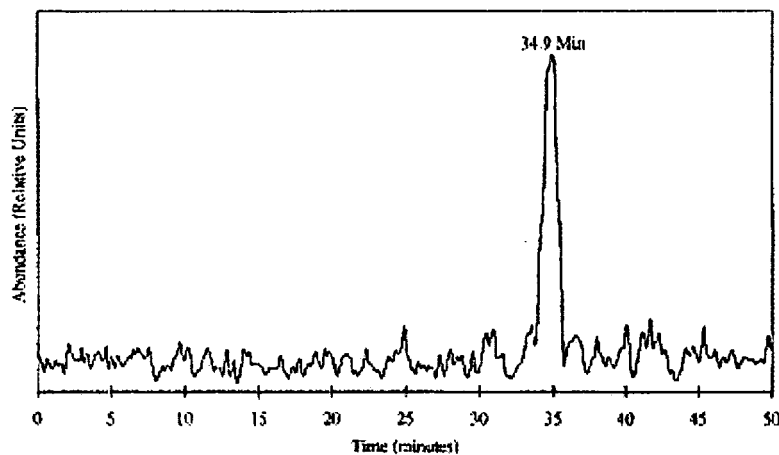


FIGURE 1.9 : Exemple d'une chromatographie des ions totaux. TIC de l'endoPG II d'*Aspergillus niger*. Source : (Yang et al. 1997)

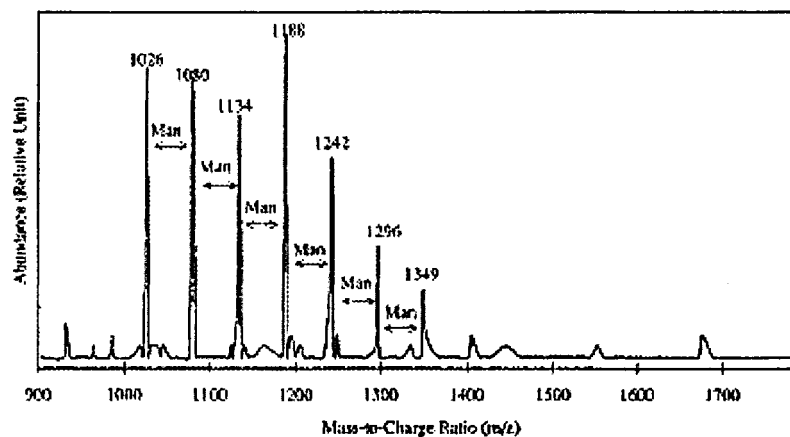


FIGURE 1.10 : Exemple d'une spectroscopie de masse d'un fragment d'une protéine. MS du pic de la TIC (figure 9) pour l'endo-PG d'*A. niger*. Source : (Yang et al. 1997).

petits fragments permettant ainsi de le dégrader plus rapidement qu'une exoPG qui dégrade le substrat par les extrémités raccourcissant le polymère d'un monomère à la fois. Par la suite, le choix a été fait en priorisant des enzymes avec des propriétés plus adaptées aux conditions présentes dans l'industrie, ces conditions étant dans l'intervalle de pH 5.0 à 5.5, 50 à 60 °C pour le procédé visé. Ainsi, trois enzymes ont été choisies, soit l'endoPG du champignon *Stereum purpureum* et celles des levures *Kluyveromyces marxianus* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les deux gènes de levures ont été isolés directement de l'ADN génomique par PCR (polymerase chain reaction), puis clonés dans un vecteur. Le gène de *S. purpureum* a été obtenu par PCR récursif (Prodromou et Pearl 1992) dû à la présence d'introns dans le gène ne permettant pas d'isoler ce gène directement de l'ADN génomique. De plus, lors du PCR récursif, les codons du gène ont été optimisés pour une traduction maximale dans la levure. Les optima de l'endoPG de *S. purpureum* sont pH 4.5, 70 °C (figure 1.11 A et B) et elle est stable à 30 °C de pH 4.0 à 9.0 en gardant une activité enzymatique de 100 % (figure 1.11 C) (Miyairi et al. 1985). Les figures 1.12 A et B démontrent les optima de l'endoPG de *S. cerevisiae* soit pH 4.5, 45 °C (Sieiro et al. 2003). Pour ce qui est de l'endoPG de *K. marxianus*, les graphiques des figures 1.13 A et B démontrent que cette enzyme a un pH et une température optimale de 5.0 et 40 °C. Toutefois, ces trois protéines seront produites dans une souche de *S. cerevisiae* ce qui pourrait affecter les propriétés de ces enzymes. De plus, l'activité et la stabilité des enzymes devront être mesurées, puisque la souche de chacun des organismes qui seront utilisés n'est pas celle étudiée par les autres équipes, donc les enzymes pourraient avoir des propriétés quelques peu différentes.

Dans la section 1.1.1 (les polygalacturonases en général), il a été dit que le site actif est très conservé chez les différents organismes qui produisent des polygalacturonases et aussi que la structure 3D avait beaucoup de similarité. Cependant, au niveau des séquences consensus NXS/T des sites de glycosylation, il y a une grande diversité dans le nombre et la position de ceux-ci, et ce, pour tous les organismes. Dans

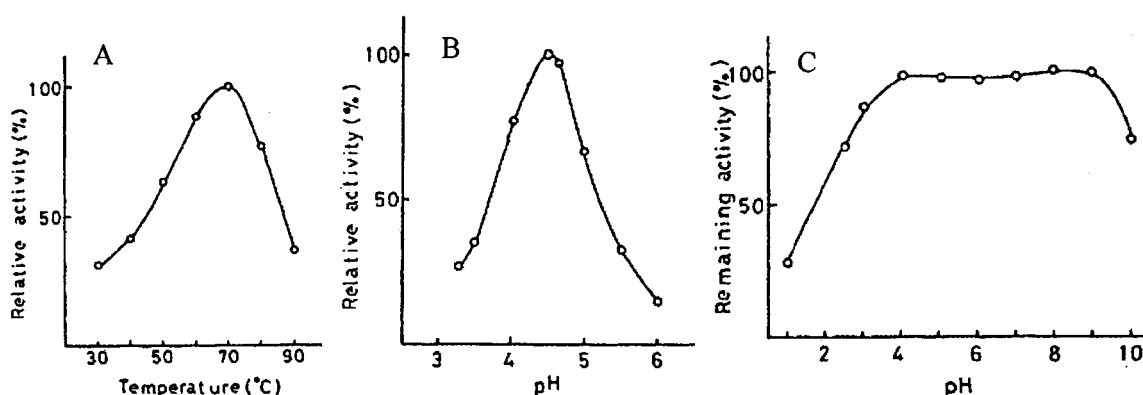


FIGURE 1.11: Graphiques des résultats obtenus par l'équipe de Miyairi et al. (1985) pour l'endoPG de *S. purpureum*. A) Détermination de la température optimale B) Détermination du pH optimum C) Stabilité à 30 °C à différents pH.

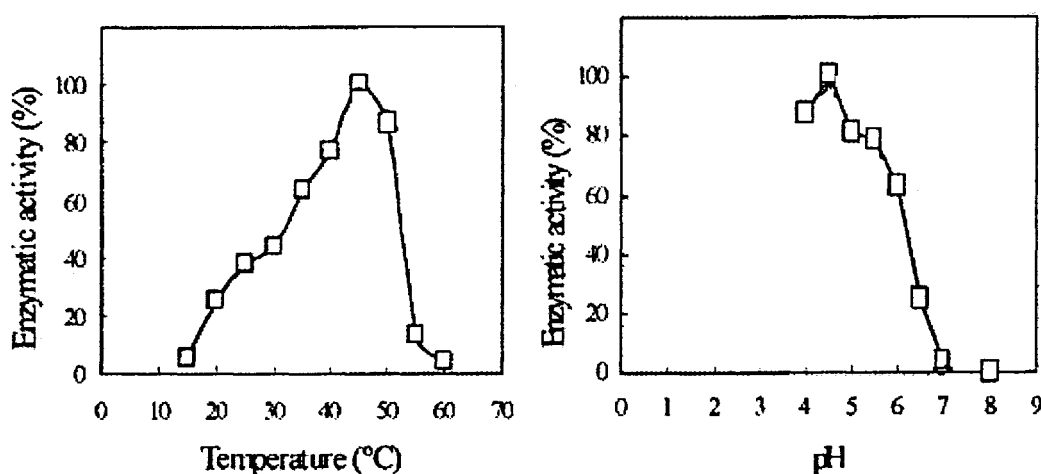


FIGURE 1.12 : Graphiques des résultats obtenus par l'équipe de Sieiro et al. (2003) pour l'endo-PG de *S. cerevisiae*. A) Détermination de la température optimale B) Détermination du pH optimum.

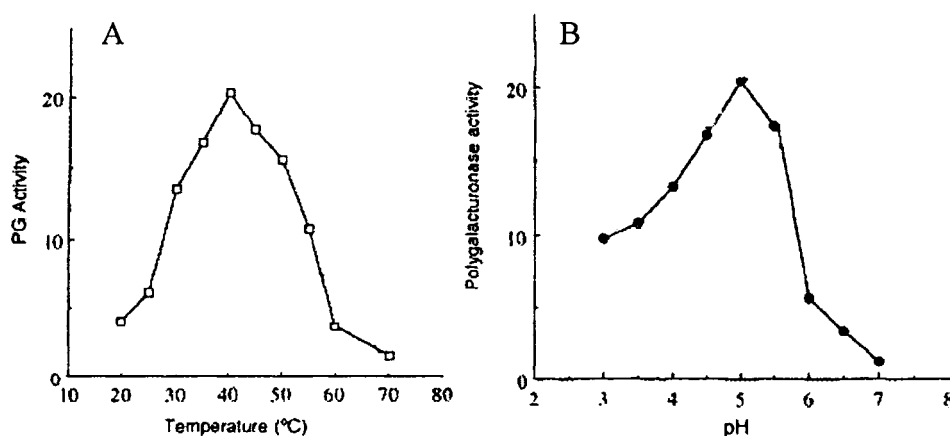


FIGURE 1.13 : Graphiques des résultats obtenus par l'équipe de Schwan et al. (1997) pour l'endo-PG de *K. marxianus*. A) Détermination de la température optimale B) Détermination du pH optimum.

le cas des trois endoPGs choisies, seul les sites de glycosylation de *S. purpureum* ont été démontrés. Dans sa séquence, cette enzyme possède cinq sites potentiels NXS/T aux positions 92, 161, 279, 302 et 308, mais seulement les quatre premiers sont glycosylés. Les endoPGs de *S. cerevisiae* et de *K. marxianus*, ont chacun deux sites potentiels NXS/T aux positions 318-330, et 193-297 respectivement (figure 1.14). Dans le cas de ces deux levures, aucune étude directe n'a été faite pour déterminer si ces sites sont glycosylés ou non. De plus, dans les trois cas, aucune étude n'a été faite sur l'effet de la glycosylation sur l'activité, la stabilité et la sécrétion des ces enzymes.

```

Km 112 wdgkgdsgkkvkpk-fmslklgtgnsdvvgglqikntpiqaisvnsc-sdtvihdvtidnsdgdgkdsldghntdg
Sc 113 wdgldsgk-vkpk-fvklaltgtskvtglniknaphqvfsinkc-sdltisditiidirdgdsag-ghntdg
Sp 85 wdgkgtn[REDACTED]kphpfik-iksgstykkfevl[REDACTED]paqaisvgptdahltldgitvd[REDACTED]dfagdknlghntdg

Km 182 fdvgsvn[REDACTED]ienchvynqddciavnsgtgvyfknnycsgghgasigsvglrsnnvvtvyfennqivnsdn
Sc 181 fdvgsssnvliqgctvynqddciavnsgstikfmnnycynghgisvgsvggrsdntvngfwaennhvinsdn
Sp 155 fdv-san[REDACTED]iqncivknqddciaindgnnirfennqcsghgisigia--tgkhvsnvvikgntvtramy

Km 254 glriktiqkatg-svnnvhflsntisgirkfgyivvetdys[REDACTED]ttgtpgskvpit--nfevdgltgsvdssa
Sc 253 glriktvegatg-tvtnvnfisnkisgiksygiviiegdylnqkttgtatggvpis--nlvmkditgsv[REDACTED]a
Sp 224 gvrikaqrtatsasvsgvtydantisgiakygvlisqsydp--dvgnpgtgapfsdv[REDACTED]ggattikvnaa

Km 323 yrvkilvagas-kwtwkdvdt
Sc 322 krvkilvk[REDACTED]-nwqwsqvsit
Sp 294 trvtvecg[REDACTED]gnw[REDACTED]qltvt

```

FIGURE 1.14 : Alignement de séquence des acides aminés pour les endoPGs de *S. purpureum*, *S. cerevisiae* et *K. marxianus*. En vert, séquence avec 100 % d'homologie, en magenta, sites NXS/T.

1.4 Les objectifs

Dans le cadre du projet, l'endoPG de *S. purpureum* avait été la première utilisée pour la détermination de l'effet de la glycosylation sur l'activité enzymatique et la stabilité. Cependant, cette enzyme était produite en trop petite quantité dans la levure *S. cerevisiae* ce qui ne permettait pas de mesurer l'activité enzymatique et la stabilité. Ceci est un problème courant lors de la production d'une protéine dans un hôte différent de l'organisme naturel, puisque certains signaux de sécrétion ou de changements post-traductionnels sont présents aux N-terminal ou au C-terminal de ces protéines et le

nouvel organisme n'a pas le métabolisme nécessaire pour les décoder. Il a donc été préférable de changer d'enzyme. Par la suite, les endoPGs de *K. marxianus* et de *S. cerevisiae* ont été produites en quantité suffisante pour faire les tests, toutefois, l'endoPG de *S. cerevisiae* avait une activité plus forte que celle de *K. marxianus*. Cette endoPG semblait donc la plus intéressante. Le projet a été poursuivi avec l'endoPG de *S. cerevisiae* puisque sa forte activité lui conférait un avantage pour l'industrie. Une enzyme active permet qu'elle soit mise en plus petite quantité dans le procédé ce qui diminue les coûts d'achat de l'enzyme.

Ainsi cette enzyme possède deux sites de glycosylation NXS/T, chacune des asparagines de ces sites sera remplacée par un acide aspartique ou une glutamine par mutagenèse dirigée pour empêcher la glycosylation s'il y en a. Les deux acides aminés pour le remplacement des asparagines ont été choisis pour leur ressemblance à l'asparagine. Les mutations seront faites individuellement et en combinaison, ainsi huit mutants seront obtenus en plus de la protéine native. La présence de glycosylation sur ces sites sera déterminée sur un gel SDS-polyacrylamide. Pour chacune de ces neuf enzymes, l'activité et la stabilité seront mesurées pour déterminer l'effet de la glycosylation sur les propriétés de cette endoPG si glycosylation il y a, puisque la glycosylation de ces sites reste à démontrer.

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE

2.1 Résumé

Dans l'industrie de l'alimentaire, les endopolygalacturonases produites par certaines levures ont un impact commercial important et celles-ci pourraient aussi être des enzymes intéressantes pour d'autres procédés industriels. Les séquences d'acides aminés des endopolygalacturonases de levures contiennent des sites de glycosylation qui sont très variables au niveau de leur nombre et de leur position. Dans la littérature, il n'y a aucune certitude que l'endopolygalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae* est glycosylée aux positions 318 et 330, ces deux sites étant des sites de glycosylation putatifs pour cette enzyme. Dans un contexte industriel où l'enzyme doit être produite à un prix compétitif, l'importance de la glycosylation sur les propriétés de cette enzyme doit être évaluée. Pour vérifier cela, l'endoPG de la levure *S. cerevisiae* CECT 1389 a été isolée et la protéine recombinante a été produite dans la souche *S. cerevisiae* INVSc. Des mutagenèses dirigées individuelles et combinatoires ont été effectuées sur les sites de glycosylation putatifs de l'endoPG recombinante de *S. cerevisiae* en remplaçant les asparagines 318 et 330 par un acide aspartique ou par une glutamine. L'analyse sur SDS-PAGE des différents patrons de bandes obtenus pour les enzymes étudiées indique que les sites de glycosylation putatifs aux positions 318 et 330 sont, en fait, glycosylés lorsque produit dans *S. cerevisiae*. La plupart des mutations ont montré un impact positif sur l'activité, cependant, la mutation Asn330Gln entraîne une diminution de l'activité pour les deux doubles mutants, peu importe l'acide aminé présent en position 318. De plus, cette mutation entraîne une importante diminution au niveau de la stabilité aux pH 4.5 et 5.0. Parmi les combinaisons de mutations effectuées, aucun impact sur la stabilité à pH 6.0 n'a été observé. Cette étude démontre que l'endoPG est glycosylée,

mais que la glycosylation n'est pas nécessaire pour le fonctionnement optimal de l'enzyme à pH 4.5. Ces résultats ont une importance significative dans le cas où cette enzyme aurait à être produite commercialement pour son utilisation dans un procédé industriel.

2.2 Contribution des auteurs

La revue littérature sur l'endoPG de *S. cerevisiae* pour déterminer la position des sites de glycosylation putatifs et quels acides aminés utilisés pour le remplacement des asparagines a été faite par l'auteure Vicky Houle. L'auteure principale a effectué toutes les manipulations présentées dans la section Matériels et méthodes à l'exception de la modélisation de la structure 3D de l'endoPG. Pour cette étape, l'aide d'Étienne Dubé, étudiant au Doctorat dans le laboratoire de Marc Beauregard, a été requise. Le choix de la méthode de Lever pour les tests de mesure de l'activité enzymatique a été trouvée par Mylène Gagnon, étudiante au Doctorat dans le laboratoire de Marc Beauregard, suite à une comparaison de trois méthodes. Cependant toute la mise au point des tests sur le Biomek 2000 de Beckman Coulter et les prises de mesures ont été effectuées par l'auteure Vicky Houle. Les résultats obtenus ont été analysés par Vicky Houle avec l'aide du professeur Marc Beauregard Ph.D. pour la section discussion. Le professeur Marc Beauregard Ph.D. est co-auteur de cet article pour l'aide apportée lors de l'écriture et pour le fait que c'est mon directeur de maîtrise.

2.3 Présentation de l'article

Modulation of yeast endopolygalacturonase stability by site-directed mutagenesis of putative glycosylation sites.

Houle V.¹ and Beauregard M.^{1,2,*}

1 : Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada;

2 : Centre de recherche sur la fonction, la structure et l'ingénierie des protéines (CREFSIP), Université Laval, Québec, Canada, G1K 7P4.

* : To whom correspondence should be addressed : Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.
Phone: +1(819)376-5011 #3354; Fax: +1(819)376-5084, e-mail: marc.beauregard@uqtr.ca.

2.4 Abstract

Yeasts endopolygalacturonases are commercially important in the food industry and are interesting development targets for a number of other industrial applications. In yeast endopolygalacturonases, the number and the position of glycosylation sites are variable and the importance of glycosylation for activity and stability is a matter of debate. Further, there is no evidence in the literature whether *S. cerevesiae* endopolygalacturonase is indeed glycosylated at positions 318 and 330 or not, these are putative sites previously suggested for this enzyme. The importance of glycosylation has to be settled in the context of developing industrially relevant enzymes at a competitive price. Here we performed combinatorial mutagenesis of recombinant *S. cerevesiae* endopolygalacturonase putative glycosylation sites by replacing asparagines 318 and 330 with either aspartic acid or glutamine. Analysis on SDS-PAGE of the different band pattern observed for all enzymes studied here indicates that the putative sites 318 and 330 are in fact glycosylated in *S. cerevesiae*. While most mutations were found to have a positive impact on activity, the mutation Asn330Gln decreased activity in double mutants, regardless of the substitution in position 318. Such substitutions also lead to an important decrease in stability at pH 4.5 and 5.0. Among the different combinatorial mutants generated, none had any impact on stability at pH 6.0. This work indicates that glycosylation is not required for *S. cerevesiae* endopolygalacturonase optimal performance at pH 4.5. These findings have important implications regarding commercial production of this enzyme for industrial applications.

2.5 Introduction

Pectic substances, a major constituent of plant cell walls, are degraded by a wide range of enzymes called polygalacturonases (32, 33). Among them, endopolygalacturonases (endoPG) (E.C. 3.2.1.15) catalyze the random hydrolysis of α -1,4-D-glucosidic bonds between two non-methylated galacturonic acid residues (8, 22). EndoPG production has been widely reported in plants and microorganisms. Plant endoPGs are important in fruit ripening and senescence (11), whereas the microbial enzymes are deployed during infection of plants (2, 3, 27). The presence of polygalacturonases enzymes has been reported in yeasts and the genes coding endoPG from *S. cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* have been cloned and characterised (3, 27). Amino acids sequence derived from these genes show high similarity with each other and with endoPG from filamentous fungi. Recombinant expression systems have allowed for major advances in characterising endoPG, namely the identification of active site critical residues in *Aspergillus niger* (32), *S. cerevisiae* (5) and *Stereum purpureum* (24). It was also useful for the elucidation of structural features associated with processivity in crystallised *A. niger* endoPGs (19).

Due to its ability to degrade pectic substances in fruit juices and other food preparations, endoPGs are commercialised on a large scale in the beverage industry. The main source for commercial pectinases is *A. niger*, which secretes a number of other enzymatic contaminants (4). The optimal pH for *A. niger* endoPG activity (pH 4.0-4.5) and its low purity are important limitations for its use in industrial applications other than food (14, 28). For instance, the applicability of endoPG in pulp and paper industry has been recognised and demonstrated under near-industrial conditions. But for this industry to adopt endoPG as a reliable product, better adapted yet affordable enzymes have to be made available (20). The yeast *S. cerevisiae* might be an interesting candidate for this quest. First, *S. cerevisiae* endoPG present some distinctive features (optimal pH and temperature, thermostability) that may be of interest in various fields of

application other than food. Second, among the eukaryotic systems used to date on a commercial scale, *S. cerevisiae* offers several advantages: it is unicellular and easy to manipulate through several well established recombinant/heterologous expression strategies. Further, it can be grown at high density, can perform post-translational modifications, and has an efficient secretory pathway while secreting only few contaminants. It has a low level of endotoxins, it is considered GRAS, and is freely accessible for commercial purposes (1). *S. cerevisiae* is not the universal solution to any protein expression challenge however, and it usually does not provide the high protein expression yield available today with expression systems such as *Pichia pastoris* (13).

Another aspect of this quest for more adapted endoPG involves the potential of powerful methods known as “accelerated evolution” techniques. In this regard, prokaryotic systems are easier to manipulate and readily amenable to accelerated evolution experiments when compared to yeast. Further, some prokaryotes can perform very well and compete with eukaryotes as high yield expression systems (*Methylobacterium extorquens* for example) (7). Their use has to be considered with caution, however, since they usually do not carry out complex post-translational modifications such as glycosylation. For several industrially applicable enzymes glycosylation appears to be necessary for optimal activity or stability. Generally speaking, protein glycosylation has been related to solubility, stability and proteolytic resistance (15, 30, 35). Although most endoPG characterised to date have been found to have one glycosylation site or more, the role of this modification in defining endoPG properties is not clear yet. First, as indicated earlier by Stratilova (29), the number and sequence location of putative glycosylation sites vary across endoPG from different organisms. Then, divergent results have been reported regarding the impact of removing the oligosaccharides from (or avoiding their addition to) mature endoPGs. Enzymatic removal of oligosaccharides from native *A. niger* endoPG and from recombinant *Phytophthora parasitica* endoPG completely inhibited enzymatic activity of both enzymes (29, 34). At variance, it was reported that glycosylation had no impact on activity for recombinant *S. purpureum* endoPG expressed in *S. purpureum* (25). For this

particular case, enzyme thermostability decreased as the extent of glycosylation increased (12, 23). Glycosylation of *S. cerevisiae* endoPG also appears to be accessory, as mutagenesis of the two putative glycosylation sites lead to partial enzymatic inhibition, or had no effect at all depending on the combination of sites mutated (5). Stratilova (29) indicated that while several endoPG were glycosylated near the active site region, endoPG from *S. cerevisiae* was not. This observation may provide a rationale for the different behaviours reported for different endoPGs. A possible interaction between endoPG putative oligosaccharides is not completely out of the question however: the recent observation that *S. cerevisiae* endoPG properties are modulated by the different glycosylation pattern afforded by *S. pombe* suggests such interaction (26).

Clearly, the importance of glycosylation in defining specific endoPG properties has to be addressed: this post-translational modification increases the metabolic cost of producing the enzyme. Further, the functional importance of such post-translational modifications may decrease the validity of prokaryote-based accelerated evolution strategies. Both aspects may have a deleterious impact on the costs associated with the development and the commercialisation of endoPG for various industries.

Here we describe the use of a commercial *S. cerevisiae* strain for the recombinant expression of endoPG isolated from *S. cerevisiae* strain CECT 1389. This expression system will be used to investigate the impact of glycosylation on *S. cerevisiae* endoPG activity and stability.

2.6 Materials and methods

2.6.1 Strains and plasmids

The gene coding for endoPG I (PGU1) and its native sequence signal were isolated from the strain *S. cerevisiae* CECT 1389 (ATCC). For polymerase chain reaction (PCR) gene amplification, the following primers were used: 5' ATA TTA AGC TTG ATG ATT TCT GCT AAT TCA 3' and 5'CGC GCG GCC GCC TTA ACA GCT TGC ACC AGA 3'. This strategy provided amplified genes flanked by *HindIII* and *NotI* restriction site at their 5' and 3' end respectively. After PCR amplification, the gene was cloned in pYES2/CT yeast vector (Invitrogen, Burlington, Ontario Canada). The recombinant vector was transferred by electroporation in *Escherichia coli* DH5 α (Stratagene, Cedar Creek, Texas USA) for cloning, and in *S. cerevisiae* INVSc (Invitrogen, Burlington, Ontario Canada) for production of the enzyme.

2.6.2 Media composition and growth conditions

Bacterial cells were grown at 37 °C on Lowry Broth medium containing ampicillin (100 μ g/mL) overnight after transformation. INVSc cells were grown on YPD medium (1 % yeast extract, 2 % peptone and 2 % glucose) for two days at 30 °C. After transformation, yeast clones were grown at 30 °C for three days on Sc minimal medium as per manufacturer's instructions (pYES2/CT manual, Invitrogen, Burlington, Ontario Canada). For enzyme production, yeast clones were grown in liquid YPD for 24 h, with agitation (300 rpm) at 30 °C. The induction was performed in YPG (equivalent to YPD except for glucose being replaced by galactose) for 23 h, 300 rpm. The secretion of the endoPG I by the new production host was verified on a Sc minimal media gelose equilibrated at pH 5.0 which contained 1 % of polygalacturonic acid (PGA).

2.6.3 Purification and quantification

After induction the supernatant was collected by centrifugation for 10 minutes at 2057 *g* and filtered on a 0.2 μm filter, then concentrated 4-fold using an ultrafiltration device (Amicon membrane 30 kDa, YM30 from Millipore, Cambridge, Ontario). The proteins were then resuspended and conserved in sodium acetate buffer 50 mM at pH 5.0. Quantification of proteins was carried out in a 96 well microtiter plate format using a bicinchoninic acid test (BSA (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) was used for calibration of the assay). Absorbance was measured at 560 nm on a multi-well plate absorption reader (Multiskan Ascent from Thermo Electron Corporation, Calgary, Alberta).

2.6.4 DNA manipulation, cloning and mutagenesis

The substitution of the Asn by either Asp or Gln in the Sc HN gene (recombinant endoPG I) was performed using the Quickchange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, Cedar Creek, Texas USA) as per manufacturer's instructions. The mutants were sequenced and analysed with an ABI Prism 3100 (SUCOF, Laval University, Quebec, Canada).

2.6.5 Electrophoresis and protein detection

Protein electrophoresis was performed using tricine 10 % ready gel (Gradipore, Hawthorne NY), a tricine buffer system and the Silver stain SDS-PAGE Standard, low range calibration mix from Biorad (Hercules, California, USA). Silver nitrate staining

was used for detection, using the Proteosilver Silver Stain Kit from Sigma (Oakville, Ontario, Canada).

2.6.6 Detection of endoPG activity

INVSc clones obtained on Sc minimal media gelose were isolated and grown on Sc minimal media gelose supplemented with 1 % PGA. The yeast *Kluyveromyces marxianus* Y-49 (ATCC) which produces an active endoPG, was used as a positive control, while *S. cerevisiae* INVSc which does not produce endoPG provided a negative control. The endoPG activity was detected by reacting with ruthenium red 0.075 % using the method described by McKay (17).

2.6.7 Enzymatic and stability assay

Quantitative measurements of enzymatic reaction initial velocity were performed using a reducing sugar detection method adapted from Lever (16). The enzymatic assay was carried out in an acetate/bis-tris (Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl) methane) buffer 100 mM adjusted from pH 4.0 to 6.5 as specified. The temperature was maintained at 50, 55 or 60 °C using a Digital heat block (VWR, Montreal, Quebec, Canada) modified to transfer heat to a multititer plate. PGA 1 % solution and all the acetate/bis-tris buffers were equilibrated at the specified temperature before addition of the enzyme. The reaction mixture was sampled every 35 seconds for 3 minutes and mixed with 1 mL of PABAH (4-hydroxybenzoyl hydrazine) 0.5 % (previously dissolved in 0.5 M NaOH). The reactions were then heated at 110 °C for 10 min., cooled on ice for 10 min., and transferred to microtiter plates for reading at 405 nm. One unit was defined as the production of 1 μ mole of galacturonic acid per minute. For thermostability measurements, endoPGs were equilibrated in the acetate/bis-tris buffers at the specified temperature and sampled every 30 minutes. Residual activity was then measured as indicated above, at a fixed temperature of 50 °C and pH 5.0. For sake of

reproducibility, the reactions and incubations described in this section were automated using a Biomek 2000 workstation (Beckman Coulter, Mississauga, Ontario) and all measures were done in triplicates.

2.6.8 Modelling of the 3D structure

A hypothetical 3D structure of *S. cerevisiae* endoPG was generated using Swiss-Model and Swiss-PDBViewer (10, 21). The crystallography structures used for homology modeling were those of *Aspergillus niger* endoPG II (1czfA)(32), *A. aculeatus* PG (1ib4A) (6) and *A. niger* endoPG I (1nhcD) (31). The 3D structure was done with a RMS of 1.89Å. This RMS was calculated considering the RMS of the three endoPG used to generate the structure.

2.7 Results

The endoPG produced by *S. cerevisiae* has two putative glycosylation sites at position 318 and 330. To verify that these two sites are indeed glycosylated in *S. cerevisiae*, those sites were mutated individually or in a combinatorial mode and the resulting mutants were produced and purified. The electrophoretic investigation of endoPG extracts reveals that in *S. cerevisiae*, three bands separated by about 4 kDa are associated with endoPG activity (Figure 2.1). Mutating one of the two putative glycosylation sites (either site) resulted in the loss of the 45 kDa band, which is the heaviest species, while mutating both sites lead to disappearance of both bands at 41 and 45 kDa. For all double mutants analysed, only one band at 37 kDa was detected on the gel, corresponding to the molecular mass of deglycosylated endoPG (9). These results suggest that in *S. cerevisiae*, endoPG is not homogenously glycosylated. The data also suggest that putative glycosylation sites Asn 318 and 330 are actually glycosylated to different extent in *S. cerevisiae*.

The activity of Sc HN and the eight mutants was measured at various temperatures and pH. As shown in Figures 2.2 and 2.3, all the curves were characterised by two peaks: one at pH 4.5-4.75 and another at pH 5.5. None of the nine enzymes were active at pH 6.5. Similar activity curves were obtained for the recombinant endoPG of *S. cerevisiae* IM1-8b (26). Removing one or both glycosylation sites resulted in increased enzymatic activity for mutants Sc N318D, Sc N318Q, Sc N330D, Sc N318D-N330D and Sc N318D-N330Q (from pH 4.0 to 5.5 for all temperatures studied, see also Table 2.1). However, substituting Asn with Gln in position 330 lead to no effect from 50 to 55 °C, and to a 20 % decrease in activity at 60 °C. Also, both double mutants with the same mutation (Asp330Gln) were less active than Sc HN. Like for Sc N330Q, the loss of activity was more important at 60 °C (30 %) than at 50 and 55 °C (10 %) (Table 2.1).

Table 2.1 summarises the results obtained at pH 4.5, 5.0, and 6.0, measured at 50, 55, and 60 °C. Recombinant Sc HN was mostly active at 60 °C except at pH 6.0 where a decrease in activity was detected for all enzymes studied here. Clearly, endoPG activity is not dependant on glycosylation, and the impact of mutating glycosylation sites varies depending on the residues chosen for replacement.

The stability of Sc HN, Sc N318D, Sc N330D and Sc N318D-N330D exposed at 37 °C, pH 5.0 for one hour was measured (data not shown). After one hour of treatment, all enzymes conserved 100 % of their initial activity. The stability of Sc HN and all eight mutants was then analysed after treatment at 50 °C from pH 4.5 to 6.0 (Table 2.2). Sc HN was stable at all pH for more than one hour at this temperature. At pH 4.5 and 5.0, Sc N318D, Sc N330D, Sc N318D-N330D and Sc N318Q-N330D were inactivated in one hour or less. All nine enzymes were stable more than one hour at pH 6.0 with less then 30 % of activity left after two hours treatment. Sc N318Q was the only mutant that had the same stability then Sc HN at all pH studied here. As for Sc N330Q, Sc N318D-N330Q and Sc N318Q-N330Q, which all have Gln in position 330, they were quickly inactivated at pH 4.5 and 5.0. It took less then 30 min to inactivate these enzymes. Glycosylation appears to control stability under pH 4.5 and 5.0, but not at pH 6.0.

2.8 Discussion

The importance of glycosylation for protein stability is well established. Glycosylation may provide conformational stability by its steric impact on the denatured state entropy, and may protect otherwise exposed proteolytic targets from hydrolysis by proteases (30). Glycosylation is also an important factor regarding commercial application of enzymes. The need for glycosylation will determine strategies one can adopt in designing an economically sound production system for an industrial enzyme. Examination of endoPG sequences by Stratilova (29) revealed that, at variance with several other endoPGs, putative glycosylation sites in *S. cerevisiae* endoPG are remote from its active site, and point outward from the substrate binding cleft (Figure 2.4). On the basis of this observation one would predict a limited impact of glycosylation in *S. cerevisiae* endoPG activity. Obviously, an experimental verification of this postulate is mandatory before considering large scale production of endoPG in organism devoid of post-translational modification machinery.

Blanco (5) attempted to address this issue by mutating the two putative glycosylation sites (Asn 318, Asn 330) in *S. cerevisiae* endoPG. Modification of pectinase activity at 37 °C, pH 5.0, was detected for a double mutant (N318D-N330D), with 50 % activity left compared to control. Since nothing in this study proves that these sites were glycosylated in the wild-type enzyme and not in the double mutant, interpretation is not straightforward: The possibility that this change in activity was due to deleterious mutations of Asn to Asp themselves was not addressed. In addition, since activity was calculated on the basis of volume used for the activity assay, one cannot rule out a possible loss of protein production or recovery yield as an explanation for the apparent decrease in activity. Since glycosylation may offer protection against proteolysis, avoiding glycosylation by mutating both Asn may lead to increased proteolysis, reduced protein recovery and lower apparent endoPG activity.

Another group reported on the expression of *S. cerevisiae* endoPG gene in *Schizosaccharomyces pombe* (26). Using this host, an endoPG with modified properties (optimal pH and temperature, stability) was generated. It was suggested that differences in glycosylation pattern between this host and *S. cerevisiae* was responsible for the modulation of optimal conditions for enzymatic activity. This work suggested that glycosylation may affect *S. cerevisiae* endoPG. In absence of a detailed analysis of the oligosaccharide structure achieved in *S. pombe* versus the one expected in *S. cerevisiae*, no clear confirmation can be done about the effect of glycosylation. Further, actual glycosylation of Asn 318 and 330 was neither demonstrated nor than characterised in this study.

We attempted here to shed some light on this important issue by reassessing the experimental strategy: First, a recombinant system based on *S. cerevisiae* as a host was chosen. This ensures that glycosylation pattern, if glycosylation occurs, is directly relevant to the wild-type endoPG environment. Second, we compared all activities on the basis of endoPG concentration (mg/L), eliminating the impact of expression yield on measured endoPG activity. Third, we adapted an enzymatic assay that measures rates of product accumulation and that can be carried out at the pH and temperature that one selects to investigate. Also, earlier works were from earlier work based on the method of Somogyi modified by Nelson (18) where all measurements are “end point” and are carried out at 37 °C, after incubation under selected conditions.

The successful expression of recombinant *S. cerevisiae* endoPG in a commercial *S. cerevisiae* host was achieved. Routinely yields in the 100-150 mg/L of broth were observed, and endoPG was found to represent at least 70 % of all secreted proteins. The enzyme produced did compare with the wild-type endoPG reported in earlier publications: the pH curve shows a maximum at pH 4.5 and a shoulder at pH 5.5 (26), its optimal temperature was in the range 55-60 °C, depending on pH. For the recombinant enzyme, the authors reported an optimal temperature of 40 °C and a

substantial increase in stability at neutral to slightly alkaline pH. It was suggested by these authors that the different glycosylation pattern in *S. pombe* caused such improvements in stability. Unfortunately, the measurements carried out were all performed at 37 °C and pH 5.0, and not under the actual conditions of the stability challenge. Because of the different activity measurement methods used, it remains difficult to compare our results to earlier ones.

The electrophoretic analysis shown in Figure 2.1 provided first evidence that *S. cerevisiae* endoPG was glycosylated at Asn 318 and 330. The proteins secreted by *S. cerevisiae* were not homogeneously glycosylated however. Depending of the presence of one, two or no putative glycosylation sites at 318 and 330, three forms of different masses were observed. An obvious question that arose was: what is the impact of glycosylation on endoPG activity? Are we faced with three isoforms of different activity? The observation that most single mutants and double mutants were found to be as active, or more active, than the wild type version, is compatible with three isoforms having substantial endoPG activity. Glycosylation does occur at both sites to a different extent depending on the mutations performed (i.e. relative intensities of each bands), and apart from few exceptions, this appears to have little impact on measured enzymatic activity. The mass of oligosaccharides in both positions was estimated at 4 kDa, i.e. the difference in apparent size of the various mutants on gel. This mass would be compatible with an oligosaccharide comprised of 2 N-acetylglucosamine residues linked to 22 units of mannose at each position. Sieiro suggested that *S. pombe* would produce overglycosylated endoPG and the consequent modulation of enzymatic properties compared to native *S. cerevisiae* endoPG (26). The putative overglycosylated endoPG was estimated to be 38.8 kDa in size, indicating that the overglycosylation would account for 1.5 kDa compared to non-glycosylated endoPG. Clearly, *S. cerevisiae* endoPG produced by *S. cerevisiae* had much larger oligosaccharides at its surface than in *S. pombe*.

Eight mutants were analysed, using a combinatorial approach for the double mutant. All of them displayed substantial activity and all had a similar pH – activity curve. The presence of glycosylation had moderate or no impact at all on these enzymatic properties. All but one mutant (Asn318Gln) were somewhat less resistant to incubation at pH 4.5 and 5.0 when compared to the wild-type endoPG. All mutants were more stable at pH 6.0 as compared to other pHs. When one compares wild-type endoPG with any other mutant prepared here, the only obvious advantage that glycosylation afforded is an increase in stability, especially at pH 4.5 and 5.0.

Three sets of mutations resulted in important change in behaviour: First, the mutant Sc N318Q had an increased activity while preserving stability during incubations, matching the wild-type enzyme's stability. The replacement of Asn318 by Gln lead to a different sensitivity to pH: The protective effect of glycosylation at pH 4.5 and 5.0 appears to be compensated for with this particular choice of Q in position 318.

Second, the double mutants harbouring Gln in position 330 instead of Asn were all destabilised at pH 4.5 and 5.0, more so than all variants studied. Also, their activity in optimal conditions was decreased compared to the wild-type enzyme. This observation is puzzling, considering that position 330 points outward from the binding cleft in endoPG (Figure 2.4) and that Asp at the same position does not lead to such a loss in activity. The presence of Gln in this position leads to changes that have nothing to do with this position being glycosylated or not. The fact that these enzymes are not stable at pH 4.5 and 5.0 could explain the decrease in activity. A long range impact on conformation, which is not induced with Asp, would explain our observations. Third, the double mutant Sc N318D-N330D was found to provide the largest increase in activity at 60 °C compared to 50 °C for this mutant. The combined impact of these two Asn-Asp mutations leads to an enzyme that can be used at higher temperature at pH 6.0.

It remains to be solved how to control the consequent decrease of stability due to lack of glycosylation in this double mutant.

We demonstrated here that *S. cerevisiae* endoPG does not need to be glycosylated for maintaining wild type behaviour in the range of conditions studied here. We could now consider the production of this enzyme in other yeasts to see the impact on production yield and on enzymatic properties.

2.9 Figures

FIGURE 2.1

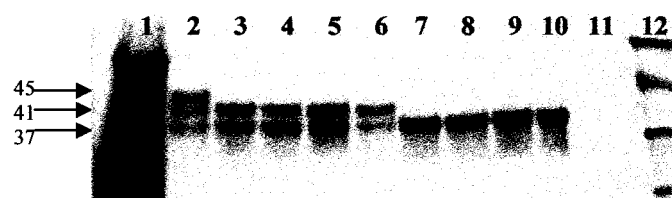


FIGURE 2.2

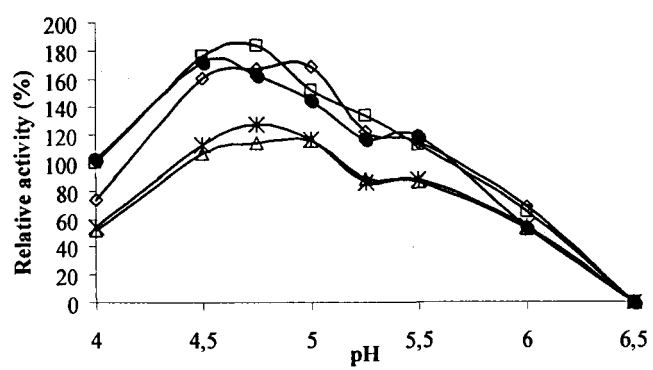


FIGURE 2.3

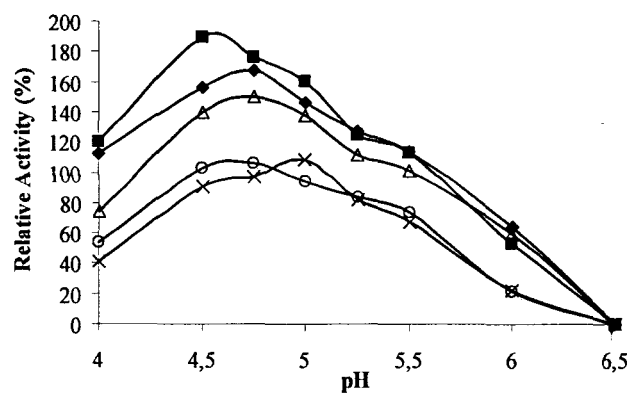
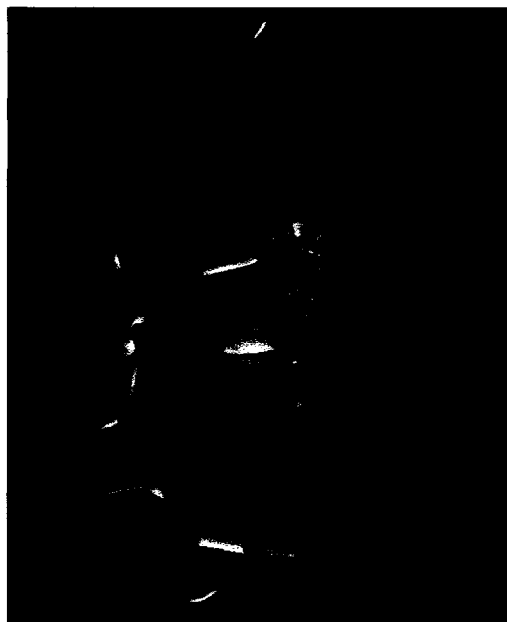


FIGURE 2.4

2.10 References

1. **Amberg, D. C., D. J. Burke, and J. N. Strathern.** 2005. Methods in yeasts genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press ed. Inglis, J., Cold Spring Harbor.
2. **Basset, A., R. S. Khush, A. Braun, L. Gardan, F. Boccard, J. A. Hoffmann, and B. Lemaitre.** 2000. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3376-81.
3. **Blanco, P., C. Sieiro, N. M. Reboredo, and T. G. Villa.** 1998. Cloning, molecular characterization, and expression of an endo-polygalacturonase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b. *FEMS Microbiol Lett* **164**:249-55.
4. **Blanco, P., C. Sieiro, and T. G. Villa.** 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol Lett* **175**:1-9.
5. **Blanco, P., G. Thow, C. G. Simpson, T. G. Villa, and B. Williamson.** 2002. Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endo-polygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Lett* **210**:187-91.
6. **Cho, S. W., S. Lee, and W. Shin.** 2001. The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. *J Mol Biol* **311**:863-78.
7. **Choi, Y. J., D. Bourque, L. Morel, D. Groleau, and C. B. Miguez.** 2006. Multicopy integration and expression of heterologous genes in *Methylobacterium extorquens* ATCC 55366. *Appl Environ Microbiol* **72**:753-9.
8. **Gainvors, A., N. Nedjaoum, S. Gognies, M. Muzart, M. Nedjma, and A. Belarbi.** 2000. Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **183**:131-5.
9. **Gognies, S., A. Gainvors, M. Aigle, and A. Belarbi.** 1999. Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (PGL1). *Yeast* **15**:11-22.
10. **Guex, N., and M. C. Peitsch.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714-23.
11. **Hadfield, K. A., and A. B. Bennett.** 1998. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiol* **117**:337-43.

12. **Hasui, Y., Y. Fukui, J. Kikuchi, N. Kato, K. Miyairi, and T. Okuno.** 1998. Isolation, characterization, and sugar chain structure of endoPG Ia, Ib and Ic from *Stereum purpureum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**:852-7.
13. **Heslot, H., and C. Gaillardin.** 1992. Molecular biology and genetic engineering of yeasts, CRC Press, Inc. ed. CRC Press, Inc., Boca Raton.
14. **Jyothi, T. C., S. A. Singh, and A. G. Appu Rao.** 2005. The contribution of ionic interactions to the conformational stability and function of polygalacturonase from *A. niger*. *Int J Biol Macromol* **36**:310-7.
15. **Kim, B. M., H. Kim, R. T. Raines, and Y. Lee.** 2004. Glycosylation of onconase increases its conformational stability and toxicity for cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **315**:976-83.
16. **Lever, M., T. A. Walmsley, R. S. Visser, and S. J. Ryde.** 1984. Optimal conditions for 4-hydroxybenzoyl- and 2-furoylhydrazine as reagents for the determination of carbohydrates, including ketosamines. *Anal Biochem* **139**:205-11.
17. **McKay, A. M.** 1988. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. *FEMS Microbiology Letters* **56**:355-358.
18. **Nelson, N.** 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**:375-380.
19. **Pages, S., H. C. Kester, J. Visser, and J. A. Benen.** 2001. Changing a single amino acid residue switches processive and non-processive behavior of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase I and II. *J Biol Chem* **276**:33652-6.
20. **Ricard, M., I. Reid, and J. A. Orcotoma.** 2005. Pectinase reduces the cationic demand of peroxide-bleached TMP: A paper machine trial. *Pulp and Paper Canada* **106**:78-88.
21. **Schwede, T., J. Kopp, N. Guex, and M. C. Peitsch.** 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**:3381-5.
22. **Serrat, M., R. C. Bermudez, and T. G. Villa.** 2002. Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. *Appl Biochem Biotechnol* **97**:193-208.
23. **Shimizu, T., K. Miyairi, and T. Okuno.** 2000. Determination of glycosylation sites, disulfide bridges, and the C-terminus of *Stereum purpureum* mature endopolygalacturonase I by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur J Biochem* **267**:2380-9.

24. Shimizu, T., T. Nakatsu, K. Miyairi, T. Okuno, and H. Kato. 2002. Active-site architecture of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum* revealed by crystal structures in native and ligand-bound forms at atomic resolution. *Biochemistry* **41**:6651-9.
25. Shimizu, T., H. Shibata, T. Araya, T. Nakatsu, K. Miyairi, T. Okuno, and H. Kato. 2005. Expression, purification, and crystallization of endopolygalacturonase from a pathogenic fungus, *Stereum purpureum*, in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*.
26. Sieiro, C., M. Poza, M. Vilanova, and T. G. Villa. 2003. Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGU1 gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields an enzyme with more desirable properties for the food industry. *Appl Environ Microbiol* **69**:1861-5.
27. Siekstele, R., D. Bartkeviciute, and K. Sasnauskas. 1999. Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (EPG1). *Yeast* **15**:311-22.
28. Singh, S. A., and A. G. Appu Rao. 2002. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Appl Biochem* **35**:115-23.
29. Stratilova, E., D. Mislovicova, M. Kacurakova, E. Machova, N. Kolarova, O. Markovic, and H. Jornvall. 1998. The glycoprotein character of multiple forms of *Aspergillus* polygalacturonase. *J Protein Chem* **17**:173-9.
30. van Berkel, P. H., M. E. Geerts, H. A. van Veen, P. M. Kooiman, F. R. Pieper, H. A. de Boer, and J. H. Nuijens. 1995. Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *Biochem J* **312** (Pt 1):107-14.
31. van Pouderooyen, G., H. J. Snijder, J. A. Benen, and B. W. Dijkstra. 2003. Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. *FEBS Lett* **554**:462-6.
32. van Santen, Y., J. A. Benen, K. H. Schroter, K. H. Kalk, S. Armand, J. Visser, and B. W. Dijkstra. 1999. 1.68-A crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **274**:30474-80.
33. Willats, W. G., L. McCartney, W. Mackie, and J. P. Knox. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* **47**:9-27.

34. **Yan, H. Z., and R. F. Liou.** 2005. Cloning and analysis of pppg1, an inducible endopolygalacturonase gene from the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. *Fungal Genet Biol* **42**:339-50.
35. **Yanez, E., T. A. Carmona, M. Tiemblo, A. Jimenez, and M. Fernandez-Lobato.** 1998. Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. *Biochem J* **329** (Pt 1):65-71.

2.11 Figure legends

FIGURE 2.1: SDS-PAGE analysis of endoPG Sc HN and its mutants. Lane 1: INVSc (host without expression vector); lane 2: Sc HN; lane 3: Sc N318D; lane 4: Sc N318Q; lane 5: Sc N330D; lane 6: Sc N330Q; lane 7: Sc N318D-N330D; lane 8: Sc N318D-N330Q; lane 9: Sc N318Q-N330D, lane 10: Sc N318Q-N330Q, lane 11: empty and lane 12: standards.

FIGURE 2.2: Relative activity of Sc HN and all the simple mutants measured at various pH. Enzymatic activities were measured on a period of 3 minutes and expressed as percentage of enzymatic activity measured for Sc HN at 50 °C, pH 5.0 (defined as 100%). The enzymatic activity was measured at 55 °C. Sc HN (Δ), Sc N318D (\square), Sc N318Q (\bullet), Sc N330D (\diamond), Sc N330Q (\times)

FIGURE 2.3: Relative activity of Sc HN and all the dopuble mutants measured at various pH. Enzymatic activities were measured on a period of 3 minutes and expressed as percentage of enzymatic activity measured for Sc HN at 50 °C, pH 5.0 (defined as 100%). The enzymatic activity was measured at 60 °C. Sc HN (Δ), Sc N318D-N330D (\blacksquare), Sc N318D-N330Q (\circ), Sc N318Q-N330D (\blacklozenge), Sc N318Q-N330Q (\times).

FIGURE 2.4: Model of the 3D structure of endoPG I from *S. cerevisiae*. Putative glycosylation sites are shown: asparagine 318 side chain is in red and asparagine 330 side chain is in green.

2.12 Tables

Table 2.1: Enzymatic activity of Sc HN and all the mutants measured at different pH and temperatures.

Enzymes	Enzymatic activity U/mg ¹								
	pH 4.5			pH 5.0			pH 6.0		
	50 °C	55 °C	60 °C	50 °C	55 °C	60 °C	50 °C	55 °C	60 °C
Sc HN	599	698	922	658	763	903	267	344	391
Sc N318D	1052	1152	1616	1006	996	1178	406	427	503
Sc N318Q	948	1126	1301	873	955	978	423	354	356
Sc N330D	1052	1209	1349	1106	1237	1203	450	450	321
Sc N330Q	548	739	713	746	769	831	363	359	248
Sc N318D-N330D	738	699	1249	668	663	1058	240	246	347
Sc N318D-N330Q	527	671	674	532	851	619	211	313	143
Sc N318Q-N330D	849	957	1027	835	967	964	327	419	422
Sc N318Q-N330Q	520	696	598	479	584	713	202	146	147

¹One unit is the concentration of GA produced in $\mu\text{mol/mL}$ per minute ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). The activity is calculated per mg ($U \times \text{mg}^{-1}$) with a margin error of 10%.

Table 2.2: Time during which Sc HN and all the mutants are active after different incubation time in various pH at 50 °C.

Enzymes	Stability		
	50 °C		
	pH 4.5	pH 5.0	pH 6.0
Sc HN	++ ¹	++	++
Sc N318D	0	+	++
Sc N318Q	++	++	++
Sc N330D	+	+	++
Sc N330Q	0	0	++
Sc N318D-N330D	+	+	++
Sc N318D-N330Q	0	0	++
Sc N318Q-N330D	0	+	++
Sc N318Q-N330Q	0	0	++

¹: 0 = 0 to 30 min ; + = 30 min to 1h ; ++ = >1h

CHAPITRE III

CONCLUSION GÉNÉRALE

3.1 Hypothèse et comparaison des séquences d'endoPG

La glycosylation est un concept très important et l'étude de celle-ci a permis de déterminer les avantages que peut apporter l'ajout d'une ou plusieurs chaînes de sucre sur des sites particuliers d'une protéine. La glycosylation peut avoir un impact sur l'activité, la stabilité et la sensibilité aux protéases (van Berkel et al. 1995) pour ne nommer que ceux-ci. Cependant, l'impact varie d'une protéine à une autre et ce, même au sein d'un groupe de protéines dû à la grande variation dans le nombre et la position des sites de glycosylation. L'étude de séquences de différentes endoPGs a permis de déterminer que les sites putatifs de glycosylation de l'endoPG de *S. cerevisiae* sont situés loin du site actif (Stratilova et al. 1998). Les asparagines 318 et 330 sont situées plutôt vers l'arrière de l'enzyme et semblent pointer vers l'extérieur (figure 3.1). Ces observations ont permis de prédire que les chaînes de sucres ajoutées à cette enzyme pourraient avoir un impact limité sur ses différentes propriétés. Cela dit, il fallait vérifier cette hypothèse, puisque la production de cette enzyme non glycosylée, donc pouvant être produite par des procaryotes, pourraient être avantageuse pour la production à grande échelle pour le milieu industriel.

De plus, cette hypothèse est renforcée par d'autres études faites sur la glycosylation des endoPGs. La figure 3.2 montre l'alignement de quatre endoPGs dont le nombre et la position des sites de glycosylation varient ainsi que leurs impacts dépendamment de leur proximité par rapport au site actif. Les quatre endoPGs d'*A. niger* possèdent un seul site de glycosylation près du site actif et lorsque l'oligosaccharide n'est pas présent, aucune activité n'est détectée (Stratilova et al. 1998).



FIGURE 3.1 : Structure 3D de l'endoPG de *S. cerevisiae*. En rose : résidus du site actif, en rouge : asparagine 318, en vert : asparagine 330 et en mauve : résidus 116-121 et 289-297.

```

Sc  96  svvgasghtidgqgkwwdglgdsg-kvkpk-fvklaltgtskvtglniknaphqvfsinkcs-
An 114  tvtgadgaylngdgsrwwdgesnggktpk-ffyahdltssstisgiyiqnspvqvfsidgst-
Pp 131  tvtgp--gtldgqgawyp-qgq---rpv-ffrlsrvansklsqftiknmpfrtfsilss-
Sp  69  nfv gadh-ifdgngalywdgkgtn---hkpfpflkikgsgtyk--kfevlnsapaqaisvgptda

Sc 157  dltisditidirdgdsaggh-ntgfdvgsssnvliqgctvynq---ciavnsgstikfmnnycy
An 176  yltmeditidntdgdgdaa-ntgfdigdstyititganvynq---cvavnsgeni yfsggvcs
Pp.188  ---tiseltidsrag---ak-ntgfdlsrnnhvtitnnrvynq---clamqssntv fsnnycs
Sp 131  hltldgitvddfagdtknlgntgfdv-san---iqncivknq---ciaindggnnirfennqcs

Sc 220  ng---gisvgsvggrsdn---tvngfwaennhvinsdnglriktvegatgt-vtnvnfiskisgi
An 239  gg---gl sigsvggrsdn---tvk---fydsdikssqngvrik tiygd tgs-vsevykeitlsdi
Pp 250  gs---gisigslggpeqnv---vsgllvkdntiv---ngiriktiigl kgl-vtnvtytnrlvvnv
Sp 194  gg---gisigsiatgkhvsnvvikg-----ntvtrsm ygvrikaqrtatsasvsgvtydantisgi

Sc 280  ksygiviegdylngkttgtatggvp-----isnlvmkditgsvnstakrv-kilv--knatnwq
An 299  tdygivveqny--ddt sesptdgit-----iedfvldnvqgs vesssgtni-yivcgdsdctdwt
Pp 313  k-haivmhsdy---nktkggygipsslvnitnikidglfg----satnlydivanpavvsnw e
Sp 253  akygvlisqsyppddvgnpgt--gapfsdv---nftggattikvnnaatr v-tvecgncsg-nwn

```

FIGURE 3.2 : Alignement de séquence des endoPGs de *S. cerevisiae* (Sc), *A. niger* (An), *P. parasitica* (Pp) et *S. purpureum* (Sp). En mauve : site actif DDDH ; en vert : site de glycosylation près du site actif selon la structure 3D ; en jaune : site de glycosylation loin du site actif selon la structure 3D.

Dans un autre cas, l'endoPG de *Phytophthora parasitica*, qui possède 11 sites de glycosylation dont cinq sont près de DDDH, perd aussi son activité lorsque déglycosylée (Yan et Liou 2005). Une troisième étude portant sur l'endoPG de *Stereum purpureum* va dans le même sens, cette enzyme possède trois isoformes et quatre sites de glycosylation. Tous les isoformes sont glycosylés aux positions 92 et 161, ces deux sites sont près du site actif, tandis que les sites 282 et 308 sont éloignés et ne semblent pas nécessaires pour le fonctionnement de l'enzyme (Shimizu et al. 2000).

3.2 Expression des isoformes d'endoPGs

L'expression de l'endoPG de *S. cerevisiae* recombinante a été effectuée avec succès dans un hôte commercial de *S. cerevisiae* soit la souche INVSc. Le rendement de protéines pour les cultures de Sc HN et des mutants est de 100-150 mg/L avec une pureté d'au moins 70 % sur gel de polyacrylamide. Les résultats obtenus en ce qui a trait à la forme des courbes de pH, peuvent se comparer à ce qui avait déjà été fait pour une autre endoPG, soit un maximum d'activité à pH 4.5 et un autre petit sommet à pH 5.5 (Sieiro et al. 2003). La température optimale mesurée pour les enzymes étudiées se situe entre 55 et 60 °C dépendamment du pH auquel l'activité a été mesurée.

Le patron de bandes obtenu suite à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (figure 2.1) a permis pour la première fois de mettre en évidence que l'endoPG de *S. cerevisiae* est glycosylée sur les asparagines 318 et 330. Cependant, la glycosylation n'est pas homogène sur ces deux sites. Selon le nombre de sites de glycosylation présents, soit un, deux ou pas du tout, un patron de bandes composé de trois bandes correspondant à trois protéines de masses différentes a été obtenu. La bande ayant migrée le plus loin correspond à une masse d'environ 37 kDa soit la masse de l'endoPG non glycosylée (Gognies et al. 1999). Les bandes à 45 et 41 kDa correspondent donc à des protéines glycosylées. La différence de masse entre chacune des trois protéines, soit

4 kDa, permet d'estimer le nombre de mannoses composant chacune des deux chaînes d'oligosaccharides. Ainsi, chacune des chaînes serait composée de deux N-acétylglucosamines et de 22 mannoses. Aussi, ces trois bandes représentent trois isoformes de la protéine. Les tests d'activité faits ultérieurement ont permis de déterminer que ces isoformes sont aussi actives ou plus actives que Sc HN dans la majorité des cas. En effet, lorsque des quantités semblables de mutants sont utilisées pour effectuer les tests d'activité, des activités enzymatiques similaires ou supérieures sont détectées comparativement à Sc HN. L'activité est donc conservée, peu importe le niveau de glycosylation.

3.3 Activité et stabilité

Suite à l'électrophorèse, des tests d'activité enzymatiques et de stabilité ont été effectués sur Sc HN, la protéine sauvage, et sur les huit mutants. L'apparence des courbes de pH obtenues pour les neuf enzymes est similaire, avec un maximum d'activité à pH 4.5, la différence se situe au niveau de la valeur d'activité seulement. La présence ou l'absence de glycosylation sur les sites 318 et 330 n'a pas d'impact sur les propriétés de l'enzyme en rapport avec son activité à différents pH. Pour obtenir une enzyme avec un maximum de pH significativement différent, il faudra faire des mutations sur des acides aminés autres que les asparagines des sites de glycosylation. Tous les mutants simples ou doubles ne possédant par la mutation N330Q sont plus actifs que la protéine sauvage à pH 4.5. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les deux chaînes de sucres pourraient indirectement affecter le repliement de la protéine et cacher en partie l'accès du substrat au site actif. Cet impact est possible considérant la grande taille des oligosaccharides qui, après estimation, seraient composées de 22 mannoses. La figure 1.2 permet de bien voir la présence de deux boucles (Asp289-Gly301 ; Leu116-Val122) près du site actif qui pourrait, une fois poussés par les oligosaccharides, cacher en partie le site actif. En enlevant une ou deux chaînes d'oligosaccharides, la protéine pourrait être plus ouverte ainsi le site actif pourrait être plus accessible. Dans le

cas de la stabilité, tous les mutants à l'exception du mutant Sc N318Q sont moins stables aux pH plus acides tels pH 4.5 et 5.0 comparativement à Sc HN. Cependant, la stabilité reste inchangée à pH 6.0 pour les neuf protéines. Ainsi, en comparant la protéine native aux huit mutants, l'avantage apporté par la glycosylation est une augmentation de la stabilité aux pH 4.5 et 5.0.

3.4 Mutations d'intérêt

Parmi les mutations effectuées, trois combinaisons ont amené à une différence par rapport aux autres mutants. La première, c'est la mutation N318Q qui entraîne une augmentation au niveau de l'activité enzymatique sans pour autant diminuer la stabilité de cette enzyme lorsqu'elle est incubée aux pH 4.5 et 5.0. Le remplacement de l'asparagine 318 par une glutamine fait en sorte que la protéine ne perd pas sa stabilité aux pH 4.5 et 5.0. Ainsi, l'effet protecteur de la glycosylation sur ce site semble compensé par la présence de la glutamine en position 318. La chaîne latérale de cet acide aminé doit avoir un effet sur la conformation ce qui lui confère cette stabilité.

Ensuite, tous les mutants possédant une glutamine en position 330 au lieu d'une asparagine sont plus déstabilisés aux pH 4.5 et 5.0 que tous les autres mutants étudiés. L'activité du simple mutant est similaire à celle de Sc HN, donc dans ce cas-ci, l'augmentation d'activité à pH 4.5 n'est pas observée. De plus, l'activité des deux doubles mutants (Sc N318D/Q-N330Q) est inférieure à celle de Sc HN. Ces observations sont surprenantes en considérant que l'asparagine en position 330 pointe vers l'arrière du site actif (figure 3.1) et que la présence d'une asparagine à cette même position n'entraîne pas une diminution de l'activité. La présence de la glutamine à cette position entraîne des changements qui n'ont rien à voir avec le fait que cette position est glycosylée ou non puisque le remplacement par l'acide aspartique mène à une activité supérieure. Il pourrait donc y avoir un impact au niveau de la conformation ou du

repliement de ces protéines possédant la mutation N330Q. Cette hypothèse pourrait être vérifiée ultérieurement en analysant la structure secondaire de chacune des protéines à l'aide du dichroïsme circulaire.

Le mutant Sc N318D-N330D est celui qui a la plus grande augmentation d'activité enzymatique à 60 °C comparé à 50 °C. Cette enzyme pourrait donc peut-être être utilisée à plus haute température, cependant, sa déstabilisation aux pH 4.5 et 5.0 dû à la déglycosylation peut limiter son utilisation dans les industries où les conditions sont plus acides.

Il est donc démontré que les mutants de l'endoPG de *S. cerevisiae* n'ont pas besoin d'être glycosylés pour avoir une activité similaire à Sc HN dans les conditions étudiées. De plus, les mutants ne possédant pas la mutation N330Q ont une activité supérieure à Sc HN de pH 4.0 à 5.0 toutefois, ils sont déstabilisés. La présence d'une activité intéressante en absence des chaînes de sucres permettrait de produire l'enzyme à plus grande échelle dans des procaryotes, étant donné que ces organismes ne produisent pas de N-glycosylation. Cela permettrait de diminuer les coûts liés à la production de l'enzyme, ce qui est avantageux au niveau industriel. Aussi, le choix de l'acide aminé pour le remplacement des asparagines 318 et 330 peut avoir un impact important sur les propriétés de l'enzyme.

3.5 Comparaisons avec des données de la littérature

L'équipe de Blanco et al. (2002) a aussi travaillé avec une endoPG d'une souche de *S. cerevisiae* (IM1-8B). Leur but premier était de démontrer par mutagenèse dirigée que les quatre acides aminés DDDH, composant le site actif de plusieurs endoPGs, correspondait aussi aux résidus du site actif de cette enzyme. Cependant, ils ont élargi leur recherche en remplaçant aussi les asparagines 318 et 330, correspondant aux

positions des asparagines composant les deux sites de glycosylation potentiels de cette enzyme, par des acides aspartiques. Les résultats de cette étude ont démontré que l'activité enzymatique détectée (à 37 °C, pH 5.0) pour la protéine sauvage et les mutants N318D et N330D sont similaires, toutefois dans le cas du double mutant N318D-N330D, cette activité était 50 % plus faible comparé à la protéine sauvage. Étant donné qu'aucun résultat dans cette étude ne prouve que cette enzyme est glycosylée, il n'est pas certain que la diminution d'activité soit due à une perte de glycosylation. Elle pourrait aussi être due à la mutation des asparagines par des acides aspartiques ce qui entraîne un changement de charge puisque l'Asn n'est pas chargée et que l'Asp possède une charge négative. De plus, pour effectuer leurs mesures d'activité, ils utilisent la même quantité de surnageant de culture, sans égard à la teneur en enzyme obtenu dans ces surnageants. Ce qui peut biaiser les mesures puisque le rendement de protéines pour chacune des cultures peut varier. Cela pourrait donc expliquer la diminution d'activité observée pour le double mutant. Troisièmement, en considérant la présence possible de glycosylation sur ces deux sites et en sachant que la glycosylation peut offrir une protection contre les protéases, la perte des deux oligosaccharides due aux mutations Asn vers Asp pourrait entraîner l'augmentation de la protéolyse et ce mutant se retrouverait en moins grande quantité dans le surnageant et cela pourrait aussi expliquer la diminution apparente de l'activité enzymatique.

Une autre équipe a aussi travaillé avec une endoPG d'une souche de *S. cerevisiae* (IM1-8B) (Sieiro et al. 2003). Ils ont exprimé cette enzyme dans *S. cerevisiae* et dans *Schizosaccharomyces pombe*. Leur courbe de pH obtenue dans *S. cerevisiae* ressemble à celle obtenue avec l'endoPG de *S. cerevisiae* CECT 1389 avec un pH optimum à 4.5. La température optimale, où l'enzyme semble être le plus active, mesurée par cette équipe est de 45 °C, comparativement à 60 °C pour mes résultats. Le pH et la température optimum obtenus pour l'endoPG produite dans *S. pombe* sont de pH 5.0, 40 °C, de plus, cette enzyme est plus stable aux pH alcalins comparativement à la même enzyme produite dans *S. cerevisiae*. Ils expliquent ces différences au niveau des propriétés par le patron de glycosylation dans *S. pombe*. Ils obtiennent une protéine dont

la masse est de 38,8 kDa ce qui donne une différence de 1,5 kDa avec la masse de l'endoPG non glycosylée. Suite à mon étude, il est démontré que l'endoPG de *S. cerevisiae* est glycosylée avec une différence de masse de 4 et 8 kDa, par rapport à l'endoPG déglycosylée selon l'isoforme. Mes résultats démontrent donc que la glycosylation est plus grande lorsqu'elle est produite dans *S. cerevisiae* que dans *S. pombe*. Ainsi, la différence au niveau du patron de glycosylation pourrait être la cause de la différence dans les propriétés de l'enzyme lorsque produite dans deux organismes différents.

En résumé, aucune étude précise n'a été faite sur l'effet de la glycosylation sur l'endoPG de *S. cerevisiae*, mon projet est donc le seul visant cet objectif. Mes résultats sur les mesures de l'activité enzymatique ne peuvent être comparés à ce qui a été fait par les deux autres équipes, et ce, pour plusieurs raisons résumées dans le tableau 3.1.

TABLEAU 3.1

Résumé des comparaisons entre les méthodes de mesure de l'activité enzymatique utilisées pour trois études sur l'endoPG de *S. cerevisiae*.

	Équipe de Blanco	Équipe de Sieiro	Mes résultats
Test pour la mesure de l'activité	Test de Nelson-Somogyi	Test de Nelson-Somogyi	Adaptation du test de Lever
Pré-incubation dans conditions étudiées	Oui	Oui	Non
Conditions de mesure de l'activité	37 °C pH 5.0	37 °C pH 5.0	Conditions étudiées
Mesure de la quantité de protéines utilisées	mL de surnageant	mL de surnageant	mg de protéines
Organismes de production	<i>Pichia pastoris</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ; <i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Premièrement, les deux autres équipes ont fait toutes leurs mesures avec le test de Somogyi adapté par Nelson (Nelson 1944). Ce test requiert une pré-incubation de l'enzyme pendant une heure dans les conditions étudiées, par la suite, l'activité est mesurée à 37 °C, pH 5.0. Ce test permet seulement de faire une mesure ponctuelle à un temps choisi. Dans le cas du test d'activité adapté de la méthode de Lever (Lever et al. 1984), l'activité est mesurée directement dans les conditions étudiées et ce dans les premières minutes de la réaction. Ainsi, les mesures sont prises à plusieurs temps de réaction ce qui permet de calculer une vitesse initiale, et cela est plus précis et fiable pour faire une mesure d'activité enzymatique. De plus, avec la méthode de Nelson-Somogyi, les deux autres équipes mesurent une activité résiduelle en utilisant la méthode du "end-point", ce qui est totalement différent d'une vitesse initiale. L'activité résiduelle devrait être mesurée lors du test de stabilité et non lors du test d'activité.

Deuxièmement, les équipes de Blanco et de Sieiro mesurent leur activité en fonction d'une quantité définie de surnageant de culture, ce qui fait que leurs analyses sont dépendantes du rendement en protéines de chacune des cultures. La différence de rendement peut affecter l'analyse et l'interprétation de leurs résultats. Ils peuvent donc difficilement comparer les activités de leurs mutants. Pour contrer ce problème, les tests présentés ici ont été faits en utilisant toujours la même quantité d'enzyme, et ce, pour chacun des mutants. Ainsi, lorsque j'ai une augmentation ou une diminution d'activité, je peux dire que c'est vraiment dû à l'endoPG et non à une culture ayant plus ou moins bien produit d'enzymes.

Troisièmement, l'organisme de production peut aussi entraîner un changement au niveau de la glycosylation. L'équipe de Blanco et al (2002) a produit l'endoPG dans *Pichia pastoris*, cette levure a un patron de glycosylation différent de celui de *S. cerevisiae* et puisque la glycosylation peut avoir un impact sur plusieurs propriétés, cela peut aussi expliquer les différences de résultats obtenues entre leurs résultats et les miens. Dans le cas de l'équipe de Sieiro et al (2003), ils font la comparaison d'une

enzyme produite dans deux hôtes et ils ont mesuré l'impact que cela avait au niveau de la courbe de pH et de la température optimale. Plusieurs changements ont été observés en passant de *S. cerevisiae* à *S. pombe* comme hôte de production. Il y a eu une augmentation du pH optimum et de la stabilité aux pH plus alcalins et une diminution de la température optimale. Les valeurs pour les paramètres K_m et V_{max} ont aussi été mesurées pour cette enzyme produite dans chacun des hôtes. L'endoPG produite dans *S. pombe* a quatre fois moins d'affinité pour le PGA mais elle est 132 fois plus efficace que la protéine native. Le ratio V_{max}/K_m pour l'endoPG dans *S. pombe* indique qu'elle semble environ 30 fois plus efficace pour le PGA. Ces changements confirment donc que le changement de souche pour la production peut avoir un effet sur les propriétés de l'enzyme.

BIBLIOGRAPHIE

- Aikawa, J., Yamashita, T., Nishiyama, M., Horinouchi, S. et Beppu, T. (1990). "Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of *Mucor rennin*, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, produced by recombinant yeast." J Biol Chem 265(23): 13955-9.
- Basset, A., Khush, R. S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J. A. et Lemaitre, B. (2000). "The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response." Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3376-81.
- Blanco, P., Sieiro, C., Reboredo, N. M. et Villa, T. G. (1998). "Cloning, molecular characterization, and expression of an endo-polygalacturonase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b." FEMS Microbiol Lett 164(2): 249-55.
- Blanco, P., Sieiro, C. et Villa, T. G. (1999). "Production of pectic enzymes in yeasts." FEMS Microbiol Lett 175(1): 1-9.
- Blanco, P., Thow, G., Simpson, C. G., Villa, T. G. et Williamson, B. (2002). "Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endo-polygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*." FEMS Microbiol Lett 210(2): 187-91.
- Gainvors, A., Nedjaoum, N., Gognies, S., Muzart, M., Nadjma, M. et Belarbi, A. (2000). "Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*." FEMS Microbiol Lett 183(1): 131-5.
- Gognies, S., Gainvors, A., Aigle, M. et Belarbi, A. (1999). "Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (PGL1)." Yeast 15(1): 11-22.
- Hadfield, K. A. et Bennett, A. B. (1998). "Polygalacturonases: many genes in search of a function." Plant Physiol 117(2): 337-43.
- Hadfield, K. A., Rose, J. K., Yaver, D. S., Berka, R. M. et Bennett, A. B. (1998). "Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly." Plant Physiol 117(2): 363-73.
- Jia, J. et Wheals, A. (2000). "Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*." Curr Genet 38(5): 264-70.

Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A. et van Kan, J. A. (2005). "Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*." *Plant J* 43(2): 213-25.

Kim, B. M., Kim, H., Raines, R. T. et Lee, Y. (2004). "Glycosylation of onconase increases its conformational stability and toxicity for cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 315(4): 976-83.

Lever, M., Walmsley, T. A., Visser, R. S. et Ryde, S. J. (1984). "Optimal conditions for 4-hydroxybenzoyl- and 2-furoylhydrazine as reagents for the determination of carbohydrates, including ketosamines." *Anal Biochem* 139(1): 205-11.

Miyairi, K., Okuno, T. et Sawai, K. (1985). "Purification and Properties of Endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*, a Factor Inducing Silver-leaf Symptoms on Apple Trees." *Agric. Biol. Chem.* 49(4): 1111-1118.

Miyairi, K., Senda, M., Watanabe, M., Hasui, Y. et Okuno, T. (1997). "Cloning and sequence analysis of cDNA encoding endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*." *Biosci Biotechnol Biochem* 61(4): 655-9.

Morgutti, S., Negrini, N., Nocito, F. F., Ghiani, A., Bassi, D. et Cocucci, M. (2006). "Changes in endopolygalacturonase levels and characterization of a putative endo-PG gene during fruit softening in peach genotypes with nonmelting and melting flesh fruit phenotypes." *New Phytol* 171(2): 315-28.

Nelson, N. (1944). "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose." *J. Biol. Chem.* 153(2): 375-380.

Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K. et Jenkins, J. (1998). "Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora ssp. carotovora*." *J Biol Chem* 273(38): 24660-4.

Prodromou, C. et Pearl, L. H. (1992). "Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis." *Protein Eng* 5(8): 827-9.

Radoi, F., Kishida, M. et Kawasaki, H. (2005). "Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production." *FEMS Yeast Res* 5(6-7): 663-8.

Sakai, T., Okushima, M. et Yoshitake, S. (1984). "Purification, Crystallisation and Some Properties of Endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*." *Agric. Biol. Chem.* 48(8): 1951-1961.

Serrat, M., Bermudez, R. C. et Villa, T. G. (2002). "Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater." *Appl Biochem Biotechnol* 97(3): 193-208.

- Shimizu, T., Miyairi, K. et Okuno, T. (2000). "Determination of glycosylation sites, disulfide bridges, and the C-terminus of *Stereum purpureum* mature endopolygalacturonase I by electrospray ionization mass spectrometry." *Eur J Biochem* 267(8): 2380-9.
- Shimizu, T., Nakatsu, T., Miyairi, K., Okuno, T. et Kato, H. (2002). "Active-site architecture of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum* revealed by crystal structures in native and ligand-bound forms at atomic resolution." *Biochemistry* 41(21): 6651-9.
- Sieiro, C., Poza, M., Vilanova, M. et Villa, T. G. (2003). "Heterologous expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGU1 gene in *Schizosaccharomyces pombe* yields an enzyme with more desirable properties for the food industry." *Appl Environ Microbiol* 69(3): 1861-5.
- Siekstele, R., Bartkeviciute, D. et Sasnauskas, K. (1999). "Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (EPG1)." *Yeast* 15(4): 311-22.
- Stratilova, E., Mislovicova, D., Kacurakova, M., Machova, E., Kolarova, N., Markovic, O. et Jornvall, H. (1998). "The glycoprotein character of multiple forms of *Aspergillus* polygalacturonase." *J Protein Chem* 17(2): 173-9.
- van Berkel, P. H., Geerts, M. E., van Veen, H. A., Kooiman, P. M., Pieper, F. R., de Boer, H. A. et Nuijens, J. H. (1995). "Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis." *Biochem J* 312 (Pt 1): 107-14.
- van Santen, Y., Benen, J. A., Schroter, K. H., Kalk, K. H., Armand, S., Visser, J. et Dijkstra, B. W. (1999). "1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 274(43): 30474-80.
- Weerapana, E. et Imperiali, B. (2006). "Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems." *Glycobiology* 16(6): 91R-101R.
- Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W. et Knox, J. P. (2001). "Pectin: cell biology and prospects for functional analysis." *Plant Mol Biol* 47(1-2): 9-27.
- Williams, H. L., Tang, Y. et Hintz, W. E. (2002). "Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*." *Fungal Genet Biol* 36(1): 71-83.

Xie, M., Krooshof, G. H., Benen, J. A., Atwood, J. A., 3rd, King, D., Bergmann, C. et Orlando, R. (2005). "Post-translational modifications of recombinant *B. cinerea* EPG 6." *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(22): 3389-97.

Yan, H. Z. et Liou, R. F. (2005). "Cloning and analysis of pppg1, an inducible endopolygalacturonase gene from the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*." *Fungal Genet Biol* 42(4): 339-50.

Yanez, E., Carmona, T. A., Tiemblo, M., Jimenez, A. et Fernandez-Lobato, M. (1998). "Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion." *Biochem J* 329 (Pt 1): 65-71.

Yang, Y., Bergmann, C., Benen, J. et Orlando, R. (1997). "Identification of the glycosylation site and glycan structures of recombinant endopolygalacturonase II by mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom* 11(12): 1257-62.